

EDUARDO MENDES RAMOS

**EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE ABATE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DO RIGOR MORTIS E QUALIDADE DA
CARNE DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

**Viçosa
Minas Gerais - Brasil
2004**

EDUARDO MENDES RAMOS

**EFEITO DE DIFERENTES MÉTODOS DE ABATE SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DO *RIGOR MORTIS* E QUALIDADE DA
CARNE DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 21 de Dezembro de 2004

Prof. Frederico José Vieira Passos
(Conselheiro)

Prof. Luiz Alexandre Peternelli
(Conselheiro)

Prof. Teófilo José Pimentel da Silva

Prof. Antônio José Natali

Prof. Lúcio Alberto de Miranda Gomide
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais Geraldo Magela de Ramos e Maria Helena Mendes Ramos,
pelo amor, confiança e exemplo de vida.

À minha esposa Alcinéia de Lemos Souza Ramos,
companheira de todos os momentos.

E aos que virão, amados serão, incondicionalmente.

*“Pouca ciência torna o homem orgulhoso e muita ciência
o torna humilde. Como as espigas de trigo vazias que
elevam-se soberbas, enquanto as cheias inclinam-se
humildemente para a terra”*

Agradecimentos

À Deus, pela presença e pelo auxílio constante em todos os momentos de minhas jornadas.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), em especial, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), pela oportunidade que me foi concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Biologia Animal e ao Ranário da UFV, na pessoa do Prof. Oswaldo Oliveira, pela concessão de animais e pelo espaço no Ranário Experimental.

Ao professor Lúcio Alberto de Miranda Gomide, pela orientação, pelo apoio, pela amizade, pela confiança e pela dedicação, imprescindíveis em minha formação e na execução deste trabalho. Ao amigo e tutor, sinceros agradecimentos por ter me assistido com sabedoria e paciência durante toda minha jornada.

Ao professor Luiz Alexandre Peternelli, pela amizade e pelos aconselhamentos sempre oportunos.

Ao professor Frederico José Vieira Passo, pela amizade, pelas sugestões e críticas e pela disponibilização do laboratório de biotecnologia do DTA para execução das análises.

Aos professores Teófilo José Pimentel da Silva e Antônio José Natali, pelo auxílio e pelas valiosas sugestões.

Aos professores Paulo César Stringheta, Nélio José de Andrade e Nilda Maria de Fátima, pela disponibilização de seus laboratórios e equipamentos para execução das análises.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo convívio e conhecimentos adquiridos.

À minha esposa Alcinéia, pela convivência, dedicação e por sua contribuição indispensável na realização deste trabalho.

Aos meus amados pais, cuja confiança sem limites em mim depositada foi um incentivo em todos os aspectos de minha vida, além do exemplo, do amor, da compreensão, da ajuda, do apoio e da presença constante.

A todos os meus familiares, pelo apoio e incentivo durante toda a minha vida, em especial ao tio Zé Telefone (*in memorian*), que a dor de tê-lo perdido não nos faça esquecer a alegria e felicidade de tê-lo conhecido.

Aos amigos Paulo Rogério e Edimar, pela amizade e companheirismo incondicional, pelos bons momentos compartilhados e pelo incentivo e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Marco Aurélio, Magoo, Vanessa, Roniele, Érica, Augusto, Socorro, Nathália e Joesse pela amizade e companheirismo, pelo convívio e pelos bons momentos partilhados.

A todos os funcionários do DTA, em especial: Vaninha, Valente, Dona Ligia, Sueli, Maria Rita, Geralda, Seu Manoel, Perereca, Wandick, Valério e Adão, pela amizade, pela companhia, pelo positivismo, atenção e bom humor.

A todos os professores, funcionários, colegas e amigos do DTA que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho.

Biografia

Eduardo Mendes Ramos, filho de Geraldo Magela de Ramos e Maria Helena Mendes Ramos, nasceu em Viçosa, Estado de Minas Gerais, em 10 de janeiro de 1973.

Concluiu o curso de Engenharia de Alimentos no ano de 1997 e obteve o título de *Master Scientiae* em Ciência e Tecnologia de Alimentos em 2000, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em fevereiro de 2000, iniciou o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, na área de Ciência e Tecnologia de Carnes, Pescados e Derivados, submetendo-se à defesa de tese no dia 21 de dezembro de 2004.

Conteúdo

<i>Lista de Figuras</i>	viii
<i>Lista de Tabelas</i>	xi
<i>Resumo</i>	xiii
<i>Abstract</i>	xv
Introdução	01
Revisão da Literatura	04
1. Etapas no Abate de Rãs	04
2. Transformações <i>Post-Mortem</i>	10
2.1. Caracterização do <i>Rigor Mortis</i>	12
2.2. Efeito da Temperatura no Desenvolvimento do Rigor	18
2.3. Tipo de Fibra Muscular e Desenvolvimento do Rigor	21
2.4. Estimulação Elétrica e Desenvolvimento do Rigor	28
3. Qualidade de Carnes Frescas e Congeladas	33
3.1. Efeito do Congelamento e Descongelo Sobre a Carne	34
3.2. Métodos para Diferenciação de Carnes Frescas e Descongeladas	40
3.3. Substâncias Crioprotetoras	43
3.4. Tolerância de Anfíbios Hibernantes ao Congelamento	46
4. Referências Bibliográficas	48
CAPÍTULO 1	
Efeito dos Métodos de Insensibilização e Sangria sobre o Conteúdo de Pigmentos Heme e Cor de Carnes de Rãs-Touro	61
CAPÍTULO 2	
Atividades Glicolíticas e Oxidativas do Músculo Esquelético de Rãs-Touro Durante o Crescimento Pós-Metamorfose	77
CAPÍTULO 3	
Caracterização do Desenvolvimento do <i>Rigor Mortis</i> em Músculos de Rãs-Touro Insensibilizadas por Eletronarcole e Termonarcole	85
CAPÍTULO 4	
Efeito da Estimulação Elétrica no Desenvolvimento do <i>Rigor Mortis</i> e na Qualidade da Carne de Rãs-Touro Insensibilizadas por Eletronarcole e Termonarcole	115

CAPÍTULO 5

Efeito do Método de Insensibilização na Diferenciação de Carnes Frescas e Descongeladas de Rã-Touro Baseado na Atividade da β-Hidroxiacil-CoA-Desidrogenase	144
Conclusões Gerais	153
Apêndices	155
A. Tabelas	155
B. Publicações	161

Lista de Figuras

Revisão da Literatura

1. Fluxograma dos sistemas tradicional e alternativo, proposto por LOAIZA (1996), para o abate de rãs. 5
2. Diagrama de mudanças na extensão usada no acompanhamento do desenvolvimento do *rigor mortis* pela perda de extensibilidade em músculos *Psoas* de ratos. Tiras musculares de tamanho definido são mantidas a 17°C e submetidas a um processo cíclico de estiramento. As setas da esquerda e da direita indicam o início (*rigor onset*) e estabelecimento do *rigor mortis*, respectivamente. 13
3. Desenvolvimento hipotético da tensão isométrica durante o desenvolvimento do *rigor mortis*. 14
4. Avaliação do desenvolvimento do *rigor mortis* em peixes pelo método do índice de rigor. ... 15
5. Distribuição da água em camadas nos alimentos. Grupos carregados das proteínas musculares atraem a água, formando uma camada de moléculas ligadas (água de constituição), orientadas por sua própria polaridade e pela carga dos grupos. Uma camada de moléculas imobilizadas (água de adsorção ou interfacial) é formada com menor orientação para as cargas dos grupos. As moléculas de água livre estão fracamente ligadas, e sua orientação independe das cargas dos grupos da proteína. 36
6. Modelo esquemático da desnaturação de cadeias de miosina e sua prevenção por crioprotetores. 44
7. Modelo esquemático da desnaturação de proteínas globulares e sua prevenção por crioprotetores. 45

Capítulo 2

- 2.1. Atividade enzimática das enzimas LDH (A) e CS (B) em músculos *gastrocnemius* de rã-touro durante o crescimento pós-metmorfose. 81
- 2.2. Relação entre a atividade enzimática da LDH e CS em músculos *gastrocnemius* de rã-touro durante o crescimento pós-metmorfose. 81
- 2.3. Conteúdo de pigmentos totais em músculos *gastrocnemius* de rã-touro durante o crescimento pós-metmorfose. 82

Capítulo 3

- 3.1. Preparação da amostra para medida da tensão isométrica. A coxa foi desossada, deixando o fêmur exposto (A). A extremidade inferior do músculo *gastrocnemius* foi separada do osso e a tíbia-fíbula separada do fêmur, próximo da articulação (B). 91
- 3.2. Fotos do sistema usado na medida da tensão isométrica. O fêmur e a extremidade do músculo *gastrocnemius* foram firmemente presos por garra metálica e conectados ao braço da célula de força do texturômetro e a um gancho fixado numa câmara cúbica feita de vidro e encamisada. 91
- 3.3. Desenvolvimento da tensão isométrica média em músculos *gastrocnemius* de rãs-touro abatidas por eletr narcose. Os músculos ($n = 3$) foram imersos em solução tampão tris-acetato 60 mM (pH 7,1), contendo KCl 80 mM, MgCl₂ 5mM e azida sódica 1 mM, e mantidos a $9 \pm 2^\circ\text{C}$ por 36 horas. 92
- 3.4. Efeito da insensibilização por eletr narcose e termonarcose nos níveis de ATP, CP, G-6-P, glicogênio, glicose e ácido láctico em músculos da coxa de rã-touro, estocada a $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Valores médios \pm erro padrão da média. 95
- 3.5. Efeito da insensibilização por eletr narcose (—○—) e termonarcose (—●—) nos valores de R em músculos da coxa de rãs-touro mantidas durante 36 horas *post-mortem* a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ 99
- 3.6. Relação entre o valor R e a concentração de ATP em músculos da coxa de rãs-touro insensibilizadas por eletr narcose (—○—) e termonarcose (—●—). 100
- 3.7. Queda do pH muscular em coxas de rãs-touro insensibilizadas por eletr narcose (—○—) e termonarcose (—●—), estocadas a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ 102
- 3.8. Efeito do tempo *post-mortem* na capacidade tamponante de músculos de coxas de rãs-touro, estocada a $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Valores médios \pm erro padrão da média. 108

Capítulo 4

- 4.1. Fotografia digital (resolução 1280 x 960 dpi) de feixes de miofibrilas de homogenato de carne da coxa de rã-touro, tiradas em um microscópio ótico de contraste de fase (Olympus BX41). 120
- 4.2. Desenvolvimento da tensão isométrica média em músculos *gastrocnemius* de rãs-touro abatidas por eletr narcose e submetidas à estimulação elétrica. Os músculos ($n = 3$) foram imersos em solução tampão tris-acetato 60 mM (pH 7,1), contendo KCl 80 mM, MgCl₂ 5mM e azida sódica 1 mM, e mantidos a $9 \pm 2^\circ\text{C}$ por 36 horas. 123
- 4.3. Efeito da insensibilização (eletr narcose e termonarcose) e estimulação elétrica nos valores de R e pH em músculos da coxa de rãs-touro mantidas durante 36 horas *post-mortem* a $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Carcaças estimuladas (—●—) e não-estimuladas (—○—) eletricamente 125

- 4.4. Efeito da insensibilização e estimulação elétrica no tamanho médio e percentual de encurtamento dos sarcômeros (considerando um valor médio de 2,40 μm para músculos em repouso) de músculos da coxa de rãs-touro mantidas durante 36 horas *post-mortem* a $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Valores médios \pm erro padrão da média. TES = Termonarcose estimulado; TNE = Termonarcose não-estimulado; EES = Eletronarcose estimulado; e ENE = Eletronarcose não-estimulado..... 129
- 4.5. Coloração de coxas de rãs-touro estimuladas (EE) e não-estimuladas (EC) 24 horas (mantidas a 9°C) após insensibilização por eletronarcose..... 135
- 4.6. Diferença na firmeza de coxas de rãs-touro estimuladas (EE) e não-estimuladas (EC) 24 horas (mantidas a 9°C) após insensibilização por eletronarcose..... 137

Capítulo 5

- 5.1. Mudança nos valores de HADH em músculos *gastrocnemius* de rã-touro, ao longo da estocagem congelada (-18°C) 150

Lista de Tabelas

Revisão da Literatura

1. Capacidade tamponante (CT) média de diferentes músculos na faixa de pH entre 5,5 e 7,0 .. 25

Capítulo 1

- 1.1. Valores médios (\pm desvio padrão) dos índices de cor avaliados, do teor de pigmentos heme e suas proporções relativas 67
- 1.2. Coeficientes de correlação entre os índices avaliados 70

Capítulo 3

- 3.1. Equações e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para valores R (\hat{y}) dos diferentes tratamentos em função do tempo *post-mortem* (x)..... 99
- 3.2. Equações lineares e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para valores de pH (\hat{y}) dos diferentes tratamentos em função do tempo *post-mortem* (x)..... 103

Capítulo 4

- 4.1. Equações ajustadas e coeficientes da regressão (r^2) para valores R e pH (\hat{y}) dos diferentes tratamentos em função do tempo *post-mortem* (\hat{x}) 126
- 4.2. Valores médios (\pm desvio padrão) dos índices de cor, proporções relativas dos pigmentos heme, maciez objetiva, pH e comprimento do sarcômero da carne de rã-touro após 24 horas a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ 131

Capítulo 5

- 5.1. Valores de HADH (média \pm desvio-padrão) de carnes frescas e descongeladas de rã-touro, para diferentes métodos de insensibilização 149

Apêndice

1A.	Resumo da análise de variância para glicose-6-fosfato (G-6-P), adenosina-5'-trifosfato (ATP) e fosfocreatina (CP) em músculos de rês-touro mantidos a 6°C	155
2A.	Resumo da análise de variância para glicogênio, glicose e lactato em músculos de rês-touro mantidos a 6°C	155
3A.	Valores médios de glicose-6-fosfato (G-6-P), adenosina-5'-trifosfato (ATP), fosfocreatina (CP) em músculos de rês-touro para cada tratamento em função do tempo <i>post-mortem</i> a 6°C e respectivos valores-P para teste da diferença entre tratamentos	155
4A.	Valores médios de glicogênio, glicose e lactato em músculos de rês-touro para cada tratamento em função do tempo <i>post-mortem</i> a 6°C e respectivos valores-P para teste da diferença entre tratamentos	156
5A.	Resumo da análise de variância para a regressão do pH (1º grau) e valor R (2º grau) em músculos de rês-touro, em função do tempo <i>post-mortem</i> a 6°C	156
6A.	Resumo da análise de variância para a capacidade tamponante de músculos de rês-touro mantidos a 6°C	156
7A.	Resumo da análise de variância para a regressão linear do pH e valor R em músculos de rês-touro, para cada tratamento, em função do tempo <i>post-mortem</i> a 6°C	157
8A.	Resumo da análise de variância para o comprimento do sarcômero de músculos de rês-touro mantidos a 6°C	157
9A.	Valores médios do comprimento do sarcômero (μm) em músculos de rês-touro, em função do tempo <i>post-mortem</i> a 6°C	157
10A.	Resumo da análise de variância para os índices de cor objetiva de músculos de rês-touro após 24 horas de estocagem a 6°C	158
11A.	Resumo da análise de variância para as formas relativas dos pigmentos heme de músculos de rês-touro após 24 horas de estocagem a 6°C	158
12A.	Resumo da análise de variância para os atributos de qualidade maciez, comprimento de sarcômero e pH_{24} de músculos de rês-touro após 24 horas de estocagem a 6°C	158
13A.	Coeficientes de correlação entre os índices avaliados para os dados agrupados	158
14A.	Coeficientes de correlação entre os índices avaliados para o tratamento ENE	159
15A.	Coeficientes de correlação entre os índices avaliados para o tratamento EES	159
16A.	Coeficientes de correlação entre os índices avaliados para o tratamento TNS	160
17A.	Coeficientes de correlação entre os índices avaliados para o tratamento TES	160

Resumo

RAMOS, Eduardo Mendes, D.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2004. **Efeito de diferentes métodos de abate sobre o desenvolvimento do rigor mortis e qualidade da carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802)**. Orientador: Lúcio Alberto de Miranda Gomide. Conselheiros: Frederico José Vieira Passos e Luiz Alexandre Peternelli.

Este trabalho mostrou que, apesar de se tornar metabolicamente mais oxidativa com o aumento do peso vivo ao abate, o músculo de rãs continua essencialmente constituído de fibras brancas; que o tipo de insensibilização, bem como a aplicação de estimulação elétrica, de rãs afeta as alterações bioquímicas *post-mortem* dos seus músculos e as características de qualidade da carne obtida, a qual se apresenta mais elevada quando os animais são sangrados; e que, com base no valor da enzima HADH, é possível se diferenciar carne de rã fresca daquelas previamente congeladas. Evidenciou-se efeito ($P < 0,05$) da etapa de sangria, mas não do tipo de insensibilização ($P > 0,05$), sobre o conteúdo total de pigmentos heme e sobre a proporção relativa de suas formas químicas na carne de rãs obtidas. Entretanto, rãs insensibilizadas por eletronarcolese apresentam ($P < 0,05$) menor teor de mioglobina. Animais mais pesados e abatidos com a etapa de sangria apresentaram menor conteúdo de hemoglobina ($P < 0,05$) e carne mais clara. Os teores de O_2Mb , Mb^+ e MMb da carne de rãs apresentaram ($P < 0,05$) alta correlação com a luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*) e índice de amarelo (b^*), respectivamente. Apesar de se manter essencialmente glicolítica, a carne de rãs torna-se ($P < 0,05$) mais oxidativa (menor relação LDH/CS) e apresenta ($P < 0,05$) maior concentração de pigmentos totais com o aumento do peso ao abate. Evidenciou-se, ainda, uma maior taxa metabólica em rãs insensibilizadas por eletronarcolese, que apresentaram um rigor mais precoce que rãs insensibilizadas por termonarcolese. Ainda assim, devido ao seu elevado pH (6,40) muscular e de níveis elevados de ATP (cerca de 4 $\mu\text{mol/g}$) e fosfocreatina (cerca de 2 $\mu\text{mol/g}$), o rigor parece ser oriundo do fenômeno de encolhimento pelo frio. Tanto em rãs insensibilizadas por termo e eletronarcolese, os níveis de glicogênio se mantiveram estáveis, enquanto os de glicose apresentaram constante elevação *post-mortem*, atingindo valores finais duas vezes superiores aos iniciais. Durante o período de estocagem avaliado, as rãs insensibilizadas por eletronarcolese apresentaram níveis de lactato

superiores ($P < 0,05$) e valores de pH inferiores que aquelas insensibilizadas por termonarcore. Para rãs insensibilizadas por eletronarcore, mas não nas insensibilizadas por termonarcore, a aplicação de estimulação elétrica de baixa voltagem (60 V, 60 Hz por 60 segundos) de carcaças acelera o metabolismo muscular, produzindo uma antecipação (e aumento na taxa) da queda de pH e de aumento de valor R, antecipando o desenvolvimento do rigor. Este resultado aponta para uma possível necessidade do uso de altas voltagens para a estimulação de animais insensibilizados por termonarcore. Após 24 horas, a EE induziu ($P < 0,05$) um aumento na proporção relativa de pigmentos heme reduzidos (Hb^+ e Mb^+) e redução na proporção relativa das demais formas químicas (O_2Mb , O_2Hb , MMb e MHb), além de induzir ($P < 0,05$) aumento no valor de a^* e diminuição do valor de h^* , gerando uma carne de coloração mais avermelhada. O índice de amarelo (b^*) não foi afetado pela estimulação, mas exerceu uma importante participação relativa na cor da carne de rã, apresentando ($P < 0,05$) correlação negativa com a $\%Mb^+$ e positiva com a $\%MbO_2$ e $\%MMb$. Embora sem diferir quanto ao comprimento do sarcômero, os músculos estimulados de rãs-touro insensibilizadas por eletronarcore apresentaram ($P < 0,05$) menor pH_{24} , maior força de cisalhamento e textura mais firme do que os demais tratamentos. Por fim, evidenciou-se que o método de insensibilização não afeta ($P > 0,05$) a atividade da enzima HADH, e que, embora esta atividade se eleve ($P < 0,05$) com o tempo de estocagem congelada, independente do tempo de estocagem refrigerada, é possível obter uma elevada acuidade (96,5% de acerto) na distinção entre carne fresca de rãs ($HADH < 65$) e carne de rãs congeladas ($HADH > 69$).

Abstract

RAMOS, Eduardo Mendes, D.S., Universidade Federal de Viçosa, december, 2004. **Effect of different slaughter methods on rigor development and Bullfrog (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802) meat quality.** Adviser: Lúcio Alberto de Miranda Gomide. Committee Members: Frederico José Vieira Passos and Luiz Alexandre Peternelli.

This research showed that, despite turning metabolically more oxidative with increasing live weight, frog muscles are still mostly constituted of white fibers; that the type of frog stunning, as well as the use of electrical stimulation, affect the muscle postmortem biochemical changes and the quality of its meat, which is enhanced by animal bleeding; and, finally, that by using the activity of the HADH enzyme it is possible to distinguish refrigerated frog meat from frozen frog meat. It was shown that bleeding ($P < 0.05$), but not stunning type ($P > 0.05$), affected the frog meat total heme pigment content and the relative proportions of its chemical forms. However, electrically stunned frogs presented ($P < 0.05$) lower myoglobin content. Heavier and bled frogs presented a lighter meat having lower ($P < 0.05$) hemoglobin content. The levels of O_2Mb , Mb^+ and MMb were, respectively, highly correlated with lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*) scores. It was demonstrated that, despite maintaining itself essentially glycolytic, frog meat becomes ($P < 0.05$) more oxidative (lower LDH/CS ratio) and present ($P < 0.05$) higher total heme pigment content with increasing frog live weight. In the third chapter it was shown a higher metabolic rate in electrically stunned frogs that had a hastened rigor compared to those thermally stunned. Still, due to its high muscle pH (6.40) and high ATP ($\sim 4 \mu\text{mol/g}$) and phosphocreatine ($\sim 2 \mu\text{mol/g}$) content, the rigor seems to be cold induced. Both in electrically, as well in thermally, stunned frogs muscular glycogen content remained unchanged while their glucose levels raised constantly *postmortem*, reaching final values about twice those of the initial ones. In every storage time, compared to thermally stunned frogs, lactate levels were higher ($P < 0.05$) and pH values were lower in electrically stunned frogs. It was shown that for electrically stunned frogs, but not for thermally stunned frogs, the use of low voltage carcass electrical stimulation (60 V, 60 Hz for 60 seconds) hastens muscle metabolism accelerating pH fall and R value increase as well as the rate of their change inducing a faster rigor development. This

result points to a possible need of using high voltages if electrical stimulation (EE) of thermally stunned frogs is to be effectively used. After 24 hours EE induced ($P < 0.05$) an increase in the relative proportion of reduced heme pigments (Hb^+ e Mb^+) and a decrease in the relative proportion of the other pigment chemical forms (O_2Mb , O_2Hb , MMb e MHb). It also induced ($P < 0.05$) an increase in \mathbf{a}^* value and a decrease in hue angle (\mathbf{h}^*), yielding a more reddish colored frog meat. Though \mathbf{b}^* value was not affected by EE it had an important contribution to the frog meat color, showing ($P < 0.05$) a negative correlation with Mb^+ content and a positive correlation with MbO_2 and MMb content. Though not differing as to their sarcomere length the stimulated muscles of electrically stunned frogs showed ($P < 0.05$) lower pH_{24} , higher shear force and firmer texture than those of the other treatments. Finally, it was shown that the stunning method does not affect ($P < 0.05$) the activity of the HADH enzyme and that, though this activity increases ($P < 0.05$) with time of frozen storage, it is possible, regardless the time of refrigerated storage, to obtain a high level of success (96.5% of correct identifications) in distinguishing fresh ($\text{HADH} < 65$) from frozen ($\text{HADH} > 69$) frog meat.

Introdução

As técnicas de criação de rãs no Brasil tiveram uma grande evolução com a simplificação das instalações do ranário comercial, principalmente com o desenvolvimento de sistema de baias de recria, denominado “confinamento”, proposto por OLIVEIRA (1982). A partir daí, surgiram outras propostas de instalações para ranário, como o Sistema Anfigranja implantado por LIMA e AGOSTINHO (1992), que levou à otimização operacional das atividades de reprodução, produção de girinos e recria, com melhorias consideráveis dos índices zootécnicos nas fases de crescimento e engorda. Recentemente tem havido uma atenção especial quanto à seleção genética e formulação de rações específicas para o desenvolvimento da rã-touro criada em cativeiro.

Entretanto, embora os avanços nas pesquisas desenvolvidas no país tenham contribuído para um aumento da produtividade do setor, existe ainda uma grande carência de trabalhos quanto à utilização da carne de rã como matéria-prima para a indústria de alimentos.

Das espécies de rã utilizadas na criação intensiva no Brasil, a que apresentou melhor capacidade de adaptação, precocidade, prolificidade e produtividade foi a rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802), também conhecida como rã-touro gigante, que possui a seguinte classificação na escala zoológica: classe *amphibia*; subclasse *batrachia*; ordem *anura*; família *ranidae*; gênero *rana*; espécie *catesbeiana*.

Trabalhos conduzidos no Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), têm contribuído como suporte para o aproveitamento industrial da carne de rã-touro, espécie utilizada na criação em cativeiro no Brasil. ALBINATI (1994) estudou o efeito e a eficiência de diversos tipos de insensibilização, associado à forma de sangria, sugerindo a adoção do sistema de eletronarcose como o processo mais adequado. LOAIZA (1996), avaliou o efeito de dois sistemas de evisceração, sobre a qualidade microbiológica das carcaças estocadas sob refrigeração e congelamento. Suas observações indicaram um novo sistema de evisceração e tempos de vida-útil de 8 dias, para carnes embaladas a vácuo e armazenadas refrigeradas (4°C), e de pelo menos 6 meses, quando mantidas congeladas

a -18°C. MOURA et al. (2001) avaliaram o efeito de diferentes períodos de jejum pré-abate sobre a qualidade microbiológica e físico-química de carcaças de rês-touro, ao longo do período de estocagem refrigerada, indicando um jejum de 24 horas como mais adequado. RAMOS et al. (1998) e RAMOS (2000) avaliaram as características alométricas, perfil de desenvolvimento e o rendimento em carcaça entre os sexos de rês-touro, observando que para a produção de carnes, é aconselhável o abate de animais mais pesados, sendo machos economicamente mais eficientes que as fêmeas. Os autores ressaltaram, ainda, a necessidade de estudos sobre o aproveitamento industrial do dorso destes animais, visto que as coxas têm maior valor comercial, e dos subprodutos, especialmente das fêmeas, que forneceriam subsídios ao abate e comercialização do produto final, permitindo uma produção mais racional e eficiente. RAMOS et al. (2003) estabeleceram o perfil da composição química centesimal da carne ao longo do desenvolvimento do animal, sugerindo o abate de animais mais pesados por apresentarem maior conteúdo protéico e menor teor de lipídeos muscular. MOURA (2000) determinou algumas características bioquímicas, físicas, e físico-químicas da carne de rã de diferentes sexos e submetidas a diferentes combinações de insensibilização e sangria. Seu estudo envolveu avaliação de características de qualidade como capacidade de retenção de água (CRA), capacidade emulsionante (CE), perda por cozimento, maciez e cor, e concluiu que os sistemas de abate estudados, assim como o sexo das rês, não têm efeito sobre as características avaliadas, exceto para a maciez da carne, que se apresentou menor em animais insensibilizados por eletronarcose.

MOURA (2000) também avaliou o efeito de diferentes formas de insensibilizações sobre as transformações bioquímicas do músculo *post-mortem* e, baseado no valor R, determinou que o início do *rigor mortis* em rês sofre um retardo mínimo de 8 a 9 horas para animais insensibilizados por eletronarcose e quimionarcose (anestesia), respectivamente, e de 12 horas quando do uso de termonarcose. Este tempo é considerado elevado, visto que, em se tratando de um animal em que a carne se apresenta com aspecto de predominância de fibras brancas, era esperado que o *rigor mortis* tivesse início a tempos próximos do que ocorre em peixes e aves (cerca de 1 a 2 horas). Segundo o autor, este tempo de rigor prolongado pode ser oriundo das características metabólicas particulares da musculatura da rã.

A caracterização do *rigor mortis* realizado por MOURA (2000) foi, no entanto, baseada apenas na medida do valor R, razão entre a concentração de nucleotídeos derivados de inosina (IMP, inosina e hipoxantina) e os derivados de adenosina (ATP,

ADP e AMP), e, uma vez que grande parte das variações que ocorrem na qualidade da carne de consumo, como cor, maciez, textura e sabor, é consequência das mudanças físicas e bioquímicas sofridas pelos músculos *post-mortem*, uma caracterização mais precisa da conversão do músculo em carne se faz necessária para elucidar as particularidades da carne de rã, permitindo um melhor direcionamento nas suas etapas de obtenção e comercialização, com vistas à melhor qualidade do produto final.

No Capítulo 1 do presente trabalho foi avaliado o efeito da etapa de sangria, associada aos diferentes métodos de insensibilização, na quantidade de sangue residual presente na carne. Para tanto, determinou-se o conteúdo residual de hemoglobina na carne de rãs-touro insensibilizadas por eletro e termonarose, e abatidas com e sem a etapa de sangria. Também se procedeu a análise objetiva de cor, determinando o percentual de pigmentos relativos na superfície da carne, a fim de se verificar o efeito destes fatores sobre a cor do produto obtido.

No Capítulo 2, através de análises enzimáticas, avaliaram-se as capacidades oxidativa e glicolítica das fibras musculares esqueléticas de rã-touro e sua diferenciação durante o crescimento pós-metamorfose. As informações obtidas com esta avaliação são importantes do ponto de vista da qualidade da carne, uma vez que influenciam parâmetros como a maciez, textura, suculência, cor, sabor e rendimento de carne. Além disso, conferem informações pertinentes para a discussão das mudanças metabólicas que ocorrem durante o período *post-mortem*.

O Capítulo 3 foi conduzido para se avaliar as mudanças físicas e bioquímicas, que ocorrem no músculo de rãs-touro durante o período *post-mortem*. Para tal, determinou-se o tempo de desenvolvimento do *rigor mortis*, sendo este associado às mudanças físicas (tensão isométrica) e aos padrões de depleção *post-mortem* de ATP, fosfocreatina e glicogênio e da produção de ácido lático nestes músculos.

No Capítulo 4 foi avaliado o efeito da introdução de uma etapa de estimulação elétrica de baixa voltagem no abate de rãs-touro sobre o desenvolvimento do *rigor mortis* e características de qualidade da carne, em especial a maciez.

Por fim, o Capítulo 5 foi conduzido para avaliar o efeito dos principais métodos de insensibilização (eletronarose e termonarose) utilizados no abate de rãs sobre a atividade da enzima β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH) extraída em tampão fosfato, a fim de verificar a validade de seu uso na diferenciação de carnes de rã-touro resfriadas das descongeladas, definindo limites superiores e inferiores de detecção passíveis de categorizar tais condições com acuidade.

Revisão da Literatura

1. Etapas no Abate de Rãs

Embora nos últimos anos as técnicas de abate tenham sido intensivamente melhoradas, devido à inexistência de equipamentos especificamente destinados ao abate de rãs, várias etapas e equipamentos ainda são adaptados, principalmente da indústria avícola.

Várias pesquisas têm sido conduzidas para adequação das etapas de abate às condições tecnológicas e higiênico-sanitária, necessárias para a obtenção de carne e subprodutos de qualidade garantida. Entretanto, muitas informações obtidas destas pesquisas não têm sido aplicadas, ainda, nos abatedouros de rãs do país. Em levantamento realizado por LIMA et al. (1999), observou-se que a maioria dos abatedouros de rãs brasileiros prende-se a conceitos pré-estabelecidos, operando por impulso, sem considerar, de fato, a suas reais necessidades e potencialidades. Associado a isto, a inexistência de políticas empresariais bem definidas que orientem as tomadas de decisões, tanto de caráter interno como externo da empresa, limitam o progresso da ranicultura no país (MOURA, 2000).

O artigo 438 do Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1997), define com a denominação genérica “pescado”, os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, quelônios e mamíferos de água doce ou salgada, usados na alimentação humana, incluindo as rãs dentro desta definição. Segundo LOIAZA (1996), através do Informativo Técnico 86/87 da Delegacia Federal de Agricultura, o Ministério da Agricultura estabelece algumas normas e diretrizes para o abate de rãs, para se obter um melhor aproveitamento higiênico-sanitário dos produtos. O informe sugere como requisitos microbiológicos para a carne de rã, aqueles estabelecidos pelo Comitê Misto FAO/OMS, do CODEX ALIMENTARIUS (1984). No entanto, não existem, sequer para a obtenção do registro no SIF, diretrizes para certificação da unidade de abate de rãs, sendo utilizados para este fim parâmetros comparativos com a unidade de abate de animais de pequeno porte, como aves.

Esta posição conservadora dos produtores e a ausência de políticas de incentivos e de normas e diretrizes específicas para o setor, torna difícil a aplicação de inovações tecnológicas e melhorias nas condições de obtenção e comercialização da carne de rã, mantendo as

unidades de abate um caráter de “status” na obtenção de um produto ainda considerado exótico.

O processo de abate de rãs tradicional no Brasil, desenvolvido pelo Serviço de Inspeção de Produtos Animal e Vegetal do Distrito Federal (SIPAV/DF) em conjunto com uma equipe técnica do abatedouro de rãs Rander, é baseada em experiências técnicas e higiênico-sanitárias adquiridas através do acompanhamento do abate de outros animais de corte, somado a informações colhidas de rancultores (BORGES et al., 1995). LOIAZA (1996) sugeriu um sistema de abate de rãs alternativo (Figura 1) que se mostrou tecnologicamente e economicamente superior ao sistema tradicional, por levar a uma menor contaminação por coliformes, além de permitir se trabalhar com um número menor de operários na linha de abate.

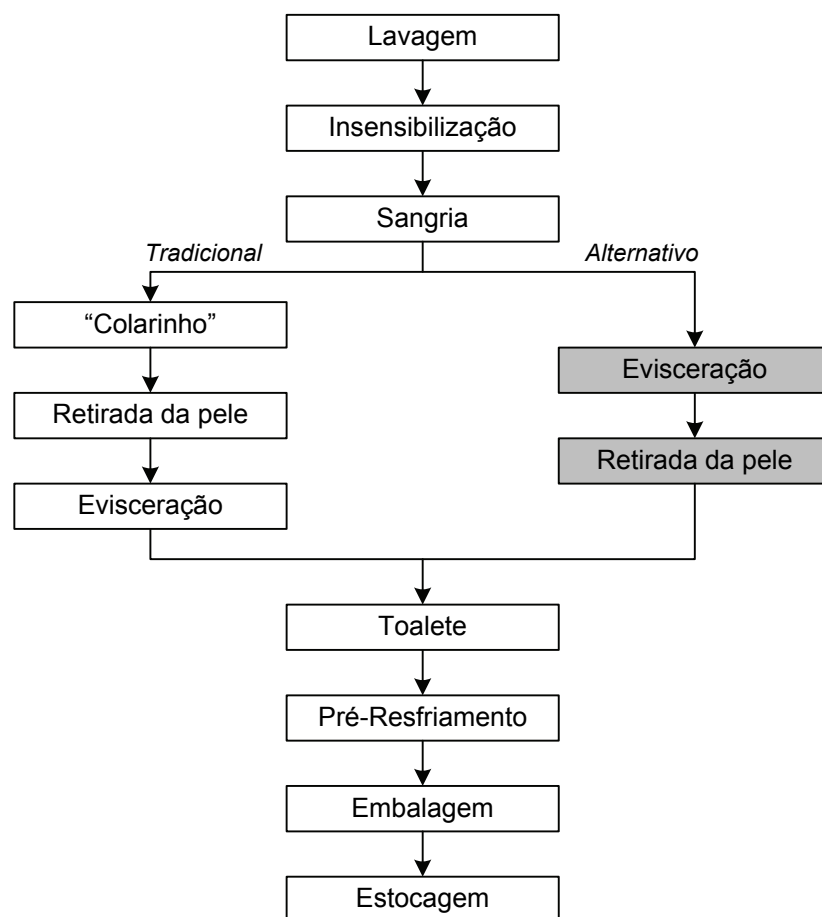


Figura 1. Fluxograma dos sistemas tradicional e alternativo, proposto por LOIAZA (1996), para o abate de rãs.

No entanto, o processo tradicional de abate é, ainda hoje, conforme constatado por LIMA et al. (1999), o principal processo aplicado no abate de rãs em territórios brasileiros,

sendo que diferenças significativas têm sido observadas nas diversas etapas empregadas nas unidades de abate.

O período de jejum e dieta hídrica tem como objetivo, a eliminação e esvaziamento do conteúdo intestinal, para minimizar os riscos de contaminação da carcaça por regurgitação e, ou, rompimento de alças intestinais durante a etapa de evisceração (LIMA e AGOSTINHO, 1988; FAUCITANO, 2000; MOURA et al., 2001). Vários autores recomendam um tempo de jejum entre 24 e 72 horas. LONGO (1986) e LIMA e AGOSTINHO (1988) sugerem 24 horas, enquanto BORGES et al. (1995) sugerem um período mínimo de 36 horas. Autores citados por ALBINATI (1994), recomendam períodos de 72 horas.

Avaliando 15 abatedouros de rãs, distribuídos por uma larga faixa do território nacional, sendo 7 legalmente estabelecidos (4 com SIF e 3 com SIE) e 8 em processo em andamento para obtenção do SIF, LIMA et al. (1999) constataram uma variação no tempo de jejum e dieta hídrica de 24 a 48 horas, com 2 abatedouros praticando tempos de 72 horas ou mais.

Empregando o abate alternativo proposto por LOIAZA (1996), MOURA et al. (2001) não observaram nenhuma diferença sensível nas contagens microbiológicas (mesófilos, coliformes totais e coliformes fecais), especialmente nas de coliformes fecais, nos diferentes tempos de jejum (24, 48 e 72 horas) avaliado. Também não foi observada diferença significativa nos valores de pH, bases voláteis totais (BVT) e nitrogênio não-protéico (NNP), avaliados durante 12 dias de estocagem, para os diferentes tempos de jejum. Seus resultados indicam não haver necessidade de prolongamento do período de jejum pré-abate de rãs acima de 24 horas, embora neste período o conteúdo intestinal tenha sido superior aos dos demais tratamentos.

A lavagem antes da insensibilização tem por finalidade a eliminação dos restos de fezes, urina e outros resíduos contaminantes, assim como iniciar o processo de desinfecção da pele, através da redução da carga microbiológica. Entretanto, LIMA et al. (1999) não observaram esta preocupação nos abatedouros avaliados. É comum a eliminação da etapa de lavagem, substituindo-a pelo uso de água clorada, que deve ser constantemente renovada, na etapa de jejum e dieta hídrica (ALBINATI, 1994; LOIAZA et al., 1996).

A insensibilização e a sangria são etapas necessárias no abate de animais de corte e, uma vez que possuem funções diferentes, devem ser observadas como dois processos distintos. Resumidamente, a insensibilização visa tornar o animal inconsciente de modo que este possa ser abatido de forma eficiente, sem lhe causar dor e angústia. Esta etapa permite uma melhor sangria e manejo do animal no abate, uma vez que o animal se encontra inconsciente. Ao contrário da insensibilização, que visa, de princípio, manter o animal vivo,

porém imóvel, a sangria é o principal processo de matança utilizado. Seus propósitos são: a morte do animal por falência circulatória antes que este retorne à consciência; e a subsequente remoção de todo sangue possível da carcaça.

A etapa de insensibilização deve ser efetuada de forma a provocar a inconsciência imediata do animal, que deve perdurar até o fim da etapa de sangria, não causando sofrimento desnecessário e promovendo uma sangria tão completa quanto possível (GREGORY, 1998; ANIL et al., 2000b).

De um modo geral, os métodos de insensibilização utilizados no processamento de rãs no Brasil, podem ser divididos em dois grupos (LONGO, 1986; LIMA e AGOSTINHO, 1988; ALBINATI, 1994; BORGES et al., 1995): a) imersão em água ou salmoura gelada (termonarcese); e b) eletronarcese. A utilização de eletronarcese para o abate de rãs é mais recente (AYAPPAN PILLAI, 1986; ALBINATI, 1994), e tem mostrado ser mais eficiente do que os métodos de insensibilização tradicionais (ALBINATI, 1994). No entanto, todos os abatedouros avaliados por LIMA et al. (1999) aplicavam o processo de termonarcese, efetuado em tinas com água e gelo.

Aparentemente é mais fácil conduzir a insensibilização por termonarcese, simplesmente colocando os animais em tinas com água e gelo, onde são mantidos por 15 minutos, do que por eletronarcese, em que os animais devem ser pendurados na nórea antes de insensibilizados, como nos métodos propostos por AYAPPAN PILLAI, (1986) e ALBINATI (1994). Neste sentido, MOURA (2000) desenvolveu um equipamento específico, similar aos utilizados na insensibilização de aves em abatedouros de pequeno porte, em que a cabeça da rã é posicionada entre dois eletrodos, com a corrente sendo aplicada entre os olhos, na parte superior da cabeça, e a região gular, na parte inferior da cabeça. O equipamento, foi ajustado para fornecer uma tensão de 60 V por um tempo de 7 segundos, conforme sugerido por ALBINATI (1994). Os animais insensibilizados, podem ser, então, facilmente pendurados na nórea de abate para as etapas subsequentes.

Outra forma de aplicação da corrente elétrica é através do uso de dois pólos elétricos presos com duas “garras-jacaré”, um na mandíbula e o outro nas extremidades posteriores de cada animal, garantindo que a corrente elétrica circule através do cérebro, efetuando a eletronarcese (LOIAZA, 1996). No equipamento desenvolvido por MOURA (2000), no entanto, a etapa de insensibilização é mais rápida e fácil de ser aplicada.

Para produzir a inconsciência do animal por eletronarcese, é necessário que seja induzido um estado de epilepsia após a insensibilização. A epilepsia é oriunda de uma massiva despolarização dos neurônios no cérebro, causada pela passagem da corrente elétrica,

que consome as suas reservas energéticas disponíveis, causando uma inconsciência instantânea e indolor ao animal (GREGORY, 1998; BILGILI, 1999).

É necessária uma amperagem mínima para induzir o estado de epilepsia (GREGORY, 1998; BILGILI, 1999), sendo variável de acordo com a espécie animal: para suínos a corrente mínima é de 1,25 A; 0,50 A, para ovinos; de 1,0 a 3,0 A, para bezerros e bovinos adultos (embora sua aplicação não seja muito comum); 120 mA para frangos; e 150 mA para perus. Usando estes níveis de corrente, aplicada por 3 a 4 segundos, 98% dos animais serão bem insensibilizados (GREGORY, 1998). Para coelhos, uma aplicação mínima de 140 mA é requerida (ANIL et al., 2000a). O uso de uma corrente elétrica insuficiente, ou que não atravesse o cérebro, será dolorosa para o animal e provocará uma insensibilização ineficaz (GREGORY, 1998; BILGILI, 1999).

A tensão média aplicada por MOURA (2000) foi de 60 V, que induziu nos animais uma corrente média de 139 mA, três vezes maior do que a determinada por ALBINATI (1994), que encontrou 43,5 mA para uma tensão nominal também de 60V. Entretanto, vale ressaltar que, em nenhum dos dois trabalhos a efetividade da eletroanestesia foi avaliada no tocante ao bem-estar animal, ou seja, se no processo de inconsciência a fase de epilepsia foi alcançada imediatamente, evitando dor e sofrimento desnecessário à rã. Tanto ALBINATI (1994) quanto MOURA (2000) avaliaram a eficiência da insensibilização apenas em relação ao tempo necessário para o retorno dos primeiros movimentos da rã.

Outra etapa extremamente importante no abate animal é a sangria, que visa, de princípio, cortar o fornecimento de sangue para o cérebro do animal induzindo-o à morte. Entretanto, a sangria deve ser realizada mesmo que o animal morra na etapa de insensibilização por parada cardíaca, uma vez que também visa à remoção de todo o sangue possível da carcaça do animal (ABERLE et al., 2001; GREGORY, 1998).

Devido ao grande teor protéico e por possuir um elevado pH (7,35 a 7,45), o sangue constitui um excelente meio para o crescimento de microrganismos, sofrendo uma rápida putrefação (ASGHAR e PEARSON, 1980; GREGORY, 1998; ABERLE et al., 2001). Além disso, o sangue na carne pode, ainda, promover a autólise e oxidação das gorduras (GREGORY, 1998). Desta forma, a capacidade de conservação da carne mal sangrada é limitada, e a eficiência de sangria torna-se uma exigência importante das operações de abate para obtenção de um produto de qualidade (WARRIS, 1977).

Entretanto, quando a carne moída é misturada com sangue e inoculada com bactérias, a taxa de proliferação destas não é maior do que em carne moída sem sangue adicionado (GREGORY, 1998). A carne é, portanto, um meio de incubação tão bom quanto o sangue. Além disso, o sangue é praticamente estéril e possui no plasma fatores com atividade

antimicrobiana (WARRIS, 1984). Provavelmente, as considerações mais importantes a serem observadas sobre uma presença maior de sangue na carne envolvem a questão sensorial (GREGORY, 1998).

De fato, o maior requerimento para se obter e manter a qualidade da carne, tanto da aparência quanto durante o ato de degustação (*eating quality*), é o de remover a maior quantidade possível de sangue da carcaça. Sangue retido nas veias e nos músculos pode causar uma aparência indesejável na carne (GREGORY, 1998; LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001), como veias enegrecidas e manchas desagradáveis quando esta é cortada. Áreas musculares que contêm elevada concentração de hemoglobina apresentam uma maior velocidade de descoloração, principalmente durante o congelamento (HUNT e KROPF, 1987). O sabor e odor da carne também são ligeiramente alterados com a presença de sangue residual (GREGORY, 1998; ABERLE et al., 2001).

Nas diretrizes do CODEX ALIMENTARIUS (1984) para o abate e processamento de coxas de rã, a sangria é feita através de um corte na altura da cintura pélvica e posterior imersão das coxas em solução salina gelada. Entretanto, o processo de sangria mais usado no país, promove o corte dos grandes vasos sanguíneos emergentes do coração. Os animais, pendurados pelos pés e com a cabeça para baixo, têm os grandes vasos do tronco cardíaco seccionados com a ajuda de um bisturi, permanecendo nesta posição durante toda a etapa de sangria, sempre submetidos a jatos de água contínuos (LOIAZA, 1996).

O tempo de sangria comumente empregado nos abate de rãs é de 3 minutos, por ser tratar do tempo mínimo preconizado pela legislação brasileira no abate de animais de açougue (BRASIL, 1997), embora BORGES et al. (1995) tenham sugerido um tempo mínimo de 8 minutos para rãs insensibilizadas por termonarcole. Para a eliminação de 95% do volume total de sangue corporal, ALBINATI (1994) preconizou um tempo de sangria de 10 minutos, independentemente do tipo de insensibilização utilizada. Entretanto, considerando este tempo demasiadamente longo para uma linha de abate e avaliando os rendimentos obtidos em tempos intermediários, ALBINATI (1994) considerou que tempos de 6 e 4 minutos para animais insensibilizados por termonarcole e eletronarcole, respectivamente, são adequados para a utilização na linha de abate de rãs. Nestes tempos, o rendimento de sangria em relação à quantidade de sangue removido em 10 minutos corresponde a 94%.

A observação de que a insensibilização por termonarcole dificulta a etapa de sangria tem sido consistente em vários estudos (ALBINATI, 1994; MOURA, 2000), estando em consonância com os resultados reportados por STOREY e STOREY (1984 e 1985) de que rãs (*Rana sylvatica*) que entram em estado letárgico, em temperaturas em torno de zero, mostram não respirar, não sangrar e os órgãos surgem pálidos (aparentemente destituídos de sangue),

ao passo que o sangue parece ter empossado nas sinuosidades em volta do coração. Em experimentos conduzidos no laboratório do DTA/UFV em que as rãs-touro foram insensibilizadas em água e gelo por 15 minutos, têm-se observado (análise visual) um acúmulo de sangue na cavidade interna, e, aparentemente, sua ausência quase total na musculatura, mesmo em animais não sangrados.

ALBINATI (1994), comparando o teor residual de ferro, como indicativo do teor residual de pigmentos, especialmente hemoglobina, na musculatura de rãs-touro sangradas, não encontrou diferenças significativas entre rãs insensibilizadas por termonarcese e aquelas insensibilizadas por eletronarcese, indicando que os diferentes métodos de insensibilização não afetam a qualidade da carne final. Entretanto, a própria autora admite que o parâmetro avaliado (teor de ferro) não é adequado para a avaliação dos níveis residuais de sangue no músculo, não sendo, portanto, um bom indicador de qualidade final da eficiência de sangria. MOURA (2000), ao comparar a interação entre os métodos de insensibilização e a execução ou não da etapa de sangria, encontrou maiores valores de índice de vermelho (valor **a**) no músculo de animais insensibilizados por termonarcese do que para eletronarcese, associando a possível maior retenção de hemoglobina no músculo de animais que no processo de abate são submetidos a temperaturas mais baixas.

Seguindo-se o abate pelo método tradicional, é realizado o “colarinho”, que constitui o corte da pele em torno da junção da cabeça e o tronco, e seu desprendimento. A pele é desprendida no sentido da cabeça para as patas posteriores, mantendo o animal enganchado pela mandíbula. Através da abertura da cavidade abdominal (o corte segue a linha média do abdômen em direção ao tórax), com a ajuda de uma tesoura, a carcaça é separada das vísceras e da cabeça do animal, que ficam presas no gancho (LIMA e AGOSTINHO, 1988; LOIAZA, 1996).

Após a evisceração as carcaças são lavadas com água corrente e submersas em caixas de água gelada com o objetivo de promover um pré-resfriamento. Embora ALBINATI (1994) relate que este procedimento seja normalmente adotado nos abatedouros do Brasil, LIMA et al. (1999) observaram ser prática habitual nas unidades visitadas, concluída a toaleta da carcaça, esta ser embalada e submetida ao congelamento imediato. Dos 15 abatedouros visitados naquele ano, apenas um aplicava a etapa de pré-resfriamento.

2. Transformações *Post-Mortem*

As funções vitais do sistema muscular não cessam no momento da morte do animal. Uma série de modificações bioquímicas e estruturais ocorre simultaneamente após o

sacrifício, num processo que conduz à conversão do músculo em carne. Estas reações são dependentes dos tratamentos *ante-mortem*, do processo de abate e das técnicas de armazenamento da carne, afetando a sua qualidade final.

As mudanças *post-mortem* nos músculos têm início após a eliminação do sangue na etapa de sangria (GREASER, 1986; ABERLE et al., 2001). Com a sangria e morte do animal, o suprimento de sangue para os tecidos corporais é cortado, ocorrendo uma quebra no fluxo de oxigênio e nutrientes, bem como no recolhimento de produtos finais do metabolismo destes tecidos. O tecido muscular, no entanto, continua respirando, produzindo e consumindo adenosina trifosfato (ATP), sua principal fonte energética (LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001).

As fontes de energia muscular *post-mortem* são poucas, se restringindo basicamente às reservas de glicogênio, ATP e ADP residual e fosfocreatina. Como o nível de ADP residual se encontra relativamente alto, a reposição do ATP pela refosforilização do ADP é conduzida na presença da fosfocreatina. A fosfocreatina, no entanto, está presente em concentrações insuficientes (13 a 23 $\mu\text{mol/g}$) para manter o metabolismo muscular por tempo prolongado (BENDALL, 1973a e 1973b; GREASER, 1986; ABERLE et al., 2001). No momento que esta reserva cessa, a resíntese de ATP é realizada pela glicólise muscular.

A glicólise é um conjunto de reações bioquímicas realizadas com a conversão da glicose, geralmente oriunda do glicogênio, em piruvato (SQUIRE, 1981; NELSON e COX, 2000). Na presença de oxigênio, o piruvato formado na glicólise entra na mitocôndria, seguindo pelo Ciclo de Krebs e pela Cadeia Transportadora de Elétrons, até ser completamente convertido a dióxido de carbono e água, fornecendo a energia necessária para a refosforilização do ADP e mantendo o nível energético necessário para sustentação do metabolismo muscular. Esta seqüência de reações, denominada “mecanismo oxidativo”, constitui a principal via utilizada pelo músculo na síntese de ATP. Embora outros açúcares simples, aminoácidos e lipídios possam ser utilizados no mecanismo oxidativo, a glicose é o primeiro composto a ser mobilizado para este fim, seja da corrente sanguínea ou das reservas musculares de glicogênio (GREASER, 1986; BECHTEL, 1986; NELSON e COX, 2000).

Entretanto, embora a mioglobina funcione como um reservatório de oxigênio para o tecido muscular, este estoque só é suficiente para manter por curto período as reações oxidativas, necessárias à sobrevivência do tecido. Quando as reservas de oxigênio no músculo tornam-se insuficientes, o piruvato é rapidamente transformado em ácido láctico, a fim de recuperar o potencial redutor da célula, permitindo que esta utilize a glicólise como um importante mecanismo para a obtenção rápida de ATP (LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001).

O glicogênio é a principal reserva energética da célula animal para a síntese de ATP. Como a circulação não está mais presente, a glicose sanguínea, abastecida pelo glicogênio presente no fígado, não pode ser transportada para a célula muscular, sendo as reservas de glicogênio do músculo as únicas fontes energéticas disponíveis (GREASER, 1986; LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001). Os níveis de glicogênio presente nos tecidos celulares variam consideravelmente, mesmo em animais da mesma espécie, devido à dependência do estado nutricional e fatores hormonais do animal durante o abate, além do tempo *post-mortem* em que foi medido. Suas reservas podem ser reduzidas por exaustivos exercícios *ante-mortem* ou por qualquer outro estresse fisiológico a que o animal seja submetido (NEWBOLD, 1966; GREASER, 1986; BECHTEL, 1986).

À medida que as reservas de glicogênio são consumidas, ocorre um acúmulo de ácido láctico (devido à ausência da circulação sanguínea) no músculo, responsável pela queda do pH *post mortem* a níveis tão baixos que inativa as enzimas envolvidas no processo de glicólise, cessando a refosforilização do ATP (NEWBOLD, 1966; ASGHAR e PEARSON, 1980; GREASER, 1986; PEARSON, 1994).

Quando o nível de ATP não pode mais ser mantido pelas reservas de fosfocreatina e glicogênio, seja devido ao esgotamento destas reservas ou à redução da atividade enzimática associada à glicólise, causada pelo abaixamento do pH, o músculo começa a se contrair até atingir um estado de rigidez. Na ausência de ATP, as moléculas de actina e miosina combinam-se, formando cadeias rígidas de actomiosina. A formação do complexo de actomiosina torna a natureza flexível e elástica do músculo num estado mais rígido e inextensível, em um processo denominado *rigor mortis* (BENDALL, 1973a e 1973b; GREASER, 1986; PEARSON, 1994; ABERLE et al., 2001).

Estudos extensivos sobre o desenvolvimento do *rigor mortis*, tornaram evidente que estas mudanças bioquímicas são, essencialmente, as mesmas para todas as espécies de vertebrados (CHRYSTALL e DEVINE, 1985).

2.1. Caracterização do *Rigor Mortis*

O *rigor mortis* pode ser definido como uma contração muscular lenta, porém intensa e irreversível, que ocorre quando o nível ATP é reduzido a concentrações inferiores a 1,0 $\mu\text{mol/g}$ (BENDALL, 1973a; HONIKEL et al., 1981a e 1981b; HAMM, 1982; GREASER, 1986).

As mudanças na extensibilidade do músculo foram originalmente medidas com o acompanhamento das mudanças no alongamento de tiras musculares, obtidas com fibras na

direção longitudinal, pela aplicação e remoção alternadas de forças de tensão constantes (BENDALL, 1973a; GREASER, 1986). Durante a análise, o aumento do comprimento da tira muscular, obtido em cada ciclo, é registrado, sendo a sua redução relacionada com a perda de extensibilidade muscular (NEWBOLD, 1966). A curva de deformação obtida pela medida da perda da extensibilidade é extensa e contínua (Figura 2).

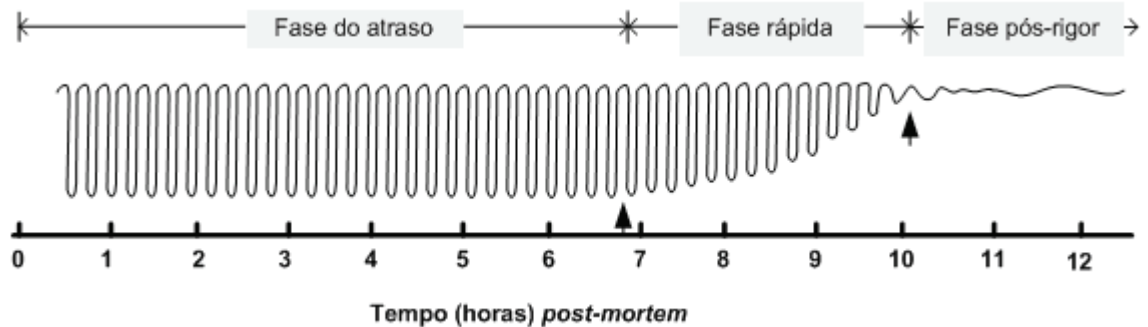


Figura 2. Diagrama de mudanças na extensão usada no acompanhamento do desenvolvimento do *rigor mortis* pela perda de extensibilidade em músculos *Psoas* de ratos. Tiras musculares de tamanho definido são mantidas a 17°C e submetidas a um processo cíclico de estiramento. As setas da esquerda e da direita indicam o início (*rigor onset*) e estabelecimento do *rigor mortis*, respectivamente. Fonte: modificado de BENDALL (1973a).

Através da análise de curvas obtidas de músculos de rato, BATE-SMITH e BENDALL (1949) dividiram o padrão do *rigor mortis* em três fases distintas:

1. **Fase do atraso** (*delay phase*): período de tempo em que não há mudança na elasticidade do músculo: sua extensibilidade permanece constante e elevada;
2. **Fase rápida** (*rapid phase* ou *onset phase*): inicia quando a extensibilidade do músculo começa a declinar e termina quando a extensibilidade alcança seu mínimo. O tempo em que ocorre o início da fase rápida é definido como **início do rigor** (*rigor onset*) e o tempo em que a extensibilidade é mínima é definido como **estabelecimento do rigor** (*rigor completion*); e
3. **Fase Pós Rigor** (*postrigor phase*): refere-se ao período em que a extensibilidade volta a ser constante, porém com valores mínimos. O músculo pós-rigor permanece inextensível até que mudanças estruturais causadas pela ação enzimática ocorram.

A medida de extensibilidade do músculo é amplamente utilizada desde os primeiros estudos sobre o rigor realizados por Bate-Smith (1939), mas hoje está em desuso. A análise física da extensão do rigor tem sido conduzida atualmente por medidas de tensão isométrica. Ao contrário do que ocorre na medida da extensibilidade, em que os músculos são avaliados pela aplicação de força constante (isotônica), na medida por tensão isométrica a tira muscular é mantida numa extensão constante (isométrico) durante todo o desenvolvimento do rigor, o

qual é avaliado pelo aumento de tensão formada devido ao encurtamento ocorrido durante o *rigor mortis* (JUNGK et al., 1967; SCHMIDT et al., 1968; BUSCH et al., 1972).

A Figura 3 ilustra o gráfico obtido durante a análise isométrica do *rigor mortis*. Da mesma forma que na medida da extensibilidade, três fases distintas podem ser observadas: **fase do atraso**, período *post-mortem* em que nenhuma tensão é desenvolvida; **fase rápida**, período em que a tensão isométrica cresce; e **fase pós-rigor**, período em que a tensão isométrica é máxima. Alguns experimentos, no entanto, notificaram que após uma tensão isométrica máxima desenvolvida, a habilidade da tira muscular de manter esta tensão na ausência de ATP é perdida e, portanto, a tensão isométrica gradualmente declina (JUNGK et al., 1967; SCHMIDT et al., 1968; BUSCH et al., 1972). Este declínio é definitivamente uma propriedade fisiológica do músculo, sendo atribuído à degradação proteolítica por enzimas endógenas, especialmente as calpaínas, e comumente referido como resolução do rigor (GOLL, 1968; GOLL et al., 1971; ABERLE et al, 2001). A participação de enzimas dependentes de cálcio (calpaínas) na resolução do rigor ficou mais clara com a observação de BUSCH et al. (1972) de que tiras de músculo *Psoas* de coelho submetidas à tensão isométrica em solução com deoxicholate 1 mM (solução detergente) e EDTA 1 mM (complexante de cálcio) apresentam um declínio extremamente pequeno após atingir a tensão máxima.

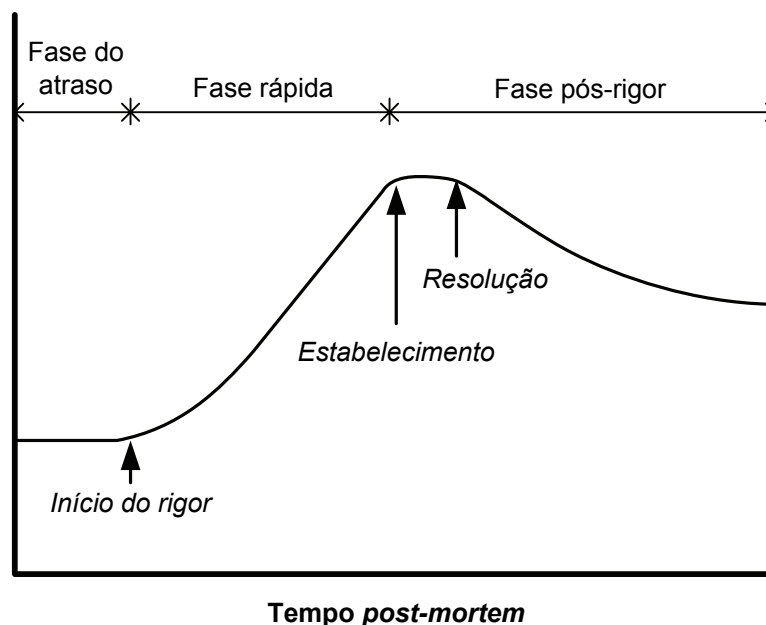


Figura 3. Desenvolvimento hipotético da tensão isométrica durante o desenvolvimento do *rigor mortis*. Fonte: ABERLE et al. (2001).

A medida da tensão isométrica possui várias vantagens sobre a análise da extensibilidade para monitorar, quantitativamente, o *rigor mortis*; a mais importante é a sua maior sensibilidade e, provavelmente, maior acuracidade em monitorar as mudanças *post-*

mortem, permitindo a detecção de mudanças que correspondem à resolução do rigor (GOLL et al., 1971; BUSCH et al., 1972), não observado nas medidas de extensibilidade (MARSH, 1954). Ao atingir a fase pós-rigor, o músculo permanece inextensível por até 48 horas, embora a tensão isométrica decresça até próximo de zero no mesmo período (BUSCH et al., 1972).

Vale ressaltar que o músculo não começa a se tornar inextensível (início do rigor) enquanto a tensão isométrica não se aproximar do valor máximo. Isto indica que a medida da fase de atraso e, conseqüentemente do início do *rigor mortis*, não é a mesma observada nas medidas de extensibilidade e de tensão isométrica. Por outro lado, a tensão isométrica máxima ocorre no mesmo tempo em que o estabelecimento do *rigor mortis* é observado pela medida de extensibilidade (SCHMIDT et al., 1970; BUSCH et al., 1972).

Em peixes, o acompanhamento físico do *rigor mortis* também pode ser realizado pelos métodos de extensibilidade e tensão isométrica. No entanto, a forma mais comum de análise é pelo Índice de Rigor (RI), em que se mede a mudança na curvatura da parte caudal quando esta é deixada suspensa. Para tal, o peixe inteiro é colocado sobre uma mesa horizontal, de forma que a metade do corpo (parte caudal) fique suspensa, como ilustrado na Figura 4. Em intervalos de tempos selecionados, obtêm-se o índice de rigor pela seguinte equação (IAWAMOTO et al., 1987):

$$RI\% = \frac{(D_0 - D_t)}{D_0} \cdot 100$$

Em que:

D_0 = distância da base da nadadeira à linha horizontal da mesa imediatamente após a morte do peixe (tempo zero);

D_t = distância da base da nadadeira à linha horizontal da mesa em determinado tempo *post-mortem*;

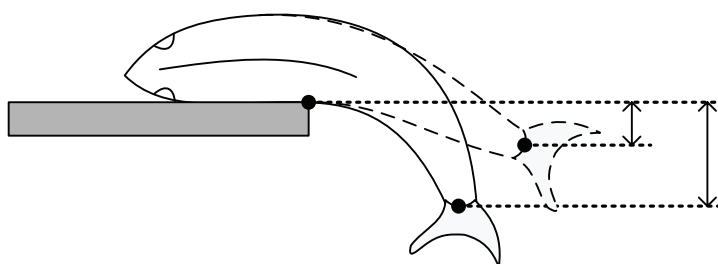


Figura 4. Avaliação do desenvolvimento do *rigor mortis* em peixes pelo método do índice de rigor. Fonte: IWAMOTO et al. (1987).

Segundo WANG et al. (1998), o RI em peixes pode ser classificado pelos seguintes critérios: (1) *Pré-rigor* (RI \leq 10%): nenhuma rigidez e com movimento total da cauda; (2) *Fase rápida* (RI $>$ 10%): início da rigidez até o *rigor pleno* (RI \geq 80%), caracterizado pela rigidez completa; e (3) *Pós-rigor*: estado após a máxima rigidez (*rigor pleno*).

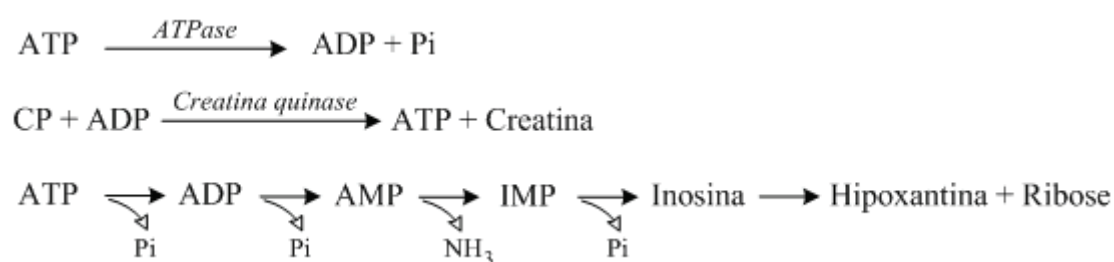
Um grande número de fatores influencia a velocidade de início e estabelecimento do *rigor mortis*, mas os primeiros determinantes são as concentrações de compostos de alta energia, como o ATP, fosfocreatina e glicogênio, no músculo após a morte (NEWBOLD, 1966). Conhecendo-se a concentração inicial destes três componentes pode-se estimar, com boa precisão, a duração do *rigor mortis* (BENDALL, 1973a).

Portanto, uma forma bioquímica de se estimar o grau de desenvolvimento do rigor é a avaliação da quantidade de compostos de alta energia, especialmente ATP e fosfocreatina (CP). Para músculos de coelho, BENDALL (1973b) observou que a queda nos níveis de ATP tem início quando a concentração de CP é menor que 4 $\mu\text{mol/g}$ de músculo. HERTZMAN et al. (1993), trabalhando com músculos bovinos, observaram que a depleção nos níveis de ATP apenas acontece quando a concentração de CP se encontra entre 1 e 2 $\mu\text{mol/g}$ de músculo, estando de acordo com resultados reportados por FABIANSSON e LASER REUTERSWÄRD (1985), também para bovinos, em que valores menores que 2 μmol de CP/g de músculos são necessários para o início da queda de ATP.

Segundo BENDAL (1973b), a fase de atraso em que o músculo permanece extensível acontece enquanto o nível de ATP for constante. À medida que se inicia o declínio da concentração de ATP, a redução na extensibilidade também tem início. Este autor postulou, ainda, que quando o nível de ATP inicial cai pela metade, corresponde a aproximadamente 50% do declínio na extensibilidade. No entanto, em estudos subseqüentes observou-se que a perda de extensibilidade tem início quando a concentração média de ATP é de 1,0 $\mu\text{mol/g}$ (HONIKEL e FISCHER, 1977; HONIKEL et al., 1981a; HAMM, 1982) e continua decrescendo até alcançar níveis abaixo de 0,1 $\mu\text{mol/g}$, quando a inextensibilidade é máxima (HONIKEL et al., 1981a e 1981b; HAMM, 1982). Em aves, o início do rigor ocorre quando o nível de ATP é reduzido a valores menores que 40% do seu valor inicial (KHAN, 1975; LYON e BUHR, 1999).

Uma forma simples de acompanhar o declínio de ATP *post-mortem* é a medida do valor R, baseado na mudança na absorvância do espectro UV que ocorre com a deaminação dos nucleotídeos de adenina a inosina (KHAN e FREY, 1971; DAVIDEK e VELISEK, 1973; HONIKEL e FISCHER, 1977). Durante as primeiras horas *post-mortem*, o nível de ATP muscular é mantido pela quebra de fosfocreatina (CP), que fosforiliza moléculas de ADP residual, presente em níveis relativamente altos, em novas moléculas de ATP. Quando as

reservas de fosfocreatina se esgotam, o nível de ATP começa a reduzir pela sua desfosforilação a ADP (liberação de fosfato inorgânico, Pi) ou AMP (liberação de pirofosfato inorgânico, PPi). O ADP formado também é desfosforilado a AMP e este, por sua vez, é deaminado, quase que instantaneamente, a inosina-5'-monofosfato (IMP). Durante a estocagem do músculo, IMP é enzimaticamente transformado (desfosforilado) a inosina (HxR). A reação seguinte é a formação da hipoxantina (Hx) pela retirada da ribose da molécula de inosina (HONIKEL e FISCHER, 1977; LAWRIE, 1998). Estas reações, representadas a seguir, resultam na rápida queda dos suprimentos de nucleotídeos de adenina do músculo e no conseqüente estabelecimento do *rigor mortis*.



O valor R é calculado como a razão das absorvâncias entre os nucleotídeos de adenina (ATP + ADP + AMP, obtida a 260 nm), e os derivados de inosina (IMP + inosina + hipoxantina, obtida a 250 nm) (DAVIDEK e VELISEK, 1973; HONIKEL e FISCHER, 1977). Assim, as mudanças que ocorrem no valor R são paralelas ao decréscimo dos níveis de ATP durante o desenvolvimento do *rigor* (JOLLEY et al., 1980). Valores de R entre 1,05 e 1,10 correspondem a uma concentração de ATP de 1,0 $\mu\text{mol/g}$ e, portanto, permite determinar o tempo de início do *rigor mortis* (*rigor onset*) do músculo analisado. Já valores de R próximos a 1,30 indicam o estabelecimento do rigor por corresponderem a um nível de ATP de aproximadamente 0,1 $\mu\text{mol/g}$ (DAVIDEK e VELISEK, 1973; HONIKEL e FISCHER, 1977; PAPINAHO e FLETCHER, 1996).

Uma vez que o pH do músculo está diretamente relacionado com a ocorrência do *rigor mortis*, a sua medida também tem sido um seguro e sensível indicador da extensão da glicólise *post-mortem* (GREASER, 1986). A amplitude e, não menos importante, a taxa de declínio do pH *post-mortem* influenciam de forma crucial a qualidade final da carne (HUFF-LONERGAN et al., 2000; SANTÉ et al., 2001). O declínio do pH muscular durante o período *post-mortem* é determinado pelas condições fisiológicas do músculo no momento do abate, se relacionando diretamente com a formação de ácido láctico, ou bioquimicamente falando, à capacidade do músculo em produzir energia (ATP) (BENDALL, 1973a). Desta forma, pode-se através da medida do pH, estimar o grau de desenvolvimento do *rigor mortis*. Conforme

anteriormente citado, a perda de extensibilidade tem início quando a concentração média de ATP é de 1,0 $\mu\text{mol/g}$ e continua decrescendo até alcançar níveis abaixo de 0,1 $\mu\text{mol/g}$, quando a inextensibilidade é máxima. Nestas concentrações de ATP, em músculos bovinos com níveis normais de glicogênio (700 mg/g) na hora da morte e mantidos a 20°C, os valores de pH se encontram em torno de 5,9 e 5,5, respectivamente (HAMM, 1982; HONIKEL et al., 1981a e 1981b).

Qualquer situação que reduza o teor *ante-mortem* de ATP, fosfocreatina e glicogênio, diminuirá a duração do período pré-rigor, que afetará, proporcionalmente, a duração da fase rápida (GUZMÁN, 1994; ABERLE et al., 2001). Os níveis de ATP e de fosfocreatina podem ser reduzidos se houver alguma agitação excessiva do animal durante as etapas de abate, e os níveis de glicogênio podem ser reduzidos por exaustivos exercícios *ante-mortem* ou por outro estresse fisiológico (NEWBOLD, 1966).

As operações que tomam parte antes e durante o abate dos animais de corte, são de extrema importância, no que se refere à qualidade final da carne de consumo, uma vez que os procedimentos utilizados neste período são invariavelmente estressantes. Dentre os fatores *ante-mortem* que afetam a composição muscular e, conseqüentemente, influenciam na qualidade final da carne, cita-se: a hereditariedade, a idade e a maturidade fisiológica, a localização do músculo, o sexo, a dieta, as condições ambientais e de manejo pré-abate, e os métodos de insensibilização (ASGHAR e PEARSON, 1980; ABERLE et al., 2001).

Conforme anteriormente citado, a etapa de insensibilização visa facilitar a sangria e diminuir o estresse do animal no momento do abate, além de constituir um abate mais humanitário. Entretanto, as diferentes formas de insensibilização diferem quanto ao grau de efetividade de redução do estresse durante o abate, o que pode ser observado pelas diferenças nas quantidades de metabólitos musculares, especialmente no teor de glicogênio, ATP, fosfocreatina e seus derivados, podendo influenciar diretamente o desenvolvimento do *rigor mortis* e, conseqüentemente, a qualidade final da carne.

2.2. Efeito da Temperatura no Desenvolvimento do Rigor

As condições para o início e estabelecimento do rigor têm influência marcante na textura, suculência e capacidade de retenção de água (CRA) da carne. Enquanto fatores como espécie, raça, idade, tipo de músculo, condições *ante* e *post-mortem*, entre outros, têm influência sobre o desenvolvimento do rigor, a temperatura é provavelmente o mais importante (JAMES e JAMES, 2002). O *rigor mortis* é tão dependente da temperatura *post-mortem* a que o músculo é submetido, que nenhuma referência ao tempo de início ou

estabelecimento do rigor de um determinado músculo e, ou, espécie animal pode ser feita sem se mencionar a correspondente temperatura de análise.

Vários trabalhos relatam a dependência das mudanças *post-mortem* e do curso do *rigor mortis* com a temperatura (MARSH, 1954; FREMERY e POOL, 1960; BRISKEY et al., 1962; CASSENS e NEWBOLD, 1967; JUNGK et al., 1967; SMITH et al., 1969; BUSCH et al., 1967 e 1972; LOCKER e DAINES, 1975; JOLLEY et al., 1981; HONIKEL et al., 1981a e 1983; IWAMOTO et al., 1987; HERTZMAN et al., 1993; FERNANDEZ e TORNBERG, 1994; PAPINAHO e FLETCHER, 1995; SIGHOLT et al., 1997; MCKEE e SAMS, 1998). De forma geral, numa faixa de temperatura de 15 a 37°C, a fase de atraso é prolongada com a redução da temperatura; mas este efeito é menos pronunciado na faixa de 1 a 15°C. A fase rápida também é prolongada com a redução de temperatura na faixa de 5 a 37°C, mas este prolongamento da fase rápida é menor entre 1 e 5°C (CASSENS e NEWBOLD, 1967). LOCKER e DAINES (1975) encontraram tempos de 7 h a 37°C, 10 h a 34°C e 28°C, 12 h a 24°C e 24 h a 15°C para o estabelecimento do rigor em músculos *sternomandibulares* de bovino. Em músculos de bovinos o desenvolvimento de tensão isométrica é máximo a temperaturas entre 1 e 2°C e menor a 37°C; porém, o desenvolvimento de tensão isométrica ocorre com menor intensidade em temperaturas entre 16 e 25°C. Já em músculos de suínos e coelhos, a tensão isométrica máxima ocorre a 37°C (BUSCH et al., 1967 e 1972). Em músculos do peito de aves, a tensão isométrica máxima ocorre tanto em temperaturas próximas de 37°C quanto em temperaturas próximas de 0°C, sendo que em temperaturas abaixo de 5°C o tempo de rigor é menor do que em temperaturas acima de 25°C (WOOD e RICHARDS, 1974).

Em peixes, a entrada em rigor ocorre em velocidade moderada, porém progressiva, desde 0°C a 17°C e, a partir deste valor, nota-se uma grande aceleração para pequenos aumentos de temperatura (GUZMÁN, 1994). IWAMOTO et al. (1987 e 1988) observaram que, no linguado americano (*Paralichthys olivaceus*), o início do *rigor mortis* é mais rápido em músculos mantidos a 0°C (6 horas) do que a 10°C (15 horas). A aceleração do rigor causada pela redução extrema da temperatura também tem sido observada em outras espécies de peixes, especialmente as tropicais (HEDGES e NIELSEN, 2000; SKJERVOLD et al., 2001). Neste sentido, a temperatura do habitat natural (mar ou água doce) tem influência marcante, apresentando os peixes de água fria um retardo, mais ou menos acentuado, no tempo de rigor com a redução da temperatura para valores próximos de zero (HEDGES e NIELSEN, 2000).

O padrão e a causa do encurtamento que ocorre nos músculos *post-mortem* a baixas temperaturas, é totalmente diferente daquele a altas temperaturas (PEARSON, 1994). Duas

condições, conhecidas como Encolhimento pelo Frio (“*Cold shortening*”) e rigor de descongelamento (“*Thaw rigor*”), têm sido reconhecidas nos anos recentes, como resultantes da baixa temperatura do músculo antes do início do *rigor mortis*.

O fenômeno do ***Encolhimento pelo Frio*** é um tipo severo de *rigor mortis* que ocorre quando o músculo pré-rigor é resfriado a temperaturas inferiores a 15-16°C. O encurtamento muscular é resultante do aumento dos níveis intracelulares de cálcio (Ca^{+2}), devido a uma incapacidade do retículo sarcoplasmático e das mitocôndrias em seqüestrar e ligar estes íons, liberados por estas organelas devido à influência de baixas temperaturas no músculo pré-rigor (NEWBOLD, 1966; ASGHAR e PEARSON, 1980; CONRFORTH et al., 1980; LOCKER, 1985; GREASER, 1986; PEARSON, 1986 e 1994; LAWRIE, 1998).

No músculo em repouso, o nível de íons Ca^{+2} no sarcoplasma é muito baixo: menos do que 10^{-7} M. A maioria do total de cálcio intracelular (10^{-3} M) se encontra estocado nas mitocôndrias e, especialmente, no retículo sarcoplasmático. O processo de contração muscular tem início quando a concentração de Ca^{+2} no sarcoplasma atinge valores da ordem de 10^{-6} a 10^{-5} M, devido a um aumento da permeabilidade da membrana do retículo sarcoplasmático ao cálcio, induzido por um estímulo nervoso. Ao cessar o estímulo, a concentração de cálcio no sarcoplasma é restabelecida pela ação da *bomba de cálcio* que, utilizando energia da quebra de ATP, passa a bombear cálcio em excesso de volta ao retículo sarcoplasmático contra o gradiente eletroquímico (CONRFORTH et al., 1980; LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001).

Dois considerações são de especial importância quanto ao mecanismo de bombeamento de cálcio. Primeiro, é plausível que os sítios de armazenamento de cálcio não sejam totalmente eficientes na retenção do íon, mesmo no músculo em repouso, e, desta forma, a bomba de cálcio tem que operar de forma contínua, embora lentamente, para manter baixos os níveis de cálcio no sarcoplasma. Segundo, o mecanismo da bomba de cálcio tem um coeficiente de temperatura extremamente alto, de forma que a temperaturas de 2 e 10°C este mecanismo trabalha em taxas de 1000 e 200 vezes menores que a taxa de trabalho a 38°C, respectivamente (Bendall, 1974, citado por JAMES e JAMES, 2002). Assim, há um aumento na concentração de Ca^{+2} no sarcoplasma à medida que a temperatura cai, especialmente em valores abaixo de 10°C (JAMES e JAMES, 2002).

Tem sido observado que a redução da temperatura muscular para valores inferiores a 15°C, assim como a redução do pH muscular, leva a um aumento da permeabilidade das membranas das mitocôndrias e do retículo sarcoplasmático ao cálcio, causado por alterações do sistema lipoprotéico das membranas destas organelas (CASSENS e NEWBOLD, 1967; CONRFORTH et al., 1980; WHITING, 1980). Estas observações também têm sido

constatadas em músculos de peixes, que têm seu rigor acelerado com a redução da temperatura *post-mortem* para valores próximos de zero (IWAMOTO et al., 1988).

A associação destes dois fatores (maior permeabilidade ao cálcio e menor atividade da bomba de cálcio) induzidos pela temperatura, faz com que a concentração de Ca^{+2} no espaço miofibrilar se eleve, resultando no aumento do consumo de ATP, devido à maior atividade da ATPase miofibrilar (Mg^{+2} -ATPase) na presença de Ca^{+2} , desencadeando o processo de contração muscular antes do início do *rigor mortis*. A energia necessária para o encurtamento muscular é, então, suprida pelo aumento da síntese de ATP, que é acompanhada pela aceleração da glicólise (WHITING, 1980; HAMM, 1982; JAMES e JAMES, 2002). Assim, a aceleração do tempo de rigor observada em músculos de vertebrados e de algumas espécies de peixe com o abaixamento da temperatura a valores inferiores a 15°C é causada pelo fenômeno do Encolhimento pelo Frio.

O Encolhimento pelo Frio gera maior dureza da carne por produzir maior formação de complexo actomiosina, gerando maior compactação do sarcômero e, conseqüentemente, maior contração muscular. Uma vez que este fenômeno ocorre rapidamente em pH e níveis de ATP ainda elevados (normalmente pH maiores que 6,7 e níveis de ATP de 5 a 6 $\mu\text{mol/g}$ contra pHs próximos a 5,75, e níveis de ATP inferiores a 1 $\mu\text{mol/g}$ no encolhimento pelo *rigor mortis*), os músculos sujeitos a este fenômeno também sofrerão uma segunda contração quando atingirem a fase de depleção rápida de ATP, o que se traduzirá no maior desenvolvimento de tensão e encolhimento (GREASER, 1986). Segundo ASGHAR e PEARSON (1980), o encurtamento do músculo pré-rigor, estimulado pelo frio, resulta numa perda de maciez da ordem de 2 a 3 vezes maior que no encolhimento pelo rigor.

O ***Rigor de Descongelamento*** é um processo similar ao Encolhimento pelo Frio, porém mais severo, que ocorre quando se descongela músculos congelados pré-rigor. O fenômeno parece ser devido a um excessivo fluxo salino durante o descongelamento, resultando num acúmulo de cálcio no meio intracelular e conseqüente encurtamento muscular, com redução da maciez e perda excessiva de exsudado da carne (ASGHAR e PEARSON, 1980; LOCKER, 1985; PEARSON, 1994; LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001).

2.3. Tipo de Fibra Muscular e Desenvolvimento do Rigor

O início e estabelecimento do *rigor mortis* varia para cada espécie animal e mesmo para diferentes músculos em um mesmo animal (GREASER, 1986; ABERLE et al., 2001). O tempo médio necessário para o início do *rigor mortis* em bovinos é de 18 horas, sendo observada uma variação de 8 a 30 horas. Em ovinos este tempo também é alto, cerca de 10 a

20 horas, com média em 12 horas. Para suínos tempos de 0,6 a 8 horas são necessários, com média de 3 horas (Offer et al., 1988, citado por JAMES e JAMES, 2002). Em frangos e perus o tempo para o início do rigor também é de 3 a 4 horas (LYON e BURH, 1999), embora tempos menores que 1 hora tenham sido reportados (ABERLE et al., 2001). Existe uma grande variação quanto ao *rigor mortis* entre as espécies de peixe. Algumas espécies entram em rigor rapidamente, atingindo o estabelecimento em 1 hora após a morte. Outras demoram tempos de 2 a 8 horas para o início do *rigor mortis*, sendo inclusive reportados tempos de até 22 horas em algumas espécies (OGAWA e OGAWA, 1999).

A variação observada dentro das espécies é oriunda da dependência do rigor para vários fatores, como mencionado anteriormente. No caso de peixes, esta variação é especialmente acentuada por se tratar de um grupo com inúmeras espécies de características diferenciadas, em que os fatores envolvidos são mais numerosos ou proeminentes, como: composição química corporal, fisiologia, grau de exaustão (devido à forma de captura e abate), tamanho do peixe, temperatura da água ambiente (animais pecilotérmicos), origem (cultivados ou nativos) e temperatura *post-mortem*. Destes fatores, a temperatura é, provavelmente, o fator de maior influência e participação nas variações encontradas na literatura. Conforme anteriormente mencionado, o rigor pode ser retardado ou acelerado, dependendo da espécie, com a redução da temperatura para valores próximos de zero, prática corriqueira na comercialização de peixes, devido a sua alta perecibilidade.

Já as variações observadas entre diferentes espécies são atribuídas às propriedades *post-mortem* dos músculos, principalmente ao teor de fibras brancas e vermelhas. As fibras vermelhas são mais ricas em mioglobina, mitocôndrias e lipídios (CASSENS e COOPER, 1971) e, portanto, possuem maior reserva de oxigênio do que as fibras brancas, podendo produzir energia por mais tempo pela via aeróbia, utilizando também como substrato os lipídeos, com conseqüente retardo do acionamento da via anaeróbia, queda do pH e prolongamento da instalação do *rigor mortis* (LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001). Em contraste, as fibras brancas possuem maior capacidade para a realização dos processos glicolíticos, apresentando uma maior reserva de glicogênio (CASSENS e COOPER, 1971) e utilizando, preferencialmente, o mecanismo anaeróbio (LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001).

Embora a explicação quanto à diferenciação de fibras para diferenças observadas no rigor entre espécies pareça ser pertinente, comparações entre músculos com diferentes proporções de fibras brancas e vermelhas dentro de uma mesma espécie tem demonstrado resultados contraditórios.

BRISKEY et al. (1962), através da medida de extensibilidade, observaram que a fase de atraso é maior em músculos de suínos com maior proporção de fibras brancas. Seus resultados também evidenciaram que, embora músculos com predominância de fibras vermelhas apresentem uma fase rápida mais prolongada, o *rigor mortis* se estabelece mais tarde em músculos com maior proporção de fibras brancas. Outros autores também observaram um maior tempo para o estabelecimento do rigor, avaliados pelo método da tensão isométrica, em músculos suínos (BUSCH et al., 1972) e bovinos (BUSCH et al., 1967) com maior predominância de fibras brancas.

Avaliando músculos bovinos, HERTZMAN et al. (1993) também observaram um maior tempo para o início do rigor (maior fase de atraso) em músculos com predominância de fibras brancas.

Em aves, o *rigor mortis* não só inicia mais cedo em músculos vermelhos da coxa como também se estabelece antes dos músculos brancos do peito (KIJOWSKI et al., 1982). Este comportamento também foi observado por SAMS e JANKY (1991), em que músculos de frangos com metabolismo essencialmente aeróbio (*Anterior latissimus dorsi* e *Satorius*) apresentaram um menor tempo para o estabelecimento do rigor do que em músculos com predominância do metabolismo anaeróbio (*Pectoralis superficialis* e *Posterior latissimus dorsi*). Estes autores ainda chamam a atenção para o fato de que o tempo para o desenvolvimento do rigor avaliado pela medida do encolhimento isotônico não coincidiu com as mudanças nos parâmetros bioquímicos (valor R, glicogênio, ácido láctico) também avaliados.

Estas constatações indicam que diferenças intrínsecas no metabolismo muscular e características do tecido são mais importantes do que as diferenças na concentração de pigmentos (BRISKEY et al., 1962). Tem sido sugerido que a maior duração da fase de atraso em músculos com predominância de fibras brancas é devido à maior capacidade destes músculos em produzir ATP *post-mortem* na ausência da circulação sanguínea e suprimento de oxigênio (SAMS e JANKY, 1991). Neste sentido, a determinação da capacidade tamponante do músculo torna-se um parâmetro de suma importância.

A taxa e extensão do declínio do pH *post-mortem* é dependente primeiramente dos níveis de glicogênio e compostos ricos em fosfatos imediatamente após a morte, da taxa de síntese de ATP e, também, da capacidade tamponante do tecido (PUOLANNE e KIVIKARI, 2000). Os diferentes músculos estão bem adaptados à sua função. Assim, a capacidade tamponante mantém o pH em níveis que permitam a efetiva ação de enzimas vitais ao metabolismo do tecido. De forma geral, a capacidade tamponante é maior em músculos com maior metabolismo glicolítico, maior diâmetro e capilarização deficiente, ou seja, músculos

com maior predominância de fibras brancas (metabolismo anaeróbico) (POULANNE et al., 2002). Isto é consistente, uma vez que o produto final do metabolismo glicolítico é o ácido láctico, que, ao se acumular no músculo, causa a queda do pH *post-mortem*. Desta forma, as fibras brancas precisam de um mecanismo tamponante mais efetivo do que as fibras vermelhas (OLSMAN e SLUMP, 1981).

A capacidade tamponante também varia com as mudanças no pH *post-mortem*, estando intimamente correlacionada com o acúmulo de ácido láctico no músculo (Kivikari, 1996, citado por MOLETTE et al., 2003). De fato, dentro do limite de pH 7,0 a 5,5 a concentração de ácido láctico no músculo é de longe a mais importante variável na determinação do valor do pH em qualquer tempo (POULANNE et al., 2002). Tem sido reportado que a capacidade tamponante aumenta com o tempo *post-mortem* em músculos de suínos (SAYRE et al., 1963) e de perus (MOLETTE et al., 2003), enquanto em músculos bovinos permanece estável (Honikel e Hamm, 1974, citado por MOLETTE et al., 2003). As reações *post-mortem* causam um aumento na capacidade tamponante da ordem de 8 a 10% (POULANNE et al., 2002).

O pH final da carne é, portanto, função da quantidade de ácido láctico produzido e da capacidade tamponante do músculo. A capacidade tamponante é a habilidade da carne em resistir a mudança de pH quando ácido ou álcali é adicionado (POULANNE e KIVIKARI, 2000). Os mesmos compostos que regulam o pH no músculo vivo também o regulam no músculo *post-mortem*. Dentre os compostos que mais afetam a capacidade tamponante de músculos de diferentes espécies na faixa de pH entre 5,5 e 7,0 citam-se: (1) compostos de fosfato com valores de pK_a entre 6,1 e 7,1; (2) resíduos de histidilimidazol nas proteínas miofibrilares; e (3) dipeptídeos contendo histidina, como a carnosina, anserina e balenine (SEWELL et al., 1992; ABE 2000; KYLÄ-PUHJU et al., 2004). As proteínas miofibrilares são responsáveis por, aproximadamente, metade da capacidade tamponante da carne na faixa de pH entre 5,5 e 7,0 (Honikel e Hamm, 1974, citado por KYLÄ-PUHJU et al., 2004). A grande diferença entre a capacidade tamponante de vários músculos é devido ao fato das fibras brancas conterem maior quantidade de compostos de histidina do que os músculos vermelhos (OLSMAN e SLUMP, 1981; ABE 2000; POULANNE e KIVIKARI, 2000), especialmente no músculo vivo (OKUMA e ABE, 1992; ABE 2000).

Embora a capacidade tamponante varie com a espécie e com o tipo e proporção de fibra muscular presente, a maioria dos músculos apresenta valores entre 40 e 60 mmol H^+ /Kg.pH (Kivikari, 1996, citado por POULANNE et al., 2002). Assim, pode-se calcular que um declínio no pH muscular de 7,0 a 5,5 requer a formação de 60 a 80 mmol de ácido

lático/kg de músculo, dependendo da espécie animal e tipo de fibra muscular predominante (PUOLANNE e KIVIKARI, 2000; POULANNE et al., 2002).

Os valores da capacidade tamponante reportados para músculos bovinos são ligeiramente menores e menos variáveis que os reportados para suínos, embora uma comparação direta somente possa ser feita se a forma de análise for rigorosamente a mesma (POULANNE et al., 2002). Da mesma forma, valores observados para músculos de aves são ligeiramente maiores quando comparados com suínos (Tabela 1).

Tabela 1. Capacidade tamponante (CT) média de diferentes músculos* na faixa de pH entre 5,5 e 7,0

Espécie/músculo	CT (mmol H⁺/kg.pH)
Bovino	
<i>Longissimus dorsi</i>	51
<i>Triceps brachii</i>	48
Suíno	
<i>Longissimus dorsi</i>	52
<i>Triceps brachii</i>	45
Frango	
Músculo (branco) do peito	58
Músculo (vermelho) da coxa	41

*O músculo *longissimus dorsi* contém maior proporção de fibras brancas do que vermelhas, quando comparado com o *triceps brachii*. Já os músculos do peito e da coxa de frangos diferem grandemente em suas características fisiológicas. Os músculos do peito contêm quase que exclusivamente fibras brancas, enquanto que o músculo da coxa apresenta maior predominância de fibras vermelhas.

Fonte: PUOLANNE e KIVIKARI (2000).

Outra importante constatação é a de que músculos que contêm grandes proporções de fibras vermelhas são altamente susceptíveis à ocorrência do Encolhimento pelo Frio, enquanto que aqueles ricos em fibras brancas parecem apresentar uma maior resistência (CASSENS e NEWBOLD, 1967; ASGHAR e PEARSON, 1980; GREASER, 1986; PEARSON, 1986 e 1994; LAWRIE, 1998; ABERLE et al. 2001).

Conforme anteriormente discutido, não parece haver dúvidas de que o “gatilho” para a ocorrência dos fenômenos de Encolhimento pelo Frio e Rigor de Descongelamento é a liberação de Ca⁺² no sarcoplasma. A questão é de onde este cálcio se origina? Duas organelas parecem estar envolvidas: o retículo sarcoplasmático e a mitocôndria; ambas com capacidade considerável em armazenar cálcio.

Foi postulado que a reabsorção dos íons Ca^{+2} liberados no sarcoplasma pode ser mais efetivo em músculos com predominância de fibras brancas, por apresentarem um retículo sarcoplasmático relativamente mais desenvolvido (LAWRIE, 1998; PEARSON, 1986). Por ser mais desenvolvido, o retículo sarcoplasmático destas fibras também seria menos susceptível ao efeito da temperatura, restando maior quantidade de Ca^{+2} (LAWRIE, 1998).

Buege e Marsh (1975), citados por LOCKER (1985), observaram que músculos “vermelhos” não sofrem o fenômeno do Encolhimento pelo Frio quando resfriados a temperaturas inferiores a 15°C , se adequadamente supridos com oxigênio. Esta resistência foi anulada com o uso de reagentes que inibiam a síntese oxidativa do ATP. Estes autores então concluíram que a condição de anaerobiose causa a liberação de Ca^{+2} da mitocôndria numa taxa muito maior do que esta e o retículo sarcoplasmático possam reabsorver. Uma vez que músculos “vermelhos” contêm uma quantidade maior de mitocôndrias do que músculos “brancos”, esta observação tem relação significativa com a susceptibilidade destes dois tipos de músculos ao Encolhimento pelo Frio (LOCKER, 1985; LAWRIE, 1998).

Em estudo conduzido com músculos bovinos, sob condições em que o retículo sarcoplasmático foi excluído, MICKELSON (1983) demonstrou que a mitocôndria não libera íons Ca^{+2} no período pré-rigor e, portanto, a anoxia *per se* não causa esta liberação, desde que exista ATP suficiente disponível para suportar a reabsorção de Ca^{+2} pela mitocôndria. A liberação de Ca^{+2} induzida pelo frio na mitocôndria é muito mais limitada do que no retículo sarcoplasmático, e o fosfato inorgânico não acentua a reabsorção deste íon por estas organelas (Newbold, 1980, citado por LAWRIE, 1998). Uma vez que a concentração de proteínas carreadoras de cálcio na mitocôndria é muito menor quando comparado com a capacidade do mecanismo de captura de cálcio do retículo sarcoplasmático, o envolvimento do Ca^{+2} liberado da mitocôndria pela indução do frio, parece ser bem menos significativo do que mudanças na concentração de Ca^{+2} entre o sarcoplasma e o retículo sarcoplasmático (Greaser, 1977, citado por LAWRIE, 1998).

As evidências apontam claramente para uma participação das duas organelas e, portanto, a não ocorrência, ou ocorrência em menor grau, do Encolhimento pelo Frio em músculos com predominância de fibras brancas. Nos músculos em que predominam fibras brancas, a menor propensão ao Encolhimento pelo Frio parece ser devido à sua menor concentração e tamanho de mitocôndrias e a um retículo sarcoplasmático bem mais desenvolvido do que nas fibras vermelhas (CASSENS e NEWBOLD, 1967; ASGHAR e PEARSON, 1980; GREASER, 1986; PEARSON, 1994; LAWRIE, 1998).

No entanto, a relação destes fenômenos (Encolhimento pelo Frio e Rigor de Descongelamento) com a fibra muscular ainda não está completamente definida, uma vez que

músculos de avestruz, que são “vermelhos”, contendo inclusive maior quantidade média de mioglobina do que músculos de bovinos, não são, aparentemente, susceptíveis ao Encolhimento pelo Frio (SALES e MELLETT, 1996). Novamente, tem-se uma indicação de que diferenças intrínsecas no metabolismo e características do músculo, inclusive para diferentes espécies, são mais importantes do que as diferenças na concentração de pigmentos.

Embora a ocorrência do Encolhimento pelo Frio ou Rígor de Descongelamento seja de suma importância para a qualidade da carne obtida de espécies animais que contêm grande quantidade de fibra vermelha, como bovinos e ovinos, estudos têm demonstrado que estes fenômenos também são relevantes em outras espécies, como frangos, perus e suínos (LOCKER, 1985). Músculos de coelho (LOCKER, 1985; PEARSON, 1986), no entanto, assim como de avestruz (SALES e MELLETT, 1996), parecem não ser afetados por estes fenômenos.

O tipo de fibra predominante na musculatura do animal tem influência sobre as características de qualidade da carne, seja afetando a maciez, via os fenômenos acima citados, seja afetando a textura, suculência, cor, sabor e rendimento de carne, devido a diferenças na sua composição química e bioquímica (GREASER, 1986; PEARSON, 1994). Assim, a evolução do tipo de fibras durante o desenvolvimento do animal, em especial a relação fibras brancas e vermelhas, pode influenciar na qualidade da carne obtida, fornecendo implicações diretas na sua forma de processamento e armazenamento.

A carne de anfíbios, em especial os ranídeos, apresenta-se com aspecto predominante de fibras brancas mas, embora a literatura quantifique estas fibras e estabeleça diferenças nesta relação entre espécies e modelos comportamentais, não foram encontrados trabalhos relacionando a diferenciação das fibras ao longo do desenvolvimento do animal.

Autores citados por PUTNAM e BENNETT (1983) discorrem sobre a capacidade funcional dos músculos de organismos que geralmente combinam seus modelos comportamentais de atividade. Assim, animais pouco movediços, que contam com metabolismo aeróbio, têm uma grande proporção de fibras musculares oxidativas de contração lenta, e animais de movimentos rápidos, que engajam em explosões de atividade e contam com metabolismo glicolítico, têm uma grande proporção de fibras brancas, glicolíticas, com rápida velocidade contrátil.

Em estudo histoquímico com músculos de vertebrados, OGATA e MORI (1963) categorizaram as fibras musculares de répteis e anfíbios como vermelhas, mostrando alta atividade das enzimas oxidativas; fibras médias, com moderada atividade; e fibras brancas com baixa atividade dessas enzimas. Os autores afirmam a existência destes três tipos de

fibras musculares, claramente distinguidos por suas diferenças de atividade das enzimas oxidativas.

Em todos os estudos de músculos locomotores, efetuados por PUTNAM e BENNETT (1983) das espécies *Bufo*, *Rana* e *Xenopus*, foi definido que de 80% a 90% da área muscular consiste de fibras brancas e os respectivos 20% e 10% remanescentes são compostos de fibras intermediárias. Em músculos de *Rana*, as fibras vermelhas foram avaliadas em menos de 1% da área de seção transversal. Segundo OGATA e MORI (1963), o músculo de rãs hibernantes mostra baixa atividade em todas as enzimas oxidativas. Em relação aos constituintes, a fibra muscular branca apresenta 3,7 vezes mais glicogênio e duas vezes mais fosfato e fosfocreatina do que o músculo vermelho.

Assim, o conhecimento do tempo de instalação do *rigor mortis* é importante para se maximizar algumas características importantes de qualidade da carne, especialmente a sua maciez e as capacidades de retenção de água (CRA) e emulsificante (CE), uma vez que o resfriamento e congelamento da carne antes que o rigor se instale (pré-rigor) leva aos fenômenos de Encolhimento pelo Frio e Rigor de Descongelamento, respectivamente, o que compromete estes parâmetros de qualidade.

MOURA (2000) verificou que a instalação do *rigor mortis* em rãs-touro tem início entre 8 e 12 horas *post-mortem*, dependendo do tipo de insensibilização aplicada. Este tempo é considerado elevado, visto que, em se tratando de um animal com predominância aparente de fibras brancas, era esperado que o *rigor mortis* ocorresse em tempos próximos do que ocorre com peixes e aves, cerca de 1 a 2 horas. Segundo o autor, este tempo de rigor prolongado pode ser oriundo das características metabólicas da musculatura da rã.

No entanto, a caracterização do *rigor mortis* realizado por MOURA (2000) foi baseada apenas na medida do valor R, razão entre a concentração de nucleotídeos derivados de inosina (IMP, inosina e hipoxantina) e os derivados de adenosina (ATP, ADP e AMP), sendo necessária uma caracterização mais precisa da conversão do músculo em carne para elucidar as particularidades da carne de rã, permitindo um melhor direcionamento nas suas etapas de obtenção e comercialização, com vistas à melhor qualidade do produto final, e contribuindo com informações pertinentes para o desenvolvimento de produtos derivados.

2.4. Estimulação Elétrica e Desenvolvimento do Rigor

A constatação de que os fenômenos de Encolhimento pelo Frio e rigor de descongelamento estão relacionados com a liberação excessiva de Ca^{+2} para o meio intracelular, quando ainda existem reservas de energia (ATP) suficientes para promover o

encurtamento muscular, permitiu a conclusão de que o aumento da taxa de glicólise *post-mortem* ou a exaustão das reservas de glicogênio e fosfocreatina, enquanto a temperatura da carcaça ainda é alta (15 a 20°C), podem reduzir as fontes energéticas do músculo a níveis críticos, minimizando ou mesmo prevenindo os efeitos causados por estes fenômenos. Isto pode ser obtido mantendo-se as carcaças a temperaturas de 15-16°C até o início do *rigor mortis*, de modo que a taxa glicolítica e o consumo de ATP e, conseqüentemente, a instalação do rigor, sejam acelerados. Entretanto, a manutenção da carne a estas temperaturas a torna mais susceptível à proliferação microbiana, além de requerer um maior espaço físico nas câmaras, onerando o processo (ASGHAR e PEARSON, 1980; PEARSON, 1986 e 1994).

Atualmente, o método mais difundido nos abatedouros para se prevenir os fenômenos de Encolhimento pelo Frio e Rigor de Descongelamento, assegurando a maciez e a qualidade das carnes vermelhas, é a estimulação elétrica da carcaça durante o abate. Este método tem demonstrado ser bastante efetivo, não somente na melhoria da maciez, mas também na melhoria da cor, sabor e grau de marmorização da carne magra, além de prevenir o desenvolvimento do chamado “anel de aquecimento” (aparência no lombo de dois tons de cores com um anel escuro na extremidade) e reduzir o tempo de maturação da carne (ASGHAR e PEARSON, 1980; STIFFLER et al., 1982; PEARSON e DUTSON, 1985; SMITH, 1985; PEARSON, 1994; ABERLE et al., 2001).

Embora os primeiros relatos da aplicação da estimulação elétrica no amaciamento de carnes datem de 1749, existindo, inclusive, uma patente registrada nos EUA no ano de 1951, o seu uso somente foi difundido após intensas pesquisas realizadas, principalmente na Nova Zelândia, na década de 70. Em 1978 foi desenvolvido o primeiro estimulador elétrico comercial, permitindo que esta tecnologia fosse rapidamente difundida na indústria de carnes (CROSS, 1979; STIFFLER et al., 1982; CHRYSTALL e DEVINE, 1985).

O processo baseia-se na indução da aceleração da contração muscular *post-mortem*, pela aplicação de um estímulo elétrico externo, que leva a um consumo mais rápido das reservas de ATP musculares, acelerando a glicólise e, conseqüentemente, o início do *rigor mortis*. Permite-se, assim, o aumento na taxa de resfriamento das carcaças, sem que se incorra nos fenômenos estimulados pelo frio (STIFFLER et al., 1982; CHRYSTALL e DEVINE, 1985; PEARSON e DUTSON, 1985).

O aumento da maciez da carne induzida pelo uso da estimulação elétrica também é atribuído a dois outros mecanismos. O primeiro está relacionado ao aumento pronunciado da queda do pH muscular em carnes estimuladas eletricamente enquanto a temperatura da carcaça ainda é alta. Esta circunstância favorece a liberação das enzimas proteolíticas naturais da carne presentes nos lisossomos, que degradam as proteínas responsáveis pela estrutura

muscular acelerando o processo de maturação e favorecendo a maciez. O segundo mecanismo pelo qual a estimulação elétrica aumenta a maciez da carne foi observado quando micrografias de músculos estimulados eletricamente revelaram danos estruturais nas fibras musculares. A excessiva contração muscular a que é submetido o músculo quando estimulado por altas voltagens causa rupturas (efeito mecânico) na estrutura fibrilar que também contribuem para uma maior maciez da carne (ASGHAR e PEARSON, 1980; STIFFLER et al., 1982; PEARSON e DUTSON, 1985; ABERLE et al., 2001).

Além do efeito na melhoria da maciez da carne, a estimulação elétrica traz rápidos benefícios para o desenvolvimento de outras características qualitativas da carcaça.

Painéis sensoriais têm revelado um aumento significativo nos escores de sabor em carnes de carcaças em que se utilizou a estimulação elétrica quando comparado com carnes de carcaças não estimuladas (CALKINS et al., 1980 e 1982; SMITH, 1985). Aparentemente, ao acelerar o processo de maturação, a aplicação da estimulação elétrica libera compostos químicos responsáveis pelo sabor e aroma característicos da carne maturada, bem como os potencializadores do sabor, como a inosina monofosfato (IMP) e a hipoxantina, favorecendo sua qualidade sensorial (CALKINS et al., 1982; SMITH, 1985).

Também se tem observado uma melhora na coloração vermelha brilhante do músculo de bovinos 18-24 horas *post-mortem*, que se apresenta mais clara e atrativa (STIFFLER et al., 1982; SMITH, 1985; EIKELENBOOM et al., 1985). Acredita-se que as reações *post-mortem* são necessárias para se alcançar uma cor desejável no músculo e, desta forma, ao acelerar a glicólise, a estimulação elétrica simplesmente faz com que a cor da carne esteja mais próxima do que estaria no final do processo (STIFFLER et al., 1982; SMITH, 1985). Este efeito na melhoria da cor da carne com a aplicação da estimulação elétrica também foi observado em carcaças de ovinos, caprinos (STIFFLER et al., 1982) e veados (WIKLUND et al., 2001). Entretanto, a estimulação elétrica parece ter um efeito deletério na cor da carne de suínos (STIFFLER et al., 1982; SMITH, 1985), o que parece estar associado à indução da anomalia PSE¹.

Uma melhora na visualização da gordura de marmoreio de carcaças, 24 horas *post-mortem* durante a tipificação, também tem sido atribuído à estimulação elétrica. Sabe-se que uma meia-carcaça apresenta melhores pontuações de gordura de marmoreio se, após a exposição do músculo, esta for avaliada após um período de resfriamento maior do que a sua outra meia-carcaça. Aparentemente, o maior desenvolvimento do marmoreio em carcaças eletricamente estimuladas avaliadas um dia após o abate é similar ao observado em carcaças avaliadas após uma semana de armazenamento. Assim, a estimulação elétrica, ao conferir

¹ PSE = condição anormal da carne, que se apresenta pálida, flácida e exsudativa.

uma melhor textura e uma cor mais clara ao músculo, confere um maior contraste na aparência da gordura, permitindo um maior escore sensorial. Diferenças em meias-carcaças, estimulada e não-estimulada, são mínimas ou não existem se, com os músculos expostos, forem resfriadas por mais de 48 horas (STIFFLER et al., 1982; SMITH, 1985).

De forma geral, existem dois tipos de estimulação elétrica que podem ser aplicados: a de baixa voltagem e a de alta voltagem.

A estimulação elétrica de baixa voltagem utiliza voltagens da ordem de 35 a 70V, geralmente aplicadas em bovinos com eletrodos presos às narinas do animal. Trata-se de um método mais seguro para os funcionários, porém de eficiência limitada à integridade física do sistema nervoso central (SNC) do animal, uma vez que baixas voltagens apenas estimulam o cérebro e o SNC a executar a contração muscular. Desta forma, para ser efetiva, a estimulação elétrica de baixa voltagem deve ser aplicada no máximo 10 minutos após a insensibilização, sendo a área de sangria o local mais apropriado, e mais comumente utilizado. O efeito da estimulação elétrica de baixa voltagem na maciez é basicamente devido à aceleração da glicólise *post-mortem*. Já a estimulação elétrica de alta voltagem utiliza valores de voltagem muito maiores (acima de 400 V) e, portanto, necessita de sistemas de segurança eficazes para evitar riscos de acidentes no abatedouro. Uma vez que não depende do SNC do animal, pode ser usada num tempo *post-mortem* maior (até uma hora após a insensibilização), mesmo quando aplicada após a evisceração. Altas voltagens permitem uma estimulação direta e uniforme através de toda a carcaça, com seu efeito sobre a qualidade da carne oriunda não apenas da aceleração da glicólise, mas também devido a rupturas nas fibras musculares causadas pelas extensivas distensões e violentas contrações (SAVELL, 1985).

A estimulação elétrica tem sido usada com sucesso no abate de animais com predominância de fibras vermelhas, especialmente bovinos, mais susceptíveis aos fenômenos do Encolhimento pelo Frio e Rigor de Descongelamento. A aplicação da estimulação elétrica na obtenção de carnes de animais de fibras brancas tem sido estudada devido à necessidade cada vez maior da indústria em resfriar e desossar a carcaça mais rapidamente. No entanto, a efetividade da aplicação da estimulação elétrica no abate de suínos e aves ainda é inconclusivo.

O fenômeno de Encolhimento pelo Frio é raro na obtenção da carcaça de suínos, ocorrendo, no entanto, em maior frequência quando do uso da desossa quente (HUFF-LONERGAN, 2001). A desossa quente envolve a desossa da carne ou remoção dos cortes principais da carcaça ainda pré-rigor. Embora esta prática permita uma redução dos custos de produção, por necessitar de menor espaço na câmara e menor remoção de energia térmica durante o resfriamento, pode resultar num aumento na dureza da carne devido à rápida queda

da temperatura muscular quando os cortes são resfriados (OWENS e SAMS, 1997; SAMS, 1999), como também devido à ausência da restrição imposta pelo esqueleto ao encolhimento muscular.

Para se evitar o Encolhimento pelo Frio, aconselha-se não resfriar as carcaças de suínos a temperaturas abaixo de 5°C enquanto o pH muscular for maior do que 6,0 (HUFF-LONERGAN, 2001). Quando do uso de desossa quente, recomenda-se que os cortes suínos não sejam resfriados a temperaturas inferiores a 15°C enquanto o pH do músculo for maior que 6,2 (HONIKEL, 1999).

Assim, a utilização da estimulação elétrica no abate de suínos permite que a carcaça seja obtida, desossada e processada mais rapidamente, reduzindo os requerimentos de espaço na estocagem refrigerada e eliminando os problemas oriundos dos fenômenos estimulados pelo frio. Entretanto, a sua aplicação parece aumentar os riscos da perda de qualidade da carne (GREGORY, 2000).

HALLUND e BENDALL (1965) foram os primeiros a observar que a estimulação elétrica em suínos resulta no aumento da incidência de carnes PSE, sendo confirmada por trabalhos mais recentes (GIGIEL e JAMES, 1984; BOWKER et al., 1999; MARIBO et al., 1999; TAYLOR e TANTIKOV, 1992; WARRISS et al., 1995). No entanto, esta relação parece depender do tipo (baixa ou alta voltagem) e condição de aplicação (tempo após a morte e uso de refrigeração rápida).

No caso do uso da estimulação elétrica por baixas voltagens, aplicada durante ou imediatamente após a sangria, os resultados são bastante variáveis quanto à maciez mas, em geral, induz um aumento na perda por gotejamento e na proporção de carne PSE (GIGIEL e JAMES, 1984; TAYLOR e TANTIKOV, 1992) e, por isso, seu uso não tem sido recomendado (MARIBO et al., 1999). Em contraste, a aplicação da estimulação elétrica 20 minutos *post-mortem* em combinação com um resfriamento rápido melhora a maciez da carne suína sem aumentar a perda por gotejamento, seja pela aplicação de alta (TAYLOR e TANTIKOV, 1992; TAYLOR et. al, 1995) ou baixa (TAYLOR e MARTOCCIA, 1995) voltagem. Aparentemente, se a estimulação elétrica for aplicada após 20 minutos *post-mortem* não há perdas significativas por gotejamento (ROSENVOLD e ANDERSEN, 2003). Na prática, o grande risco é a estimulação excessiva da carcaça, o que fatalmente acarretará na condição PSE (GREGORY, 2000).

Também existe um interesse das indústrias de abate de aves em acelerar o processo de desossa e filetagem das carcaças sem, no entanto, afetar a qualidade da carne. A possibilidade de se desossar partes nobres, em especial o peito, imediatamente após a etapa de pré-resfriamento permite aumentar a eficiência de produção e reduzir o espaço necessário e os

custos com energia associados à etapa de maturação das carcaças ou cortes específicos. A maturação é o procedimento de estocagem, sob temperatura refrigerada ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), dos cortes ou carcaças por algumas horas antes da desossa, para permitir o desenvolvimento do *rigor mortis* (SAMS, 1999). Estudos reportaram que a desossa e filetagem de cortes de frango antes do início do *rigor mortis* causa uma perda na maciez da carne, que é atribuída a três fatores: 1) a uma estimulação física natural de encolhimento causado pela desossa e filetagem; 2) a uma perda da resistência ao encolhimento conferida pela estrutura óssea; e, finalmente, 3) ao Encolhimento pelo Frio, ocasionado pela queda mais rápida da temperatura dos cortes filetados, uma vez que estes possuem uma maior área de troca térmica, menor massa e ausência da pele que atua como isolante (STEWART et al., 1984; LYON et al., 1985; BILGILI et al., 1989). Uma vez que o início do *rigor mortis* em aves ocorre entre 2 e 4 horas *post-mortem*, um período de maturação de pelo menos 4 horas tem sido apontado como necessários para se evitar a perda de maciez (STEWART et al., 1984; LYON et al., 1985). Entretanto, por uma margem de segurança ou mesmo por logística (como mudança de turnos) tempos de 6 a 8 horas de maturação tem sido usados (SAMS, 1999).

Dentro deste contexto, a estimulação elétrica de carcaças de frango tem sido estudada como forma de acelerar a taxa de desenvolvimento do *rigor mortis*, permitindo a redução, ou mesmo eliminação, do tempo de estocagem refrigerada antes da desossa das peças.

Atualmente, os vários métodos de estimulação elétrica em aves existentes podem ser agrupados em dois sistemas: 1) os que utilizam baixa amperagem (até 200 mA por ave); e 2) os de alta amperagem (350 a 500 mA por ave). Ambos os sistemas induzem a contração muscular (exercitando o músculo e acelerando o rigor), mas nos de baixa amperagem não é possível reduzir o tempo de estocagem refrigerada a ponto de eliminar a etapa de maturação, embora a dureza dos cortes desossados seja significativamente reduzida. Nos sistemas de alta amperagem a indução à contração muscular é tão forte que o músculo não é apenas exercitado, mas também sofre uma ruptura em sua estrutura física, tornando-se mais macio. Uma vantagem adicional do sistema de alta amperagem é a necessidade da aplicação de apenas 15 segundos na linha de abate, enquanto o sistema de baixa amperagem requer de 1 a 15 minutos (LI et al., 1993; SAMS, 1999).

3. Qualidade de Carnes Frescas e Descongeladas

Devido à sua alta perecibilidade, a carne de rã é comercializada predominantemente congelada, sendo prática habitual nos abatedouros brasileiros, concluída a toailete da carcaça, esta ser submetida ao congelamento imediato. No mercado internacional, tradicionalmente se

comercializam as coxas de rã congeladas, resfriadas ou frescas, sendo as carcaças inteiras pouco comercializadas (LIMA et al., 1999). Entretanto, a comercialização da carne refrigerada é preferível uma vez que se obtêm um maior preço para estas do que para as carnes congeladas (PAVLOV et al., 1994; LIMA et al., 1999). De fato, alguns países como Estados Unidos, Canadá e França importam animais vivos, devido à preferência de seus consumidores por carne fresca (LIMA et al., 1999).

No caso da carne de animais tradicionais, seus produtos congelados tem tido um crescimento no mercado global pelo desenvolvimento de novos produtos, que tem sido efetivos em adicionar valor agregado a produtos de menor valor comercial. Entretanto, principalmente para a comercialização da carne *in natura*, a percepção do consumidor de que carne congelada possui menor qualidade ainda persiste (VARNAN e SHUTERLAND, 1995). Os consumidores preferem a carne resfriada em detrimento à congelada, mesmo custando mais caro.

Ocorre que a carne resfriada possui uma vida-de-prateleira muito inferior à congelada, sendo comum a venda de carnes, principalmente de pescados e de aves, descongelados como se fossem resfriadas. Esta é uma prática fraudulenta, uma vez que o consumidor é enganado no ato da compra e, por desconhecimento, pode vir a recongelar o produto ou mesmo mantê-lo refrigerado, o que favorece a perda de qualidade ou riscos de ordem sanitária. Nesta situação (ciclos de congelamento e descongelamento), carnes descongeladas tornam-se ainda mais susceptíveis à contaminação e deterioração, devendo ser consumida o mais rapidamente possível.

De acordo com o regulamento de rotulagens de alimentos da Comunidade Européia, a carne que for submetida ao processo de congelamento e, em seguida, descongelada não pode ser oferecida ao consumidor sem a declaração de que foi congelada e de que deve ser consumida o mais breve possível (GOTTESMANN e HAMM, 1983). No Brasil, o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) do Ministério da Agricultura (BRASIL, 1997), no parágrafo único de seu Artigo 440, determina que o pescado uma vez descongelado não pode ser novamente recolhido a câmaras frigoríficas para recongelamento.

3.1. Efeito do Congelamento e Descongelamento sobre a Carne

O congelamento é um dos métodos mais efetivos na preservação da carne. Baixas temperaturas não só protegem o produto da deterioração microbiológica como reduz a taxa de outras reações bioquímicas degradativas (MILLER et al., 1980; LAWRIE, 1998; WALKER e

BETS, 2000). Entretanto, as vantagens atribuídas à conservação da carne sob congelamento têm sido contrabalanceadas pela exsudação (“*drip*”) durante o descongelamento (LAWRIE, 1998). Proteínas, peptídeos, aminoácidos, ácido lático, purinas, vitaminas solúveis em água e vários sais são alguns dos constituintes presentes no líquido exsudado da carne (LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001), sendo um excelente substrato para o desenvolvimento microbiano. A quantidade de exsudado e nutrientes varia com as condições de congelamento e descongelamento (ABERLE et al., 2001).

De princípio, a carne descongelada não é mais susceptível ao crescimento microbiológico do que a carne fresca, desde que as condições de congelamento e descongelamento sejam conduzidas de forma adequada, apresentando inclusive uma qualidade sensorial muito similar (ABERLE et al., 2001).

O congelamento, e a subsequente estocagem, podem acarretar em efeitos marcantes sobre as propriedades estruturais e químicas da carne, incluindo mudanças nas fibras musculares, lipídios e proteínas, que possuem influência potencial significativa sobre os atributos de qualidade da carne e dos produtos cárneos (MILLER et al., 1980). A qualidade da carne congelada é influenciada pela taxa de congelamento e pelo tempo e condições durante a estocagem congelada (LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001). Destes, o principal fator envolvido na qualidade da carne é a taxa de congelamento, sendo amplamente conhecido que os processos de congelamento rápido produzem menos alterações do que o congelamento lento (FRAZIER e WESTHOFF, 1985).

O músculo estriado esquelético contém cerca de 72 a 75% de água, enquanto 21 a 24% do peso muscular consiste de diferentes proteínas (HONIKEL e HAMM, 1994; LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001). Do total da água muscular, cerca de 85 a 95% se encontra no meio intracelular e em equilíbrio dinâmico com a água (5 a 15%) presente no meio extracelular. Parte da água intracelular é mantida entre os miofilamentos, mas parte substancial se encontra presa entre as miofibrilas (HONIKEL e HAMM, 1994; JAMES e JAMES, 2002).

Não há dúvidas que a estrutura do músculo e suas subestruturas, especialmente as proteínas miofibrilares insolúveis altamente organizadas (actina e miosina), são responsáveis pela retenção da água no tecido muscular (HAMM, 1986; HONIKEL e HAMM, 1994). Embora não haja uma divisão clara em relação às localizações da água no músculo, podemos considerar a sua existência em três formas (Figura 5):

- a) **água de constituição** ou **ligada** (de primeira camada);
- b) **água imobilizada** ou **de adsorção** (de segunda camada ou interfacial); e
- c) **água livre**.

As moléculas de água são polares podendo se associar com os grupos carregados das proteínas musculares. A *água de constituição* está diretamente ligada às estas proteínas, contribuindo para estabilização de sua estrutura, através de pontes de hidrogênio e atração eletrostática, não estando disponível como solvente. Do total da água no músculo, apenas 0,5 g/100g proteína, ou seja, cerca de 0,1%, se encontra ligada (HAMM, 1986; HONIKEL e HAMM, 1994; FENNEMA, 1996; ABERLE et al., 2001). A energia de ligação proteína-água para a água de constituição é muito mais elevada do que na ligação normal da água, tornando-a muito difícil de ser removida (FENNEMA, 1996).

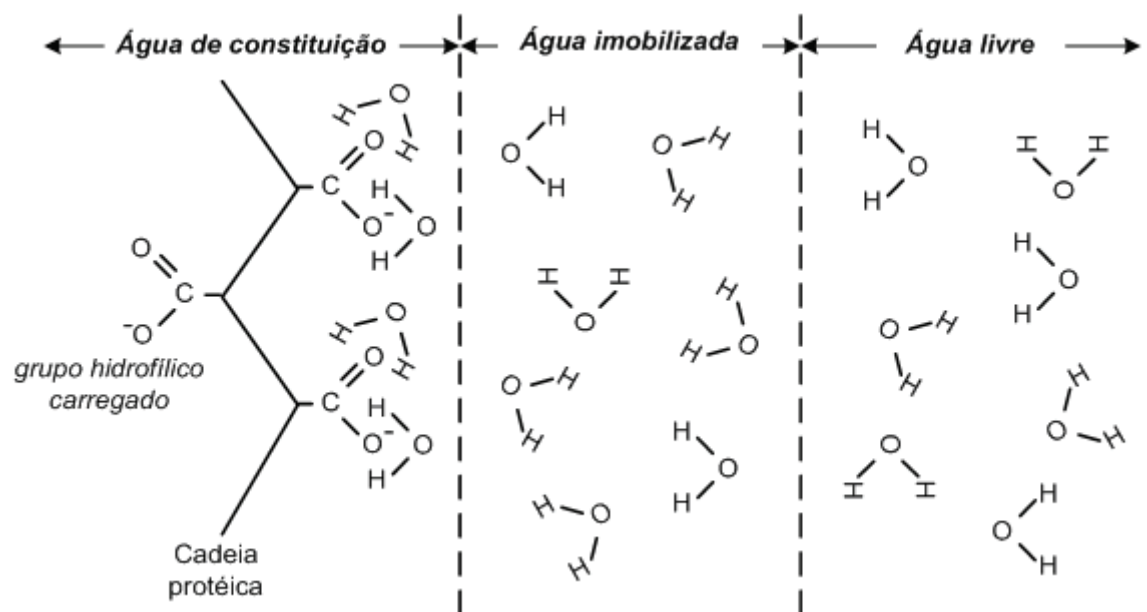


Figura 5. Distribuição da água em camadas nos alimentos. Grupos carregados das proteínas musculares atraem a água, formando uma camada de moléculas ligadas (*água de constituição*), orientadas por sua própria polaridade e pela carga dos grupos. Uma camada de moléculas imobilizadas (*água de adsorção* ou *interfacial*) é formada com menor orientação para as cargas dos grupos. As moléculas de água livre estão fracamente ligadas, e sua orientação independe das cargas dos grupos da proteína. Fonte: ABERLE et al. (2001).

As outras moléculas de água são, subseqüentemente, atraídas pelos grupos carregados das proteínas, formando camadas que se tornam, sucessivamente, mais fracas à medida que a distância dos grupos reativos se torna maior. Esta água, que se orienta em direção, e de acordo com a polaridade do grupo carregado, pode ser denominada *água imobilizada* (ou de *adsorção* ou, ainda, *água interfacial*). Sua orientação molecular, no entanto, não é ordenada e sua mobilidade é relativamente restrita. A energia de ligação proteína-água para a água imobilizada também é mais elevada do que na ligação normal da água (HAMM, 1986;

FENNEMA, 1996). Cerca de 5 a 10% da água muscular está presente na forma imobilizada, sendo que parte desta água se mantém líquida mesmo após o congelamento abaixo de -40°C (HAMM, 1986; HONIKEL e HAMM, 1994; ABERLE et al., 2001).

Finalmente, o restante de água presente no músculo (90 a 95%) se encontra livre, no sentido físico do termo, ou seja, pode se movimentar sem ser atraída pelas proteínas. As moléculas de *água livre* se mantêm unidas por forças capilares e sua orientação é independente do grupo carregado, atuando como solvente e permitindo o crescimento de microorganismos e reações químicas (HAMM, 1986; HONIKEL e HAMM, 1994). Esta água é facilmente removida por necessitar de quantidades mínimas de energia para sua remoção (FENNEMA, 1996; ABERLE et al., 2001), sendo considerada a água congelável presente na carne (JAMES e JAMES, 2002).

O congelamento da água da carne começa em temperaturas próximas de $-1,5^{\circ}\text{C}$, sendo que cerca de 50% da água congelável se encontra congelada a -2°C . Em temperaturas próximas de -5°C , cerca de 80% da água congelável se encontra congelada. Embora a faixa crítica de congelamento se encontre entre as temperaturas de -1 e -5°C , o congelamento não se torna inteiramente completo mesmo a temperaturas de -30°C (ZARITZKY, 2000; JAMES e JAMES, 2002). A temperatura em que o congelamento máximo da água de um alimento pode ocorrer, embora quase sempre não ocorra, é denominada *temperatura eutética final* (FENNEMA, 1996; FELLOWS, 2000). Em carnes, a temperatura eutética é de aproximadamente -60°C , onde ocorre a cristalização máxima da água (FELLOWS, 2000).

As definições de congelamento lento e congelamento rápido são baseadas no tempo gasto para se vencer a faixa crítica de -1 a -5°C , em que ocorre máxima formação de cristais de gelo (LAWRIE, 1998). Na prática comercial, taxas de congelamento variam de 0,2 a 100 cm/h. Taxas de 0,2 a 0,5 cm/h correspondem a um congelamento lento; de 0,5 a 3,0 cm/h é considerado um congelamento rápido; entre 5 e 10 cm/h o congelamento é dito muito rápido; e de 10 a 100 cm/h tem-se o congelamento ultra-rápido (FELLOWS, 2000; ZARITZKY, 2000).

PETROVIC et al. (1993) sugerem taxas de congelamento entre 2 e 5 cm/h, como ótimas para o congelamento de porções de carne bovina. GRUJIC et al. (1993) sugerem limites mais próximos, entre 3 e 4 cm/h. Estes autores, ao trabalhar com congelamento lento (até 0,39 cm/h), observaram um decréscimo na solubilidade das proteínas miofibrilares, aumento na perda de peso durante o congelamento, descongelamento e cozimento, redução na capacidade de retenção de água (CRA) e maior dureza da carne. Quando aplicaram um tratamento por congelamento muito rápido (acima de 4,9 cm/h), também observaram menor solubilidade das proteínas miofibrilares, menor CRA e maior dureza da carne.

Durante o congelamento lento, grandes cristais de gelo se acumulam ao longo do eixo da fibra muscular. O meio intracelular é deficiente em sítios de nucleação (partículas microscópicas suspensas), necessárias para a formação de grandes quantidades de pequenos cristais de gelo. Esta condição favorece a migração gradual da água da célula para o meio extracelular, que começa a apresentar sítios com grandes cristais de gelo, em contraste com o aumento na concentração de solutos do meio intracelular (SHENOUDA, 1980; LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001). Ocorre que o gelo ocupa muito mais volume do que a água e, eventualmente, os cristais de gelo formados podem danificar a estrutura do tecido. Além disso, a exclusão dos solutos dos cristais de gelo causa um incremento na concentração destes componentes nas soluções não congeladas, especialmente no meio intracelular, aumentando a sua força iônica (FELLOWS, 2000; ZARITZKY, 2000). Estes fenômenos causam uma perda na estrutura do tecido e uma desnaturação parcial (efeito *salting-out*) de algumas proteínas musculares, reduzindo a sua solubilidade e capacidade de gelatinização (MILLER et al., 1980; SHENOUDA, 1980; ZARITZKY, 2000). Como conseqüência, a estrutura histológica da carne fica comprometida e no descongelamento a restauração das condições originais é deficiente. O resultado é um produto de qualidade inferior, com textura e gosto deficiente, que perde muito exsudado durante o descongelamento (LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001).

Já no processo de congelamento rápido, a temperatura na carne cai rapidamente abaixo do ponto de congelamento (FELLOWS, 2000; ZARITZKY, 2000). Como conseqüência um grande número de microcristais de gelo com aparência filamentosa são formados nos meios intra e extracelular (ABERLE et al., 2001). Aparentemente não ocorre a migração de água da região intracelular (SHENOUDA, 1980). Numa rápida taxa de transferência de calor, os pequenos cristais de gelo têm pouca oportunidade de crescer em tamanho (ZARITZKY, 2000), acarretando em menores danos estruturais e, portanto, em uma menor perda de exsudado durante o descongelamento do que no processo de congelamento lento (SHENOUDA, 1980; LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001).

A maioria da água da carne se encontra congelada a -18°C . Entretanto, à medida que a temperatura aumenta, a proporção de solução não congelada também aumenta, e torna-se especialmente notável já em temperaturas próximas de -10°C . Por isso, é extremamente importante que se evitem flutuações na temperatura durante a estocagem congelada, minimizando a recristalização e, conseqüentemente, a perda de exsudado associada (ABERLE et al., 2001). A recristalização envolve o aumento dos cristais de gelo, devido ao fato de que pequenos cristais são termodinamicamente menos estáveis do que cristais maiores. Assim, as moléculas de água migram de cristais menores para sítios de água não congelada para recristalizar, formando cristais maiores (FELLOWS, 2000; ZARITZKY, 2000).

Foi sugerido que as flutuações na temperatura, que ocorrem frequentemente durante a estocagem e o transporte congelado, causem o fenômeno da recristalização, o que explicaria a deterioração observada de produtos congelados. Vários estudos, por exemplo, detectaram um aumento na perda por cozimento (JEREMIAH, 1980; MILLER et al., 1980), redução na quantidade de proteína extraída (MILLER et al., 1980) e aumento na rancidez (JEREMIAH, 1980) com a estocagem congelada. Em outros estudos, no entanto, a estocagem congelada da carne resultou apenas em pequenas deteriorações (BAKER et al., 1976; SUTER et al., 1976).

O congelamento pode ser considerado um processo de desidratação em que a água congelada é removida de seu local original no alimento, para formar os cristais de gelo. Durante o descongelamento, a água pode não ser reabsorvida nas regiões originais, levando à formação de exsudados. Fatores que afetam a perda por exsudação durante o descongelamento são: tamanho e localização dos cristais de gelo; velocidade de descongelamento; extensão da reabsorção de água; estado do tecido antes do congelamento; e capacidade de retenção de água do tecido (ZARITZKY, 2000).

Os danos causados pelo processo de descongelamento são maiores do que no processo de congelamento. Devido ao baixo diferencial de temperatura e a maior capacidade de transferência de calor do gelo, a temperatura da carne sobe rapidamente durante o descongelamento para o ponto de congelamento, permanecendo nesta temperatura por um longo período de tempo (VARNAN e SHUTERLAND, 1995; FELLOWS, 2000; ZARITZKY, 2000). Desta forma, a maior duração da etapa de descongelamento, quando comparada com o processo de congelamento, fornece uma grande possibilidade para a formação de novos e grandes cristais de gelo (recristalização) e para o aumento do crescimento microbiano e das mudanças químicas (ABERLE et al., 2001).

É geralmente recomendado que a carne seja descongelada em temperaturas de refrigeração (CALVELO, 1981; LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001), mas trata-se de um processo extremamente lento. No entanto, os requerimentos comerciais usualmente demandam um tempo de descongelamento mais rápido possível. Por outro lado, o descongelamento rápido, com o uso de temperaturas mais elevadas (ambiente ou água quente), favorece o crescimento microbiano devido a uma temperatura relativamente alta na superfície externa da carne, especialmente em cortes grandes (CALVELO, 1981, ABERLE et al., 2001).

No caso da carne inteira, é necessário observar que a taxa ótima de descongelamento é dependente da taxa de congelamento. Poucos problemas resultam do descongelamento rápido de uma carne congelada rapidamente. Já o descongelamento lento de uma carne que foi congelada rapidamente, resulta numa recristalização e conseqüente perda de exsudado. Por

outro lado, um descongelamento rápido de uma carne que sofreu um congelamento lento, não permite que os fluidos nos espaços extracelulares sejam reabsorvidos, acarretando numa rápida perda de exsudado. Conseqüentemente, os efeitos adversos de um congelamento lento podem ser minimizados pelo descongelamento lento, que permite que algum fluido seja reabsorvido (VARNAN e SHUTERLAND, 1995). Infelizmente, a aplicação desta relação entre a taxa de descongelamento e a taxa de congelamento implica, obviamente, no conhecimento das condições em que a carne foi congelada, o que nem sempre é possível. Devido a estas considerações é que se sugere que a carne seja descongelada a baixas temperaturas, num processo lento mas que permite a difusão de água no tecido descongelado e sua realocação na fibra muscular, favorecendo a qualidade da carne e não acarretando em riscos quanto à questão microbiológica (CALVELO, 1981; ABERLE et al., 2001).

Assim, aconselha-se que a carne descongelada não seja recongelada pois isto não implica numa melhora da sua condição microbiológica. Pelo contrário, se durante o descongelamento houver condições que permitam o desenvolvimento microbiano, a qualidade microbiológica da carne ficará comprometida. Além disso, todos os efeitos físicos e químicos associados às condições inadequadas de congelamento poderão ocorrer no recongelamento, acarretando na queda da qualidade das propriedades da carne. Sob condições práticas, carnes que são descongeladas e recongeladas várias vezes apresentam propriedades qualitativas reduzidas, especialmente o sabor e a suculência (ABERLE et al., 2001).

3.2. Métodos para Diferenciação de Carnes Frescas e Descongeladas

Para permitir a fiscalização da carne comercializada, diferenciando a fresca da descongelada, métodos rápidos, seguros e acurados têm sido propostos, dentre os quais os métodos enzimáticos são os mais promissores. Estes métodos se baseiam na medição de enzimas que são liberadas durante o congelamento e subsequente descongelamento da carne, que originalmente não estão presentes no sarcoplasma.

Para o propósito do teste de congelamento, a enzima deve possuir três propriedades fundamentais (GOTTESMANN e HAMM, 1983; REHBEIN, 1992): (1) deve ser liberada pelo congelamento e descongelamento, mas não pelo envelhecimento/maturação da carne; (2) sua atividade total não deve decrescer acentuadamente durante o armazenamento do músculo, seja ele congelado ou resfriado (fresco); e (3) deve ser facilmente detectável no suco do músculo, fornecendo uma medida acurada e precisa.

Segundo GOTTESMANN e HAMM (1983), um método para diferenciar carnes congeladas das resfriadas foi desenvolvido em seus laboratórios, medindo-se a atividade da

enzima *aspartato aminotransferase*, ou *glutamato-oxaloacetato-transaminase* (GOT), liberada da mitocôndria durante o processo de congelamento e descongelamento. Este método, embora seja seguro e confiável e tenha sido utilizado na análise de carnes de diferentes espécies, como bovina, suína e de aves, incluindo o fígado, utiliza técnicas de eletroforese, necessária para separar as isoenzimas liberadas das mitocôndrias (GOT_M) daquelas presentes no sarcoplasma (GOT_S). Isto torna o método inapropriado para testes rotineiros, uma vez que a eletroforese é uma técnica tediosa que requer tempo, equipamentos específicos e certa experiência para se avaliar o gel de corrida.

Dentre as várias enzimas (*fumarase*, *aconitase*, *lipoamido desidrogenase*, *citrato sintase*), liberadas das mitocôndrias durante o congelamento e descongelamento, estudadas por GOTTESMANN e HAMM (1983), a β -*Hidroxiacil-CoA-Desidrogenase* (HADH, EC 1.1.1.35) foi a que apresentou as melhores características que permitam distinguir entre carne descongelada e resfriada. Esta enzima tem sido usada com esta finalidade por vários autores em carnes de animais domésticos, como suínos, bovinos, caprinos e aves (GOTTESMANN e HAMM, 1983; DEMMER e WERKMEISTER, 1985; CHEN et al., 1988; TOLDRÁ et al., 1991; BILLINGTON et al., 1992), bem como de animais exóticos, como veado e lebre (GOTTESMANN e HAMM, 1983). Entretanto, GOTTESMANN e HAMM (1983) concluíram que o método da HADH não é satisfatório para o uso no músculo de pescados, pois esta é liberada no sarcoplasma da fibra muscular durante a estocagem sob refrigeração (não-congelado).

GOULD (1971) e VICENZO et al. (1985) propuseram métodos enzimáticos para diferenciação de carnes de peixe congeladas das descongeladas, baseados na liberação de enzimas presentes nos lisossomos. Entretanto, estes métodos possuem o inconveniente de se utilizar a aplicação da técnica de eletroforese. Outros autores desenvolveram métodos enzimáticos sem o uso da eletroforese, mas, segundo GARCIA DE FERNANDO et al. (1992) e HOZ et al. (1993), nenhum deles foi utilizado comercialmente. Para estes autores, isto se deve ao fato do método proposto por BARBAGLI e CRESCENZI (1981) ser aplicável apenas a trutas, e a técnica desenvolvida por KITAMIKADO et al. (1990), embora seja útil para uma grande variedade de peixes, não permita distinguir entre filés de peixe descongelados e frescos porque é baseado na atividade da enzima β -*N-acetilglicosaminidase*, localizada nas células vermelhas do sangue.

Mais recentemente, GARCIA de FERNANDO et al. (1992) e HOZ et al. (1992) modificaram a forma de extração da enzima HADH da carne, proposta por GOTTESMANN e HAMM (1983), que era extraída por prensagem (aproximadamente 10 Kg/cm²) do tecido muscular entre duas placas de acrílico. No método sugerido por GARCIA de FERNANDO et

al. (1992) e HOZ et al. (1992) a extração foi realizada pela imersão da amostra em dois volumes de tampão fosfato 0,1 M a 25°C por um período de 15 minutos, permitindo a diferenciação de carnes descongeladas das resfriadas em trutas (*Salmo gairdneri*) e lagostim (*Procambarus clarkii*), respectivamente.

A extração por prensagem não é aconselhada quando se deseja avaliar carnes de pescado. Neste sistema, a pressão aplicada sobre o tecido muscular de peixes parece liberar as enzimas endocelulares de amostras resfriadas, enquanto no sistema de imersão apenas as enzimas liberadas no ato do congelamento/descongelamento são extraídas (HOZ et al., 1992). HOZ et al. (1993) e PAVLOV (1994) testaram e aprovaram o uso da HADH extraída pelo método da imersão em camarões (*Penaeus japonicus*) e coxas de rã (*Rana esculenta*), respectivamente. Por ser um método muito mais simples de ser conduzido, RAMOS et al. (2003) validaram o uso da extração da HADH por imersão em tampão fosfato na diferenciação de carnes de frango (peito e coxas) frescas das descongeladas.

O método da HADH para diferenciação de carnes frescas das descongeladas não pode ser aplicada em carnes moídas, pois os danos causados à mitocôndria muscular pelo processo de moagem acarretam na liberação de elevadas quantidades da enzima no sarcoplasma, mascarando o método (GOTTESMANN e HAMM, 1983), seja a extração conduzida pelo método de prensagem ou por imersão.

TOLDRÁ et al. (1991) reportaram que a determinação da atividade da enzima HADH não é útil para diferenciar carne de porco resfriada da descongelada, quando esta foi congelada a temperaturas superiores a -12°C. Esta observação não foi confirmada, para outras espécies, por outros autores (GARCIA DE FERNANDO et al., 1992; PAVLOV et al., 1994), que também trabalharam com diferentes temperaturas de congelamento. Entretanto, HOZ et al. (1993) obtiveram menores valores de HADH para camarões congelados a -10°C do que aqueles congelados em outra temperatura. E, embora a diferença não tenha sido significativa, isto parece suportar, parcialmente, a opinião de TOLDRÁ et al. (1991).

Em qualquer caso, no Brasil, temperaturas acima de -18 e -15°C não podem ser utilizadas comercialmente para o armazenamento congelado de carnes e pescados, respectivamente (BRASIL, 1997). Além disso, a indústria de pescado utiliza temperaturas de congelamento inferiores a -18°C, uma vez que em temperaturas mais altas, como -15°C, a vida-de-prateleira destes produtos é grandemente reduzida (GEROMEL e FORSTER, 1982; HOZ et al., 1993).

3.3. Substâncias Crioprotetoras

Para minimizar os efeitos negativos, previamente discutidos, do congelamento e da armazenagem congelada de produtos alimentícios, alguns estudos têm sido conduzidos a respeito do uso de crioprotetores, aplicados antes da etapa de congelamento.

Substâncias crioprotetoras são compostos que melhoram a qualidade e aumentam a vida-útil de alimentos congelados. Uma grande variedade de crioprotetores é conhecida, e incluem: polióis; metil-aminas; aminoácidos; carboidratos, principalmente os açúcares; algumas proteínas; e sais inorgânicos, como fosfato de potássio e sulfato de amônia (MacDONALD e LANIER, 1991; HEDGES e NIELSEN, 2000). Um exemplo clássico da aplicação de crioprotetores em alimentos é a utilização de açúcares e polifosfatos no processamento de surimi, para minimizar perdas das propriedades funcionais das proteínas da carne do peixe causada pela etapa de congelamento e estocagem congelada (LEE, 2000; HEDGES e NIELSEN, 2000).

É consenso geral que a desnaturação protéica é a principal responsável pela mudança na qualidade das carnes congeladas. A desnaturação de proteínas, especialmente as miofibrilares, faz com que os músculos sofram alterações em suas capacidades funcionais como, capacidade de retenção de água, capacidade emulsionante e geleificação (WHITAKER e FUJIMAKI, 1980). A importância das proteínas miofibrilares foi comprovada em estudos onde a quantidade do complexo actomiosina (nativa) extraída decresceu com o tempo de estocagem congelada, implicando em maior desnaturação, enquanto que a quantidade de proteínas sarcoplasmáticas extraídas não alterou (AWAD et al., 1969; WHITAKER e FUJIMAKI, 1980; WAGNER e AÑÓN, 1985).

A desidratação da célula causada pela formação do gelo é um dos mais importantes fatores que acarreta na desnaturação protéica. Proteínas expostas ao meio intracelular possuem no interior de sua cadeia enovelada grupos hidrofóbicos e, na sua superfície externa, resíduos aminoacídicos carregados (ou polares). Durante o congelamento, devido à migração da água para sítios de nucleação no meio extracelular, a interação proteína-água é desfavorecida; as moléculas de proteína, expostas a um meio menos polar, aumentam a exposição de cadeias hidrofóbicas modificando a sua conformação original. Assim, interações proteína-proteína, de caráter hidrofóbico e iônico, são favorecidas, resultando na formação de agregados (ZARITZKY, 2000).

A desnaturação da miosina, provavelmente, ocorre em ambas as subunidades: meromiosina leve (LMM) e meromiosina pesada (HMM) (BUTTKUS, 1970; WHITAKER e FUJIMAKI, 1980). A cabeça da molécula de miosina (HMM) é um dos pontos mais sensíveis

à desnaturação pelo congelamento, embora a contribuição de outras partes da molécula de miosina e também das proteínas do miofilamento fino (actina) à desnaturação total não possam ser descartados (ZARITZKY, 2000).

A desnaturação da subunidade LMM da miosina ocorre pela formação de ligações cruzadas (*crosslinking*) entre grupos sulfidrílicos, inter e intramoleculares, favorecidas pela remoção da água de solvatação, formando agregados protéicos (Figura 6). Estas ligações cruzadas também são mantidas por forças secundárias como ponte de hidrogênio e interações hidrofóbicas. As estruturas α -helicoidais sofrem pouco, ou nenhum, desdobramento (BUTTKUS, 1970; WHITAKER e FUJIMAKI, 1980; WAGNER e AÑÓN, 1985).

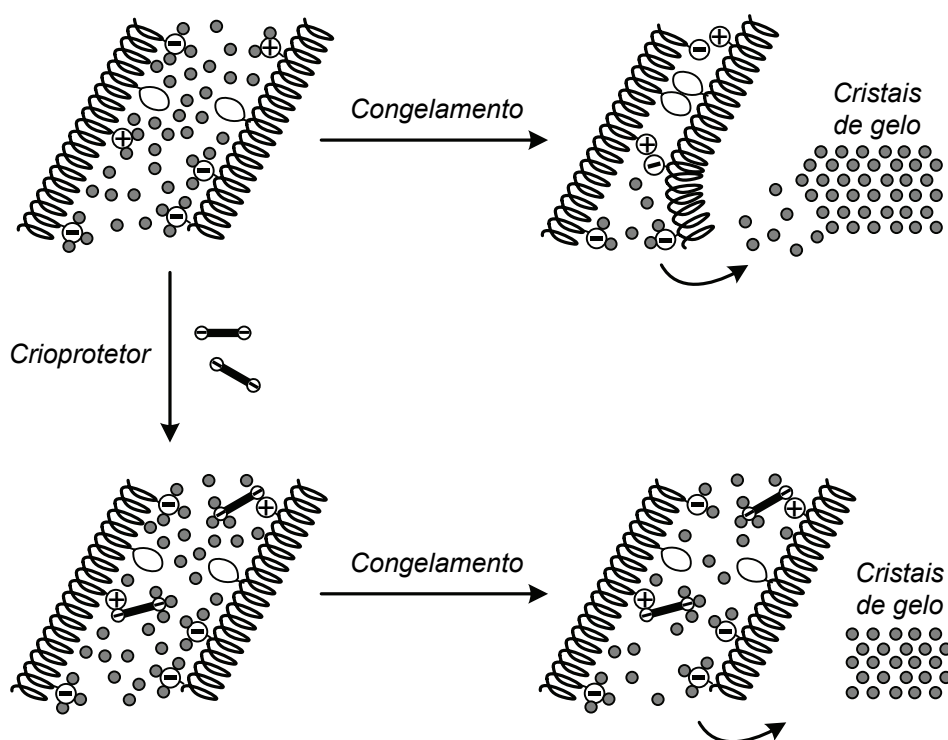


Figura 6. Modelo esquemático da desnaturação de cadeias de miosina e sua prevenção por crioprotetores. Fonte: WHITAKER e FUJIMAKI (1980).

A adição de um agente crioprotetor, com dois ou mais grupos funcionais, ao sistema antes do congelamento, evita que a água de solvatação da proteína seja removida. Um dos grupos funcionais se liga, ou associa, à molécula de proteína, tanto por ligação iônica como por pontes de hidrogênio. Assim, cada molécula de proteína é revestida com a substância crioprotetora (Figura 6). As moléculas de crioprotetores podem ser hidratadas nos grupos funcionais livres restantes, de forma que quando o sistema é congelado muitas moléculas de água permanecem ligadas ao complexo crioprotetor-proteína, impedindo uma grande

desidratação e, conseqüentemente, desfavorecendo a interação proteína-proteína (WHITAKER e FUJIMAKI, 1980).

Já a desnaturação das proteínas globulares, como os monômeros de actina e a subunidade HMM da miosina, parece envolver um desdobramento da cadeia protéica, expondo os grupos hidrofóbicos (apolares), alterando a sua conformação nativa (Figura 7) e ocasionando a agregação das moléculas (WHITAKER e FUJIMAKI, 1980; WAGNER e AÑÓN, 1985). Quando da adição de agentes crioprotetores, estes se ligam à molécula de proteína, aumentando a sua hidratação e resistência contra o deslocamento da água durante o congelamento (WHITAKER e FUJIMAKI, 1980).

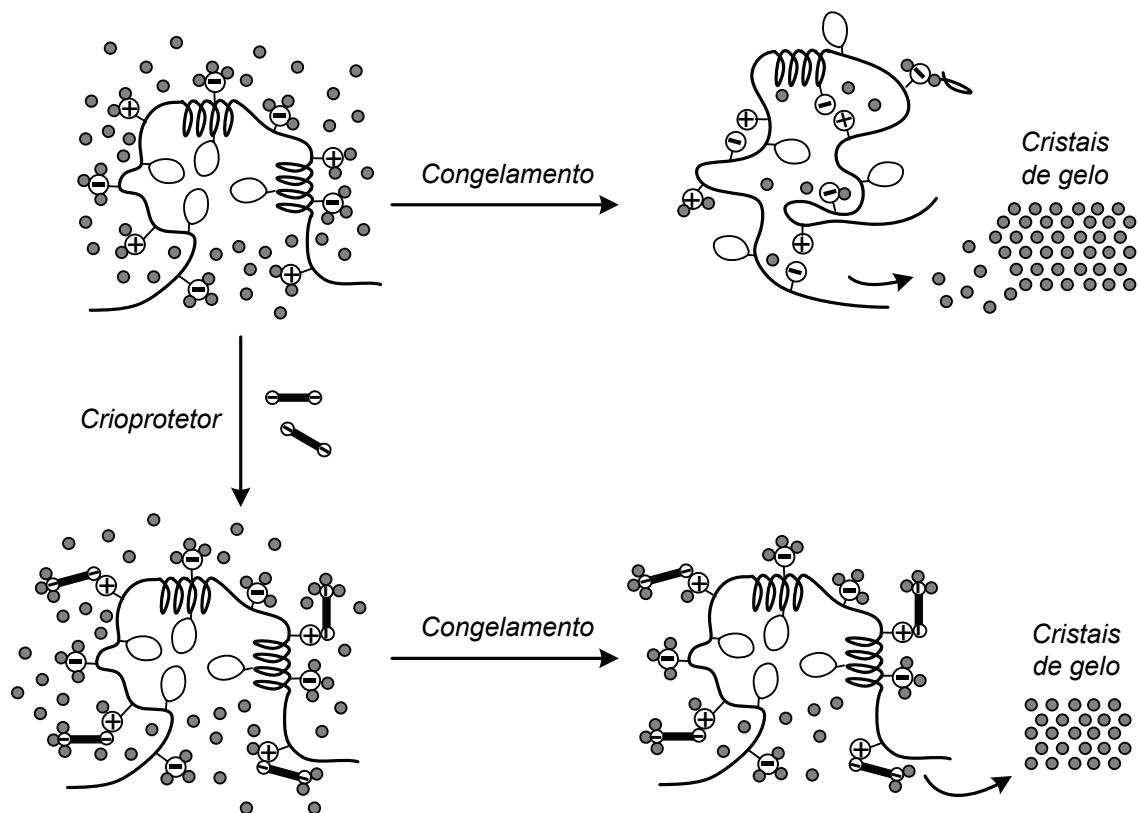


Figura 7. Modelo esquemático da desnaturação de proteínas globulares e sua prevenção por crioprotetores. Fonte: WHITAKER e FUJIMAKI (1980).

Outros fatores também contribuem para a desnaturação das proteínas na carne. Durante o congelamento, as proteínas são expostas a concentrações crescentes de sais na fase não congelada. Um aumento significativo da força iônica pode acarretar numa competição com as ligações eletrostáticas das proteínas pela água, modificando a sua forma nativa e favorecendo a formação de agregados. Processos oxidativos durante a estocagem congelada também podem contribuir para a desnaturação protéica, devido a reações com agentes

oxidantes (enzimas, metais de transição, grupo heme) via radicais lipídicos e não-lipídicos (ZARITZKY, 2000).

Embora vários crioprotetores, como o glicerol e o dimetil-sufóxido, possam ser usados para reduzir o ponto de congelamento da água, minimizando os danos na célula muscular, as altas concentrações necessárias para eficácia do processo são tóxicas ou causam outras mudanças indesejáveis no alimento. Estudos com animais, plantas e microrganismos que sobrevivem a ambientes muito frios têm, no entanto, revelado a existência de inúmeras proteínas anticongelantes que abaixam o ponto de congelamento da água por absorção/inibição, alteram o padrão de formação dos cristais de gelo e inibem a recristalização (LAWRIE, 1998).

A possibilidade do uso de proteínas crioprotetoras durante o congelamento e armazenamento congelado de carnes foi investigada por alguns autores. PAYNE et al. (1994), por exemplo, demonstraram que quando a carne é imersa em soluções contendo glicoproteínas anticongelantes, extraídas de bacalhaus da Antártica, antes do congelamento a -20°C, o tamanho dos cristais de gelo é reduzido, quando comparado com o controle. KRIVCHENIA e FENNEMA (1988) estudaram os efeitos de crioprotetores tripolifosfatos de sódio (TPS) e glutamato de monossódico (GMS) em filés de *whitefish*, por injeção a alta pressão e por banho de imersão, estocados congelados a -12°C. Os autores observaram uma menor perda por gotejamento (*drip*) no uso de crioprotetores quando comparado com o controle, sendo as melhores propriedades de textura (especialmente firmeza) apresentadas pelas amostras tratadas com TPS.

É, portanto, plausível que, com o desenvolvimento da tecnologia do uso de crioprotetores, esta técnica permita, no futuro, melhorar a qualidade da carne congelada.

3.4. Tolerância de Anfíbios Hibernantes ao Congelamento

Recentemente, enfoque especial tem sido dado a um grupo particular de anfíbios e répteis resistentes ao frio, que sobrevivem expostos no inverno a temperaturas sub-zero (entre zero e -8°C), com o propósito de determinar com precisão esses fatores bioquímicos de sobrevivência para auxiliar nos projetos de criogenia de tecidos e órgãos humanos (MOURA, 2000).

Várias espécies de anfíbios e répteis possuem a extraordinária capacidade de suportar o congelamento de boa parte dos fluidos corporais. No congelamento desses animais, a concentração de gelo alcança de 35 a 48% da água total do corpo, o que é uma estimativa consistente com o congelamento somente da água presente no meio extracelular. Um exame

visual de rãs congeladas revela que os órgãos internos não estão congelados, mas embebidos em uma massa abdominal de gelo (STOREY e STOREY, 1986a). Isso possibilita a sua sobrevivência em climas de inverno rigoroso (hibernação).

A adaptação bioquímica realizada pelo organismo destes animais para permitir sua sobrevivência durante o congelamento é a síntese maciça de quantidades de glicose ou glicerol, que atuam como agentes anticongelantes (STOREY e STOREY, 1984, 1985, 1986b, 1988). Estes crioprotetores elevam a osmolaridade dos fluidos corporais, diminuindo a extensão da redução do volume celular durante a formação dos cristais de gelo no meio extracelular e, desta forma, previnem o aumento a níveis críticos da concentração de solutos no meio intracelular, estabilizando as membranas de proteínas. Outros compostos, como proteínas anticongelantes e um sistema especial de proteínas antioxidantes, também possuem importante participação na ação crioprotetora (STOREY et al., 1996).

Dentre os anuros hibernantes, a rã-madeira (*Rana sylvatica*) é a espécie mais estudada quanto aos mecanismos de sobrevivência a baixas temperaturas (STOREY, 1987; STOREY e STOREY, 1984, 1985, 1986a, 1986b, 1988; LAYNE e LEE, 1990; COSTANZO e LEE, 1991, 1993; HOLDEN e STOREY, 2000). Este anfíbio é capaz de resistir a um período de congelamento de duas semanas, sem nenhuma atividade cardiorespiratória e com mais de 65% dos fluidos corporais completamente congelados (STOREY et al., 1996).

A tolerância ao congelamento da rã-madeira é altamente dependente da síntese de glicose (COSTANZO e LEE, 1993) que, aparentemente, é estimulada pela temperatura. Assim que a formação de gelo tem início nas extremidades do corpo, um sinal é transmitido ao fígado para estimulação da gluconeogênese. Dentro de 2 a 5 minutos, os níveis de glicose sanguínea começam a subir e em apenas algumas horas é distribuída em todos os órgãos do corpo, alcançando concentrações de 150 a 300 mM, enquanto em condições normais a concentração de glicose é da ordem de 1 a 5 mM (STOREY e STOREY, 1988). Esta hiperglicemia extrema é alcançada pela grande reserva de glicogênio (acima de 180 mg/g tecido) presente no fígado da rã-madeira e pela elevada atividade da enzima *glicogênio fosforilase* hepática nestes animais (STOREY, 1987; HOLDEN e STOREY, 2000).

O efeito crioprotetor da glicose depende de sua concentração, com implicação óbvia de que rãs que sintetizam mais glicose incorrem em menores crioinjúrias (COSTANZO e LEE, 1993). Esta relação foi observada *in vitro*, onde altas concentrações de glicose ofereceram efetiva crioproteção para eritrócitos congelados (COSTANZO e LEE, 1991). Adicionalmente, LAYNE e LEE (1990) associaram altas concentrações de glicose com baixa concentração de gelo nos tecidos musculares.

Em trabalho conduzido com rã-touro (*Rana catesbeiana*), STEINER et al. (2000) observaram um aumento na concentração de glicose sanguínea quando os animais foram transferidos de um ambiente de 20 para -2°C. Segundo estes autores, o glicogênio hepático foi a principal fonte de carbono para a síntese de glicose, enquanto o glicogênio muscular parece ter menor participação no acúmulo de glicose sanguínea estimulado pela exposição ao frio.

Assim, pelo exposto, a insensibilização por termonarcorese, comumente empregada no Brasil (LIMA et al., 1999), pode acarretar em um estímulo à produção de crioprotetores, tornando a diferenciação de músculos frescos dos descongelados, baseado em análises enzimáticas, passíveis de erro. Os animais insensibilizados por termonarcorese podem gerar carnes que, quando congeladas e posteriormente descongeladas, apresentam uma característica próxima à da carne fresca, devido ao efeito dos crioprotetores produzido nos músculos da rã, em resposta à redução da temperatura durante a etapa de insensibilização.

4. Referências Bibliográficas

ABE, H. Role of Histidine-Related Compounds as Intracellular Próton Buffering Constituents in Vertebrate Muscle. **Biochemistry (Moscow)**, v.65, n.7, p.757-765, 2000.

ABERLE, E.D., FORREST, J.C., GERRARD, D.E., MILLS, E.W. **Principles of Meat Science**. 4 ed. New York: Kendall/Hunt Publishing Company, 2001. 354p.

ALBINATI, F. L. **Avaliação de diferentes métodos de insensibilização e sangria de rãs**. Viçosa: UFV, 1994. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 1994.

ANIL, M.H., RAJ, A.B.M., McKINSTRY, J.L. Evaluation of electrical stunning in commercial rabbits: effect on brain function. **Meat Science**, v.54, p.217-220, 2000a.

ANIL, M.H., WHITTINGTON, P.E., McKINSTRY, J.L. The effect of the sticking method on the welfare of slaughter pigs. **Meat Science**, v.55, p.315-319, 2000b.

ASGHAR, A., PEARSON, A.M. Influence of ante e postmortem treatments upon muscle composition and meat quality. **Advances in Food Research**, v.26, p.53-177, 1980.

AWAD, A., POWRIE, W.D., FENNEMA, O. Deterioration of fresh-water whitefish muscle during frozen storage at -10°C. **Journal of Food Science**, v.34, p.1-7, 1969.

AYAPPAN PILLAI, S. Development of an apparatus for humane method of killing frogs for frogleg processing industry. **Food Science and Technology Abstracts**, v.18, n.9, p.177, 1986. (Abstract 35.139).

BAKER, R.C., DARFLER, J.M., MULNIX, E.J., NATH, K.R. Palatability and other characteristics of repeatedly refrozen chicken broilers. **Journal of Food Science**, v.41, p.443-445, 1976.

- BARBAGLI, C., CRESCENZI, S. Influence of Freezing and Thawing on the Released of Cytochrome Oxidase from Chicken Liver and from Beef and Trout Muscle. **Journal of Food Science**, v.46, p.491-493, 1981.
- BATE-SMITH, E.C., BENDALL, J.R. Factors determining the time course of rigor mortis. **Journal of Physiology**, v.110, p.47-65, 1949.
- BECHTEL, P.J. Muscle Development and Contractile Proteins. In: BECHTEL, P.J. **Muscle as Food**. New York: Academic Press, p.1-35, 1986.
- BENDALL, J.R. Post-Mortem Changes in Muscle. In: BOURNE, G.H. **The Structure and Function of Muscle**. 2 ed. New York: Academic Press, p.243-309, 1973a.
- BENDALL, J.R. The Biochemistry of Rigor-Mortis and Cold Contracture. In: 19th EUROPEAN MEETING MEAT RESEARCH WORKERS, **Proceedings...**, Paris, p.1-27, 1973b.
- BILGILI, S.F. Recent Advances in Electrical Stunning. **Poultry Science**, v.78, p.282-286, 1999.
- BILGILI, S.F., EGBERT, W.R., HUFFMAN, D.L. Effect of postmortem aging temperature on sarcomere length and tenderness of broiler *Pectoralis major*. **Poultry Science**, v.68, p.588-1591, 1989.
- BILLINGTON, M., BOWIE, H., SCOTTER, S., WALKER, H., WOOD, R. The differentiation of fresh and frozen-thawed poultry meat by the determination of the beta-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) activity of chicken breast press juice: Collaborative trial. **Journal Association of Public Analysts**, v.28, p.103-116, 1992.
- BORGES, G.F., COSTA JR., G.A., TEIXEIRA, R.D. Técnicas de Abate de Rãs como Perspectivas de um Melhor Aproveitamento Higiênico-Sanitário dos Produtos Obtidos. In: 1st INTERNATIONAL MEETING OF FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY & VIII ENAR -ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 1995, Viçosa. **Curso Abate e Comercialização de Rãs**. Viçosa, MG: ABETRA/UFV, 1995. p.7-15.
- BOWKER, B.C., WYNVEEN, E.J., GRANT, A.L., GERRARD, D.E. Effects of electrical stimulation on early postmortem muscle pH and temperature declines in pigs from different genetic lines and halothane genotypes. **Meat Science**, v.53, p.125-133, 1999.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria da Defesa Agropecuária (SDA). Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). Divisão de Normas Técnicas. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Decreto no. 30.691, de 29 de março de 1952**, alterado pelos Decretos no.s 1.255 de 25-06-1962, 1.236 de 02-09-1994, no. 1.812 de 08-02-1996 e no. 2.244 de 04-06-1997. Brasília, 1997.
- BRISKEY, E.J., SAYRE, R.N., CASSENS, R.G. Development and Application of an Apparatus for Continuous Measurement of Muscle Extensibility and Elasticity Before and During Rigor Mortis. **Journal of Food Science**, v.27, n.6, p.560-566, 1962.
- BUSCH, W.A., GOLL, D.E., PARRISH JR., F.C. Molecular Properties of Postmortem Muscle. Isometric Tension Development and Decline in Bovine, Porcine and Rabbit Muscle. **Journal of Food Science**, v.37, p.289-299, 1972.

- BUSCH, W.A., PARRISH JR, F.C., GOLL, D.E. Molecular Properties of Postmortem Muscle. 4. Effect of Temperature on Adenosine Triphosphate Degradation , Isometric Tension Parameters and Shear Resistance of Bovine Muscle. **Journal of Food Science**, v.32, p.390-394, 1967.
- BUTTKUS, H. Acelerated desnaturation of myosin in frozen solution. **Journal of Food Science**, v.31, n.1, p.558, 1970.
- CALKINS, C.R., DUTSON, T.R., SMITH, G.C., CARPENTER, Z.L. Concentration of creatine phosphate, adenine nucleotides and their derivatives in electrically stimulated and nonstimulated beef muscle. **Journal of Food Science**, v.47, p.1350, 1982
- CALKINS, C.R., SAVELL, J.W., SMITH, G.C., MURPHEY, C.E. Quality-indicating characteristics of beef muscle as affected by electrical stimulation and postmortem chilling time. **Journal of Food Science**, v.45, p.1330, 1980.
- CALVELO, A. Recent studies on meat freezing. In: LAWRIE, R. **Developments in Meat Science**, v.2, London: Elsevier Applied Science, p.125-158, 1981.
- CASSENS, R.G., COOPER, C.C. Red and White Muscle. **Advances in Food Research**, v.19, p.1-74, 1971.
- CASSENS, R.G., NEWBOLD, R.P. Effect of Temperature on the Time Course of Rigor Mortis in Ox Muscle. **Journal of Food Science**, v.32, p.269-272, 1967.
- CHEN, M.T., YANG, W.D., GUO, S.L. Differentiation Between Fresh Beef and Thawed Frozen Beef. **Meat Science**, v.24, p.223-226, 1988.
- CHRYSTALL, B.B., DEVINE, C.E. Electrical Stimulation: Its Early Development in New Zealand. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R., (Eds.) **Advances in Meat Research**, v.1 (Electrical Stimulation), New York: Blackie Academic & Professional, p.73-120, 1985.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Recommended international code for hygienic practice for the processing of frog legs**. Rome, FAO, 1984. v.c. n.p.
- CONRFORTH, D.P., PEARSON, A.M., MERKEL, R.A. Relationship of mitochondria and sarcoplasmic reticulum to cold shortening. **Meat Science**, v.4, p.103, 1980.
- COSTANZO, J P., LEE, R.E. Cryoprotectant production capacity of the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 71, p.71-75, 1993.
- COSTANZO, J.P., LEE, R.E. Freeze-thaw injury in erythrocytes of the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. **American Journal of Physiology**, v.261, p. R1346-R1350, 1991.
- 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, 1979.
- DAVIDEK, J., VELISEK, J. Eine Schnellmethode zur Untersuchung des Rigor mortis (A Quick Method of Examining Rigor Mortis). **Die Fleischwirtschaft**, v.53, n.9, p.1285-1290, 1973
- DEMMEER, W., WERKMEISTER, K. Differentiation of Fresh and Thawed Frozen Pork. **Archiv. Für Lebensmittelhygiene**, v.36, p.15-18. 1985.

- EIKELENBOOM, G., SMULDERS, F.J.M., RUDERUS, H. The effect of high and low electrical stimulation on beef quality. **Meat Science**, v.15, p.247-254, 1985.
- FABIANSOON, S., LASER REUTERSWÄRD, A. Low voltage stimulation and post-mortem energy metabolism in beef. **Meat Science**, v.12, p.205-223, 1985.
- FAUCITANO, L. Efeitos do Manuseio Pré-Abate sobre o Bem Estar e sua Influência sobre a Qualidade da Carne. In: I CONFERÊNCIA VIRTUAL INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, Via Internet: 16 de novembro a 16 de dezembro de 2000. **Anais...**, CNPSA/Embrapa, p.55-75, 2000. <<http://www.cnpsa.embrapa.br/>>
- FELLOWS, P. **Food Processing Technology: Principles and Practice**. 2nd Edition. New York: CRC Press. 2000.
- FENNEMA, O.R. Water and Ice. In: FENNEMA, O.R. (ed) **Food Chemistry**. 3th Edition, Manual Dekker Inc, p.17-94, 1996.
- FERNANDEZ, X., TORNBERG, E. The influence of high *postmortem* temperature and differing ultimate pH on the course of rigor and ageing in Pig *Longissimus* Muscle. **Meat Science**, v.36, p.345-363, 1994.
- FRAZIER, W.C., WESTHOFF, D.C. **Microbiología de los alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Acribia, 1985. 522p.
- FREMERY, D., POOL, M. F. Biochemistry of chicken muscles as related to *rigor mortis* and tenderization. **Food Research**, v. 25, n.1, p.73-87, 1960.
- GARCIA DE FERNANDO, G.D., FERNANDEZ, M., DIAZ, O., ORDOÑEZ, J.A., HOZ, L. An objective method to differentiate between fresh and thawed trout meat (*Salmo gairdneri*). **Archiv. Für Lebensmittelhygiene**, v.43, n., p.13-14, 1992.
- GEROMEL, E.J., FORSTER, R.J. Princípios fundamentais em tecnologia de pescado. **Série Tecnologia Agroindustrial**, Secretaria da Industria, Comércio, Ciência e Tecnologia de São Paulo, 1982. 127p.
- GIGIEL, A.J., JAMES, S.J. Electrical stimulation and ultrarapid chilling of pork. **Meat Science**, v.11, p.01-12, 1984.
- GOLL, D.E. The resolution of rigor mortis. In: 21ST ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 1968, **Proceedings...**, p.16, 1968.
- GOLL, D.E., STROMER, M.H., ROBSOM, R.M. TEMPLE, J., EASON, B.A., BUSCH, W.A. Tryptic digestion of muscle components simulates many of the changes cause by postmortem storage. **Journal of Animal Science**, v.33, p.963-982, 1971.
- GOTTESMANN, P., HAMM, R. New biochemical methods of differentiating between fresh meat and thawed, frozen meat. **Fleischwirtschaft**, v.63, p.219-221,1983.
- GOULD, E. Fish Inspection and Quality Control. In: KREUZER, R. (ed.) **Fishing News (Books)**, London, p.72-75. 1971.
- GREASER, M.L. Conversion of Muscle to Meat. In: BECHTEL, P.J. **Muscle as food**. New York: Academic Press, p.37-102, 1986.

- GREGORY, N.G. **Animal Welfare and Meat Science**. Wallingford: CABI Publishing. 1998, 298p.
- GREGORY, N.G. Processing Factors Influencing pH Values. **Meat Science Reciprocation Series**. American Meat Science Association, 2000. 6p.
- GRUJIC, R., PETROVIC, L., PIKULA, B., AMIDZIC, L. Definition of the optimum freezing rate. 1. Investigations of structure and ultrastructure of beef M. *longissimus dorsi* frozen at different rates. **Meat Science**, v.33, n.3, p.301-318, 1993.
- GUZMÁN, E.S.C. **Bioquímica de Pescados e Derivados**. Jaboticabal: FUNEP. 1994. 409p.
- HALLUND, O., BENDALL, J.R. The long-term effect of electrical stimulation on post-mortem fall of pH in the muscles of Landrace pigs. **Journal of Food Science**, v.30, p.296-299, 1965.
- HAMM, R. Functional Properties of the Myofibrillar System and Their Measurements. In: BECHTEL, P.J. **Muscle as food**. New York: Academic Press, p.37-102, 1986.
- HAMM, R. Post Mortem Changes in Muscle with Regard to Processing of Hot-Boned Beef. **Food Technology**, v.36, n.11, p.105-115, 1982.
- HEDGES, N., NIELSEN, J. The selection and pre-treatment of fish. In: KENNEDY, J. (ed) **Managing frozen foods**. 2nd Edition, New York: CRC Press, pp.96-110, 2000.
- HERTZMAN, C., OLSSON, U., TORNBERG, E. The Influence of High Temperature, Type of Muscle and Electrical Stimulation on the Course of Rigor, Ageing and Tenderness of Beef Muscle, **Meat Science**, v.35, p.119-141, 1993.
- HOLDEN, C.P., STOREY, K.B. Purification and Characterization of Protein Kinase A from Liver of the Freeze-Tolerant Wood Frog: Role in Glycogenolysis during Freezing **Cryobiology**, v.40, p.323-331, 2000.
- HONIKEL, K. Influence of chilling of pork carcasses on physical quality traits. In: NATIONAL PORK PRODUCERS COUNCIL CHILLING WORKSHOP, November 2, 1999. **Material...**, Des Moines: National Pork Producers Council, 1999.
- HONIKEL, K. O., HAMID, A., FISCHER, C., HAMM, R. Influence of postmortem in bovine muscle on the water-holding capacity of beef. Postmortem storage of muscle at various temperatures between 0 and 30°C. **Journal of Food Science**, v.46, n.1, p.23-25, 31, 1981a.
- HONIKEL, K.O., FISCHER, C. A rapid method for the detection of PSE and DFD porcine muscle. **Journal of Food Science**, v.42, n.6, p.1633-1636, 1977.
- HONIKEL, K.O., FISCHER, C., HAMID, A., HAMM, R. Influence of Postmortem Changes in Bovine Muscle on the Water-Holding Capacity of Beef. Postmortem Storage of Muscle at 20°C. **Journal of Food Science**, v.46, n.1, p.1-6, 1981b.
- HONIKEL, K.O., HAMM, R. Measurement of Water-Holding Capacity and Juiciness. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (Eds.) **Advances in Meat Research**, v.9 (Quality Attributes and their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products), New York: Blackie Academic & Professional, p.125-161, 1994.

- HONIKEL, K.O., RONCALES, P., HAMM, R. The Influence of Temperature on Shortening and Rigor Onset in Beef Muscle. **Meat Science**, v.8, n.3, p.221-241, 1983.
- HOZ, L., FERNÁNDEZ, M., DIÁZ, O., ORDÓÑEZ, J.A., PAVLOV, A., GARCIA DE FERNANDO, G.D. Differentiation of Unfrozen and Frozen-thawed Kuruma Prawn (*Penaeus japonicus*) from the activity of β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH) in Aqueous Extracts. **Food Chemistry**, v.48, p.127-129, 1993.
- HOZ, L., YUSTES, C., CAMARA, J.M., RAMOS, M.A., GARCIA DE FERNANDO, G.D. β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH) Differentiates Unfrozen from Frozen-thawed Crawfish (*Procambarus clarkii*) and Trout (*Salmo gairdneri*) meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v.27, p.133-136, 1992.
- HUFF-LONERGAN, E. The Role of Carcass Chilling in the Development of Pork Quality. **Facts (Pork Quality)**. National Pork Producers Council & American Meat Science Association, 2001. 8p.
- HUFF-LONERGAN, E., LONERGAN, S.M., VASKE, L. pH Relationships to Quality Attributes: Tenderness. **Meat Science Reciprocation Series**, American Meat Science Association, 2000, 4p.
- HUNT, M.C., KROPF, D.H. Color and Appearance. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (eds.) **Advances in Meat Research**. v.3 (Restructured Meat and Poultry Products). New York: AVI Books, p.125-159, 1987.
- IWAMOTO M, YAMANAKA H, ABE H, USHIO H, WATABE S, HASHIMOTO K. ATP and creatine phosphate breakdown in spiked plaice muscle during storage, and activities of some enzymes involved. **Journal of Food Science**, v.53, n.6, p.1662-1665, 1988.
- IWAMOTO, M., YAMANAKA, H., WATABE, S., HASHIMOTO, K. Effect of storage temperature on rigor-mortis and ATP degradation in plaice *Paralichthys olivaceus* muscle. **Journal of Food Science**, v.52, p.1514-1517, 1987.
- JAMES, S.J., JAMES, C. **Meat Refrigeration**. New York: CRC Press, 2002. 347p.
- JEREMIAH, L.E. Effect of frozen storage and protective wrap upon the cooking losses, palatability and rancidity of fresh and cured pork products. **Journal Food Science**, v.45, p.187-196, 1980.
- JOLLEY, P.D., HONIKEL, K.O., HAMM, R. Influence of Temperature on the Rate of Postmortem Changes Metabolism and Water-Holding Capacity of Bovine Neck Muscles. **Meat Science**, v.5, p.99, 1980.
- JUNGK, R.A., SNYDER, H.E., GOLL, D.E., McCONNELL, K.G. Isometric Tension Changes and Shortening in Muscle Strips during Post-Mortem Aging. **Journal of Food Science**, v.32, p.158-161, 1967.
- KITAMIKADO, M., YUAN, C.S., UENO, R. An Enzymatic Method Designed to Differentiate Between Fresh and Frozen-Thawed Fish. **Journal of Food Science**, v.55, p.74-76, 1990.
- KHAN, A.W. Effect of chemical treatments causing rapid onset of rigor on tenderness of poultry breast meat. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.23, p.449-451, 1975.

- KHAN, A.W., FREY, A.R. A Simple Method for Following Rigor Mortis in Beef and Poultry Meat. **Canadian Institute of Food Technology Journal**, v.4, n.4, p.139-142, 1971.
- KIJOWSKI, J., NIEWIAROWICZ, A., KUJAWSKA-BIERNAT, B. Biochemical and technological characteristics of hot chicken meat. **Journal of Food Technology**, v.17, p.553-560, 1982.
- KRIVCHENIA, H., FENNEMA, O. Effect of crioprotectantes on frozen whitefish filets. **Journal of Food Science**, v.53, n.4, p.999-1003, 1988.
- KYLÄ-PUHJU, M., RUUSUNEN, M., KIVIKARI, R., PUOLANNE, E. The buffering capacity of porcine muscles. **Meat Science**, v.67 p.587-593, 2004.
- LAWRIE, R.A. **Lawrie's Meat Science**. 6th Edition. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 1998. 336p.
- LAYNE, J.R., LEE, R.E. Glicose may reduce ice formation in the freeze tolerant frog (*Rana sylvatica*). **FASEB Journal**, v.4, p.A552 (Abstract), 1990.
- LEE, C.M. Surimi: Science and Technology. In: FRANCIS, F.J. (ed) **Encyclopedia of Food Science and Technology**. 2nd Edition, v.1, New York: John Wiley & Sons, Inc., p.2229-2239, 2000.
- LI, Y., SIEBENMORGEN, T.J., GRIFFIN, C.L. Electrical stimulation in poultry: a review and evaluation. **Poultry Science**, v. 72, p.7-22, 1993.
- LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. **A criação de rãs**. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 187p.
- LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. **A tecnologia de criação de rãs**. Viçosa: UFV, Impr. Univ., 1992. 168 p. il.
- LIMA, S.L., CRUZ, T.A., MOURA, O.N. **Ranicultura: análise da cadeia produtiva**. Viçosa: Folha de Viçosa. 1999. 172p.
- LOAIZA, J.F.U. **Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de carne de rã (*Rana catesbeiana*) estocada sob refrigeração e congelamento**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. 1996.
- LOCKER, R.H. Cold-induced Toughness of Meat. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (eds.) **Advances in Meat Research**. v.1 (Electrical Stimulation). New York: AVI Books, p.1-44, 1985.
- LOCKER, R.H., DAINES, G.J. Rigor Mortis in Beef *Sternomandibularis* Muscle at 37°C. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v.26, p.1721-1733, 1975.
- LONGO, A.D. **Manual de ranicultura: uma nova opção da pecuária**. 3. ed. São Paulo: Ícone, 1986. 221p.
- LYON, C.E., BUHR, R.J. Biochemical Basis of Meat Texture. In: RICHARDSON, R.I., MEAD, G.C. (eds) **Poultry Meat Science**. (Poultry Science Symposium Series, v.25) England: CABI Publishing, p.99-126, 1999.

- LYON, C.E., HAMM, D, THOMSON, J.E.. pH and tenderness of broiler breast meat deboned at various times after chilling. **Poultry Science**, v.64, p.307-310, 1985.
- MacDONALD, G.A., LANIER, T.C. The role of carbohydrates as cryoprotectants in meat and surimi. **Food Technology**, p. 101-105, March, 1991.
- MARIBO, H., ERTBJERG, P., ANDERSSON, M., BARTON, G.P., MOLLER, A.J. Electrical stimulation of pigs - effect on pH fall, meat quality and cathepsin B+L activity. **Meat Science**, v.52, p.179-187, 1999.
- MARSH, B.B. Rigor Mortis in Beef. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v.5, p.70-75, 1954.
- MCKEE, S.R., SAMS, A.R. Rigor mortis development at elevated temperature induces pale exudative turkey meat characteristics. **Poultry Science**, v.77, p.169-174, 1996.
- MICKELSON, J.R. Calcium transport by bovine skeletal-muscle mitochondria and its relationship to post-mortem muscle. **Meat Science**, v.9, p.205-229, 1983.
- MILLER, A.J., ACKERMAN, S.A., PALUMBO, S.A. Effect of Frozen Storage on Functionality of Meat for Processing. **Journal of Food Science**, v.45, p.1466-1471, 1980.
- MOLETTE, C., RÉMIGNON, H., BABILE, R. Maintaining muscles at a high post-mortem temperature induces PSE-like meat in turkey. **Meat Science**, v.63, n.4, p.525-532, 2003.
- MOURA, F. F.; GOMIDE, L. A. M.; RAMOS, E. M. **Efeito do Jejum Pré-Abate Sobre a Qualidade da Carne de Rã-Touro (Rana catesbeiana)**. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 2001, São Pedro - SP I Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes - Carne: Qualidade e Segurança para os Consumidores do Novo Milênio, Campinas - SP Centro de Tecnologia da Carne - CTC do Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2001, p. 114-115.
- MOURA, O.M. **Efeito de métodos de insensibilização e sangria sobre características de qualidade da carne de rã-touro e, perfil das indústrias de abate**. Viçosa: UFV, 2000. 205p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger: Principles of Biochemistry**. 3 ed. New York: Worth Publishers, 2000. 1232p.
- NEWBOLD, R.P. Changes Associated with Rigor Mortis. In: BRISKEY, E.J., CASSENS, R.G., TRAUTMAN, J.C. (eds) **The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food**. Madison: University of Wisconsin Press, p.181-196, 1966.
- OGATA, T., MORI, M. Histochemical study of oxidative enzymes in vertebrate muscle. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.12, p.171-182, 1963.
- OGAWA, M., OGAWA, N.B.P. Alterações do pescado pós-morte. In: OGAWA, M., MAIA, E.L. (eds) **Manual de Pesca**. v.1 (Ciência e Tecnologia do Pescado). São Paulo: Livraria Varela, p.113-137, 1999.
- OKUMA, E., ABE, H. Major buffering constituents in animal muscle. **Comparative Biochemical Physiology**, v.102A, n.1, p.37-41, 1992.

- OLIVEIRA, G.A., Instalação de Ranário. In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 3, 1982. **Anais...** Uberlândia: UFU, 1982. p.41-58.
- OLSMAN, W.J., SLUMP, P. Methods of determination of connective tissue free muscle protein in meat products. In: LAWRIE, R. (ed) **Developments in Meat Science**, v.2, London: Elsevier Applied Science, p.195-240, 1981.
- OWENS, C.M., SAMS, A.R. Muscle Metabolism and Meat Quality of Pectoralis from Turkeys Treated with Postmortem Electrical Stimulation. **Poultry Science**, v.76, p.1047-1051, 1997.
- PAPINAHU, P.A., FLETCHER, D.L. The Effects of Stunning Amperage and Deboning Time on Early Rigor Development and Breast Meat Quality of Broilers. **Poultry Science**, v.75, p.672-676, 1996.
- PAPINAHU, P.A., FLETCHER, D.L. The influence of temperature on broiler breast muscle shortening and extensibility. **Poultry Science**, v.75, p.797-802, 1995.
- PAVLOV, A., GARCIA DE FERNANDO, G.D., ORDONEZ, J.A., HOZ, L. β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) Activity of Unfrozen and Frozen-Thawed Frog (*Rana esculenta*) legs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.64, p.141-143, 1994.
- PAYNE, S.R., SANDFORD, D., HARRIS, A., YOUNG, O.A. The effects of antifreeze proteins on chilled and frozen meat. **Meat Science**, v.37, p.429-438, 1994.
- PEARSON, A.M. La Función Muscular y los Cambios *Post-Mortem*. In: PRICE, J.F., SCHWEIGERT B.S. **Ciência de la Carne y los Productos Cárnicos**. 2 ed. Zaragoza: Editorial Acribia, p.139-173, 1994.
- PEARSON, A.M. Physical and Biochemical Changes Occurring in Muscle during Storage and Preservation. In: BECHTEL, P.J. **Muscle as food**. New York: Academic Press, p.103-134, 1986.
- PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. Scientific Basis for Electrical Stimulation. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (Eds.). **Advances in Meat Research**, v.1 (Electrical Stimulation) New York: Elsevier Applied Science, p.185-218, 1985.
- PETROVIC, L., GRUJIC, R., PETROVIC, M. Definition of the optimal freezing rate - 2. Investigations of the physico-chemical properties of beef *M. longissimus dorsi* frozen at different freezing rates. **Meat Science**, v.33, p.319-331, 1993.
- PUOLANNE, E.J., KIVIKARI, R. Determination of the buffering capacity of postrigor meat. **Meat Science**, v.56, p.7-13, 2000.
- PUOLANNE, E.J., PÖSÖ, A.R., RUUSUNEN, M.H., SEPPONEN, K.V., KYLÄ-PUHJU, M.S. Lactic Acid in Muscle and its Effects on Meat Quality. In: 55th ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, American Meat Science Association, 2002. **Proceedings...** (International Award Lecture), 2002. p.57-62.
- PUTNAM, R.W., BENNETT, A.F. Histochemical, enzymatic, and contractile properties of skeletal muscles of three anuran amphibians. **American Journal of Physiology**, v.244 (Regulatory Integrative Comp. Physiol., 13), R558-R567, 1983.

- RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M.; MOURA, O. M.; PEIXOTO, F. S.; NEPOMUCENO, L. C. **Perfil de Desenvolvimento e Evolução do Rendimento em Carcaças de Rãs-Touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802)**. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 1998, Rio de Janeiro , Campinas-SP Sociedade Brasileira de Ciencia e Tecnologia de Alimentos, 1998, v. 1, n. , p. 338-341
- RAMOS, E.M. **Características Alométricas e Químicas de Rã-Touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802)**. Viçosa: UFV, 2000. 104p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- RAMOS, E.M., GOMIDE, L.A.M., PARREIRAS, F.M., LIMA, S.L., PETERNELLI, L.A. Effect of Sex and Live Weight on Bullfrog (*Rana catesbeiana*) Meat Composition. In: 49th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 31st August - 05th September, 2003. **Proceedings...**, Campinas - SP, p.29-30, 2003.
- REHBEIN, H. Physical and Biochemical Methods for the Differentiation Between Fresh and Frozen-Thawed Fish or Fillets. **Italy Journal of Food Science**, v.4, p.75-86, 1992.
- ROSENVOLD, K., ANDERSEN, H.J. Factors of significance for pork quality - a review. **Meat Science**, v.64, p.219-237, 2003.
- SALES, J., MELLETT, F.D. *Post-mortem* pH decline in different ostrich muscles. **Meat Science**, v.42, p.235-238, 1996.
- SAMS, A.R. Commercial Implementation of Postmortem Electrical Stimulation. **Poultry Science**, v.78, p.290-294, 1999.
- SAMS, A.R., JANKY, D.M. Characterization of Rigor Mortis Development in Four Broiler Muscles. **Poultry Science**, v.70, p.1003-1009, 1991
- SANTÉ, V.S., FERNANDEZ, X., MONIN, G., RENOU, J.-P. Nouvelles Méthodes de Mesure de la Qualité des Viandes de Volaille. **INRA Productions Animales**, v.14, p.247-254, 2001.
- SAVELL, J.W. Industrial Applications of Electrical Stimulation. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (Eds.). **Advances in Meat Research**, v.1 (Electrical Stimulation) New York: Elsevier Applied Science, p.219-236, 1985.
- SAYRE, R.N., BRISKEY, E.J., HOESTRA, W.G. Comparison of muscle characteristics and post-mortem glycolysis in three breeds of swine. **Journal of Animal Science**, v.22, p.1012-1020, 1963.
- SCHMDIT, G.R., CASSENS, R.G., BRISKEY, E.J. Development of an Isotonic-Isometric Rigorometer. **Journal of Food Science**, v.33, p.239-241, 1968.
- SEWELL, D.A., HARRIS, R.C., MARLIN, D.J., DUNNETT, M. Estimation of the carnosine content of different fibre types in the middle gluteal muscle of the thoroughbred horse. **Journal of Physiology**, v.455, p.447-453, 1992.
- SHENOUDA, S.V. Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. **Advances in Food Research**, v.26, p.275-311, 1980.

- SIGHOLT, T., ERIKSON, U., RUSTAD, T., JOHANSEN, S., NORDTVEDT, T.S., SELAND, A. Handling stress and storage temperature affect meat quality of farmed-raised atlantic salmon (*Salmo salar*). **Journal of Food Science**, v.62, n.4, p.898-905, 1997.
- SKJERVOLD, P.O., RØRA, A.M.B., FJÆRA, S.O., VEGUSDAL, A., VORRE, A., EINEN, O. Effects of pre-, in-, or post-rigor filleting of live chilled Atlantic salmon. **Aquaculture**, v.194, p.315-326, 2001.
- SMITH, G.C. Effects of Electrical Stimulation on Meat Quality, Color, Grade, Heat Ring and Palatability. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (Eds.). **Advances in Meat Research**, v.1 (Electrical Stimulation) New York: Elsevier Applied Science, p.121-158, 1985.
- SMITH, M.C., JUDGE, M.D., STADELMAN, W.J. A "Cold Shortening" Effect in Avian Muscle. **Journal of Food Science**, v.34, p.42-46, 1969.
- SQUIRE, J. **The Structural Basis of Muscular Contraction**. New York: Plenum Press, 1981. 698p.
- STEINER, A.A., PETENUSCI, S.O., BRENTGANI, L.G., BRANCO, L.G.S. The Importance of Glucose for the Freezing Tolerance/Intolerance of the Anuran Amphibians *Rana catesbeiana* and *Bufo paracnemis*. **Revista Brasileira de Biologia**, v.60, n.2, p.321-328, 2000.
- STEWART, M.K., FLETCHER, D.L., HAMM, D., THOMSON, J.E. The influence of hot boning broiler breast muscle on pH decline and toughening. **Poultry Science**, v.63, p.1935-1939, 1984.
- STIFFLER, D.M., SAVELL, J.W., SMITH, G.C., DUTSON, T.R., CARPENTER, Z.L. Electrical Stimulation: Purpose, Application and Results. **Texas Agricultural Extension Service Bulletin (B-1375)**, 1982. 10p.
- STOREY, J.M., STOREY, K.B. Triggering of cryoprotectant synthesis by the initiation of ice nucleation in the freeze tolerant frog *Rana sylvatica*. **Journal of Comparative Physiology**, v.B156, p.191-195, 1985.
- STOREY, K.B. Glycolysis and the regulation of cryoprotectant synthesis in liver of the freeze-tolerant wood frog. **Journal of Comparative Physiology**, v.157, p.373-380, 1987.
- STOREY, K.B., MOSSER, D.D., DOUGLAS, D.N., GRUNDY, J.E., STOREY, J.M. Biochemistry below 0°C: nature's frozen vertebrates. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v.29, p.293-307, 1996.
- STOREY, K.B., STOREY, J.M. Biochemical adaptation for freezing tolerance in the wood frog. *Rana sylvatica*. **Journal of Comparative Physiology**, v.B155, n.1. p.29-36, 1984.
- STOREY, K.B., STOREY, J.M. Freeze tolerant frogs: cryoprotectants and tissue metabolism during freeze-thaw cycles. **Canadian Journal of Zoology**, v.64, n. 1, p.49-56, 1986a.
- STOREY, K.B., STOREY, J.M. Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially-hibernating amphibians. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.83A, p.613-617, 1986b.
- STOREY, K.B., STOREY, J.M. Freeze tolerance in animals. **Physiological Reviews**, v.68, p.27-84, 1988.

- SUTER, D.A., MARSHALL, W.H., DUTSON, T.R., CARPENTER, Z.L. Effect of freezing on the mechanical properties of lamb loin chops. **Journal of Food Science**, v.41, p.1455-1456, 1976.
- TAYLOR, A.A., MARTOCCIA, L. The effect of low voltage and high voltage electrical stimulation on pork quality. **Meat Science**, v.9, p.319-326, 1995.
- TAYLOR, A.A., NUTE, G.R., WARKUP, C. The effect of chilling, electrical stimulation and conditioning on pork eating quality. **Meat Science**, v.39, p.339-347, 1995.
- TAYLOR, A.A., TANTIKOV, M.Z. Effect of different electrical stimulation and chilling treatments on pork quality. **Meat Science**, v.31, p.381-395, 1992.
- TOLDRÁ, F., TORRERO, Y., FLORES, J. Simple Test for Differentiation Between Fresh Pork and Frozen/Thawed Pork. **Meat Science**, v.29, p.177-181, 1991.
- VARNAN, A.H, SUTHERLAND, J.P. **Meat and Meat Products**. New York: Chapman & Hall, 1995. 430p.
- VINCENZO, S., FRANCESCO, F., GIOVANNA, P. A Micro-Method for the Differentiation of Fresh from Frozen Fish Muscle. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v.36, p.811-817, 1985.
- WAGNER, J.R., AÑÓN, M.C. Effect of freezing rate on the denaturation of myofibrillar proteins. **Journal of Food Technology**, v.20, p.735-744, 1985.
- WALKER, S.J., BETS, G. Chilled foods microbiology. In: STRINGER, M., DENNIS, C. (eds) **Chilled Foods: A Comprehensive Guide**. 2nd Edition, New York: CRC Press, pp. 2000.
- WANG, D., TANG, J., CORREIA, L.R., GILL, T.A. Postmortem Changes of Cultivated Atlantic Salmon and Their Effects on Salt Uptake. **Journal of Food Science**, v.63, n.4, p.634-637, 1998.
- WARRISS, P.D. Exsanguination of animals at slaughter and the residual blood content of meat. **Veterinary Record**, v.22, p.292-295, 1984.
- WARRISS, P.D. The residual blood content of meat. A review. **Journal of Science Food Agriculture**, v.28, p.457-462, 1977.
- WARRISS, P.D., BROWN, S.N., NUTE, G.R., KNOWLES, T.G., EDWARDS, J.E., PERRY, A.M., JOHNSON, S.P. Potential interactions between the effects of preslaughter stress and post mortem electrical stimulation of the carcasses on meat quality in pigs. **Meat Science**, v.41, n.1, p.55-68, 1995.
- WHITAKER, J.R., FUJIMAKI, M. **Chemical deterioration of proteins**. Ed. University of California, 1980.
- WHITING, R.C. Calcium Uptake by Bovine Muscle Mitochondria and Sarcoplasmic Reticulum. **Journal of Food Science**, v.45, p.288-292, 1980.
- WIKLUND, E., STEVENSON-BARRY, J.M., DUNCAN, S.J., LITTLEJOHN, R.P. Electrical stimulation of red deer (*Cervus elaphus*) carcasses - effects on rate of pH-decline,

meat tenderness, colour stability and water-holding capacity. **Meat Science**, v.59, p.211-220, 2001.

WOOD, D.F., RICHARDS, J.F. Isometric Tension Studies on Chicken Pectoralis Major Muscle. **Journal of Food Science**, v.39, p.525-529, 1974.

ZARITZKY, N.E. Factors affecting the stability of frozen Foods. In: KENNEDY, J. (ed) **Managing frozen foods**. 2nd Edition, New York: CRC Press, pp.111-135, 2000.

Efeito dos Métodos de Insensibilização e Sangria sobre o Conteúdo de Pigmentos Heme e Cor de Carnes de Rãs-Touro

Eduardo M. RAMOS¹, Lúcio A.M. GOMIDE^{1,*}, Paulo Rogério FONTES¹,
Alcinéia L.S. RAMOS¹, Luiz Alexandre PETERNELLI².

Publicado (Apêndice B): Meat Color Evaluation and Pigment Levels in Bullfrog (*Rana catesbeiana*) Slaughtered by Different Methods. **Aquaculture**, v.245, p.175-182, 2005.

¹ Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa (UFV). Av. PH Rolfs, s/n, Campus Universitário. CEP: 36571-000, Viçosa – MG, Brazil.

² Departamento de Informática, Setor de Estatística, DPI/UFV

* Tel: 55 (31) 3899-1754; Fax: 55 (31) 3899-2208; E-mail: lagomide@ufv.br

RESUMO

Avaliaram-se o efeito do tipo de insensibilização (termonarcore ou eletronarcore) e do uso da etapa de sangria sobre o conteúdo de pigmentos heme e os índices objetivos de cor da carne de rãs-touro. O tipo de insensibilização não influenciou ($P > 0,05$) a cor objetiva ou o conteúdo total de pigmentos heme e o conteúdo relativo das formas químicas destes pigmentos na superfície da carne. Entretanto, o conteúdo de mioglobina se apresentou menor em animais insensibilizados por eletronarcore ($P < 0,05$). De um modo geral, o conteúdo de mioglobina encontrado na carne de rã foi similar ao encontrado nos músculos brancos de aves. A etapa de sangria mostrou ser eficiente na melhoria da qualidade final da carne, que se apresentou mais clara e com o índice de amarelo (b^*) exercendo uma importante participação relativa. O conteúdo de hemoglobina retido no músculo de animais sangrados foi menor ($P < 0,05$) do que de animais não sangrados, existindo uma correlação negativa ($P < 0,05$) com o peso vivo ao abate. As formas químicas relativas dos pigmentos heme na superfície da carne, oximioglobina (O_2Mb), mioglobina reduzida (Mb^+) e metamioglobina (MMb), apresentaram

alta correlação com a luminosidade (L^*), índice de vermelho (a^*) e índice de amarelo (b^*), respectivamente.

Palavras-Chave: Insensibilização; Sangria; Rã-Touro; Hemoglobina; Mioglobina; Cor.

INTRODUÇÃO

O maior requerimento para se obter e manter a qualidade da carne no tocante à sua conservabilidade, aparência e mesmo durante o ato de degustação, é o de remover a maior quantidade possível de sangue da carcaça (LAWRIE, 1985).

A cor da carne fresca se deve, principalmente, à concentração e estado químico da mioglobina (Mb) e, em parte, da hemoglobina (Hb) que permanece no tecido como sangue residual (FLEMING et al., 1960). Áreas musculares que contêm elevada concentração de hemoglobina apresentam uma maior velocidade de descoloração, principalmente durante o congelamento, causando uma aparência indesejável ao produto (HUNT e KROPF, 1987). Contusões, hemorragias e outras conseqüências da presença de sangue residual, são considerados os maiores defeitos em carnes, principalmente em aves (KRANEN et al., 1999), onde a inadequada remoção de sangue pode justificar a condenação da carcaça ou a sua classificação como de qualidade inferior (BERAQUET, 1994; KOTULA e HELBACKA, 1966a,b).

Além das alterações na aparência e sabor, a capacidade de conservação da carne mal sangrada torna-se limitada. Devido ao grande teor protéico e por possuir um elevado pH (7,35 a 7,45), o sangue constitui um excelente meio para o crescimento de microrganismos, sofrendo uma rápida putrefação (ABERLE et al., 2001).

Embora a maioria da hemoglobina presente no músculo vivo seja removida quando o animal é abatido, o teor de hemoglobina remanescente na carne é altamente dependente do tempo, do método e das condições de insensibilização e sangria (FLEMING et al., 1960; LAWRIE, 1985; AHN e MAURER, 1988).

O abate e o processamento de rãs para o consumo humano têm recebido atenção, embora de forma tímida, quanto ao seu desenvolvimento tecnológico. Atualmente, são adotadas como critério de qualidade, as recomendações do CODEX ALIMENTARIUS (1984), assim como o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (BRASIL, 1997), que define a carne de rã dentro da denominação genérica de “pescado”.

No Brasil, os métodos de insensibilização atualmente utilizados no abate comercial de rãs, podem ser divididos em dois grupos: por imersão em água gelada e, ou soluções salinas

concentradas e, por eletronarcese (LONGO, 1986; LIMA e AGOSTINHO, 1988; ALBINATI, 1994). A utilização de eletronarcese para o abate de rãs é mais recente (AYAPPAN PILLAI, 1986; ALBINATI, 1994), e tem mostrado ser mais adequado ao processo de abate do que os métodos de insensibilização tradicionais (ALBINATI, 1994). Entretanto, em levantamento realizado por LIMA et al. (1999) naquele ano, todos os abatedouros registrados em operação no país, ou em processo de obtenção de registro no SIF ou SIE, aplicavam o processo de termonarcese, efetuado em tinas com água e gelo.

Nas diretrizes do CODEX ALIMENTARIUS (1984) para o abate e processamento de coxas de rã, a sangria é feita através de um corte na altura da cintura pélvica e posterior imersão das coxas em solução salina gelada. No Brasil, o aproveitamento da carcaça inteira da rã, tem obrigado a se utilizar outros métodos de sangria, que minimizem o risco de contaminação da carne (LOIAZA, 1996).

Baseados na regulamentação do RIISPOA, os abatedouros de rãs brasileiros têm utilizado um tempo de sangria de 3 minutos, embora ALBINATI (1994) tenha encontrado um tempo final de sangria de 4 e 6 minutos para animais insensibilizados por eletronarcese e termonarcese, respectivamente.

Na insensibilização por termonarcese (água e gelo), a sangria é dificultada pelo resfriamento do animal, resultando em menor volume de sangue na exsangüinação (ALBINATI, 1994). A maior retenção de sangue em animais pecilotérmicos insensibilizados pelo uso de baixas temperaturas vem de encontro com as observações de STOREY e STOREY (1984 e 1985), efetuadas em *Rana sylvatica*, de que estas entram em estado letárgico, mostrando-se não respirar, não sangrar, e os órgãos surgem pálidos, aparentemente destituídos de sangue, ao passo que o sangue parece ter empossado nas sinuosidades em volta do coração. Em rãs-touro, insensibilizadas por termonarcese, MOURA (2000) descreveu um acúmulo visual de sangue na cavidade interna e, aparentemente, sua ausência quase total na musculatura, o que também foi observado por RAMOS (2000).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do peso ao abate e da etapa de sangria, associada aos diferentes métodos de insensibilização (eletronarcese e termonarcese), através do conteúdo residual de hemoglobina e pigmentos heme, na quantidade de sangue residual presente na carne. Também objetivou determinar a cor objetiva e determinar o percentual de pigmentos relativos na superfície da carne, a fim de se verificar o efeito destes fatores sobre a cor do produto obtido.

MATERIAIS E MÉTODOS

Abate

Foram utilizadas 40 rãs, machos e fêmeas, da espécie *Rana catesbeiana*, com peso vivo médio de 220 ± 33 gramas. As rãs foram escolhidas ao acaso e separadas em quatro grupos de 10 animais segundo o método de abate:

Grupo 1: animais insensibilizados por termonarcole e submetidos a sangria;

Grupo 2: animais insensibilizados por termonarcole e não submetidos a sangria;

Grupo 3: animais insensibilizados por eletronarcole e submetidos a sangria;

Grupo 4: animais insensibilizados por eletronarcole e não submetidos a sangria;

Previamente ao abate, os animais foram mantidos em jejum hídrico de 24 horas (MOURA et al., 2001), após o que foram pesados, insensibilizados e abatidos. A insensibilização por termonarcole foi realizada pela imersão dos animais em água e gelo, na proporção de 1:1, por 15 minutos, após o que foram penduradas pelas patas traseiras. Na eletronarcole, as rãs foram penduradas pelas patas traseiras e insensibilizadas mediante aplicação de choque elétrico (60 V, 60 Hz), durante sete segundos (ALBINATI, 1994), pelo uso de garras presas no nariz e em uma das patas traseiras. Os animais insensibilizados foram sangrados pela secção dos vasos do tronco cardíaco (ALBINATI, 1994). Após um período mínimo de 3 minutos de sangria, procedeu-se à evisceração, remoção da pele e toailete das carcaças, sob jatos constantes de água (LOIAZA, 1996).

Determinação de Pigmentos Heme

Imediatamente após a etapa de toailete, a musculatura de uma das pernas, de cada animal, foi removida identificada, embalada, congelada em nitrogênio líquido e mantida em ultra-freezer (NUAIRE) a -85°C , para análise posterior. No período máximo de uma semana, os tecidos musculares foram descongelados em refrigerador a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, por um período de 12 horas. Cinco gramas da amostra foram homogeneizadas em 25 mL de tampão fosfato 0,04 M (pH 6.8) (WARRIS, 1979), com auxílio de um triturador tipo ultraturrax (MARCONI). Nenhum exsudado (mínimo devido à elevada capacidade de retenção de água da carne de rã-touro) foi intencionalmente removido ou incluído antes da homogeneização das amostras.

Uma alíquota do homogenato obtido foi usada para determinação de pigmentos heme totais (WARRIS, 1979), utilizando a conversão dos pigmentos para a forma cianometá (cianometahemoglobina e cianometamioglobina). Em outra alíquota, a hemoglobina foi precipitada pela adição de acetato de chumbo (RICKANSRUD e HENRICKSON, 1967) e o conteúdo de mioglobina total foi avaliado segundo procedimento proposto por WARRIS (1979). O peso molecular usado no cálculo de pigmentos heme total e mioglobina foi o de 17,000 g/mol, sendo o conteúdo de hemoglobina no homogenato obtido por diferença (pigmentos heme totais - mioglobina).

Avaliação Objetiva da Cor

Uma das pernas de cada animal, aleatoriamente escolhida, foi utilizada para análise objetiva da cor, imediatamente após o abate, usando o aparelho Color Quest II (HunterLab, Reston, VA), conectado a um computador equipado com o programa *Universal System*. Para o cálculo dos índices de cor, os seguintes parâmetros foram usados: iluminante A; ângulo do observador de 10°; e leitura na escala CIELAB com a reflectância especular incluída (RSIN). Os índices de cor L^* , a^* e b^* foram obtidos considerando-se a média dos valores de cinco leituras realizadas em diferentes pontos da superfície da coxa não desossada. A tonalidade (C^*) e o ângulo de saturação (h^*) foram calculados pelas seguintes fórmulas: $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5}$ e $h^* = \arctan (b^*/a^*)$ (AMSA, 1991).

Análise do Espectro de Reflectância

O conteúdo relativo dos pigmentos, expresso como oximioglobina (O_2Mb), mioglobina reduzida (Mb^+) e metamioglobina (MMb), na superfície da carne, foi calculado a partir da curva de reflectância obtida na análise objetiva da cor, segundo o método de KRZYWICKI (1979). As curvas espectrais de reflectância foram obtidas na região do visível, entre 400 e 700 nm, realizadas em intervalos de 10 nm, sendo os valores intermediários (473, 525 e 572 nm) calculados por interpolação linear.

Análise Estatística

Os tratamentos foram dispostos em esquema fatorial 2x2 (insensibilização x sangria) com delineamento inteiramente casualizado. Os resultados obtidos foram submetidos à análise

de variância no programa SAS[®] System for Windows[™], versão 8.0 (SAS Institute Inc.), considerando um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhum dos parâmetros de cor foi afetado pela interação ($P > 0,05$) entre os métodos de insensibilização e sangria, indicando que estes fatores exercem efeitos independentes na cor, bem como na quantidade e proporção relativa das diversas formas químicas dos pigmentos heme presentes na carne de rã.

Estes resultados são diferentes daqueles encontrados por MOURA (2000), que reportou, ao longo da estocagem refrigerada, efeito da interação entre métodos de insensibilização e sangria sobre os valores de luminosidade (**L**), índice de vermelho (valor **a**) e índice de amarelo (valor **b**) na carne de rãs estocadas a 8°C. Entretanto, os valores de luminosidade encontrados neste trabalho são bastante similares àqueles iniciais reportados por MOURA (2000), embora este tenha usado a escala Hunter Lab ao invés da CIELAB.

Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) dos métodos de insensibilização sobre o conteúdo de pigmentos totais, de hemoglobina, bem como sobre a proporção relativa das formas químicas de mioglobina e dos índices CIELAB de cor da carne de rãs (Tabela 1.1). Entretanto, a concentração de mioglobina no músculo variou em função do tipo de insensibilização ($P < 0,05$).

Teores de mioglobina mais elevados na carne de rãs abatidas por termonarcolese não eram esperados, uma vez que todos os animais possuíam peso e idade similares, eram provenientes de um mesmo lote de criação e foram submetidos às mesmas condições ambientais e nutricionais. Entretanto, ROÇA et al. (2001) também observaram variações nos níveis musculares de mioglobina em carne bovina obtida a partir de diferentes métodos de insensibilização.

A diferença no teor de mioglobina em função dos métodos de insensibilização poderia ser oriunda de uma diferença no pH inicial, infelizmente não medido neste experimento. Entretanto, MOURA (2000) observou menores valores de pH inicial na carne de rãs insensibilizadas por eletronarcolese (pH 6,9) quando comparada com a termonarcolese (pH 7,3). É possível que menores valores de pH, associado a uma maior temperatura corporal, tenham contribuído para uma maior desnaturação protéica relativa dos pigmentos da carne, dificultando o processo de extração da mioglobina e mascarando os resultados obtidos para carnes de rãs insensibilizadas por eletronarcolese. Entretanto, os valores iniciais de pH (6,7 a 7,3), obtidos em experimentos anteriores, encontram-se distantes daqueles reportados por

LAWRIE (1985) que induzem a desnaturação das proteínas de bovinos. Segundo LAWRIE (1985), a 0°C, a precipitação das proteínas sarcoplasmáticas é da ordem de 0,4% em pH 7,1 e 0,6% em pH 6,5. Em temperaturas próximas de 10°C, estes valores são 0,4% para pH 7,1 e 0,8% para pH 6,5.

Tabela 1.1. Valores médios (\pm desvio padrão) dos índices de cor avaliados, do teor de pigmentos heme e suas proporções relativas¹

Índices	Termonarcese		Eletronarcese	
	c/ sangria	s/ sangria	c/ sangria	s/ sangria
Pigmentos totais (mg/g)	0,422 \pm 0,124a	0,618 \pm 0,207b	0,488 \pm 0,182a	0,746 \pm 0,270b
Hemoglobina (mg/g)	0,397 \pm 0,128a	0,592 \pm 0,204b	0,469 \pm 0,181a	0,731 \pm 0,266b
Mioglobina (mg/g)	0,025 \pm 0,012a	0,026 \pm 0,007a	0,018 \pm 0,005b	0,015 \pm 0,005b
Luminosidade (L*)	57,84 \pm 1,98a	57,11 \pm 1,54b	57,99 \pm 1,66a	56,37 \pm 1,96b
Índice de vermelho (a*)	2,42 \pm 1,15a	2,60 \pm 0,73b	1,94 \pm 0,96a	2,96 \pm 1,20b
Índice de amarelo (b*)	1,24 \pm 0,75a	0,46 \pm 0,92b	0,95 \pm 0,81a	0,01 \pm 1,05b
Saturação (C*)	2,85 \pm 1,05a	2,79 \pm 0,70a	2,33 \pm 0,86a	3,14 \pm 1,16a
Tonalidade (h*)	28,95 \pm 19,06a	7,84 \pm 21,76b	27,03 \pm 24,69a	-2,00 \pm 21,55b
Mb ⁺ (%)	16,97 \pm 4,82a	20,01 \pm 4,15b	15,41 \pm 4,94a	21,67 \pm 3,38b
O ₂ Mb (%)	51,83 \pm 4,21a	49,41 \pm 3,73b	52,72 \pm 4,44a	47,83 \pm 2,54b
MMb (%)	31,20 \pm 0,79a	30,15 \pm 1,55b	31,87 \pm 0,78 a	30,50 \pm 1,22b

¹As proporções relativas dos pigmentos heme referem-se às formas químicas da mioglobina e hemoglobina, mas serão descritas como: oximioglobina (O₂Mb), mioglobina reduzida (Mb⁺) e metamioglobina (MMb).

Médias seguidas de uma mesma letra (a, b), na linha, não diferem entre si ao nível de 5% de significância

O método de insensibilização não teve efeito ($P > 0,05$) sobre as concentrações relativas das suas diversas formas químicas, indicando não exercer efeitos significativos sobre os sistemas redutores e sobre o metabolismo do músculo.

Esta ausência de efeito dos métodos de insensibilização sobre os índices de cor e sobre as formas químicas dos pigmentos de mioglobina e hemoglobina indica que a coloração da carne de rã não é afetada por esta etapa do processo de abate, já que a mioglobina, único componente afetado, contribui, relativamente, muito pouco (0,9%) na concentração final de pigmentos da carne de rãs.

A ausência de diferença nos teores de pigmentos totais e de hemoglobina em função dos métodos de insensibilização confirma os resultados de ALBINATI (1994), que também não observou variação nos níveis musculares de ferro (usado pela autora para estimar, indiretamente, os níveis residuais totais de pigmentos na carne) em virtude dos métodos de insensibilização aplicados no abate de rãs-touro.

Apesar de não diferirem ($P > 0,05$) quanto ao teor de mioglobina para um mesmo método de insensibilização, de forma contrária aos resultados reportados por HEATH (1984) em frangos, os músculos de rãs não sangradas apresentam ($P < 0,05$) maiores teores de pigmentos totais e de hemoglobina do que os de rãs submetidas à etapa de sangria. Da mesma forma, observam-se diferenças nas concentrações relativas das diversas formas químicas dos pigmentos e nos índices de cor, exceto na saturação (C^*), influenciando no aspecto e qualidade final da carne de rãs.

A ausência de diferença quanto ao teor de mioglobina nos músculos sangrados e não sangrados, no mesmo método insensibilização, se justifica pelo fato de se ter abatido, numa mesma idade (peso) animais de mesmo grupo genético, submetidos a uma mesma dieta e criados numa mesma época.

A concentração de mioglobina encontrada na carne de rã equivale àquelas encontradas em músculos brancos de carnes de aves (0,01 a 0,58 mg/g) (AHN e MAURER, 1988; FLETCHER, 1999), devido à predominância de fibras brancas nos músculos de rã-touro (RAMOS et al., 2003). Esta concentração é considerada baixa e, assim como ocorre em carnes de aves (DRABKIN, 1950; AHN e MAURER, 1988), a concentração de citocromo c pode ser relativamente maior, exercendo um papel importante na pigmentação da carne de rã.

Menores valores de L^* em músculos de rãs não sangradas corroboram os resultados reportados na literatura. BOULIANNE e KING (1998) verificaram uma elevada correlação negativa entre o conteúdo de pigmentos totais e a luminosidade (L^*) em peitos de frangos, e GUZMAN et al. (1995) reportaram que a redução de luminosidade (L^*) em produtos cárneos é mais pronunciada quando da adição de quantidades crescentes de sangue. Tal fato é suportado pelo conceito de que a adição de uma maior quantidade de pigmento leva ao escurecimento da cor de um alimento ou superfície.

Os valores de a^* encontrados nos músculos de rã-touro são similares aos reportados por VAN LAACK et al. (2000) e BRESSAN et al. (2001) para peito de frango, possivelmente devido à maior proporção de fibras brancas no músculo destes animais (RAMOS et al., 2003). Outrossim, os maiores valores de a^* observados nos músculos de rãs não sangradas estão em consonância com os resultados para valor de a (Hunter Lab) reportados por MOURA (2000), também para músculos de rãs-touro não submetidas à etapa de sangria. BOULIANNE e KING (1998), também reportaram maiores valores de a^* em músculos de frango com maior conteúdo de pigmentos totais.

Finalmente, os maiores valores do índice de vermelho, considerado o índice mais sensível de cor em carnes (DVORAK et al., 2001), na carne de rãs não sangradas indicam a necessidade da etapa de sangria no processo de abate de rãs.

Os maiores valores de b^* observados nos músculos de rãs abatidas com a etapa de sangria, contradizem os resultados apresentados por MOURA (2000) para o índice de amarelo (obtido na escala Hunter Lab) e parece indicar uma participação relativa de outros cromóforos, como flavinas, vitamina B12, citocromos, oxidases e catalases na cor da carne de rãs, como ocorre em carnes de aves (Von ELBE e SCHWARTZ, 1996). Menores valores de b^* nos músculos de rãs não sangradas estão de acordo com as observações (BOULIANNE e KING, 1998); GUZMAN et al., 1995) de que um maior conteúdo de sangue (pigmento total) implica na redução do índice de amarelo em carnes frescas e produtos processados.

JEREMIAH et al. (1972) afirmaram que o valor b^* exerce um importante papel na avaliação da cor da carne, e INSAUSTI et al. (1999), ao trabalharem com estabilidade de cor de carnes bovinas durante a estocagem, concluíram que pequenas mudanças no valor b^* , quando relacionados com a descoloração de carnes, são tão importantes quanto grandes mudanças nos outros índices de cor. Vale ressaltar, que os valores de b^* encontrados para rã-touro correspondem a cerca de 50% dos valores de a^* , o que não é observado nos músculos de peito de frango (VAN LAACK et al., 2000; BRESSAN et al., 2001), cujos índices de amarelo são cerca de 2 a 4 vezes maiores do que os valores para os índices de vermelho.

Independente do método de insensibilização e abate, a cor da carne de rã pode ser considerada equivalente ao branco-cremoso indicado pelo CODEX ALIMENTARIUS (1984) como característica da carne de rãs e também verificado por MOURA (2000). Isto talvez se deva ao fato de que, embora significativas, as alterações causadas pela sangria nos índices de cor são pequenas ou se anulam. Neste sentido, a luminosidade da carne de animais sangrados é apenas cerca de 1,3% superior à dos não sangrados, enquanto que o aumento no valor de a^* nas rãs não sangradas tende a ser contrabalançado pela diminuição nos valores de b^* . Segundo FRANCIS e CLYDESDALE (1975), a mudança na cor de produtos alimentícios raramente ocorre somente em um índice de cor, sendo, geralmente, afetada pelos três valores (L^* , a^* , b^*).

O peso vivo (PV) ao abate apresentou correlação negativa ($P < 0,05$) com o conteúdo de hemoglobina retida no músculo, e elevada correlação positiva ($P > 0,01$) com o índice de amarelo e o teor relativo de MMb no músculo dos animais (Tabela 1.2).

A menor retenção de pigmentos totais (PT) e de hemoglobina (Hb) na carne com o aumento no peso do animal (correlação negativa PT x PV), diverge dos resultados encontrados para rã-touro (RAMOS et al., 2003) e para bovinos (ROÇA et al., 2001). Entretanto, RAMOS et al. (2003) usaram uma faixa de peso mais ampla (100 a 300 g), garantindo que os animais mais pesados também eram mais velhos. No presente experimento, no entanto, o peso vivo não está relacionado à idade do animal, mas provavelmente à

população dominante, sendo que, nos períodos de desova, o sexo tem influência marcante (RAMOS, 2000). Ou seja, independente do peso vivo (que neste experimento variou de 190 a 250 g), todos os animais usados eram de idades aproximadas e esta falta de diferença na concentração de pigmentos era esperada. Como neste experimento as fêmeas e os machos não foram separados, também é possível que as fêmeas estivessem mais pesadas que machos da mesma idade, devido ao fato destas estarem ovulando (RAMOS, 2000). Desta forma, a correlação negativa observada entre o peso vivo e pigmentos totais é inesperada e não pode ser explicada até o momento.

Tabela 1.2. Coeficientes de correlação entre os índices avaliados

	PT	Hb	Mb	L*	a*	b*	C*	h*	%O ₂ Mb	%Mb ⁺	%MMb
Hb	1,00**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mb	0,01 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L*	-0,15 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-	-	-	-	-	-	-	-
a*	0,27 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,16 ^{ns}	-0,46**	-	-	-	-	-	-	-
b*	-0,26 ^{ns}	-0,27 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,39*	-0,02 ^{ns}	-	-	-	-	-	-
C*	0,22 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-0,33*	0,95**	0,20 ^{ns}	-	-	-	-	-
h*	0,16 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,22 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	-0,68**	-0,11 ^{ns}	-	-	-	-
%O ₂ Mb	-0,15 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	1,00**	-0,49**	0,36*	-0,37*	-0,20 ^{ns}	-	-	-
%Mb ⁺	0,28 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,13 ^{ns}	-0,46**	0,95**	-0,17 ^{ns}	0,88**	0,07 ^{ns}	-0,49**	-	-
%MMb	-0,27 ^{ns}	-0,27 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,39*	-0,08 ^{ns}	0,99**	0,13 ^{ns}	-0,69**	0,37*	-0,27 ^{ns}	-
PV	-0,32*	-0,32*	0,023 ^{ns}	0,42**	-0,21 ^{ns}	0,93**	0,02 ^{ns}	-0,61**	0,40**	-0,39*	0,95**

*P < 0,05; **P < 0,01; ^{ns} diferença não significativa.

PT = Pigmento total; Hb = hemoglobina; Mb = mioglobina; L* = luminosidade; a* = índice de vermelho; b* = índice de amarelo; C* = saturação; h* = tonalidade; %O₂Mb = oximioglobina; %Mb⁺ = mioglobina reduzida; %MMb = metamioglobina; PV = Peso vivo ao abate. As proporções relativas dos pigmentos heme referem-se às formas químicas da mioglobina e hemoglobina.

A diminuição na retenção total de pigmentos em animais mais pesados é consistente (P > 0,05) com o aumento observado nos índices de amarelo (b*) nestes animais. Vale ressaltar que, embora o peso vivo ao abate tenha se correlacionado com o teor de pigmentos heme retidos na musculatura de rãs, o peso não se correlacionou (P > 0,05) com o teor de mioglobina.

A elevada correlação entre o teor relativo de MMb e o peso vivo das rãs parece indicar uma mudança no metabolismo muscular ou redução na eficiência do sistema metamioglobina redutase no músculo de rãs mais pesadas. RAMOS et al. (2003) demonstraram que durante o crescimento os músculos de rãs tornam-se mais oxidativos. Vários trabalhos mostraram que carnes oriundas de músculos com metabolismo mais oxidativo são mais propensas à

descoloração. LEDWARD (1985) reportou que músculos de bovinos com alta atividade de MMb redutase possuíam maior estabilidade de cor durante a estocagem. Entretanto, ECHEVARNE et al. (1990) e RENERRE e LABAS (1987) demonstraram que músculos brancos, de contração rápida, de bovinos, como o *Tensior fasciae latae*, são mais estáveis à descoloração do que músculos vermelhos, de contração lenta, como o *Diafragma medialis*. Estes autores mostraram que músculos de contração rápida possuem menor conteúdo de ferro heme (teor de mioglobina), atividade de citocromo a (+a₃) e taxa de consumo de oxigênio (OCR) e, embora possuísem menor atividade de MMb redutase, apresentavam menor quantidade relativa de MMb após estocagem. O'KEEFE e HOOD (1982) também verificaram que músculos mais oxidativos (elevada atividade da enzima succinato desidrogenase – SDH), como o *M. psoas major*, possuíam maior OCR e apresentavam-se mais propensos à descoloração do que músculos menos oxidativos como *M. longissimus dorsi*. Eles postularam que a alta OCR em músculos mais oxidativos acarreta em uma maior conversão de O₂Mb a Mb⁺ e, uma vez que este último pigmento é mais propenso à oxidação, o maior consumo de oxigênio é responsável pela descoloração mais rápida da carne. Segundo TROUT (2003), músculos com maior quantidade de mioglobina, e conseqüentemente alta OCR, geram maiores quantidades de espécies de oxigênio reativas, sendo o pigmento de mioglobina mais propenso à oxidação. Animais mais velhos e mais pesados apresentam maior quantidade de mioglobina do que animais jovens (LAWRIE, 1985).

Nenhuma correlação significativa foi observada entre o índice de vermelho (**a***) e o conteúdo de pigmentos na carne de rã-touro. Baixas correlações entre o índice de vermelho e o conteúdo de pigmentos também foram observadas na carne de suínos (FELDHUSEN, 1994; TAM et al., 1998), indicando que outros fatores além do conteúdo de pigmento são importantes para a percepção da cor vermelha em carnes (LINDAHL et al., 2001). Entretanto, os valores de **a*** apresentaram correlação negativa ($P < 0,01$) com o teor de O₂Mb e positiva ($P < 0,01$) com o teor de Mb⁺, presentes na superfície da carne.

No presente estudo o valor de **b*** também não teve nenhuma correlação significativa ($P > 0,05$) com o conteúdo de pigmentos, o que reforça o conceito (FELDHUSEN, 1994; TAM et al., 1998; LINDAHL et al., 2001) de que as formas químicas do pigmento, e não as suas concentrações, são importantes para a variação no índice de amarelo. Neste sentido, os valores de **b*** apresentaram elevada correlação positiva ($P < 0,01$) com o conteúdo relativo de MMb e menos pronunciada ($P < 0,05$) com o teor de O₂Mb. Uma forte correlação entre o índice de amarelo (**b***) e o conteúdo relativo de MMb é suportada pelos resultados de CARPENTER et al. (2001) que observaram que a percepção da coloração amarronzada está

associada com o aumento dos valores de b^* em carnes de bovinos estocadas em atmosfera contendo baixa concentração de oxigênio.

LINDAHL et al. (2001) reportaram que tanto o conteúdo de pigmentos, quanto a proporção de suas formas químicas, são importantes na variação do índice L^* na carne. Neste experimento, o valor L^* apresentou uma correlação significativa com os diferentes estados químicos da mioglobina presente na superfície da carne de rã, sendo altamente correlacionado com o conteúdo relativo de O_2Mb . Entretanto, a luminosidade da superfície da carne não se correlacionou significativamente ($P > 0,05$) com o conteúdo de pigmentos presentes. Outros trabalhos (LUNDSTRÖM et al., 1988; FELDHUSEN, 1994; TAM et al., 1998) relataram baixas correlações entre o valor L^* e o conteúdo de pigmentos.

Segundo LINDAHL et al. (2001), tanto a saturação (C^*) como o ângulo de tonalidade (h^*) são baseados nos valores de a^* e b^* e, conseqüentemente, são influenciados pelo conteúdo de pigmentos e pelo conteúdo relativos das formas químicas da mioglobina. Entretanto nossos resultados não apresentaram correlação significativa entre o conteúdo de pigmentos e estes índices.

CONCLUSÕES

Os tipos de insensibilização normalmente empregados no abate de rãs, termonarçose e eletronarçose, no tocante à cor objetiva e conteúdo de pigmentos, não influenciaram a qualidade final da carne.

A etapa de sangria no abate de rãs mostrou ser eficiente na melhoria da qualidade final da carne, uma vez que o conteúdo de hemoglobina retido no músculo de animais sangrados foi menor. Além disso, a cor final da carne de animais abatidos com a etapa de sangria apresentou-se mais clara e menos vermelha (numa tonalidade rósea), estando mais associada com a especificação de qualidade da carne de rãs feita pelo CODEX ALIMENTARIUS.

Embora o valor a^* seja considerado o índice mais importante na avaliação da cor de carnes tradicionais, os resultados sugerem que, para a carne de rãs, ambos os valores a^* e b^* têm participação representativa na avaliação da cor da carne obtida, o que parece se dever ao menor teor de pigmentos heme na sua carne. Assim, os resultados apontam para a necessidade de maiores estudos quanto à participação de outros pigmentos na cor da carne de rãs, de forma a definir quais os índices de cor devem ser considerados na avaliação de sua qualidade.

Para carne de rãs, o teor relativo de MMb apresenta elevada correlação com o peso ao abate, sendo a luminosidade, o índice de vermelho e o índice de amarelo os principais indicadores dos teores relativos de O_2Mb , Mb^+ e MMb , respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERLE, E.D., FORREST, J.C., GERRARD, D.E., MILLS, E.W. **Principles of Meat Science**. 4 ed. New York: Kendall/Hunt Publishing Company, 2001. 354p.

AHN, D.U., MAURER, A.J. Effects of Added Pigments, Salt, and Phosphate on Color, Extractable Pigment, Total Pigment, and Oxidation-Reduction in Turkey Breast Meat. **Poultry Science**, v.68, p.1088-1099, 1989.

ALBINATI, F. L. **Avaliação de diferentes métodos de insensibilização e sangria de rãs**. Viçosa: UFV, 1994. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 1994.

AMSA Guidelines for Meat Color Evaluation. In: 44th ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE. American Meat Science Association. June 9-12, 1991, Manhattan. **Proceedings...** Manhattan: National Live Stock and Meat Board, p.232-249, 1991.

AYYAPPAN PILLAI, S. Development of an apparatus for humane method of killing TECHNOLOGY frogs for frog leg processing industry. **Seafood Export Journal**, In: FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY ABSTRACTS, v.18, n.9, p.177, 1986.

BERAQUET, N.J. Abate e Evisceração. In: **Abate e Processamento de Frangos**. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. Campinas, S.P., p.19-24, 1994.

BOULIANNE, M., KING, A.J. Meat Color and Biochemical Characteristics of Unacceptable Dark-colored Broiler Chicken Carcasses. **Journal of Food Science**, v.63, n.5, p.759-762, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria da Defesa Agropecuária (SDA). Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). Divisão de Normas Técnicas. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29-03-52, alterado pelos Decretos nºs 1.255 de 25-06-62, 1.236 de 02-09-94, nº 1.812 de 08-02-96 e nº 2.244 de 04-06-97. Brasília, 1997. 154p.

BRESSAN, M.C., BERAQUET, N.J., LEMOS, A.L.S.C. Características de qualidade de carne em peito de frango utilizando a análise de componente principal. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n.35, 2001.

CARPENTER, C.H., CORNFORTH, D.P., WHITTIER, D. Consumer preferences for beef color and packaging did not affect eating satisfaction. **Meat Science**, v.57, p.359-363, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS. Recommended international code of hygienic practice for the processing of frog legs. Rome, FAO, **Codex Alimentarius Commission**, 1984. v.c.

DRABKIN, D.L. The Distribution of the Chromoproteins, Hemoglobin, Myoglobin, and Cytochrome c, in the Tissues of Different Species, and the Relationship of the Total Content of Each Chromoprotein to Body Mass. **Journal of Biological Chemistry**, v.132, p.317-333, 1950.

DVORAK, P., MUSILOVA, H., SVARCOVA, I. On-line Measurements of Colour of Pork. **Fleischwirtschaft International**, p.89-91, february of 2001.

- ECHEVARNE, C., RENERRE, M., LABAS, R. Metmyoglobin reductase activity in bovine muscles. **Meat Science**, v.27, p.161-172, 1990.
- FELDHUSEN, F. Einflüsse auf die postmortale Farbveränderung der Oberfläche von Schweinemuskulatur. **Fleischwirtschaft**, v.74, p.989-991, 1994.
- FLECHER, D.L. Poultry Meat Colour. In: RICHARDSON, R.I., MEAD, G.C. (eds) **Poultry Meat Science**. (Poultry Science Symposium Series, v.25) England: CABI Publishing, p.159-175, 1999.
- FLEMING, H.P., BLUMER, T.N., CRAIG, H.B. Quantative Estimation of Myoglobin and Hemoglobin in Beef Muscle Extracts. **Journal of Animal Science**, v.19, p.1164-1171, 1960.
- FRANCIS, F.J., CLYDESDALE, F.M. **Food Colorimetry: Theory and Applications**. Westport: The Avi Publishing company, 1975. 477p.
- GUZMAN, J.C., MCMILLIN, K.W., BIDNER, T.D., DUGAS-SIMS, S., GODBER, J.S. Texture, color and sensory characteristics of ground beef patties containing bovine blood proteins. **Journal of Food Science**, v.60, n.4, p.657-660, 1995.
- HEATH, G.B.S. The slaughter of broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, v.40, n.2, p.151-159. 1984
- HUNT, M.C., KROPF, D.H. Color and Appearance. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (eds.) **Advances in Meat Research**. v.3 (Restructured Meat and Poultry Products). New York: AVI Books, p.125-159, 1987.
- INSAUSTI, K., BERIAIN, M.J., PURROY, A., ALBERTI, P., LIZASO, L., HERNANDEZ, B. Colour stability of beef from different Spanish native cattle breeds stored under vacuum and modified atmosphere. **Meat Science**, v.53, p.241-249, 1999.
- JEREMIAH, L.E., CARPENTER, Z.L., SMITH, G.C. Beef colour as related to consumer acceptance and palatability. **Journal of Food Science**, v.37, p.476-479, 1972.
- KOTULA, A.W. HELBACKA, N.V. Blood Volume of Live Chickens and Influence of Slaughter Technique on Blood Loss. **Poultry Science**, v.45, p.684-88, 1966b.
- KOTULA, A.W.; HELBACKA, N.V. Blood Retained by Chicken Carcasses and Cut-Up Parts as Influenced by Slaughter Method. **Poultry Science**, v.45, p.404-410, 1966a.
- KRANEN, R.W., VAN KUPPEVELT, T.H., GOEDHART, H.A., VEERKAMP, C.H., LAMBOOY, E., VEERKAMP, J.H. Hemoglobin and Myoglobin Content in Muscles of Broiler Chickens. **Poultry Science**, v.78, p.467-476, 1999.
- KRZYWICKI, K. Assessment of Relative Content of Myoglobin, Oxymyoglobin and Metmyoglobin at the Surface of Beef. **Meat Science**, v.3, p.1-10, 1979.
- LAWRIE, R.A. **Meat Science**. 4 ed. New York: Pergamon Press, 1985. 451p.
- LEDWARD, D.A. Post-slaughter influences on the formation metmyoglobin in beef muscles. **Meat Science**, v.15, p.149-171, 1985.
- LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. **A criação de rãs**. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 187p.

- LIMA, S.L., CRUZ, T.A., MOURA, O.N. **Ranicultura: análise da cadeia produtiva**. Viçosa: Folha de Viçosa. 1999. 172p.
- LINDAHL, G., LUNDSTROM, K., TORNBERG, E. Contribution of pigment content, Myoglobin forms and internal reflectance to the colour of pork loin and ham from Pure breed pigs. **Meat Science**, v.59, p.141-151, 2001.
- LOAIZA, J.F.U. **Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de carne de rã (*Rana catesbeiana*) estocada sob refrigeração e congelamento**. Viçosa: UFV, 1996. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- LONGO, A.D. **Manual de ranicultura: uma nova opção da pecuária**. 3 ed. São Paulo: Ícone, 1986. 221p.
- LUNDSTRÖM, K., BARTON GADE, P., RUD ANDERSEN, J., HANSON, I. Pale pig meat - relative influence of PSE and low pigment content. In: 34TH INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 29 August–2 September, Brisbane, Australia, 1988, **Proceedings...**, p.584-587, 1988.
- MOURA, F.F., GOMIDE, L.A.M., RAMOS, E.M. Efeito do Jejum Pré-Abate Sobre a Qualidade da Carne de Rã-Touro (*Rana catesbeiana*). In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 2001, São Pedro, SP, **Anais...**, p.114-115, 2001.
- MOURA, O.M. **Efeito de métodos de insensibilização e sangria sobre características de qualidade da carne de rã-touro e, perfil das indústrias de abate**. Viçosa: UFV, 2000. 205p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- O'KEEFE, M., HOOD, D.E. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation on beef from muscles of differing color stability. **Meat Science**, v.7, p.209-228, 1982.
- RAMOS, E.M. **Características Alométricas, Químicas e Bioquímicas da Rã-Touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802)**. Viçosa: UFV, 2000. 104p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- RAMOS, E.M. GOMIDE, L.A.M., PETERNELLI, L.A. Glicolytic and oxidative activities of bullfrog (*Rana catesbeiana*) skeletal muscles during post-metamorphosis growth. In: 49TH INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 31 August - 5 September, 2003, Campinas, Brazil, **Proceedings...**, p.101-102, 2003.
- RENERRE, M., LABAS, R. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. **Meat Science**, v.19, p.151-165, 1987.
- RICKANSRUD, D.A., HENRICKSON, R.L. Total Pigments and Myoglobin Concentration in Four Bovine Muscles. **Journal of Food Science**, v.32, p.57-61, 1967.
- ROÇA, R.O., PADOVANI, C.R., FILIPI, M.C., SCHWACH, E., UEMI, A., SHINKAI, R.T., BIONDI, G.F. Efeitos dos Métodos de Abate de Bovinos na Eficiência da Sangria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.2, p.244-248, 2001.
- STOREY, J.M., STOREY, K.B. Triggering of cryoprotectant synthesis by the initiation of ice nucleation in the freeze tolerant frog, *Rana sylvatica*. **Journal of Comparative Physiology**, v.B156, p.191-195, 1985.

STOREY, K.B., STOREY, J.M. Biochemical adaptation for freezing tolerance in the wood frog, *Rana sylvatica*. **Journal of Comparative Physiology**, v.B155, n.1, p.29-36, 1984.

TAM, L.G., BERG, E.P., GERRARD, D.E., SHEISS, E.B., TAN, F.J., OKOS, M.R., & FORREST, J.C. Effect of halothane genotype on porcine meat quality and myoglobin autoxidation. **Meat Science**, v.49, p.41-53, 1998.

TROUT, G.R. Biochemistry of lipid and myoglobin oxidation in postmortem muscle and processed meats – effects on rancidity. **Brazilian Journal of Food Technology**, Especial Issue (lectures at the 49th International Congress of Meat Science and Technology), v.50-55, 2003.

VAN LAACK, R.L.J.M., LIU, C.H., SMITH, M.O., LOVEDAY, H.D. Characteristics of Pale, Soft, Exudative Broiler Breast Meat, **Poultry Science**, v.79, p.1057-1061, 2000.

VON ELBE, J.H., SCHWARTZ, S.J. Colorants. In: FENNEMA, O.W. (ed) **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker, Inc., p.651-722, 1996.

WARRISS, P.D. The Extraction of Haem Pigments From Fresh Meat. **Journal of Food Technology**, v.14, p.75-80, 1979.

Atividades Glicolítica e Oxidativa do Músculo Esquelético de Rãs-Touro Durante o Crescimento Pós-Metamorfose

Eduardo M. RAMOS¹, Lúcio A.M. GOMIDE^{1,*}, Luiz A. PETERNELLI²

Publicado (Apêndice B): Glicolytic and Oxidative Activities of Bullfrog (*Rana catesbeiana*) Skeletal Muscles During Post-Metamorphosis Growth. In: 49th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 31st August to 05th September, 2003. Campinas, Brazil. **Proceedings...**, Campinas: CTC/ITAL, p.101-102, 2003.

¹ Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa (UFV). Av. PH Rolfs, s/n, Campus Universitário. CEP: 36571-000, Viçosa – MG, Brazil.

² Departamento de Informática, Setor de Estatística, DPI/UFV

* Tel: 55 (31) 3899-1754; Fax: 55 (31) 3899-2208; E-mail: lagomide@ufv.br

RESUMO

Avaliou-se o teor de pigmentos totais e a capacidade oxidativa e glicolítica das fibras musculares esqueléticas do músculo *gastrocnemius* de rãs-touro e sua diferenciação durante o crescimento pós-metamorfose. A atividade oxidativa e glicolítica foi avaliada utilizando como indicadores as enzimas lactado desidrogenase (LDH) e citrato sintase (CS), respectivamente, em músculos de animais pesando entre 100 e 300 gramas. Tanto a capacidade glicolítica quanto oxidativa aumentou com a idade (peso vivo) do animal, com o músculo tornando-se, no entanto, mais oxidativo (menor relação LDH / CS) e com maior concentração de pigmentos totais. Entretanto, como o aumento nominal foi maior na atividade da LDH, concluiu-se que, mesmo após a diferenciação ocorrida com o aumento do peso vivo, as fibras musculares da rã-touro criada em cativeiro ainda são predominantemente glicolíticas.

Palavras-Chave: Capacidade oxidativa; Capacidade glicolítica; LDH; CS; Diferenciação; Rã-touro.

INTRODUÇÃO

As características bioquímicas da fibra muscular esquelética são importantes fatores que influenciam os processos bioquímicos *ante- e post-mortem* e, conseqüentemente, a qualidade da carne (KLONT et al., 1998), com efeitos diretos no seu processamento e estocagem. O tipo de fibra predominante no músculo esquelético tem influência na maciez, textura, suculência, sabor, cor e rendimento da carne (ABERLE et al., 2001), podendo ser classificada por métodos histoquímicos e, ou, bioquímicos. A análise bioquímica fornece uma melhor indicação da capacidade aeróbica e anaeróbica do músculo e, portanto, tem sido usada para avaliar as propriedades metabólicas através da medida de atividades enzimáticas (ESSÉN et al., 1980). Citrato sintase (CS; EC 4.1.3.7) e lactato desidrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) são enzimas frequentemente utilizadas como indicadoras oxidativa e glicolítica, respectivamente.

OGATA e MORI (1963) classificaram as fibras musculares de répteis e anfíbios em três tipos, baseado no seu diâmetro e na sua atividade enzimática predominante. Fibras vermelhas apresentam alta atividade de enzimas oxidativas, as fibras brancas apresentam baixa atividade e fibras intermediárias apresentam uma reação enzimática intermediária. Em músculos locomotores de anfíbios, PUTNAM e BENNETT (1983) encontraram que 80 a 90% da área muscular consistem de fibras brancas, com a remanescente composta por fibras intermediárias (características oxidativas e glicolíticas). Em músculos de *Rana pipiens*, as fibras vermelhas (oxidativas) foram avaliadas em menos de 1% da área de seção transversal.

Embora a carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*) possua uma aparência que sugere uma grande predominância de fibras brancas, MOURA (2000) reportaram que, dependendo do método de insensibilização aplicado, um tempo de 8 a 12 horas é necessário para o início do *rigor mortis* no músculo deste anfíbio. Trata-se de um intervalo de tempo muito elevado para o desenvolvimento do rigor em músculos glicolíticos e pode indicar uma diferenciação de fibras brancas (glicolíticas) em vermelhas (oxidativas) possivelmente influenciada pelo crescimento pós-metamorfose (peso vivo). Entretanto, a literatura referente à maioria dos animais domésticos indica que a diferenciação de fibras ocorre de outra forma (de vermelha para branca) à medida que o animal envelhece (KARLSON et al., 1999; ABERLE et al., 2001), embora LAWRIE (1985) tenha estabelecido que a atividade da citocromo oxidase (enzima marcadora oxidativa) no nascimento seja de apenas 8% do valor observado na fase adulta. Não foi encontrado na literatura indicações do efeito da idade sobre as mudanças metabólicas de músculos de rã-touro.

O objetivo deste trabalho foi determinar a capacidade oxidativa e glicolítica das fibras musculares esqueléticas de rã-touro e sua diferenciação durante o crescimento pós-metamorfose, avaliando a relação entre a atividade das enzimas LDH e CS.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram pesados e selecionados 6 animais de cada grupo de peso (100, 150, 200, 250 e 300 ± 5 g), metamorfoseados e criados no Ranário Experimental da UFV pelo sistema Anfigranja (LIMA e AGOSTINHO, 1988).

Abate

As rãs selecionadas foram identificadas, pesadas e mantidas em jejum e dieta hídrica por 48 horas antes do abate. Após insensibilização por imersão em água e gelo (1:1) por 15 minutos, as rãs foram sangradas pelo corte das veias cardíacas e suas carcaças evisceradas, lavadas e resfriadas em caixas contendo água e gelo. Os músculos *gastrocnemius* de cada rã foram removidos e um deles imediatamente submetido ao procedimento de extração enzimática. O outro músculo de cada animal foi submetido à análise de pigmentos.

Extração Enzimática

Cada músculo foi triturado no triturador de tecidos Marconi, pesado e homogeneizado em tampão fosfato (pH 7,4), contendo EDTA 2 mM e KCL 175 mM, adicionado num volume correspondente a 19 vezes o peso da amostra. O homogenato obtido foi congelado e descongelado três vezes e, então, centrifugado a 3000g (4°C) por 10 minutos (PUTNAM e BENNETT, 1983). Os sobrenadantes foram usados para a análise enzimática.

Atividade Enzimática

Os ensaios para lactato desidrogenase (LDH) e para citrato sintase (CS) foram realizados segundo os procedimentos relatado por BERGMAYER e BERNT (1974) e SRERE (1969), respectivamente. O conteúdo de proteína no sobrenadante foi determinado usando o método de Biureto. A atividade enzimática foi expressa em micromoles de produto por

minuto e grama de músculo (U/g de músculo) ou micromoles de produto por minuto e grama de proteína (U/g de proteína).

Análise de Pigmentos

O conteúdo de pigmentos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico da hematina proposto por HORNSEY (1956), com medidas a 640 nm. Valores de absorvância a 730 nm foram usados como atenuante acromático da luz (KRZYWICKI, 1979) para eliminar interferências devido à turbidez do extrato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto a capacidade glicolítica (Figura 2.1A) quanto oxidativa (Figura 2.1B) do músculo *gastrocnemius* de rã-touro, aumentam com o peso vivo (idade) do animal. Entretanto, o músculo torna-se mais oxidativo (Figura 2.2) a medida que envelhece (menor razão LDH/CS), sendo acompanhado por um aumento na concentração de pigmentos totais (Figura 2.3).

O aumento no metabolismo oxidativo e na concentração de pigmentos totais com a idade está de acordo com o padrão de diferenciação de fibras descrito por LAWRIE (1985), contrário ao reportado por KARLSON et al. (1999) e ABERLE et al. (2001). A diferenciação de fibras brancas em vermelhas, observada na rã-touro, pode ser oriunda do fato de que, quando criada em cativeiro, esta se torna menos ativa no tocante a caça e sobrevivência, reduzindo sua atividade de saltos, necessária para sua alimentação e fuga de predadores na natureza. Associado a isto, rãs mais pesadas dominam o território, tendo maior acesso ao alimento quando em cativeiro. Desta forma, à medida que envelhece e ganha peso, a rã-touro criada em cativeiro torna-se menos puladora e o músculo *gastrocnemius* é menos exigido, assim como a necessidade de fonte energética imediata provida pelo mecanismo glicolítico. Isto está em consonância com resultados reportados por CHOI e PARK (1996) que mostraram que sapos, anfíbios puladores lentos, possuem maior razão CS/LDH no músculo *gastrocnemius* do que as rãs, anfíbios puladores rápidos.

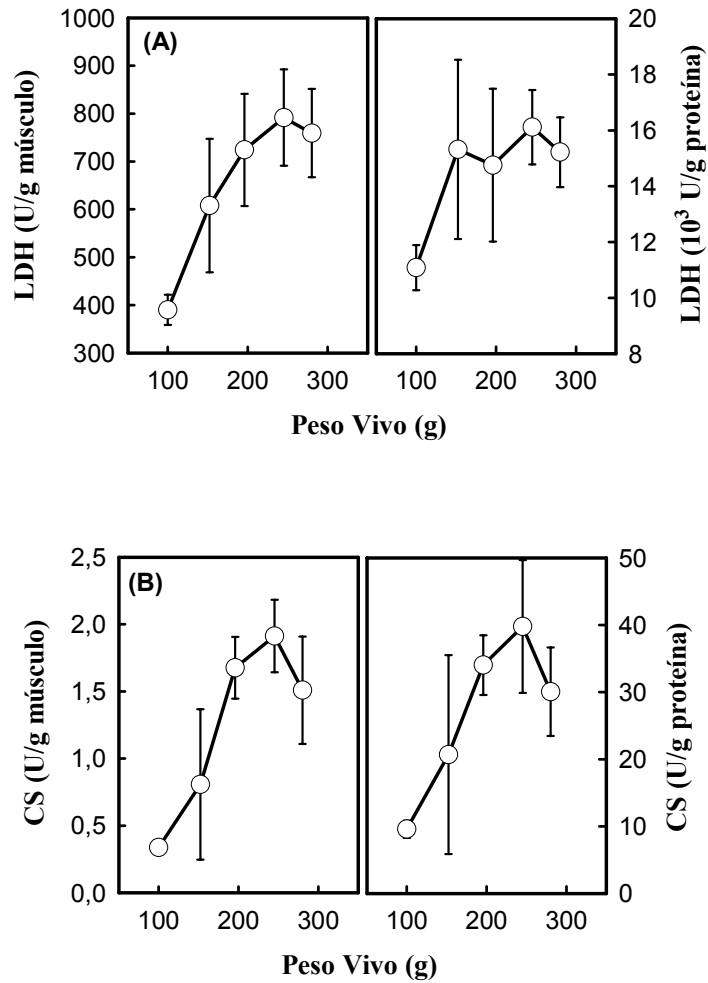


Figura 2.1. Atividade enzimática das enzimas LDH (A) e CS (B) em músculos *gastrocnemius* de rã-touro durante o crescimento pós-metmorfose.

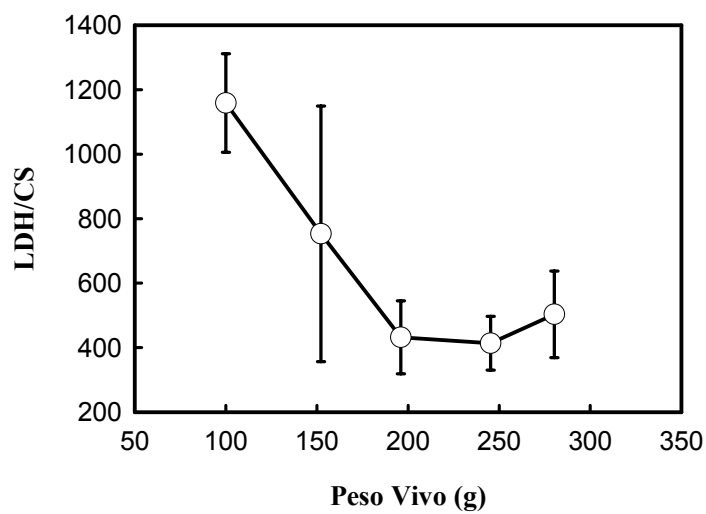


Figura 2.2. Relação entre a atividade enzimática da LDH e CS em músculos *gastrocnemius* de rã-touro durante o crescimento pós-metmorfose.

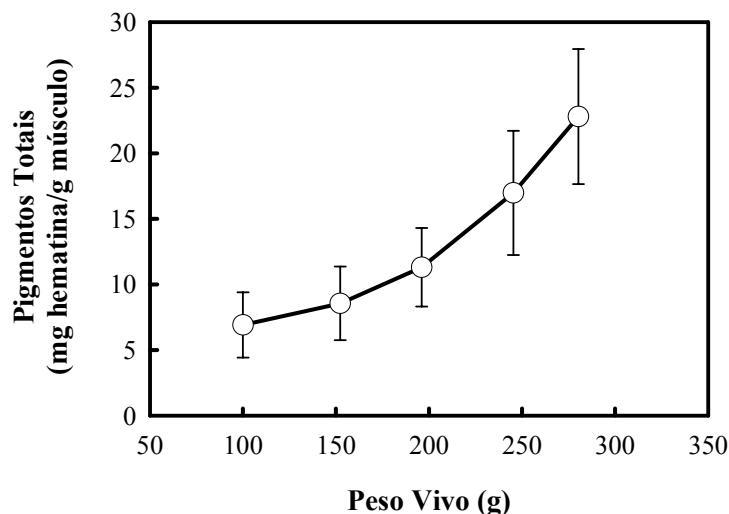


Figura 2.3. Conteúdo de pigmentos totais em músculos *gastrocnemius* de rã-touro durante o crescimento pós-metmorfose.

Apesar do exposto, estas mudanças não parecem ser suficientes para mudar a classificação das fibras musculares predominantes no músculo de rãs-touro ou alterar o desenvolvimento das reações *post-mortem*, como o rigor, uma vez que, embora o aumento na atividade da CS seja proporcionalmente maior, o aumento nominal da atividade da LDH é muito maior. Desta forma, o elevado tempo de *rigor mortis* encontrado por MOURA (2001) em músculos de rã-touro é, provavelmente, mais influenciado pelas características metabólicas e fisiológicas do músculo destes animais, como sua capacidade de metabolizar ácido láctico, independente da ação do fígado (FOURNIER e GUDERLEY, 1992; FOURNIER et al., 1994), produzir alanina como metabólico final da glicólise (STOREY e STOREY 1986) e possuir uma elevada capacidade de absorver o oxigênio atmosférico (BROWN JR., 1964).

CONCLUSÃO

Com o aumento do peso vivo ao abate e da idade do animal, a carne de rã-touro se torna mais oxidativa (baixa relação LDH / CS) e apresenta maior concentração de pigmentos heme totais. Ainda assim, as fibras musculares da rã-touro criada em cativeiro são predominantemente glicolíticas, com atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) muito superior à atividade da enzima citrato sintase (CS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERLE, E.D., FORREST, J.C., GERRARD, D.E., MILLS, E.W. **Principles of Meat Science**. 4 ed. New York: Kendall/Hunt Publishing Company, 2001. 354p.

BERGMEYER, H.U., BERNT, E. Lactate Deydrogenase: UV-Assay with Pyruvate and NADH. In: BERGMEYER, H.U. (ed) **Methods of Enzymatic Analysis**. 2 ed. New York: Academic Press Inc, v.2, p.574-579, 1974.

BROWN JR., G. W. The metabolism of Amphibia, p.1-98. In: MOORE, J. A. **Physiology of the Amphibia**. New York: Academic Press, 1964. v. 1. 654 p.

CHOI, I., PARK, K. Variations in Take-Off Velocity of Anuran Amphibians: Relation to Morphology, Muscle Contractile Function and Enzyme Activity. **Compendium of Biochemistry and Physiology**, v.113A, n.4, p.392-400, 1996.

HORNSEY, H.C. The Colour of Cooked Cured Pork. I - Estimation of the Nitric oxide-Haem Pigments. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v.7, p.534-540, 1956.

ESSÉN, B., LINDHOLM, A., THORNTON, J. Histochemical Properties of Muscle Fibre Types and Enzyme Activities in Skeletal Muscles of Standardred Trotters of Different Ages. **Equine Veterinary Journal**, v.12, n.4, p.175-180, 1980.

FOURNIER, P., GUDERLEY, H. Metabolic fate of lactate after vigorous activity in the leopard frog, *Rana pipiens*. **American Journal of Physiology**, v.262, 1992.

FOURNIER, P. A., NADEAU, A., GUDERLEY, H. The pattern of catecholamine response to burst activity in leopard frogs, *Rana pipiens*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 95, p.125-132, 1994.

KARLSSON, A.H., KLONT, R.E., FERNANDEZ, X. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. **Livestock Production Science**, v.60, p.255-269, 1999.

KRZYWICKI, K. Assessment of Relative Content of Myoglobin, Oxymyoglobin and Metmyoglobin at the Surface of Beef. **Meat Science**, v.3, p.1-10, 1979.

KLONT, R.E., BROCKS, L., EIKELENBOOM, G. Muscle Fibre Type and Meat Quality. **Meat Science**, v.49, n. Suppl. 1, p.S219-S229, 1998.

LAWRIE, R.A. **Meat Science**. 4 ed. New York: Pergamon Press, 1985. 451p.

LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. **A criação de rãs**. Rio de Janeiro: Editora Globo, 1988.

MOURA, O.M. **Efeito de métodos de insensibilização e sangria sobre características de qualidade da carne de rã-touro e, perfil das indústrias de abate**. Tese de Doutorado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) Viçosa: UFV, 2000. 205p.

OGATA, T., MORI, M. Histochemical study of oxidative enzymes in vertebrate muscle. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.12, p.171-182, 1963.

PUTNAM, R.W., BENNETT, A.F. Histochemical, Enzymatic, and Contractile Properties of Skeletal Muscles of Three Anuran Amphibians. **American Journal of Physiology**, v.244 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 13), p.R558-R567, 1983.

SRERE, P.A. Citrate Synthase. In: LOWENSTEIN, J.W. (ed.) **Methods of Enzymology**. New York: Academic Press, v.13, p.3-11, 1969.

STOREY, K. B., STOREY, J. M. Freeze tolerant frogs: cryoprotectants and tissue metabolism during freeze-thaw cycles. **Canadian Journal of Zoology**, v.64, n. 1, p.49-56, 1986.

Caracterização do Desenvolvimento do *Rigor Mortis* em Músculos de Rãs-Touro Insensibilizadas por Eletronarcose e Termonarcose

RESUMO

O desenvolvimento da tensão isométrica e os principais componentes bioquímicos musculares foram avaliados por 36 horas no intuito de caracterizar as alterações *post-mortem* na carne de rãs-touro (*Rana catesbeiana*) abatidas após insensibilização por termonarcose ou eletronarcose. Para as análises bioquímicas a carne foi mantida a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ e as amostragens conduzidas após 3, 6, 9, 12, 24 e 36 horas. A análise de tensão isométrica de músculo *gastrocnemius* de animais insensibilizados por eletronarcose mantidos a $9 \pm 2^\circ\text{C}$, realizada imediatamente após o abate, indicou o início do rigor por volta de 22 horas *post-mortem* e o estabelecimento próximo de 32 horas. Baseado no valor R, o início do rigor ocorreu 25 horas pós-abate para a eletronarcose, quando o pH muscular estava próximo de 6,4. No período avaliado, não foi observado o início do rigor nas rãs insensibilizadas por termonarcose. Os níveis musculares de ATP e fosfocreatina de animais insensibilizados por eletronarcose apresentaram uma elevação nas 12 primeiras horas, quando então começaram um declínio gradual, enquanto que para animais insensibilizados por termonarcose, ocorreu uma elevação constante durante todo o período analisado. Para ambos os tratamentos, os níveis de glicogênio se mantiveram estáveis, enquanto os de glicose apresentaram uma constante elevação *post-mortem*, atingindo valores finais duas vezes superiores aos iniciais. Os níveis de ácido lático decresceram nas primeiras horas *post-mortem*, quando, então, voltaram a se elevar até atingir valores finais similares aos iniciais. Durante o período de estocagem avaliado, os valores de pH muscular foram sempre inferiores para a insensibilização por termonarcose. Constatou-se que animais insensibilizados por termonarcose apresentam uma taxa metabólica *post-mortem* menor, que possivelmente contribuiu para o maior retardo no tempo de início do rigor. O desenvolvimento de tensão observado foi ocasionado, provavelmente, pelo fenômeno de encolhimento pelo frio.

Palavras-Chave: Insensibilização; Rigor; Rã-Touro; Capacidade Tamponante.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do *rigor mortis* é uma das mais proeminentes mudanças que ocorrem no músculo após a morte, influenciando diretamente a qualidade da carne de consumo. De forma direta, atua sobre parâmetros como maciez, textura e suculência, e de forma indireta, devido a alterações bioquímicas *post-mortem*, sobre a cor e sabor.

A maciez é, talvez, o aspecto de qualidade mais sensível ao desenvolvimento do *rigor mortis*, especialmente devido ao fato de que músculos resfriados pré-rigor tendem a desenvolver o fenômeno de encolhimento pelo frio, caracterizado pelo maior nível de compactação do sarcômero, e do músculo, gerando maior tensão *post-mortem*, originando carnes mais duras (GREASER, 1986; LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001). Assim, o conhecimento do tempo de instalação do *rigor mortis* em carnes é importante para se determinar a necessidade da introdução de tecnologias de abate que minimizem a perda de algumas características de qualidade da carne, especialmente a sua maciez, suculência e as capacidades de retenção de água e emulsificante.

Fatores como forma de insensibilização, jejum pré-abate, idade, espécie e raça animal, tipo de músculo (fibra muscular) e temperatura de estocagem *post-mortem* (BENDALL, 1973a; GREASER, 1986, LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001), influenciam o desenvolvimento do *rigor mortis* e, por conseguinte, a qualidade da carne. Em termos bioquímicos, um grande número de fatores influencia a velocidade de início e estabelecimento do *rigor mortis*, mas os primeiros determinantes são as concentrações de compostos de alta energia (ATP, fosfocreatina e glicogênio) no músculo após a morte (NEWBOLD, 1966; LAWRIE, 1998). Conhecendo-se a concentração inicial destes três componentes pode-se estimar, com boa precisão, a duração do *rigor mortis* (BENDALL, 1973a). A degradação do ATP se correlaciona bem com o progresso do *rigor mortis*, sendo o início do rigor observado quando o conteúdo de ATP começa a cair (BENDALL, 1973b). Uma forma simples de acompanhar o declínio de ATP *post-mortem* é a medida do valor R, baseado na mudança na absorvância do espectro UV que ocorre com a deaminação dos nucleotídeos de adenina a inosina (HONIKEL e FISCHER, 1977). Em condições normais, uma vez que a queda nos níveis musculares de nucleotídeos de adenina aciona a via glicolítica muscular (GREASER, 1986; BENDALL, 1973a), a ocorrência do *rigor mortis* também tem sido correlacionada com a queda de pH muscular *post-mortem*.

A bioquímica do rigor tem sido extensamente estudada em músculos de mamíferos (MARSH, 1954; NEWBOLD, 1966; GOL, 1968; BUSCH et al., 1972; BENDALL, 1973a e 1973b; HONIKEL et al., 1983; HERTZMAN et al., 1993) e aves (SAMS e JANKY, 1991;

LYON e BURH, 1999). Recentemente, enfoque também tem sido dado à bioquímica do desenvolvimento do rigor em peixes (IWAMOTO et al., 1987 e 1988; SKJERVOLD et al., 1999; WATABE et al., 1991; CAPPELN e JESSEN, 2002), embora ainda com informações limitadas. Estes estudos contribuíram para o desenvolvimento e aplicação de tecnologias de abate, como o processo de estimulação elétrica, que permitem a maximização de características de qualidade de carne, em especial da maciez.

Entretanto, apesar de ser um dos animais mais estudados, a rã tem sofrido um processo de abate que não se baseia nas características bioquímicas de seus músculos, pelo que é possível que não se consiga maximizar as características de qualidade de sua carne. Neste sentido, resultados de pesquisas anteriores (MOURA, 2000) indicam que, apesar de sua aparente pequena propensão ao desenvolvimento tardio do rigor (músculo branco), carnes de rã apresentam, baseado no valor R (HONIKEL e FISHER, 1977), um tempo de *rigor mortis* suficientemente longo para que as atuais formas de processamento desta carne levem à produção de carnes mais duras.

O abate e o processamento de rãs para o consumo humano têm recebido tímida atenção quanto ao seu desenvolvimento tecnológico, sendo adotadas como critério de qualidade, as recomendações do CODEX ALIMENTARIUS (1984), assim como o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (BRASIL, 1997), que define a carne de rã dentro da denominação genérica de “pescado”.

No Brasil, os métodos de insensibilização atualmente utilizados no abate comercial de rãs, podem ser divididos em dois grupos: insensibilização por termonarcole, que consiste na imersão em água gelada e, ou, em soluções salinas concentradas; e insensibilização por eletronarcole, com aplicação de corrente elétrica para indução de um estado epilético (LIMA e AGOSTINHO, 1988; ALBINATI, 1994). Em levantamento realizado por LIMA et al. (1999), todos os abatedouros registrados, ou em processo de obtenção de registro no SIF ou SIE, em operação no Brasil, aplicam o processo de termonarcole, efetuado em tinas com água e gelo.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o desenvolvimento do *rigor mortis* em músculos de rãs-touro (*Rana catesbeiana*), insensibilizadas por eletronarcole e termonarcole, analisando-se mudanças físicas (tensão isométrica) e padrões bioquímicos de depleção *post-mortem* de ATP, fosfocreatina e glicogênio e da produção de ácido láctico. Tais informações são necessárias para elucidar algumas das particularidades da carne de rã, permitindo um melhor direcionamento nas suas etapas de obtenção e comercialização, com

vistas à melhor qualidade (especialmente maciez e suculência) do produto final, e contribuindo com informações pertinentes para o desenvolvimento de produtos derivados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 20 rãs, machos e fêmeas, da espécie *Rana catesbeiana*, com peso vivo médio de 214 ± 29 gramas, obtidas no Ranário da Universidade Federal de Viçosa. Previamente aos abates, os animais foram pesados e mantidos em jejum hídrico de 24 horas (MOURA et al., 2001), divididos aleatoriamente em dois grupos (10 animais cada). Um grupo foi insensibilizado por termonarcole, realizada pela imersão dos animais em água e gelo (1:1) por 15 minutos, e o outro por eletronarcole (60 V, 60 Hz) durante sete segundos (ALBINATI, 1994). Os animais insensibilizados foram, então, sangrados pela secção dos vasos do tronco cardíaco (ALBINATI, 1994). Após um período mínimo de 3 minutos de sangria, procedeu-se à evisceração, remoção da pele e toailete das carcaças, sob jatos constantes de água (LOIAZA, 1996). Imediatamente após o abate, as coxas foram desossadas, divididas (cortes transversais) em sete partes de aproximadamente 4,5 gramas, que foram individualmente embaladas em sacos plásticos de polietileno, identificadas e armazenadas sob refrigeração a $6 \pm 2^\circ\text{C}$, em estufa BOD (TECNAL, modelo TE 391), até o momento da análise.

As amostras obtidas 10 a 15 minutos após o abate foram definidas como tempo zero e imediatamente analisadas. As outras análises foram realizadas nos tempos 3, 6, 9, 12, 24 e 36 horas *post-mortem* após incubação a $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Para cada tempo de análise a escolha das amostras foi realizada aleatoriamente.

Medidas de pH

A medida do pH das amostras foi realizada pelo método do iodoacetado, descrito por BENDALL (1973a). Cerca de 2 gramas de amostra foram homogeneizadas, por 30 segundos, em um triturador tipo Turrax (MARCONI) com 20 mL de solução iodoacetato 5 mM e KCl 150 mM, previamente neutralizada para pH 7. A leitura do pH foi realizada imediatamente após a homogeneização, fazendo-se uso de um pHmetro de bancada (Hanna Instruments, modelo HI 9321) acoplado a um eletrodo de vidro (Sensoglass, modelo SCO2).

Capacidade Tamponante

A capacidade tamponante (CT) dos músculos da coxa de rã-touro foi avaliada, em cada tempo *post-mortem*, após a leitura do pH em solução de iodoacetato, segundo metodologia proposta por MOLETTE et al. (2003), com pequenas modificações. O pH do homogenato (carne/solução iodoacetato), obtido na leitura do pH da carne, foi previamente ajustado para 4,8 pela adição de uma solução de HCl 0,1 M. A seguir, com o homogenato em constante agitação, foi adicionado 0,2 mL de NaOH 0,1 M a cada minuto, até a solução alcançar pH 7,0. A mudança no valor do pH foi anotada em cada adição de base e a CT calculada como a inclinação da curva de titulação entre valores de pH 5,5 e 7,0, sendo expressa em $\text{mmol H}^+ / (\text{kg} \cdot \text{pH})$.

Desproteíntização da Amostra

Em cada período *post-mortem*, cerca de 2 gramas de amostra foram homogeneizadas, em um triturador tipo Turrax (MARCONI), por 60 segundos, com 10 mL de solução de ácido perclórico 0,6 M. O homogenato foi centrifugado a 4°C por 15 minutos a 3.000g, em centrífuga BECKMAN (modelo J2-MC). Uma alíquota de 1,5 mL do sobrenadante foi separada e congelada em nitrogênio líquido, para análise posterior de glicogênio. Uma outra alíquota, de 0,5 mL, do sobrenadante foi removida e utilizada na análise do valor R. O restante do sobrenadante foi neutralizado para pH 7,0 com uma solução de KOH 2 M, Imidazol 0,4 M e KCl 0,4 M (PASSONNEAU e LOWRY, 1993). Após descanso por 10 minutos a 4°C para decantação do perclorato, alíquotas de 1,5 mL do neutralizado foram separadas e congeladas em nitrogênio líquido, para análise posterior de glicose, adenosina-5'-trifosfato (ATP), glicose-6-fosfato (G-6-P), fosfocreatina (CP) e ácido láctico.

Valor R

Uma alíquota de 50 μL do sobrenadante da amostra desproteíntizada foi diluída em 2,9 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) procedendo-se a leitura, em espectrofotômetro HITACHI U-2001, das absorvâncias a 250 ($A_{250 \text{ nm}}$), característica de nucleotídeos de inosina, e a 260 nm ($A_{260 \text{ nm}}$), característica de nucleotídeos de adenina. O tampão fosfato foi utilizado como referência (HONIKEL e FISHER, 1977).

O valor R foi calculado como:

$$\text{Valor } R = \frac{A_{250\text{nm}}}{A_{260\text{nm}}}$$

Análises de Metabólitos

Aliquotas da amostra desproteïnizada e neutralizada foram utilizadas para análise dos metabólitos. A concentração de glicose (BERGMEYER et al., 1974), ATP, G-6-P e CP (LAMPRECHT e TRAUTSCHOLD, 1974) foi determinada enzimaticamente com hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase e expressa em $\mu\text{mol/g}$. O glicogênio muscular foi hidrolisado pela enzima amiloglicosidase a moléculas de glicose (KEPPLER e DECKER, 1974), e estas também foram quantificadas enzimaticamente. O teor de glicogênio foi expresso em mg/g de amostra, utilizando-se o peso molecular da glicose anidra ($\text{PM} = 162$) nos cálculos. A concentração de ácido láctico foi determinada enzimaticamente com lactato desidrogenase e NAD^+ em tampão hidrazina (HOHORST, 1974), sendo também expresso em $\mu\text{mol/g}$. Todas as leituras espectrofotométricas foram realizadas a 340 nm em um espectrofotômetro HITACHI U-2001.

Tensão Isométrica

O padrão de desenvolvimento da tensão isométrica foi acompanhado no músculo *gastrocnemius* de três animais abatidos por eletronarcose. As medidas de tensão foram obtidas em um texturômetro TA.HDi Texture Analyser (Stable Micro System Inc.), conectado a um computador equipado com o programa *Texture Expert*[®]. As amostras dos músculos para medidas de tensão foram obtidas imediatamente após o abate. A carne de uma das coxas foi removida, deixando o fêmur exposto. A extremidade inferior do músculo *gastrocnemius* foi separada do osso e a tíbia-fíbula separada do fêmur, próximo da articulação (Figura 3.1). O fêmur foi firmemente preso por uma garra e conectado ao braço da célula de força do texturômetro. A extremidade do músculo também foi firmemente presa em uma garra e conectada a um gancho fixado numa câmara cúbica (cerca 12 cm de aresta) feita de vidro e encamisada (Figura 3.2). A câmara foi preenchida com solução tampão tris-acetato 60 mM (pH 7,1), KCl 80 mM, MgCl_2 5mM e azida sódica 1 mM (BUSCH et al., 1972) até cobrir a amostra, para evitar a sua desidratação. A temperatura da câmara foi mantida em $9 \pm 2^\circ\text{C}$ durante o experimento, através da circulação de água gelada na camisa do aparato.



Figura 3.1. Preparação da amostra para medida da tensão isométrica. A coxa foi desossada, deixando o fêmur exposto (A). A extremidade inferior do músculo *gastrocnemius* foi separada do osso e a tíbia-fíbula separada do fêmur, próximo da articulação (B).

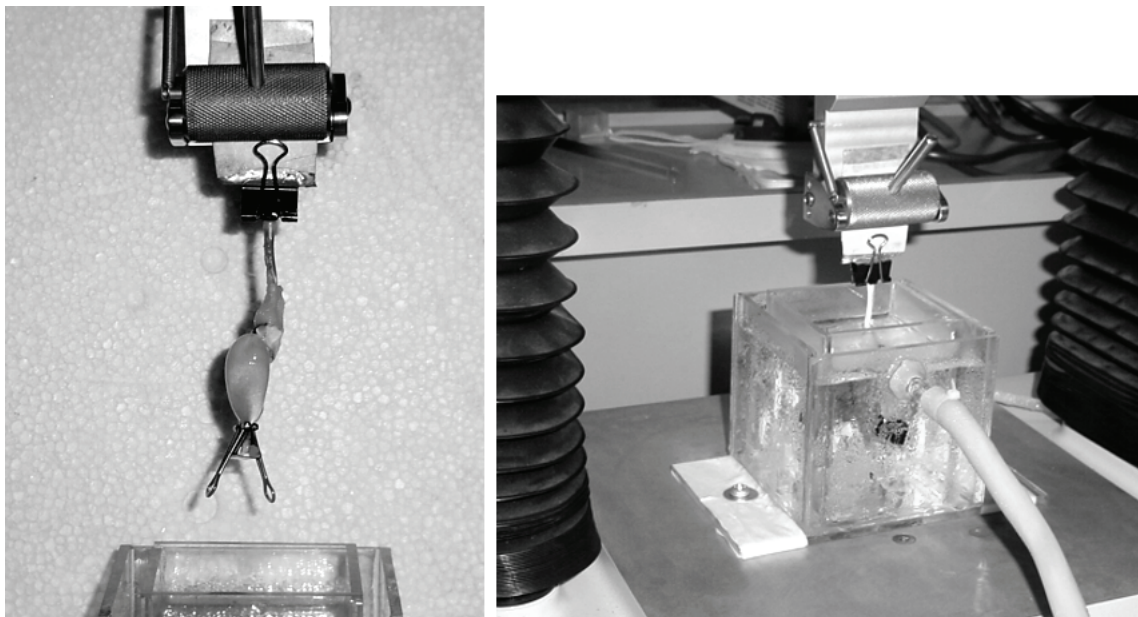


Figura 3.2. Fotos do sistema usado na medida da tensão isométrica. O fêmur e a extremidade do músculo *gastrocnemius* foram firmemente presos por garra metálica e conectados ao braço da célula de força do texturômetro e a um gancho fixado numa câmara cúbica feita de vidro e encamisada.

Para atender a uma condição inicial o mais uniforme possível, o texturômetro foi calibrado para aplicar uma tensão inicial no músculo de 5 g/cm^2 (BUSCH et al., 1972). A tensão isométrica foi medida a cada 10 segundos, durante 36 horas, sendo expressa em gramas/cm^2 . A área da seção transversal foi estimada considerando o músculo como um cilindro, sendo o raio utilizado para a estimativa obtido a partir do maior diâmetro muscular.

Análise Estatística

Os tratamentos foram dispostos em esquema de parcelas subdivididas, com o tipo de insensibilização (eletronarcolese e termonarcolese) na parcela e o tempo de estocagem *post-mortem* na subparcela, em um delineamento inteiramente casualizado.

Os dados de valor R e pH foram analisados por regressão, enquanto que os de tensão isométrica foram analisados descritivamente.

O coeficiente de correlação de Pearson também foi analisado quando pertinente, e todas as análises estatísticas foram conduzidas no programa SAS[®] System for Windows[™], versão 8.0 (SAS Institute Inc.), considerando um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A medida da tensão isométrica foi realizada para fornecer um indicativo de como as mudanças bioquímicas do músculo se relacionam com as mudanças físicas. A Figura 3.3 ilustra o desenvolvimento do rigor no músculo *gastrocnemius* de rês-touro insensibilizadas por eletronarcolese, acompanhado pela mudança na tensão isométrica.

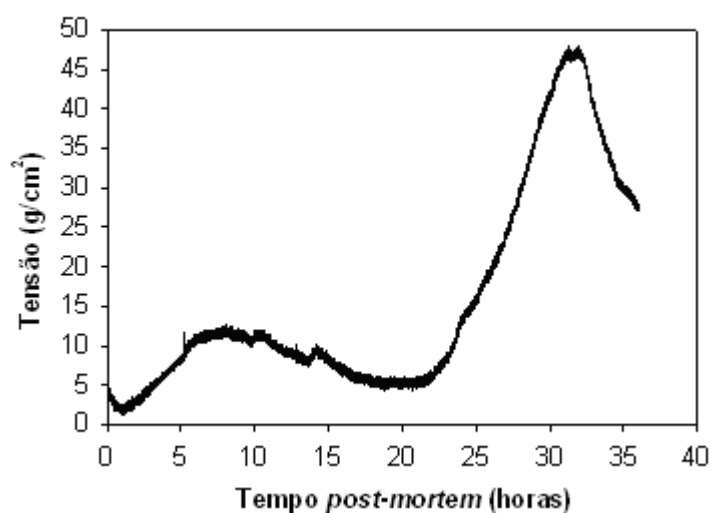


Figura 3.3. Desenvolvimento da tensão isométrica média em músculos *gastrocnemius* de rês-touro abatidas por eletronarcolese. Os músculos ($n = 3$) foram imersos em solução tampão tris-acetato 60 mM (pH 7,1), contendo KCl 80 mM, MgCl₂ 5mM e azida sódica 1 mM, e mantidos a $9 \pm 2^\circ\text{C}$ por 36 horas.

Para prevenir confusões relativas ao uso dos termos “início” e “estabelecimento” do rigor, as definições inicialmente caracterizadas por BENDALL (1973a) para a perda de extensibilidade *post-mortem* e posteriormente adaptada para medidas de tensão isométrica

(BUSCH et al., 1972; HERTZMAN et al., 1993) serão utilizadas. Assim, o termo início do rigor refere-se ao tempo necessário para se iniciar o aumento da tensão isométrica. O termo estabelecimento refere-se ao tempo *post-mortem* em que a tensão isométrica atinge o valor máximo antes de começar a declinar. O período de tempo gasto até haver uma proeminente e constante elevação da tensão isométrica foi definido como a fase de atraso, enquanto que o período compreendido entre o tempo de início do rigor e o pico máximo de tensão desenvolvida, foi definido como fase rápida do rigor.

Estabelecendo-se o início da fase rápida (início do rigor) como o ponto onde a regressão da curva relativa à fase rápida intercepta o prolongamento da regressão da curva da fase de atraso (HERTZMAN et al., 1993), verifica-se que o início do rigor ocorreu por volta de 22 horas *post-mortem* e o estabelecimento próximo de 32 horas, atingindo valores de tensão máxima de 47,9 g/cm².

Os valores de tensão máxima obtidos no músculo *gastrocnemius* de rãs-touro, mantido a 9°C, são similares aos reportados por WOOD e RICHARDS (1974) para o músculo *P. major* de frangos, mantidos a temperaturas *post-mortem* entre 23 e 30°C. BUSCH et al (1972) encontraram valores de tensão máxima próximos de 55 g/cm² para músculo *longissimus* de suínos mantidos a 37°C e de 30 g/cm² para músculos de coelhos mantidos a 25°C. Ambos os autores (BUSCH et al, 1972; WOOD e RICHARDS, 1974), no entanto, observaram um aumento na tensão máxima desenvolvida à medida que se aumenta a temperatura de estocagem, exceto para temperaturas inferiores a 5°C, a partir da qual, também se observa um aumento na tensão máxima com a redução da temperatura. HERTZMAN et al. (1993) também observaram um maior desenvolvimento de tensão isométrica máxima em músculo *M. semimembranosus* de bovinos mantidos a 37°C quando comparado com músculos mantidos a 15°C.

O tempo de início do rigor encontrado para a carne de rã-touro pode ser considerado inusitadamente alto. Uma vez que a carne de rã-touro possui uma predominância de fibras glicolíticas (RAMOS et al., 2003) era esperado que o rigor se iniciasse em tempos mais próximos daqueles preconizados (1 a 4 horas) para o início do *rigor mortis* que ocorre em peixes e aves (ABERLE et al., 2001; LYON e BURH, 1999; OGAWA e OGAWA, 1999), embora OGAWA e OGAWA (1999) tenham relatado tempos de até 22 horas em algumas espécies de peixes. BENDALL (1973a) também reporta tempo similar (superior a 24 horas) para início de rigor em músculos de rãs mantidos a 20°C. Ainda assim, este tempo é mais comumente encontrado em espécies que apresentam músculos ricos em fibras vermelhas, onde o tempo de início do *rigor mortis* varia de 8 a 30 horas (média de 18 horas) em bovinos, e de 10 a 20 horas (média de 12 horas) em ovinos (Offer et al., 1988, citado por JAMES e

JAMES, 2002). Segundo Marsh (1952), citado por BENDALL (1973a) e LAWRIE (1998), baleias também apresentam um tempo inusitadamente elevado para início do *rigor mortis*, com os níveis de ATP e pH se mantendo em valores próximos das condições *in vivo* por mais de 24 horas a 37°C, sendo que nenhuma explicação satisfatória foi ainda estabelecida para este fenômeno. Outrossim, este tempo de início de rigor é superior àqueles previamente estimados, através do valor R, em nossos laboratórios. Para rãs-touro insensibilizadas por eletronarcose, e mantidas a $8 \pm 1^\circ\text{C}$, MOURA (2000) estabeleceu um tempo mínimo de 8 horas para início do rigor.

Embora se reconheça que há diferenças fisiológicas e metabólicas entre diferentes músculos, e que estas diferenças influenciam no desenvolvimento das diversas fases do rigor, procurou-se evidenciar as razões bioquímicas para este rigor tardio no *gastrocnemius* através da análise de metabólitos nos músculos da coxa de rã, partindo do princípio de que as diferenças devido a músculo são menos intensas do que aquelas devido a espécies e a fatores extrínsecos que poderiam influenciar os níveis musculares de substâncias de reserva e compostos fosfatados de alta energia. Este pressuposto foi assumido também pelo fato de que os músculos da coxa, embora talvez não no mesmo nível, em média, devem exercer uma atividade semelhante ao músculo *gastrocnemius*.

As mudanças na concentração de fosfocreatina (CP), adenosina-5'-triosfato (ATP), glicose-6-fosfato (G-6-P), glicogênio, glicose e ácido láctico que ocorreram no músculo de rã-touro durante estocagem a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ são ilustradas na Figura 3.4. Tanto para a concentração de ATP, quanto para CP e G-6P, houve interação significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos (métodos de insensibilização) e o período de estocagem refrigerada.

Verifica-se, para rãs insensibilizadas por eletronarcose, que os níveis de ATP e CP apresentam uma elevação nas 12 primeiras horas post-mortem, quando então passam a apresentar uma queda gradual. Entretanto, nos músculos de coxa de rãs-touro, os níveis de CP e de ATP jamais atingiram valores inferiores aos iniciais. De fato, após 36 horas, estes compostos apresentavam concentrações similares às iniciais. Já para os animais insensibilizados por termonarcose, os níveis de ATP e CP apresentam uma elevação constante durante todo o período analisado. Os valores iniciais e finais de ATP dos músculos de rãs insensibilizadas por eletronarcose são similares àqueles apresentados por BENDALL (1973a) para o músculo *sartorius* em repouso de rãs. Já para rãs insensibilizadas por termonarcose, os valores iniciais são inferiores, enquanto que os finais são superiores, àqueles apresentados por este autor. Por outro lado, dependendo do tempo de estocagem e do método de insensibilização, os valores de CP encontrados são entre 10 e 20 vezes inferiores àqueles apresentados por BENDALL (1973a).

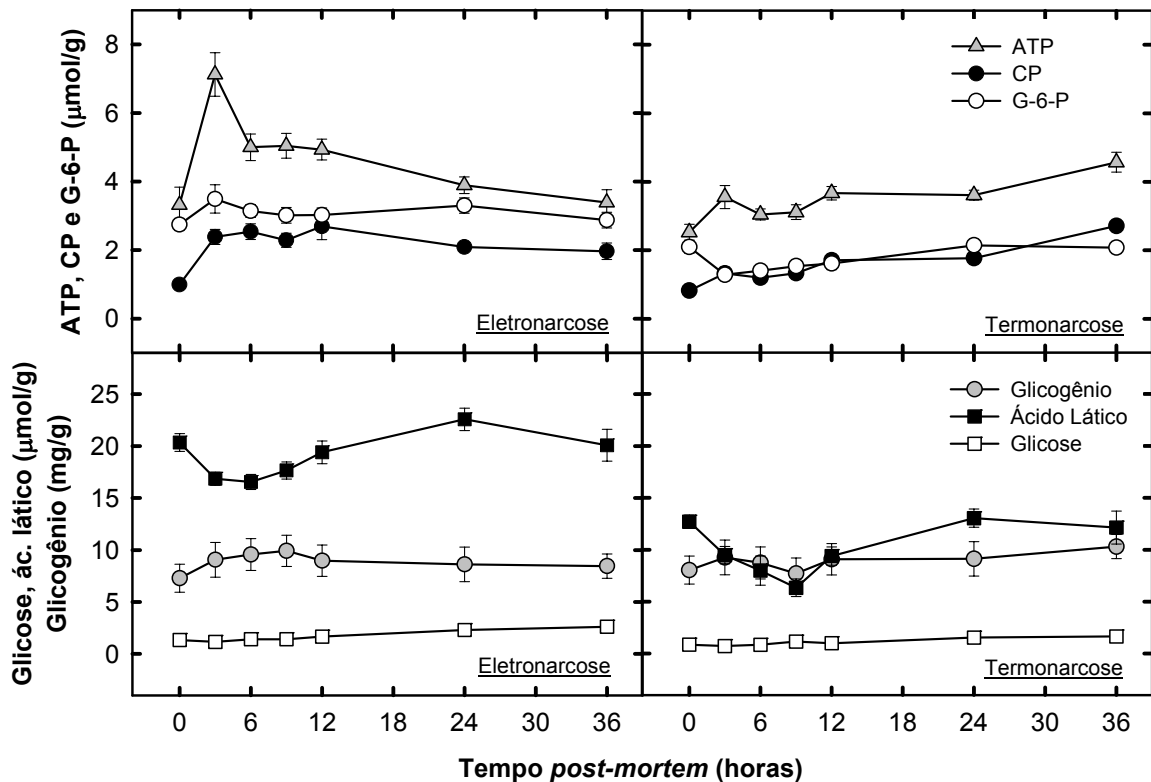


Figura 3.4. Efeito da insensibilização por eletronarcose e termonarcose nos níveis de ATP, CP, G-6-P, glicogênio, glicose e ácido lático em músculos da coxa de rã-touro, estocada a $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Valores médios \pm erro padrão da média.

A provável explicação para este elevado tempo na redução dos compostos fosforilados, ATP e CP, pode estar relacionada com as características metabólicas peculiares dos músculos de ranídeos. Neste sentido, a maior capacidade de absorção do oxigênio atmosférico por difusão pelos músculos de rãs (BROWN JR., 1964) e a sua capacidade de metabolizar ácido lático independentemente do fígado (FOURNIER e GUDERLEY, 1992 e 1993), podem contribuir para um maior tempo de resíntese destes compostos *post-mortem* e, conseqüentemente, no maior retardo do início e instalação do rigor nos músculos destes animais. Além disso, a forma de armazenamento das amostras (desossadas e cortadas em porções delgadas) pode ter contribuído para uma produção mais eficiente de ATP pela via aeróbia. LAWRIE (1998) reporta que a exposição de porções musculares de aproximadamente 3 mm de espessura ao oxigênio durante o período *post-mortem* pode induzir à produção de ATP com tamanha eficiência, a ponto de retardar o início do *rigor mortis* e manter os níveis de CP até mesmo acima dos valores observados no músculo vivo.

Os níveis de G-6-P nos músculos de animais insensibilizados por eletronarcose não variaram ($P > 0,05$) durante o período *post-mortem*, apresentando uma concentração média de

3,1 ± 0,8 µmol/g. Já nos músculos de animais insensibilizados por termonarcore, os níveis de G-6-P variaram (P < 0,05) ao longo da estocagem refrigerada, apresentando uma pequena queda nas três primeiras horas *post-mortem*, seguido de um aumento até o seu valor inicial.

Já os níveis musculares de glicose e ácido láctico apresentaram, ao longo do período de estocagem avaliado, comportamento semelhante para ambos os métodos de insensibilização, variando (P < 0,05) com o tempo de estocagem, embora sem efeito de interação (P > 0,05) entre métodos de insensibilização e o tempo de estocagem.

Para ambos os métodos de insensibilização os níveis de ácido láctico decresceram nas primeiras horas *post-mortem*, quando, então, voltaram a se elevar até atingir valores finais similares aos iniciais (20,4 µmol/g para eletronarcore e 12,7 µmol/g para a termonarcore). Entretanto, os níveis médios de ácido láctico foram sempre superiores (P < 0,05) nos músculos de rãs abatidas pelo processo de eletronarcore, o que talvez se deva a um certo nível de estímulo oriundo da passagem da corrente elétrica durante a insensibilização, uma vez que há evidências que a eletronarcore possa acelerar a glicólise *post-mortem* (LAWRIE, 1998). Os níveis de ácido láctico são bastante superiores (cerca de 2,5 vezes para rãs insensibilizadas por termonarcore e de 4 vezes para rãs insensibilizadas por eletronarcore) àqueles apresentados por BENDALL (1973a) para o músculo *sartorius* de rãs. Esta discrepância nos valores em relação àqueles apresentados por BENDALL (1973a) pode se dever a vários fatores, dentre os quais se cita o tipo de músculo avaliado, a espécie de rã, a forma de insensibilização e abate e o histórico pré-abate (criação, manejo, etc.).

Para ambos os métodos de insensibilização os níveis de glicose apresentaram uma constante elevação *post-mortem*, atingindo valores finais duas vezes superiores aos iniciais. Entretanto, os níveis médios de glicose foram quase sempre superiores (P < 0,05) nos músculos de rãs abatidas pelo processo de eletronarcore.

MOURA (2000) estabelece a síntese de glicose, induzida pela submissão do animal a temperaturas próximas de zero antes de sua morte, como causa provável de um tempo mais prolongado para o início do *rigor mortis* nos músculos de rãs insensibilizadas por termonarcore. Segundo COSTANZO e LEE (1993) e STOREY e STOREY (1988), rãs provenientes de clima temperado, como a *Rana catesbeiana*, acumulam glicose no músculo e tecidos vitais durante o inverno, assim que a temperatura corporal atinge valores ao redor de 0°C, o que é resultante do catabolismo de glicogênio muscular e do fígado. Segundo STOREY e STOREY (1985), em *Rana silvatica* submetida a congelamento, a ativação da glicogênio fosforilase e, portanto, o catabolismo de glicogênio, ocorre já nos primeiros minutos de exposição ao frio.

No entanto, embora a consideração quanto à mudança metabólica quando a rã é submetida a temperaturas sub-zero seja pertinente, é provável que, devido ao pequeno tempo (15 minutos) a que os animais são submetidos à baixa temperatura durante a insensibilização por termonarcorese, não tenha havido tempo suficiente para produção de glicose como crioprotetor no músculo (RAMOS et al., 2004). Além disso, em seu experimento, STEINER et al. (2000) concluem que o catabolismo hepático é a principal fonte de carbono para a síntese de glicose, enquanto o glicogênio muscular parece ter menor participação no acúmulo de glicose sanguínea estimulado pela exposição ao frio.

Quanto aos níveis de glicogênio, não se verificou efeito significativo ($P > 0,05$) dos métodos de insensibilização e do tempo de estocagem, ou da interação entre eles, apresentando um valor médio de 8,87 mg/g (54,8 μmol de glicose equivalente/g). Estes níveis são cerca de duas vezes superiores àqueles apresentados por BENDALL (1973a) para o músculo *sartorius* em repouso de rãs. A manutenção dos níveis de glicogênio parece ser oriunda de uma reposição a partir do ácido láctico, no qual se observa uma queda sensível no nível muscular nas primeiras 9 horas e, posteriormente, a partir das 24 horas (Figura 3.4).

A variação observada nos níveis de ácido láctico, associada à manutenção da concentração de glicogênio e ao aumento nos níveis de glicose, para ambos os tratamentos, parece indicar a sua metabolização a glicogênio, e deste a glicose, pelo músculo da rã. Esta hipótese é suportada pela observação de FOURNIER e GUDERLEY (1992 e 1993) de que músculos de rãs possuem uma grande capacidade de realizar a gluconeogênese, repondo os níveis de glicogênio muscular a partir do ácido láctico, independentemente da participação do fígado. Segundo FOURNIER e GUDERLEY (1992), neste processo, o glicogênio é um intermediário necessário na conversão de ácido láctico a glicose.

Segundo BENDALL (1973a), a fase de atraso do rigor é caracterizada pela manutenção dos níveis de ATP no músculo em repouso, sendo que o início do rigor só acontece quando as concentrações de ATP começam a cair. Ainda segundo BENDALL (1973a), a queda *post-mortem* na concentração de ATP em músculos de coelhos começa a ocorrer quando as reservas de CP decrescem para valores inferiores a 4 $\mu\text{mol/g}$. Já em músculos de bovinos, FABIANSSON e LASER REUTERSWÄRD (1985) e HERTZMAN et al. (1993) observaram que a depleção de ATP não tem início enquanto as reservas de CP não forem reduzidas a níveis entre 1 e 2 $\mu\text{mol/g}$.

Baseado em trabalhos que estabelecem o *rigor mortis* através da perda de extensibilidade, o início do *rigor mortis* ocorre quando a concentração média de ATP é de 1,0 $\mu\text{mol/g}$ em músculos bovinos (HAMM, 1982; HONIKEL et al., 1981 e 1983) e de aves (SAMS e MILLS, 1993; PAPINAHO e FLETCHER, 1996), e entre 1,0 e 2,0 $\mu\text{mol/g}$ em

músculos de peixes (IWAMOTO et al., 1988). Em frangos, o início do rigor também tem sido reportado quando o nível de ATP é reduzido a valores inferiores a 30-40% do seu valor inicial (KHAN, 1975; LYON e BUHR, 1999). No caso da rã-touro, em nenhum momento os níveis médios de ATP atingiram valores inferiores a 2 $\mu\text{mol/g}$, seja em animais insensibilizados por eletronarcese ou por termonarcese.

Porém, comparando a perda de extensibilidade com o desenvolvimento de tensão isométrica em diversas espécies, BUSCH et al (1972) ressaltam que o músculo não começa a se tornar inextensível (início do rigor) enquanto a tensão isométrica não se aproximar do valor máximo. Em outras palavras o início da fase rápida do rigor é visualizado mais cedo quando avaliada através do desenvolvimento da tensão isométrica. Assim, parece que a observação do início do rigor a partir da tensão isométrica ocorre quando os níveis de ATP musculares são superiores àqueles encontrados em medidas baseadas na perda de extensibilidade. Ou ainda, se ajustássemos o início do rigor de acordo com a perda de extensibilidade para carne de rã, verificaríamos que, no caso de animais insensibilizados por eletronarcese, o início do rigor ocorreria próximo de 30 horas. Ainda assim, neste tempo *post-mortem* haveria quantidades suficientes de ATP e de CP para evitar o encurtamento devido ao rigor.

A Figura 3.5 ilustra a evolução, em músculo da coxa de rãs-touro insensibilizadas por eletronarcese e termonarcese, do valor R, que avalia o grau de metabolização dos compostos fosfatados de alta energia (nucleotídeos de adenina), gerando a formação de nucleotídeos de inosina, sendo baseado na mudança na absorvância do espectro UV (HONIKEL e FISCHER, 1977; SAMS e MILLS, 1993; PAPINAHO e FLETCHER, 1996). As equações e seus respectivos coeficientes de regressão estão descritos na Tabela 3.1. Optou-se pela regressão quadrática, embora a falta de ajuste tenha sido significativa, pois o modelo apresentou uma razoável adequação para descrever as mudanças observadas.

Verifica-se, pelas curvas de regressão, que, apesar de um comportamento semelhante, os valores R de animais insensibilizados por eletronarcese foram sempre superiores aos daqueles de animais insensibilizados por termonarcese. Outrossim, atingiram o valor limite de 1,05, que indicaria o início do *rigor mortis* (HONIKEL e FISCHER, 1977; HAM, 1982; HONIKEL et al., 1983) por volta de 25 horas, enquanto que para animais insensibilizados por termonarcese este valor não foi alcançado no período de estocagem avaliado.

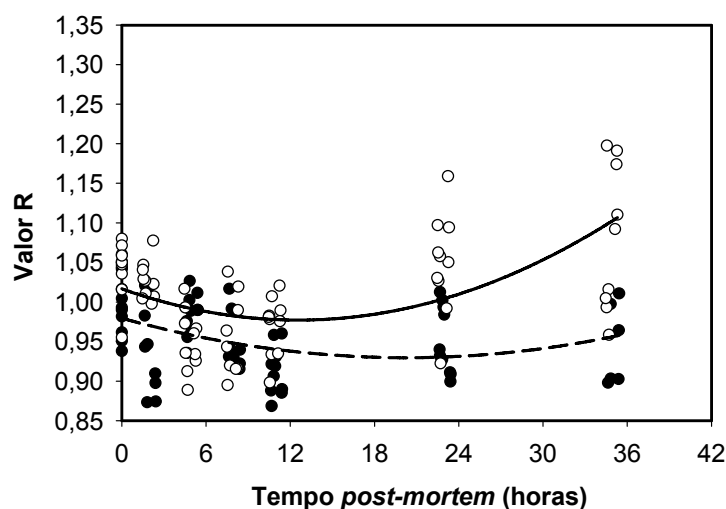


Figura 3.5. Efeito da insensibilização por eletronarcose (—○—) e termonarcose (—●—) nos valores de R em músculos da coxa de rãs-touro mantidas durante 36 horas *post-mortem* a $6 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tabela 3.1. Equações e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para valores R (\hat{y}) dos diferentes tratamentos em função do tempo *post-mortem* (x)

Tratamento	Equação de Regressão	R^2
Eletronarcose	$\hat{y} = 1,0167 - 0,0063.x + 0,0003.x^2$	0,8656
Termonarcose	$\hat{y} = 0,9814 - 0,0048.x + 0,0001.x^2$	0,6553

Um ponto intrigante é que, segundo GREASER (1986), a elevação nos níveis de IMP, a partir de seus baixos níveis nos músculos em repouso ($0,8 \mu\text{mol/g}$ em coelhos), é quase que diretamente proporcional à degradação de ATP a partir de uma concentração inicial de $6,8 \mu\text{mol/g}$ em coelhos. Assim, em essência, valores R de 1,05 só seriam alcançados quando parte significativa do ATP tivesse sido degradada, já que dados apresentados por HONIKEL e FISHER (1977) mostram que valor R de 1,05 é alcançado, em misturas de ATP e IMP, quando a relação entre os níveis de ATP e IMP está por volta de 60%:40%, o que equivale a níveis musculares residuais de ATP de $1 \mu\text{mol/g}$ (HONIKEL e FISHER, 1977; HAM, 1982; HONIKEL et al., 1983). Este tipo de relação está de acordo com o fato de KHAN (1975) e LYON e BUHR (1999) terem citado que, em frangos, o início do *rigor mortis* ocorre quando os níveis de ATP caem para níveis inferiores a 30-40% de sua concentração inicial. A relação entre valores R e a concentração de ATP no músculo da coxa de rãs-touro é representada na Figura 3.6.

Entretanto, no caso dos músculos da coxa de rãs insensibilizadas por eletronarcose, valor R de 1,05 foi alcançado quando os níveis de ATP musculares ainda se encontravam

elevados. Por exemplo, às 25 horas o valor R de 1,05 foi obtido quando o nível residual de ATP era próximo de 3,0 $\mu\text{mol/g}$ (Figura 4), pouco abaixo dos 3,3 $\mu\text{mol/g}$ no início do período avaliado. Ou seja, uma grande quantidade de IMP foi gerada a partir de uma pequena queda nos níveis de ATP, o que não faz sentido. Por outro lado, se assumirmos que os processos de insensibilização e abate produzem certa metabolização de energia, conforme demonstrado pela maior concentração de ácido láctico inicial do que nos tempos intermediários até 12 horas de estocagem (Figura 3.4), período no qual também é observada uma queda no valor R (Figura 3.5), e pela elevação, nas três primeiras horas, dos níveis de ATP, poderíamos considerar o valor de 7,8 $\mu\text{mol/g}$ (Figura 3.4) como o nível máximo de ATP nos músculos das coxas de rãs. Neste caso, o valor R de 1,05 observado às 25 horas *post-mortem* corresponderia a uma queda de cerca de 40% nos níveis iniciais de ATP (de 7,8 para 3,0 $\mu\text{mol/g}$), o que estaria de acordo com o início do *rigor mortis* estimado por KHAN (1975) e LYON e BUHR (1999) para frangos. Isto também promoveria uma relação ATP:IMP próxima daquela (60:40) sugerida pelos dados de HONIKEL e FISHER (1977).

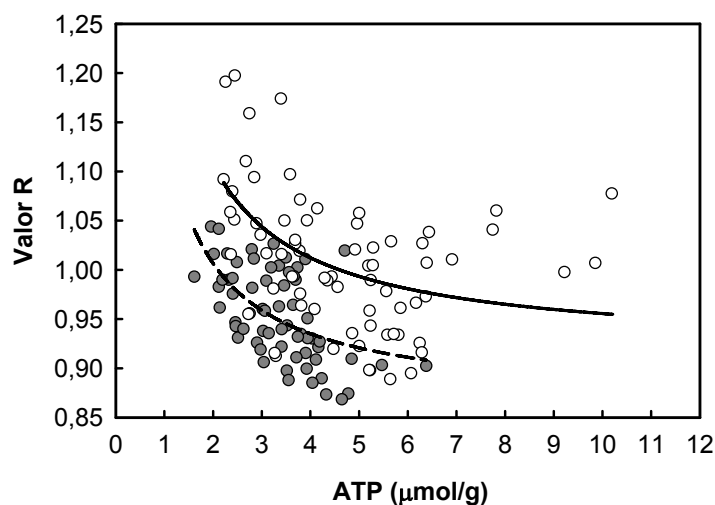


Figura 3.6. Relação entre o valor R e a concentração de ATP em músculos da coxa de rãs-touro insensibilizadas por eletronarcose (—○—) e termonarcose (—●—).

Ao analisarmos a variação do valor R (Figura 3.5) para animais insensibilizados por termonarcose, verifica-se que o rigor tenderia a ocorrer em um tempo superior às 36 horas avaliadas neste experimento. No entanto, isto não poderia ser relacionado ao nível de ATP residual, uma vez que concentrações de 3,0 $\mu\text{mol/g}$ foram atingidas após 25 horas de estocagem (Figura 2), quando os valores de R eram próximos de 0,95 (Figura 3). Isto parece indicar uma dependência entre os valores R e os níveis de ATP com a forma de

insensibilização a que o animal é submetido, o que pode ser facilmente observado na Figura 3.6.

A existência de valores R diferentes, para diferentes formas de insensibilização, tornaria este índice inviável como indicador do início do rigor em músculos de rãs. No entanto, parece existir uma explicação plausível para esta dependência, e que pode ser vislumbrada ao se analisar a Figura 3.4. Nesta figura se verifica que, nas rãs insensibilizadas por termonarcolese, o ATP, assim como a CP, continua a ser re-sintetizado durante todo o período avaliado, pelo que a deaminação de ADP a inosina é postergado. Em outras palavras, os níveis musculares máximos de ATP na coxa de rãs ainda estão sendo restaurados, pelo que a sua degradação ainda não se iniciou. Esta hipótese é suportada pelo fato de que, ao se analisar a correlação entre ATP e valor R nos dados agrupados dos dois métodos de insensibilização não se observa uma correlação significativa ($P > 0,05$), enquanto que estas se tornam significativas ($P < 0,05$) ao se analisar os dados individuais para eletronarcolese ($r = -0,32$, $n = 68$) e para termonarcolese ($r = -0,58$, $n = 66$). Outrossim, pela Figura 3.6, observa-se que em animais insensibilizados por termonarcolese, o início do rigor se relacionaria a um valor R de 1,05 quando o nível de ATP residual estivesse em torno de $1,5 \mu\text{mol/g}$, o que indica que, possivelmente, o valor de $7,8 \mu\text{mol/g}$ de ATP, hipotetizado como nível máximo de ATP residual nos músculos das coxas de rãs, não seria alcançado após o período de recuperação. Neste sentido, para uma redução de 40% dos níveis de ATP em que os valores R indicariam o início do rigor (KHAN, 1975; LYON e BUHR, 1999), os níveis máximos de ATP nos músculos de rãs insensibilizadas por eletronarcolese seriam da ordem de $4 \mu\text{mol/g}$, ou seja, próximo de 36 horas *post-mortem*.

As diferenças observadas no metabolismo *post-mortem* para os diferentes tratamentos (insensibilizações), parece ser condizente com as características metabólicas de ranídeos. Assim, animais insensibilizados por termonarcolese apresentam uma taxa metabólica menor, causada pela redução da temperatura muscular a valores sub-zero durante a etapa de insensibilização, o que possivelmente contribuiu para o maior retardo no tempo de recuperação dos níveis de ATP e, possivelmente, do início do rigor.

Ainda baseado no valor R, os tempos encontrados para o início do rigor em rãs-touro neste experimento são bem superiores aos reportados por MOURA (2000), que encontrou um retardo de 8 horas para rãs insensibilizadas por eletronarcolese e de 12 horas para rãs insensibilizadas por termonarcolese. Essa diferença pode ser devida ao maior tempo de jejum pré-abate (48 horas contra 24 horas) no experimento conduzido por MOURA (2000), o que pode levar a um maior esgotamento nos níveis musculares de substâncias de reserva, e conseqüente esgotamento mais precoce das reservas de ATP, levando a uma antecipação do

desenvolvimento do rigor (LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001). Outra diferença se deve à forma de armazenamento das amostras no período *post-mortem*. MOURA (2000) armazenou um conjunto de músculos de coxas desossadas, que pesavam aproximadamente 24 gramas, removendo amostras nas extremidades cranial e distal das coxas para análise nos tempos pós-abate. Neste experimento, os músculos da coxa foram divididos em cortes transversais de cerca de 4,5 gramas, sendo estocados com uma superfície relativamente grande exposta ao oxigênio. Essa maior exposição ao ar, associada à alta capacidade de absorção, por difusão, do oxigênio atmosférico pelos músculos de rãs (BROWN JR., 1964) pode ter maximizado a produção de energia pelo mecanismo aeróbico, retardando a via glicolítica de renovação das reservas energéticas celulares e, conseqüentemente, retardando o tempo de início do rigor. Mesmo em outras espécies animais, se reconhece que maior área de exposição à atmosfera (músculos mais finos e, ou, mais externos) promove uma maior oxigenação do tecido muscular, com conseqüente retardamento no desenvolvimento do rigor em função de uma produção mais eficiente de ATP pela via aeróbica (BENDALL, 1973a; GREASER, 1986; LAWRIE, 1998). A diferença nas temperaturas de estocagem *post-mortem* (8°C contra 6°C) também pode ter contribuído para um maior retardo no tempo de início do rigor observado neste experimento.

A queda de pH muscular *post-mortem* (Figura 3.7) apresentou um comportamento semelhante, para ambos os métodos de insensibilização. As equações e coeficientes de regressão estão descritos na Tabela 3.2.

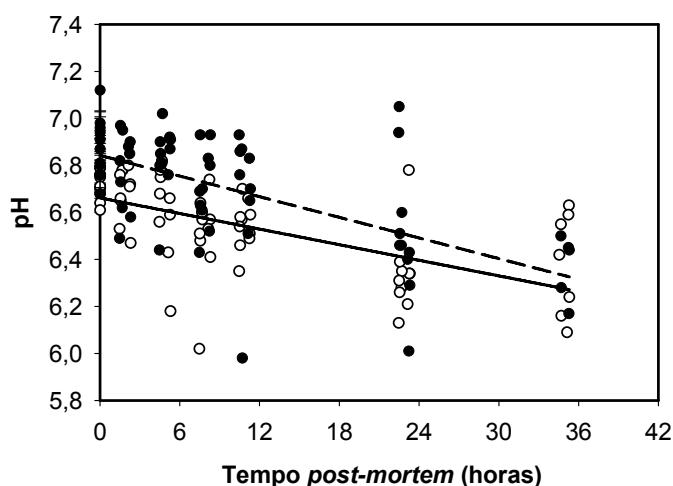


Figura 3.7. Queda do pH muscular em coxas de rãs-touro insensibilizadas por eletronarcose (—○—) e termonarcose (—●—), estocadas a $6 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tabela 3.2. Equações lineares e respectivos coeficientes de regressão (R^2) para valores de pH (\hat{y}) dos diferentes tratamentos em função do tempo *post-mortem* (x)

Tratamento	Equação de Regressão	R^2
Eletronarcose	$\hat{y} = 6,6778 - 0,0114.x$	0,8060
Termonarcose	$\hat{y} = 6,8529 - 0,0144.x$	0,7023

A insensibilização por eletronarcose induziu menores valores de pH durante o período de estocagem avaliado. Isto é condizente com a hipótese levantada de que músculos de rã-stouro insensibilizadas por termonarcose se encontram com um metabolismo mais lento. Além disso, a quantidade de ácido láctico produzido nestes animais é menor ($P < 0,05$) do que a quantidade observada no músculo de animais submetidos à eletronarcose.

Segundo STOREY e STOREY (1986), tanto o ácido láctico, como a alanina, acumulam como metabólito final da anaerobiose em músculos de rãs. No entanto, quando submetidas a temperaturas sub-zero, o coração acumula preferencialmente ácido láctico, enquanto os músculos da perna acumulam predominantemente alanina, na proporção alanina: ácido láctico de 4,5:1. Esta diferença se deve à necessidade de trabalho durante o período em que o animal irá permanecer a temperaturas de congelamento. O acúmulo de ácido láctico no coração reflete a sua contínua necessidade de circular o sangue e distribuir crioprotetores durante as últimas horas antes do congelamento dos fluídos celulares. Já os músculos da perna não trabalham durante o período hibernante (em temperaturas de congelamento) e, portanto, preferem acumular um composto neutro, alanina, ao invés de um composto ácido. Assim, é provável que a insensibilização por termonarcose tenha induzido a produção de alanina em maior concentração nos músculos da coxa. Isto não só explica porque a concentração de ácido láctico é menor em músculos de rãs insensibilizadas por termonarcose, mas também porque a queda de pH muscular *post-mortem* é menor.

Neste experimento, os valores médios do pH muscular inicial foram de 6,72 para animais insensibilizados por eletronarcose e 6,88 para os insensibilizados por termonarcose. Estes valores diferem dos resultados reportados por MOURA (2000), que encontrou valores de pH inicial de 6,98 e 7,33 para eletronarcose e termonarcose, respectivamente. Esta diferença nos valores iniciais de pH pode ser oriunda de variações referentes ao animal, histórico de criação e manejo, bem como às condições antes e durante o abate. No entanto, as taxas de declínio do pH observadas por MOURA (2000), foram bastante similares às reportadas neste experimento.

LOAIZA (1996) encontrou, 6 horas após o abate, um pH de 5,79 para carne de rã-touro insensibilizada por eletronarcese, o que foi considerado por ele como o pH final. Após um período de 32 horas pós-abate, MOURA (2000) encontrou um pH de 6,04 e 6,10 para os tratamentos com eletronarcese e termonarcese, respectivamente, ainda com tendência de queda após esse período. Neste experimento, após 36 horas do abate, foram obtidos valores médios de pH de 6,35 e 6,46 para os tratamentos com eletronarcese e termonarcese, respectivamente, com ligeira tendência de queda após esse período nos músculos de rãs insensibilizadas por termonarcese e estabilização nos músculos de rãs insensibilizadas por eletronarcese.

MOURA (2000) relata que a diferença nos valores de pH encontrados entre seus resultados e os reportados por LOAIZA (1996) para eletronarcese, possivelmente se deve a diferenças nas metodologias de abate empregadas nos dois experimentos, além da forma de armazenamento das amostras no período estudado. Ainda segundo este autor, a diferença de seus resultados em relação aos de LOAIZA (1996), se deve ao fato deste ter embalado suas carcaças a vácuo, o que impediu uma maior atuação da via aeróbica de produção de energia, conseqüentemente levando a uma queda mais rápida do pH muscular. Além disso, as amostras de MOURA (2000) foram embaladas desossadas, apresentando uma maior superfície exposta ao ar, que devido à alta capacidade de absorção do oxigênio atmosférico por difusão pelos músculos de rãs (BROWN JR., 1964), pode ter maximizado a produção de energia pelo mecanismo aeróbico, retardando a via glicolítica e conseqüente queda do pH muscular. Estes mesmos argumentos podem ser usados para explicar a menor taxa de queda do pH muscular observada neste experimento, tanto para eletronarcese como termonarcese, quando comparado com os resultados reportados por ambos os autores.

Segundo HAMM (1982) e HONIKEL et al. (1981 e 1983), em músculos bovinos com níveis normais de glicogênio (700 mg/g) na hora da morte e mantidos a 20°C, valores de pH em torno de 5,9 indicam o início do *rigor mortis*. Este valor de pH também foi utilizado por STEWART et al. (1984) e DICKENS e LYON (1995) como indicativo do início do *rigor mortis* em frangos. Se considerarmos o início do rigor observado neste experimento para rãs insensibilizadas por eletronarcese como sendo de 22 a 25 horas (pela tensão isométrica e valor R, respectivamente), o pH muscular médio em rãs que corresponde ao início do rigor situa-se entre 6,42 e 6,38. Os resultados reportados por MOURA (2000) apontam valores de 6,41 e 6,51 para eletronarcese e termonarcese, respectivamente, no início do rigor. Valores de pH próximos de 6,40 parecem, portanto, indicar o tempo de início de rigor para músculos de coxas de rãs-touro mantidas entre 6 e 9°C, apresentando-se como um indicativo aparentemente confiável.

Embora esta constatação pareça indicar a ocorrência do *rigor mortis* quando o pH atinge valores de 6,40, o desenvolvimento da tensão isométrica neste pH também pode ser justificado pelo fenômeno do Encolhimento pelo Frio. Este fenômeno se caracteriza pelo aumento de tensão, oriundo de um severo encurtamento do sarcômero, devido ao aumento dos níveis intracelulares de cálcio (Ca^{+2}) como consequência da perda da capacidade das membranas do retículo sarcoplasmático e das mitocôndrias em reter Ca^{+2} quando a carne é armazenada pré-rigor em temperaturas inferiores a 15-16°C (BENDALL, 1973a; LOCKER, 1985; GREASER, 1986; LAWRIE, 1998). Segundo WHITING (1980), a incapacidade do retículo sarcoplasmático e das mitocôndrias em seqüestrar e ligar íons cálcio quando submetidos a baixas temperaturas é dependente do pH muscular. Neste sentido, a mitocôndria é a primeira organela a perder a habilidade de seqüestrar cálcio *post-mortem*, o que ocorre quando o pH se encontra entre 6,5 e 6,0. Desta forma, no caso de músculos de rãs, valores de pH igual a 6,40 podem indicar o início do acúmulo de cálcio no sarcoplasma liberados, possivelmente, da mitocôndria que, na presença de altos níveis de ATP, induz à contração muscular ocasionando o fenômeno do Encolhimento pelo Frio. Segundo WHITING (1980), apenas quando o pH muscular se encontra entre 6,0 e 5,5 é que o retículo sarcoplasmático perde a capacidade de seqüestrar e ligar íons cálcio.

Entretanto, o músculo de rãs se apresenta com predominância de fibras brancas (RAMOS et al., 2003), que possuem poucas e pequenas mitocôndrias quando comparadas com as fibras vermelhas (LAWRIE, 1998; ARBELE et al., 2001), sendo plausível que a quantidade de cálcio liberado apenas por estas organelas não seja suficiente para iniciar a contração muscular. Ainda assim, a hipótese do Encolhimento pelo Frio torna-se mais evidente, se observarmos, que pela equação da Tabela 3.2, valores de pH próximos de 6,38 foram alcançados 32 horas *post-mortem* em músculos de rãs insensibilizadas por termonarose. Neste tempo, agora pela equação da Tabela 3.1, o valor R da carne situava-se próximo de 0,93. Valores R próximos de 1,05 ocorrem apenas quando há uma queda de cerca de 50 a 60% do ATP muscular inicial (HONIKEL e FISHER, 1977; LYON e BUHR, 1999), e serve como indicador do início de *rigor mortis* (BENDALL, 1973a; HAM, 1982; HONIKEL et al., 1983). Segundo GREASER (1986), o Encolhimento pelo Frio difere do *rigor mortis* pelo fato do desenvolvimento de tensão ocorrer em músculos que apresentam níveis mais elevados de ATP (5 a 6 $\mu\text{mol/g}$ contra 1 $\mu\text{mol/g}$). Assim, o pH de 6,40 parece realmente indicar o início do rigor, mas, uma vez que este ocorre em níveis de ATP suficientemente alto para inibir a contração muscular, parece ser devido ao fenômeno do Encolhimento pelo Frio e não ao *rigor mortis*. Infelizmente não temos dados da tensão isométrica de músculos de rãs insensibilizadas por termonarose, o que poderia ajudar a substanciar esta hipótese.

Provavelmente, nas condições estudadas neste experimento, a tensão isométrica nestes músculos ocorreria próximo de 32 horas pós-abate.

MOURA (2000) atribuiu o acúmulo de alanina como principal responsável pela menor taxa de queda do pH muscular nos músculos de coxas de rãs-touro insensibilizadas por termonarcole, quando comparada com aquelas insensibilizadas por eletronarcole. Este autor relata que uma aceleração na quebra de CP, como evidenciado em salmão (*Salmo salar*) por PROCTOR e MCLOUGHLIN (1992), e um aumento dos níveis de bicarbonato no plasma sanguíneo, observado por ROCHA e BRANCO (1998) em rãs-touro sob condições de hipoxia, também podem ter contribuído para manutenção do pH em níveis mais elevados do que outras espécies e, conseqüentemente, menor declínio *post-mortem*. No entanto, pelos resultados observados neste experimento, a menor queda do pH muscular em rãs insensibilizadas por termonarcole é devida a uma menor produção de ácido láctico e, provavelmente, maior produção de alanina (STOREY e STOREY, 1986) como metabólito final da anaerobiose.

A queda *post-mortem* do pH muscular não é função apenas da quantidade de ácido láctico produzido, mas também da capacidade tamponante do músculo (PUOLANNE e KIVIKARI, 2000; PUOLANNE et al., 2002). Uma maior capacidade tamponante muscular implica numa maior capacidade de resistência a mudanças no pH causada pelo acúmulo de ácido láctico, mantendo o pH em níveis que permitam uma função efetiva das enzimas envolvidas no metabolismo e prevenindo uma rápida queda no pH *post-mortem*. Desta forma, a menor taxa de queda do pH em músculos de rãs, quando comparada à de outras espécies, também pode ser devida a uma maior capacidade tamponante.

Os músculos de rãs-touro apresentam uma capacidade tamponante média (\pm desvio-padrão) de $40,4 \pm 5,8$ mmol H^+ /pH.kg. Segundo PUOLANNE et al. (2002), embora a capacidade tamponante varie com a espécie e com o tipo e proporção de fibra muscular presente, a maioria dos músculos apresenta valores entre 40 e 60 mmol H^+ /Kg.pH. Os valores encontrados para o músculo de rãs-touro situam-se no limite inferior desta faixa.

Segundo SOMERO (1986) ao estabilizar o pH intramuscular, uma elevada capacidade tamponante melhora a eficiência do metabolismo anaeróbio. De fato, a capacidade tamponante é muito maior em músculos brancos, de maior diâmetro, com capilarização deficiente e que necessitam de uma contração rápida, em curto espaço de tempo, o que sugere primeiramente o metabolismo glicolítico (OKUMA e ABE, 1992; ABE, 2000; PUOLANNE et al., 2002). Vários trabalhos reforçam esta afirmativa. PUOLANNE e KAVIKARI (2000) encontraram valores entre 48 e 51 mmol H^+ /Kg.pH para músculos de bovinos e entre 45 e 52 mmol H^+ /Kg.pH para suínos, avaliando os músculos *triceps brachii* e *longissimus dorsi*,

respectivamente. Para frangos, este autor encontrou valores de 41 mmol H⁺/Kg.pH para músculos da coxa e 58 mmol H⁺/Kg.pH para músculos do peito. O músculo *longissimus dorsi* contém maior proporção de fibras brancas do que vermelhas, quando comparado com o *triceps brachii*. Já os músculos do peito contêm quase que exclusivamente fibras brancas, enquanto que o músculo da coxa apresenta maior predominância de fibras vermelhas.

Resultados de diferentes estudos não devem ser diretamente comparados, uma vez que a capacidade tamponante é altamente dependente da faixa de pH e da forma de análise utilizada, especialmente com relação à diluição utilizada (PUOLANNE e KAVIKARI, 2000; PUOLANNE et al., 2002). No entanto, a forma de obtenção dos valores de capacidade tamponante usada neste experimento, especialmente a diluição (1:10) realizada e a faixa de pH (5,5 a 7,0) analisada, é a mesma relatada por PUOLANNE e KAVIKARI (2000), o que confere uma base de comparação mais confiável. Desta forma, era esperado que os valores de capacidade tamponante para músculos de rã fossem elevados, próximos do observado para músculos brancos de aves (58 mmol H⁺/Kg.pH). Novamente, as características peculiares dos músculos da rã parecem exercer um papel fundamental nesta diferença. Uma vez que os músculos da rã têm capacidade de metabolizar o ácido láctico, independentemente da participação do fígado (FOURNIER e GUDERLEY, 1992 e 1993), o seu acúmulo muscular é mais facilmente controlado e, portanto, é provável que não haja necessidade fisiológica de uma capacidade tamponante muito elevada no músculo.

Os mesmos compostos que regulam o pH no músculo vivo também o regulam no músculo *post-mortem* (PUOLANNE e KAVIKARI, 2000). Dentre os compostos que mais afetam a capacidade tamponante de músculos de diferentes espécies na faixa de pH entre 5,5 e 7,0 citam-se: (1) compostos de fosfato com valores de pK_a entre 6,1 e 7,1; (2) resíduos de histidilimidazol nas proteínas miofibrilares; e (3) dipeptídeos contendo histidina, como a carnosina, anserina e balenina (SEWELL et al., 1992; ABE 2000). Destes compostos que apresentam valores de pK_a próximo do pH fisiológico, o aminoácido L-histidina livre (pK_a = 6,21) e o dipeptídeo anserina (pK_a = 7,15) são predominantes em músculos com maior capacidade anaeróbica (OKUMA e ABE, 1992). A grande diferença entre a capacidade tamponante de vários músculos é devido à maior presença destes compostos nas fibras brancas (ABE 2000; KYLÄ-PUHJU et al., 2004), especialmente no músculo vivo (OKUMA e ABE, 1992). Não foi encontrado na literatura, níveis de dipeptídeos em músculos de rãs, em especial de carnosina e anserina, principais compostos responsáveis pela elevada capacidade tamponante dos músculos de aves.

Não houve interação significativa (P > 0,05) entre os métodos de insensibilização (tratamentos) e o período de estocagem refrigerada, para os valores de capacidade

tamponante. Também não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos aplicados, sendo, no entanto, a capacidade tamponante dependente ($P < 0,05$) do período de estocagem. Esta variação da capacidade tamponante com o tempo *post-mortem* também tem sido reportada na literatura para outras espécies animais.

A Figura 3.8 ilustra a mudança *post-mortem* da capacidade tamponante de músculos da coxa de rês-touro. Pode-se observar um aumento inicial nas primeiras 12 horas, seguido de uma redução a valores próximos do tempo zero e ligeiro aumento deste valor até 36 horas *post-mortem*. Este comportamento é bastante similar ao reportado por MOLETTE et al. (2003), para músculos de perus. O aumento na capacidade tamponante *post-mortem* também foi observado em músculos de suínos (SAYRE et al., 1963).

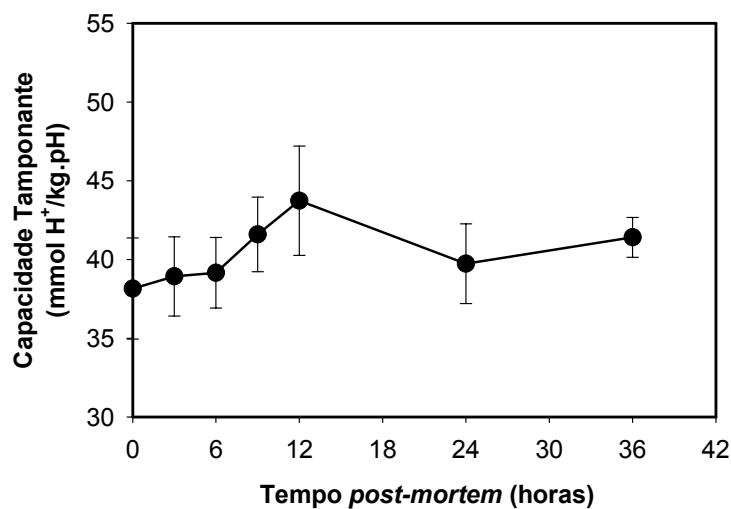


Figura 3.8. Efeito do tempo *post-mortem* na capacidade tamponante de músculos de coxas de rês-touro, estocada a $6 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Valores médios \pm erro padrão da média.

Segundo Kivikari (1996), citado por KYLÄ-PUHJU et al. (2004), as diferenças observadas na capacidade tamponante máxima durante as reações *post-mortem*, são de, aproximadamente, $8 \text{ mmol H}^+/\text{Kg.pH}$. Ainda segundo este autor, esta diferença é causada, principalmente, por compostos contendo fosfato e por fosfatos inorgânicos livres, boa parte dos quais é liberada pelo catabolismo do ATP. Diferentes compostos de fosfatos possuem diferentes pK_a e, durante a seqüência de reações *post-mortem*, a capacidade tamponante de cada composto muda, dependendo de como o seu valor de pK_a se relaciona com os valores de pH da carne. A diferença média entre os valores iniciais e finais para a capacidade tamponante de músculos de rês-touro é de $3,3 \text{ mmol H}^+/\text{Kg.pH}$ e, portanto, de acordo com as considerações reportadas por Kivikari (1996).

CONCLUSÕES

Apesar dos músculos de rãs serem constituídos predominantemente de fibras brancas, eles apresentam um desenvolvimento tardio do rigor, o que se deve às características peculiares de seu metabolismo e fisiologia muscular, que é capaz de restaurar os níveis musculares de compostos fosforilados de alta energia e postergar a queda de pH muscular por um período *post-mortem* prolongado.

Uma vez que, com base nos dados dos metabólitos musculares e do pH, pode-se concluir que o rigor desenvolvido nas rãs se deve, provavelmente, ao fenômeno de Encolhimento pelo Frio, parece que, em rãs, valor R de 1,05 é um indicador mais preciso do início do rigor (independente do tipo: Encolhimento pelo Frio ou *rigor mortis*) que a medida da concentração residual de ATP e do pH muscular.

Verifica-se ainda que diferentes métodos de insensibilização produzem taxas diferenciadas de desenvolvimento do rigor, o que pode ter conseqüências para a qualidade da carne obtida, em especial da maciez.

Por fim, foi verificado que músculos da coxa de rã-touro possuem uma baixa capacidade tamponante, provavelmente devido à sua capacidade de metabolizar o ácido láctico, independentemente da participação do fígado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H. Role of Histidine-Related Compounds as Intracellular Próton Buffering Constituents in Vertebrate Muscle. **Biochemistry (Moscow)**, v.65, n.7, p.757-765, 2000.

ABERLE, E.D., FORREST, J.C., GERRARD, D.E., MILLS, E.W. **Principles of Meat Science**. 4 ed. New York: Kendall/Hunt Publishing Company, 2001. 354p.

ALBINATI, F. L. **Avaliação de diferentes métodos de insensibilização e sangria de rãs**. Viçosa: UFV, 1994. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 1994.

BENDALL, J.R. Post-Mortem Changes in Muscle. In: BOURNE, G.H. **The Structure and Function of Muscle**. 2 ed. New York: Academic Press, p.243-309, 1973a.

BENDALL, J.R. The Biochemistry of Rigor-Mortis and Cold Contracture. In: 19th EUROPEAN MEETING MEAT RESEARCH WORKERS, **Proceedings...**, Paris, p.1-27, 1973b.

BERGMEYER, H.U., BERNT, E., SCHMIDT, F., STORK, H. Glucose: Determination with Hexokinase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. In: BERGMEYER, H.U. (ed) **Methods of Enzymatic Analysis**. 2 ed. New York: Academic Press Inc, v.3, p.1196-1201, 1974.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria da Defesa Agropecuária (SDA). Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). Divisão de Normas Técnicas. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Decreto no. 30.691, de 29 de março de 1952**, alterado pelos Decretos no.s 1.255 de 25-06-1962, 1.236 de 02-09-1994, no. 1.812 de 08-02-1996 e no. 2.244 de 04-06-1997. Brasília, 1997.

BROWN JR., G.W. The metabolism of Amphibia. In: MOORE, J.A. **Physiology of the Amphibia**. New York: Academic Press, v.1, p.1-98, 1964.

BUSCH, W.A., GOLL, D.E., PARRISH JR., F.C. Molecular Properties of Postmortem Muscle. Isometric Tension Development and Decline in Bovine, Porcine and Rabbit Muscle. **Journal of Food Science**, v.37, p.289-299, 1972.

CAPPELN, G., JESSEN, F. ATP, IMP, and Glycogen in Cod Muscle at Onset and During Development of Rigor Mortis Depend on the Sampling Location. **Journal of Food Science**, v.67, n.3, p.991-995, 2002.

CODEX ALIMENTARIUS. Recommended international code of hygienic practice for the processing of frog legs. Rome, FAO, **Codex Alimentarius Commission**, 1984. v.c.

COSTANZO, J.P., LEE, R.E. Cryoprotectant production capacity of the freeze-tolerant wood frog, *Rana sylvatica*. **Canadian Journal of Zoology**, v. 71, p.71-75, 1993.

DICKENS, J.A., LYON, C.E. The effects of electric stimulation and extended chilling times on the biochemical reactions and texture of cooked broiler breast meat. **Poultry Science**, v.74, n.3, p.2035-2040, 1995.

FABIANSSON, S., LASER REUTERSWÄRD, A. Low voltage stimulation and post-mortem energy metabolism in beef. **Meat Science**, v.12, p.205-223, 1985.

FOURNIER, P.A., GUDERLEY, H. Glucosidic pathways of glycogen breakdown and glucose production by muscle from post exercised frogs. **American Journal of Physiology**, v.265, p.R1141-R1147, 1993.

FOURNIER, P.A., GUDERLEY, H. Metabolic fate of lactate after vigorous activity in the leopard frog, *Rana pipiens*. **American Journal of Physiology**, v.262, p.R245-R254, 1992.

GOLL, D.E. The resolution of rigor mortis. In: 21ST ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 1968, **Proceedings...**, p.16, 1968.

GREASER, M.L. Conversion of Muscle to Meat. In: BECHTEL, P.J. **Muscle as food**. New York: Academic Press, p.37-102, 1986.

HAMM, R. Post Mortem Changes in Muscle with Regard to Processing of Hot-Boned Beef. **Food Technology**, v.36, n.11, p.105-115, 1982.

HERTZMAN, C., OLSSON, U., TORNBERG, E. The Influence of High Temperature, Type of Muscle and Electrical Stimulation on the Course of Rigor, Ageing and Tenderness of Beef Muscle, **Meat Science**, v.35, p.119-141, 1993.

HOHORST, H.J. L(+)-Lactate Determination with Lactic Dehydrogenase and NAD. In: BERGMAYER, H.U. (ed) **Methods of Enzymatic Analysis**. New York: Academic Press Inc, v.3, p.1464-1468, 1974.

- HONIKEL, K.O., FISCHER, C. A rapid method for the detection of PSE and DFD porcine muscle. **Journal of Food Science**, v.42, n.6, p.1633-1636, 1977.
- HONIKEL, K.O., FISCHER, C., HAMID, A., HAMM, R. Influence of Postmortem Changes in Bovine Muscle on the Water-Holding Capacity of Beef. Postmortem Storage of Muscle at 20°C. **Journal of Food Science**, v.46, n.1, p.1-6, 1981.
- HONIKEL, K.O., RONCALES, P., HAMM, R. The Influence of Temperature on Shortening and Rigor Onset in Beef Muscle. **Meat Science**, v.8, n.3, p.221-241, 1983.
- IWAMOTO M, YAMANAKA H, ABE H, USHIO H, WATABE S, HASHIMOTO K. ATP and creatine phosphate breakdown in spiked plaice muscle during storage, and activities of some enzymes involved. **Journal of Food Science**, v.53, n.6, p.1662-1665, 1988.
- IWAMOTO, M., YAMANAKA, H., WATABE, S., HASHIMOTO, K. Effect of storage temperature on rigor-mortis and ATP degradation in plaice *Paralichthys olivaceus* muscle. **Journal of Food Science**, v.52, p.1514-1517, 1987.
- JAMES, S.J., JAMES, C. **Meat Refrigeration**. New York: CRC Press, 2002. 347p.
- KEPLER, D., DECKER, K. Glycogen: Determination with Amyloglucosidase. In: BERGMEYER, H.U. (ed) **Methods of Enzymatic Analysis**. 2 ed. New York: Academic Press Inc, v.3, p.1127-1131, 1974.
- KHAN, A.W. Effect of chemical treatments causing rapid onset of rigor on tenderness of poultry breast meat. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.23, p.449-451, 1975.
- KYLÄ-PUHJU, M., RUUSUNEN, M., KIVIKARI, R., PUOLANNE, E. The buffering capacity of porcine muscles. **Meat Science**, v.67 p.587-593, 2004.
- LAMPRECHT, W., TRAUTSCHOLD, I. Adenosine-5'-Triphosphate. Determination with Hexokinase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. In: BERGMEYER, H.U. (ed) **Methods of Enzymatic Analysis**. 2 ed. New York: Academic Press Inc, v.4, p.2101-2110, 1974.
- LAWRIE, R.A. **Lawrie's Meat Science**. 6 ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 1998. 336p.
- LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. **A criação de rãs**. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 187p.
- LIMA, S.L., CRUZ, T.A., MOURA, O.N. **Ranicultura: análise da cadeia produtiva**. Viçosa: Folha de Viçosa. 1999. 172p.
- LOAIZA, J.F.U. **Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de carne de rã (*Rana catesbeiana*) estocada sob refrigeração e congelamento**. Viçosa: UFV, 1996. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- LOCKER, R.H. Cold-induced Toughness of Meat. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (eds.) **Advances in Meat Research**. v.1 (Electrical Stimulation). New York: AVI Books, p.1-44, 1985.

- LYON, C.E., BUHR, R.J. Biochemical Basis of Meat Texture. In: RICHARDSON, R.I., MEAD, G.C. (eds) **Poultry Meat Science**. (Poultry Science Symposium Series, v.25) England: CABI Publishing, p.99-126, 1999.
- MARSH, B.B. Rigor Mortis in Beef. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v.5, p.70-75, 1954.
- MOLETTE, C., RÉMIGNON, H., BABILÉ, R. Maintaining muscles at a high post-mortem temperature induces PSE-like meat in turkey. **Meat Science**, v.64, n.4, p.525-532, 2003.
- MOURA, F.F., GOMIDE, L.A.M., RAMOS, E.M. Efeito do Jejum Pré-Abate Sobre a Qualidade da Carne de Rã-Touro (*Rana catesbeiana*). In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES. 2001. São Pedro. SP. **Anais...**, p.114-115. 2001.
- MOURA, O.M. **Efeito de métodos de insensibilização e sangria sobre características de qualidade da carne de rã-touro e, perfil das indústrias de abate**. Viçosa: UFV, 2000. 205p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- NEWBOLD, R.P. Changes Associated with Rigor Mortis. In: BRISKEY, E.J., CASSENS, R.G., TRAUTMAN, J.C. (eds) **The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food**. Madison: University of Wisconsin Press, p.181-196, 1966.
- OGAWA, M., OGAWA, N.B.P. Alterações do pescado pós-morte. In: OGAWA, M., MAIA, E.L. (eds) **Manual de Pesca**. v.1 (Ciência e Tecnologia do Pescado). São Paulo: Livraria Varela, p.113-137, 1999.
- OKUMA, E., ABE, H. Major buffering constituents in animal muscle. **Comparative Biochemical Physiology**, v.102A, n.1, p.37-41, 1992.
- PAPINAHU, P.A., FLETCHER, D.L. The Effects of Stunning Amperage and Deboning Time on Early Rigor Development and Breast Meat Quality of Broilers. **Poultry Science**, v.75, p.672-676, 1996.
- PASSONNEAU, J.V., LOWRY, O.H. **Enzymatic Analysis: a Practical Guide**. Totowa: Humana Press, 1993. 403p.
- PUOLANNE, E.J., KIVIKARI, R. Determination of the buffering capacity of postrigor meat. **Meat Science**, v.56, p.7-13, 2000.
- PUOLANNE, E.J., PÖSÖ, A.R., RUUSUNEN, M.H., SEPPONEN, K.V., KYLÄ-PUHJU, M.S. Lactic Acid in Muscle and its Effects on Meat Quality. In: 55th ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, American Meat Science Association, 2002. **Proceedings...** (International Award Lecture), 2002. p.57-62.
- PROCTOR, M.R.M., MCLOUGHLIN, J.V. The effects of anesthesia and electrical stunning on chemical changes in the myotomal muscle of *Salmo salar* post-mortem. **Proceedings of the Royal Irish Academy, Section-B**, v.92, n.4, p.53-59, 1992.
- RAMOS, E.M., GOMIDE, L.A.M., PETERNELLI, L.A. Glycolytic and oxidative activities of bullfrog (*Rana catesbeiana*) skeletal muscles during post-metamorphosis growth. In: 49th INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 31 August - 5 September, 2003, Campinas, Brazil, **Proceedings...**, p.101-102, 2003.

- RAMOS, E.M., GOMIDE, L.A.M., RAMOS, A.L.S., PETERNELLI, L.A. Effect of stunning methods on the differentiation of frozen-thawed bullfrog meat based on the assay of β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase. **Food Chemistry**, v.87, n.4, p.607-611, 2004.
- ROCHA P.L., BRANCO, L.G.S. Seasonal changes in the cardiovascular, respiratory and metabolic responses to temperature and hypoxia in the bullfrog *Rana catesbeiana*. **Journal of Experimental Biology**, v.201, n.5, p.761-766, 1998.
- SAMS, A.R., JANKY, D.M. Characterization of Rigor Mortis Development in Four Broiler Muscles. **Poultry Science**, v.70, p.1003-1009, 1991.
- SAMS, A.R., MILLS, K.A. The effect of feed withdrawal duration on the responsiveness of broiler Pectoralis to rigor mortis acceleration. **Poultry Science**, v.72, n.9, p.1789-1796. 1993.
- SAYRE, R.N., BRISKEY, E.J., HOESTRA, W.G. Comparison of muscle characteristics and post-mortem glycolysis in three breeds of swine. **Journal of Animal Science**, v.22, p.1012-1020, 1963.
- SEWELL, D.A., HARRIS, R.C., MARLIN, D.J., DUNNETT, M. Estimation of the carnosine content of different fibre types in the middle gluteal muscle of the thoroughbred horse. **Journal of Physiology**, v.455, p447-453, 1992.
- SKJERVOLD, P.O., FJÆRA, S.O., ØSTBY, P.B. Rigor in Atlantic salmon as affected by crowding stress prior to chilling before slaughter. **Aquaculture**, v.175, p.93-101, 1999.
- SOMERO, G. Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. **American Journal of Physiology**, v.251, p.R197-R213, 1986.
- STEINER, A.A., PETENUSCI, S.O., BRENTGANI, L.G., BRANCO, L.G.S. The Importance of Glucose for the Freezing Tolerance/Intolerance of the Anuran Amphibians *Rana catesbeiana* and *Bufo paracnemis*. **Revista Brasileira de Biologia**, v.60, n.2, p.321-328, 2000.
- STEWART, M.K., FLETCHER, D.L., HAMM, D., THOMPSON, J.L. The effect of boning broiler breast meat muscle on postmortem pH decline. **Poultry Science**, v.63, n.11, p.2181-2186, 1984.
- STOREY, J.M., STOREY, K.B. Triggering of cryoprotectant synthesis by the initiation of ice nucleation in the freeze tolerant frog, *Rana sylvatica*. **J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.**, v.156, p.191-195, 1985.
- STOREY, K.B., STOREY, J.M. Freeze tolerant frogs: cryoprotectants and tissue metabolism during freeze-thaw cycles. **Canadian Journal of Zoology**, v.64, p.49-56, 1986.
- STOREY, K.B., STOREY, J.M. Freeze tolerance in animals. **Physiological Reviews**, v.68, p.27-84, 1988.
- WATABE, S., KAMAL, M., HASHIMOTO, K. Postmortem Changes in ATP, Creatine Phosphate, and Lactate in Sardine Muscle. **Journal of Food Science**, v.56, n.1, p.151-153, 1991.
- WHITING, R.C. Calcium Uptake by Bovine Muscle Mitochondria and Sarcoplasmic Reticulum. **Journal of Food Science**, v.45, n.2, p.288-292, 1980.

WOOD, D.F., RICHARDS, J.F. Isometric Tension Studies on Chicken *Pectoralis Major* Muscle. **Journal of Food Science**, v.39, p.525-529, 1974.

Efeito da Estimulação Elétrica no Desenvolvimento do *Rigor Mortis* e na Qualidade da Carne de Rãs-Touro Insensibilizadas por Eletronarcose e Termonarcose

RESUMO

Foi avaliado o efeito do tipo de insensibilização (termonarcose ou eletronarcose) e da estimulação elétrica (60 V, 60 Hz por 60 segundos) nas alterações *post-mortem* e qualidade da carne de rãs-touro (*Rana catesbeiana*). A tensão isométrica foi realizada em animais insensibilizados por eletronarcose e estimulados, sendo o início do rigor observado após 18 horas a 9°C, e o estabelecimento em 20 horas *post-mortem*. A insensibilização elétrica induziu um aumento ($P < 0,05$) na luminosidade (L^*) da carne de rã. A estimulação elétrica não afetou o metabolismo (6°C) *post-mortem* de animais insensibilizados por termonarcose, sendo que, baseado no valor R, o início do rigor ocorreu 9 horas pós-abate para a eletronarcose. Este resultado aponta para uma possível indicação do uso de altas voltagens para a estimulação de animais insensibilizados por termonarcose. A estimulação elétrica induziu ($P < 0,05$) um aumento na proporção relativa do pigmento heme reduzido (Hb^+ e Mb^+) e redução na proporção relativa das demais formas químicas (O_2Mb , O_2Hb , MMb e MHb). Também induziu ($P < 0,05$) aumento no valor de a^* e diminuição do valor de h^* . Estas alterações geraram uma cor de carne mais avermelhada. O índice de amarelo (b^*) não foi afetado pela estimulação, mas exerceu uma importante participação relativa na cor da carne de rã, apresentando ($P < 0,05$) correlação negativa com a $\%Mb^+$ e positiva com a $\%O_2Mb$ e $\%MMb$. Embora sem diferir quanto ao comprimento do sarcômero, os músculos estimulados de rãs-touro insensibilizadas por eletronarcose apresentaram ($P < 0,05$) menor pH_{24} , maior força de cisalhamento e textura mais firme do que os demais tratamentos. Entretanto, após 36 horas do abate, o comprimento do sarcômero de músculos de rãs submetidas à eletronarcose e estimulação elétrica foi menor ($P < 0,05$) do que aqueles provenientes dos demais tratamentos.

Palavras-Chave: Estimulação Elétrica; Insensibilização; Rigor; Rã-Touro; Maciez; Cor.

INTRODUÇÃO

O abate e o processamento de rãs para o consumo humano têm recebido atenção tímida quanto ao seu desenvolvimento tecnológico. Atualmente, são adotados como critérios de abate as recomendações do CODEX ALIMENTARIUS (1984) e o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (BRASIL, 1997), que define a carne de rã dentro da denominação genérica de “pescado”.

No Brasil, os métodos de insensibilização atualmente utilizados no abate comercial de rãs, podem ser divididos em dois grupos: insensibilização por termonarcorese, que consiste na imersão em água gelada e, ou, soluções salinas concentradas; e insensibilização por eletronarcorese, com aplicação de corrente elétrica para indução da epilepsia (LIMA e AGOSTINHO, 1988; ALBINATI, 1994). Entretanto, em levantamento realizado por LIMA et al. (1999), todos os abatedouros registrados em operação no Brasil, ou em processo de obtenção de registro no SIF ou SIE, aplicavam o processo de termonarcorese, efetuado em tinas com água e gelo.

A carne de rã, pela sua alta perecibilidade, é comercializada predominantemente congelada, sendo prática habitual nos abatedouros, uma vez concluída o toailete da carcaça, submetê-la a imediato resfriamento e, logo em seguida, ao congelamento (LIMA et al., 1999). Este tipo de procedimento pode induzir a ocorrência dos fenômenos de Encolhimento pelo Frio e Rigor de Descongelamento, afetando negativamente a qualidade final da carne, principalmente a maciez e textura. Embora a ocorrência do fenômeno de encolhimento pelo frio seja menos provável em músculos em que há predominância de fibras brancas por entrarem em rigor mais precocemente (LOCKER, 1985; LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001), esta possibilidade ficou ainda evidente com os resultados de pesquisa realizada por MOURA (2000), que verificou que a instalação do *rigor mortis* se inicia em 8 horas *post-mortem* em rãs insensibilizadas por eletronarcorese, e após 12 horas *post-mortem* em rãs insensibilizadas por termonarcorese. Estes tempos de rigor foram considerados atípicos, sendo comuns em músculos com elevada proporção de fibras vermelhas, como os de bovinos e ovinos. Entretanto, os resultados reportados no experimento descrito no Capítulo 3 evidenciaram um retardo ainda mais excessivo no metabolismo *post-mortem* na carne de rãstouro, especialmente nos animais abatidos pela termonarcorese, levando, possivelmente, à ocorrência do rigor pelo frio na carne de rãs abatidas da forma atualmente preconizada, o que foi atribuído às características metabólicas peculiares dos músculos de ranídeos.

Atualmente, o método mais difundido nos abatedouros para se prevenir os fenômenos de Encolhimento pelo Frio e Rigor de Descongelamento, assegurando a maciez e a qualidade das carnes vermelhas, é a estimulação elétrica da carcaça durante o processo de abate. A estimulação elétrica de carcaças também tem demonstrado ser efetiva na melhoria da cor, sabor e grau de marmorização da carne magra, além de prevenir o desenvolvimento do chamado “anel de aquecimento” (aparência no lombo de dois tons de cores com um anel escuro na extremidade) e reduzir o tempo de maturação da carne (CROSS, 1979; STIFFLER et al., 1982; CALKINS et al., 1980 e 1982; LOCKER, 1985; PEARSON e DUTSON, 1985; SMITH, 1985; LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001).

O processo de estimulação elétrica baseia-se na indução da aceleração da contração muscular *post-mortem*, pela aplicação de um estímulo elétrico externo, pelo que leva a um consumo mais rápido das reservas musculares de ATP, acelera a glicólise e o início do *rigor mortis*. Assim, possibilita o aumento da taxa de resfriamento das carcaças, sem que se incorra nos fenômenos estimulados pelo frio (STIFFLER et al., 1982; PEARSON e DUTSON, 1985). Embora tradicionalmente sugerida para espécies animais com musculatura rica em fibras vermelhas, a aplicação da estimulação elétrica no abate de animais com predominância de fibras brancas, como suínos e aves, recentemente tem sido avaliada em função da necessidade da indústria em acelerar o processo de desossa e resfriamento das carcaças sem, no entanto, afetar a qualidade da carne (OWENS e SAMS, 1997; MARIBO et al., 1999; SAMS, 1999; HUFF-LONERGAN, 2001; ROSENVOLD e ANDERSEN, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo investigar a aplicação da estimulação elétrica na carcaça de rãs-touro (*Rana catesbeiana*), insensibilizadas por eletronarcole e termonarcole, analisando os efeitos sobre o desenvolvimento do *rigor mortis* e nas características de qualidade final da carne, especialmente cor e maciez.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 56 rãs, machos e fêmeas, da espécie *Rana catesbeiana*, com peso vivo médio de 199 ± 16 gramas, obtidas no Ranário da Universidade Federal de Viçosa. As rãs foram escolhidas ao acaso e separadas em quatro grupos de 14 animais segundo o método de abate:

TNE: Insensibilização por termonarcole, sem aplicação da estimulação elétrica;

TES: Insensibilização por termonarcole e aplicação da estimulação elétrica;

ENE: Insensibilização por eletronarcole, sem aplicação da estimulação elétrica;

EES: Insensibilização por eletronarcore e aplicação da estimulação elétrica.

Previamente ao abate, os animais foram mantidos em jejum hídrico de 24 horas (MOURA et al., 2001), após o que foram pesados, insensibilizados e abatidos. A insensibilização por termonarcore foi realizada pela imersão dos animais em água e gelo, na proporção de 1:1, por 15 minutos, após o que foram penduradas pelas patas traseiras. Na eletronarcore, as rãs foram penduradas pelas patas traseiras e insensibilizadas mediante aplicação de choque elétrico (60 V, 60 Hz), durante sete segundos (ALBINATI, 1994), pelo uso de garras presas no nariz e em uma das patas traseiras. Os animais insensibilizados foram sangrados pela secção dos vasos do tronco cardíaco (ALBINATI, 1994). Durante o período de 3 minutos de sangria, aplicou-se a estimulação das carcaças com o mesmo dispositivo usado na insensibilização elétrica, até que a resposta (contração) muscular se tornasse pouco intensa, conforme determinado em ensaios preliminares. Assim, as rãs foram estimuladas por 60 segundos aplicando-se uma tensão de 120 V (60 Hz, corrente alternada), em 20 pulsos de 2 segundos, e com intervalos de 1 segundo sem corrente (2 segundos “on” e 1 segundo “off”). Uma corrente média de $24,3 \pm 2,9$ mA foi medida durante a estimulação dos animais, com ajuda de um multímetro digital (MINIPA ET-2080).

Após a sangria, procedeu-se à evisceração, remoção da pele e toaete das carcaças, sob jatos constantes de água (LOIAZA, 1996).

Imediatamente após o abate, as coxas de 7 animais de cada grupo foram desossadas, divididas (cortes transversais) em 5 partes de aproximadamente 5 gramas, individualmente embaladas em sacos plásticos de polietileno, identificadas e armazenadas em BOD (TECNAL, modelo TE 391) a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ até o momento da análise. As amostras obtidas entre 10 e 15 minutos após o abate foram definidas como tempo zero e imediatamente analisadas quanto ao pH, valor R e comprimento de sarcômero. As mesmas análises foram realizadas nos tempos 6, 12, 24 e 36 horas *post-mortem* após incubação a $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Para cada tempo de análise a escolha das amostras foi realizada aleatoriamente.

As coxas dos outros 7 animais de cada grupo foram individualmente embaladas em sacos plásticos de polietileno, ainda com os músculos presos aos ossos, identificadas e armazenadas em sob refrigeração (BOD TECNAL, modelo TE 391) a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, para análise da cor objetiva.

Também imediatamente após o abate, os músculos *gastrocnemius* de cada animal foram removidos, pesados, individualmente embalados em sacos plásticos de polietileno, identificados e armazenados sob refrigeração (BOD TECNAL, modelo TE 391) a $6 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, para a análise da maciez objetiva.

Medidas de pH

A medida do pH das amostras foi realizada pelo método do iodoacetado, descrito por BENDALL (1973a). Cerca de 2 gramas de amostra foram homogeneizadas por 30 segundos em 20 mL de solução iodoacetato 5 mM e KCl 150 mM, previamente neutralizada para pH 7,0 com ajuda de um triturador tipo Turrax (MARCONI). A leitura do pH foi realizada imediatamente após a homogeneização, fazendo-se uso de um pHmetro de bancada (Hanna Instruments, modelo HI 9321) acoplado a um eletrodo de vidro (Sensoglass, modelo SCO2).

Valor R

Cerca de 2 gramas de amostra foram desproteinizadas pela homogeneização, durante 60 segundos, em 10 mL de solução de ácido perclórico 0,6 M, com ajuda de um triturador tipo Turrax (MARCONI). O homogenato foi centrifugado a 4°C por 15 minutos a 3.000g, em centrífuga BECKMAN (modelo J2-MC). Uma alíquota de 50 µL do sobrenadante da amostra desproteinizada foi diluída em 2,9 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) procedendo-se a leitura das absorvâncias a 250 ($A_{250\text{ nm}}$) e 260 nm ($A_{260\text{ nm}}$), em espectrofotômetro HITACHI U-2001. O tampão fosfato foi utilizado como referência (HONIKEL e FISHER, 1977).

O valor R foi calculado como:

$$\text{Valor } R = \frac{A_{250\text{ nm}}}{A_{260\text{ nm}}}$$

Comprimento do Sarcômero

As amostras para análise do comprimento do sarcômero foram preparadas segundo metodologia sugerida por LOCKER (1960). Cerca de 0,5 gramas de músculos da coxa foram homogeneizados por cerca de 30 segundos em 30 mL de solução de KCl/KI (0,08M), com ajuda de um triturador tipo Turrax (MARCONI). Uma gota do homogenato foi transferida para a lâmina, coberta pela lamínula e imediatamente analisada microscopicamente.

A análise microscópica foi realizada segundo o método sugerido por HEINEMANN et al. (2002), com algumas modificações. As amostras foram analisadas em um microscópio ótico de contraste de fase (Olympus BX41), dotado de um sistema de aquisição de imagens (*Automatic Exposure Photomicrographic System*, PM-10AK3) adaptado a uma câmera digital MAVICA FD100, utilizando-se uma objetiva de 40x. Após focalização dos feixes de

miofibrilas, foram fotografadas (resolução 1280 x 960 dpi) cerca de 6 campos visuais para cada amostra (Figura 4.1).

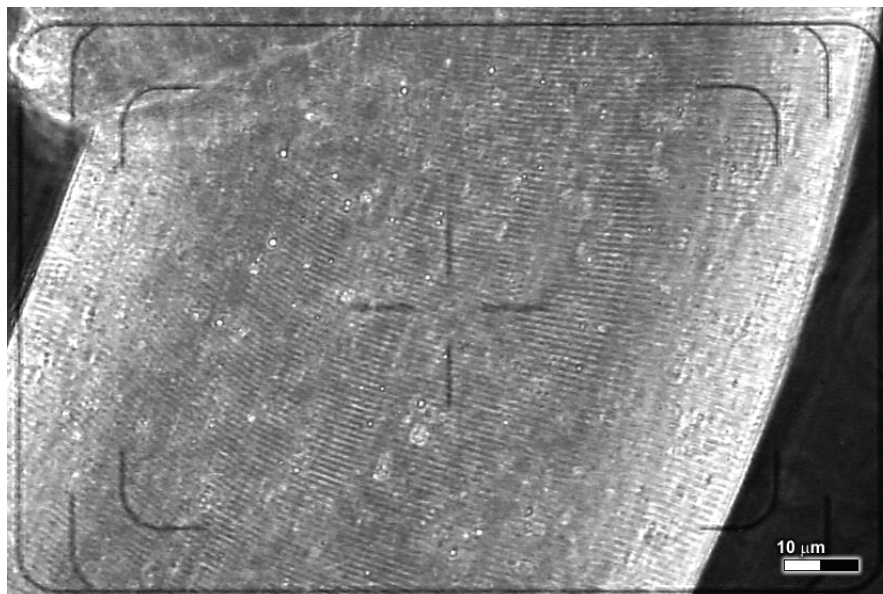


Figura 4.1. Fotografia digital (resolução 1280 x 960 dpi) de feixes de miofibrilas de homogenato de carne da coxa de rã-touro, tiradas em um microscópio ótico de contraste de fase (Olympus BX41).

A medida dos comprimentos do sarcômero foi realizada manualmente, utilizando o programa Microsoft Office Visio[®] 2002, em que se mediu uma média de 10 unidades de sarcômeros, tendo como bases as bandas A e I. A distância medida foi dividida pelo número de sarcômeros. Em cada repetição, pelo menos 200 sarcômeros foram avaliados. A calibração da escala utilizada foi realizada pela análise de fotografias, tiradas nas mesmas condições da amostra, de um micrômetro de referência (*Olympus objective micrometer - OSM*) com subdivisões de 10 μm .

Avaliação Objetiva da Cor

A análise objetiva da cor das coxas de rãs-touro foi realizada usando o aparelho Color Quest II (HunterLab, Reston, VA), conectado a um computador equipado com o programa *Universal System*. Para o cálculo dos índices de cor, os seguintes parâmetros foram usados: iluminante A; ângulo do observador de 10°; e leitura na escala CIELAB com a reflectância especular incluída (RSIN). Os índices de cor L^* , a^* e b^* foram obtidos considerando-se a média dos valores de cinco leituras realizadas em diferentes pontos da superfície da coxa não desossada. A tonalidade (C^*) e o ângulo de saturação (h^*) foram calculados pelas seguintes fórmulas: $C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0,5}$ e $h^* = \tan^{-1} (b^*/a^*)$ (AMSA, 1991).

Análise do Espectro de Reflectância

O conteúdo relativo dos pigmentos, expresso como oximioglobina (O_2Mb), mioglobina reduzida (Mb^+) e metamioglobina (MMb), na superfície da carne, foi estimado a partir da curva de reflectância obtida na análise objetiva da cor, segundo o método de KRZYWICKI (1979). As curvas espectrais de reflectância foram obtidas na região do visível, entre 400 e 700 nm, em intervalos de 10 nm, sendo os valores intermediários (473, 525 e 572 nm) calculados por interpolação linear.

Avaliação Objetiva da Maciez

Os músculos *gastrocnemius* foram acondicionados em plásticos termoresistentes e cozidos em banho-maria, com água agitada a 90°C, até uma temperatura interna de 75°C, medida com um termopar acoplado a um multímetro digital (MINIPA ET-2080) inserido no ponto frio do músculo. A seguir, os músculos foram rapidamente resfriados em banho de água e gelo até atingir a temperatura interna de 20°C, após o que foram mantidos por 24 horas em refrigerador a 4°C. As amostras foram submetidas a uma força de cisalhamento, aplicada perpendicularmente ao comprimento das fibras musculares e na seção longitudinal de maior diâmetro do músculo, fazendo-se uso uma lâmina tipo Warner-Bratzler (HDP/BS, Stable Micro System, Inc.) acoplada a um texturômetro TA.HDi Texture Analyser (Stable Micro System Inc.), conectado a um computador equipado com o programa *Texture Expert*[®]. A maior força de cisalhamento (kg) foi medida, utilizando-se uma velocidade de teste de 3 mm/s (180 mm/min) e velocidade de pré- e pós-teste de 10 mm/s.

Para compensar uma provável diferença de diâmetro entre os músculos dos diferentes animais, os resultados foram expressos em kg/cm². Para isto, a área da seção transversal de cada músculo foi estimada, considerando o maior diâmetro muscular.

Tensão Isométrica

O padrão de desenvolvimento da tensão isométrica foi acompanhado no músculo *gastrocnemius* de 3 animais abatidos por eletronarcose e posteriormente estimulados. As medidas de tensão foram obtidas em um texturômetro TA.HDi Texture Analyser (Stable Micro System Inc.), conectado a um computador equipado com o programa *Texture Expert*[®]. As amostras dos músculos para medidas de tensão foram obtidas imediatamente após o abate. A carne de uma das coxas foi removida, deixando o fêmur exposto. A extremidade inferior do

músculo *gastrocnemius* foi separada do osso e a tíbia-fíbula separada do fêmur, próximo da articulação (Figura 3.1). O fêmur foi firmemente preso por uma garra e conectado ao braço da célula de força do texturômetro. A extremidade do músculo também foi firmemente presa em uma garra conectada a um gancho fixado numa câmara cúbica (cerca 12 cm de aresta) feita de vidro e encamisada (Figura 3.2). Após a fixação da amostra, a câmara foi preenchida com solução tampão tris-acetato 60 mM (pH 7,1), KCl 80 mM, MgCl₂ 5mM e azida sódica 1 mM (BUSCH et al., 1972) até cobrir a amostra, para evitar a sua desidratação. A temperatura da câmara foi mantida em $9 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante o experimento, através da circulação de água gelada na camisa do aparato.

Para atender a uma condição inicial o mais uniforme possível, o texturômetro foi calibrado para aplicar uma tensão inicial no músculo de 5 g/cm^2 (BUSCH et al., 1972). A tensão isométrica foi medida a cada 10 segundos, durante 36 horas, sendo expressa em gramas/cm². A área da seção transversal foi estimada considerando o músculo como um cilindro, sendo o raio utilizado para a estimativa obtido a partir do maior diâmetro muscular.

Análise Estatística

Os tratamentos foram dispostos em esquema de parcelas subdivididas, com fatorial 2 x 2 na parcela (tipo de insensibilização - eletronarcose e termonarcose - *versus* estimulação elétrica - estimulado e não-estimulado) e o tempo de estocagem *post-mortem* na subparcela. Para as análises de cor e maciez, o experimento foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 (insensibilização x estimulação). Os dados de valor R e pH foram analisados por regressão ,enquanto que os de tensão isométrica foram analisados descritivamente.

O coeficiente de correlação de Pearson e o teste de Tukey também foram usados quando pertinentes, e todas as análises foram conduzidas no programa SAS[®] System for Windows[™], versão 8.0 (SAS Institute Inc.), considerando um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desenvolvimento do Rigor

A Figura 3.2 ilustra, através da mudança na tensão isométrica, o desenvolvimento do rigor no músculo *gastrocnemius* de rãs-touro eletricamente estimuladas após insensibilização por eletronarcose.

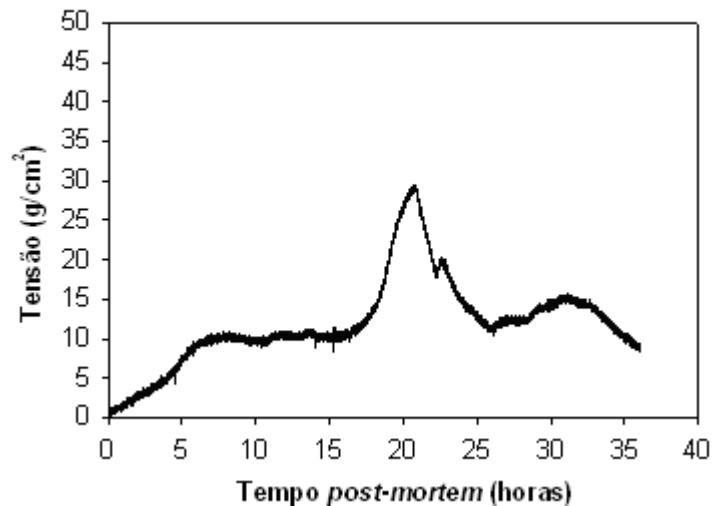


Figura 3.1. Desenvolvimento da tensão isométrica média em músculos *gastrocnemius* de rês-touro abatidas por eletronarcole e submetidas à estimulação elétrica. Os músculos ($n = 3$) foram imersos em solução tampão tris-acetato 60 mM (pH 7,1), contendo KCl 80 mM, MgCl₂ 5mM e azida sódica 1 mM, e mantidos a $9 \pm 2^\circ\text{C}$ por 36 horas.

Para prevenir confusões relativas ao uso dos termos “início” e “estabelecimento” do rigor, assim como a “fase de atraso” e “fase rápida”, serão utilizados critérios segundo as definições estabelecidas no Capítulo 3. O início da fase rápida (início do rigor) foi estabelecido como o ponto onde a regressão da curva relativa à fase rápida intercepta o prolongamento da regressão da curva da fase de atraso (HERTZMAN et al., 1993).

Quando comparado com a tensão isométrica desenvolvida em animais não-estimulados insensibilizados por eletronarcole (Figura 3.3), observa-se que a aplicação da estimulação elétrica (Figura 4.2) reduziu em 18% (22 para 18 horas) o tempo para início e em 37,5% (32 para 20 horas) o tempo para estabelecimento do rigor. Esta redução foi menos intensa do que a observada para outros animais. Se considerarmos que, em animais tradicionais, o pH 5,9 é um indicativo do início do rigor (HAMM, 1982), a estimulação elétrica de baixa voltagem (21 V, 60 Hz) aplicada por 20 segundos por JANZ et al. (2001) em músculos de bisão, resultou em uma redução de 70% no tempo para início do rigor. Com esta mesma consideração, a redução foi de 79% em músculos de bovinos estimulados (200 V, 12,5 Hz) por 2 minutos (CHRYSTALL e DEVINE, 1985) e de 69% em músculos bovinos estimulados (85 V, 14 Hz) por 32 segundos (HERTZMAN et al., 1993). Aplicando a estimulação elétrica de baixa voltagem (15 V por 1,67 minutos) para simular a atividade física exaustiva em salmão, JARRET e HOLAND (1998) e JARRET et al. (1998) observaram uma redução em 56 e 53%, respectivamente, no tempo para início do rigor quando comparado com

animais não estimulados. Ao utilizar a estimulação elétrica (15 V) por 3,33 minutos, JARRET e HOLLAND (1998) observaram uma redução de 87% no retardo para o início do rigor.

Uma vez que nos últimos segundos de aplicação da estimulação elétrica na rã-touro insensibilizada por eletronarcese, foi observado que o animal não mais respondia com tanta veemência ao estímulo elétrico, é provável que o principais fatores responsáveis pela pequena eficiência da estimulação elétrica seja os parâmetros da estimulação utilizados, principalmente a frequência e voltagem.

A tensão isométrica máxima desenvolvida ($29,5 \text{ g/cm}^2$) nos músculos de animais estimulados foi de cerca de 60% daquela desenvolvida ($47,9 \text{ g/cm}^2$) em animais não estimulados (Capítulo 3). Este menor desenvolvimento de tensão durante o estabelecimento do rigor em animais estimulados, diverge dos resultados observados em outras espécies animais. Avaliando o efeito da estimulação elétrica sobre o desenvolvimento do *rigor mortis* em bovinos, HERTZMAN et al. (1993) não observaram diferença significativa na tensão e encolhimento máximo de músculos de bovinos estimulados e não-estimulados. JERRET e HOLLAND (1998), ao simular a atividade física exaustiva em salmão através da aplicação de estimulação elétrica, observaram um aumento linear na tensão isométrica de músculos à medida que se aumentou a intensidade de exaustão (maior tempo de estimulação).

A menor tensão desenvolvida em animais que sofreram estimulação elétrica do que em animais não estimulados pode se dever ao fato de que, após o período de estimulação, grande parte das reservas de compostos fosforilados de alta energia já havia sido consumida (CHRYSTALL e DEVINE, 1985; LOCKER, 1985). Assim, provavelmente, a formação de complexo actomiosina na musculatura de rãs estimuladas foi inferior àquela de animais não estimulados, o que é responsável pelo menor desenvolvimento de tensão quando do estabelecimento do rigor em rãs estimuladas. Esta hipótese também é suportada pelo fato de HERTZMAN et al. (1993) terem observado uma elevada correlação significativa entre o encolhimento máximo e o nível de ATP no início do encurtamento muscular, o que substancia o fato de que elevados níveis de energia nos músculos favorecem um maior encolhimento muscular e, portanto um maior desenvolvimento de tensão. Isto é especialmente importante em músculos submetidos ao fenômeno de Encolhimento pelo Frio, em que o encurtamento muscular ocorre com elevados níveis residuais de ATP (LOCKER, 1985; GREASER, 1986; LAWRIE, 1998). Como a estimulação elétrica induz a uma redução nos níveis de ATP muscular, a menor tensão observada em músculos estimulados é pertinente, reforçando a possibilidade de este encurtamento ser oriundo do fenômeno de Encolhimento pelo Frio, conforme cogitado no Capítulo 3.

Uma outra possibilidade de se ter observado no presente experimento, ao contrário dos autores citados (HERTZMAN et al., 1993; JERRET e HOLAND, 1998), uma menor tensão máxima desenvolvida nas rãs estimuladas que naquelas não estimuladas, pode se dever a diferenças nos parâmetros usados na estimulação de carcaças, em especial da frequência utilizada. Segundo CHRYSTALL e DEVINE (1985), a tensão desenvolvida em bovinos submetidos à estimulação elétrica de baixa voltagem, tende a ser menor e mais duradoura à medida que se diminui a frequência dos pulsos elétricos aplicados. Além disso, a resposta à estimulação é dependente da frequência utilizada, sendo a frequência ótima variável com a espécie animal, pelo que se preconiza frequências maiores para animais de fibras brancas (CHRYSTALL e DEVINE, 1985).

A Figura 4.3 ilustra o desenvolvimento do valor R e do pH em músculo da coxa de rãs-touro insensibilizadas por eletronarcose e termonarcose, estimulados ou não. As equações e seus respectivos coeficientes de regressão estão descritos na Tabela 4.1. Para os dados de valor R, optou-se pela regressão linear, uma vez que a equação de regressão não apresentou um comportamento muito distinto daquele da regressão quadrática, muito embora tenha apresentado falta de ajuste significativa para alguns tratamentos. Assim, optou-se pelo modelo linear por apresentar uma razoável adequação para descrever as mudanças observadas.

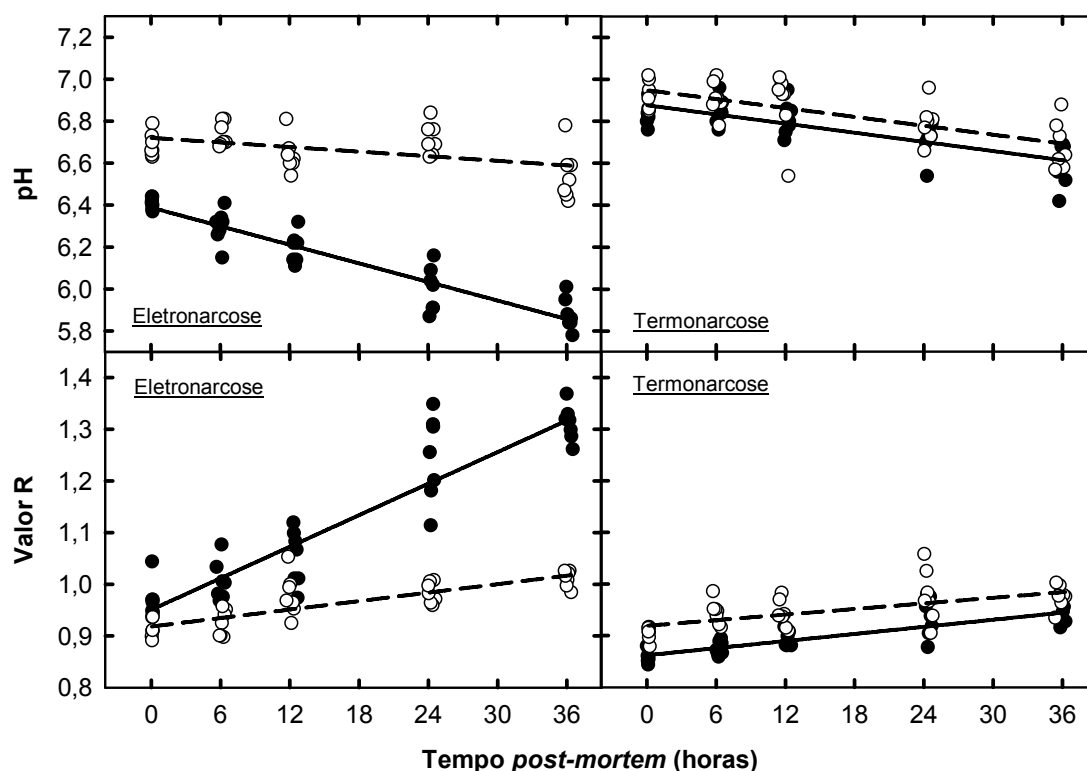


Figura 4.3. Efeito da insensibilização (eletronarcose e termonarcose) e estimulação elétrica nos valores de R e pH em músculos da coxa de rãs-touro mantidas durante 36 horas *post-mortem* a $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Carcaças estimuladas (—●—) e não-estimuladas (—○—) eletricamente.

Tabela 4.1. Equações ajustadas e coeficientes da regressão (r^2) para valores R e pH (\hat{y}) dos diferentes tratamentos em função do tempo *post-mortem* (x)

Tratamento	Equação de Regressão	r^2
pH		
ENE	$\hat{y} = 6,7206 - 0,0035.x$	0,8968
EES	$\hat{y} = 6,3907 - 0,0148.x$	0,9809
TNE	$\hat{y} = 6,9504 - 0,0070.x$	0,9658
TES	$\hat{y} = 6,8775 - 0,0072.x$	0,9362
Valor R		
ENE	$\hat{y} = 0,9207 + 0,0027.x$	0,9676
EES	$\hat{y} = 0,9540 + 0,0103.x$	0,9801
TNE	$\hat{y} = 0,9221 + 0,0018.x$	0,9948
TES	$\hat{y} = 0,8633 + 0,0023.x$	0,8839

ENE = eletronarcese não-estimulado; EES = eletronarcese estimulado; TNE = termonarcese não-estimulado; TES = termonarcese estimulado.

Pelas curvas de regressão e considerando que o rigor inicia quando o valor R é próximo de 1,05 (Capítulo 3; HONIKEL e FISCHER, 1977; HAMM, 1982; HONIKEL et al., 1983), o tempo estimado para o início do rigor em rãs insensibilizadas por eletronarcese é de, aproximadamente, 9 horas para carcaças estimuladas, bem abaixo do tempo determinado pela mudança na tensão isométrica (Figura 4.2). Em animais insensibilizados por termonarcese o tempo para início do rigor é muito alto, acima de 36 horas, não podendo ser observado neste experimento.

É provável que as discrepâncias observadas nos resultados quando comparados com os obtidos no Capítulo 3 sejam oriundas de diferenças quanto ao histórico de criação dos animais, uma vez que eram provenientes de lotes diferentes, criados em épocas diferentes e possivelmente com dietas diferentes. Além disso, embora os pesos médios de abate sejam muito próximos em ambos os experimentos, as idades médias destes animais podem não ser a mesma, uma vez que o peso vivo pode estar relacionado à população dominante, tendo o sexo, nos períodos de desova, influência marcante (RAMOS, 2000).

Quanto às diferenças entre o tempo estimado pelo valor R e pela tensão isométrica para rãs insensibilizadas por eletronarcese, as diferenças fisiológicas e metabólicas entre os músculos (*coxa versus gastrocnemius*) e as temperaturas de armazenamento utilizadas (9°C *versus* 6°C), podem ter contribuído para esta variação.

Mesmo para os músculos estimulados, o tempo para o início do desenvolvimento do rigor, seja pela tensão isométrica ou pelo valor R, ainda pode ser considerado extremamente alto, comparável ao tempo médio estipulado para o início do *rigor mortis* em bovinos (Offer

et al., 1988, citado por JAMES e JAMES, 2002). Este elevado tempo de retardo do início do rigor é, ainda, superior àqueles previamente estimados por MOURA (2000), através do valor R, para rãs insensibilizadas por eletronarcose (não-estimuladas) e mantidas a $8 \pm 1^\circ\text{C}$, e referenciados por BENDALL (1973a) para músculos de rãs (espécie não citada pelo autor) mantidos a 20°C . A diferença para os resultados reportados por BENDALL (1973a), no entanto, também pode ser oriunda da diferença de temperatura de armazenamento dos músculos, visto que, à semelhança de outros processos metabólicos, a taxa de rigor é altamente dependente da temperatura (BENDALL, 1973a; CHRYSTALL e DEVINE, 1985; PEARSON e DUTSON, 1985; LAWRIE, 1998; ABERLE et al., 2001).

Outrossim, baseado nas curvas de regressão estimadas para valor R (Tabela 4.1), em animais insensibilizados por termonarcose o retardo para o início do rigor é ainda maior do que animais insensibilizados por eletronarcose, o que reforça a hipótese de que animais insensibilizados por termonarcose apresentam uma taxa metabólica menor, causada pela redução da temperatura muscular a valores sub-zero durante a etapa de insensibilização (Capítulo 3).

Independentemente da relação com o tempo de início do rigor, pelos valores de R e pH (Figura 4.3), pode-se observar que o metabolismo muscular *post-mortem* dos animais insensibilizados por termonarcose parece não ter sido afetado pela aplicação da estimulação elétrica, como ocorreu com os animais insensibilizados por eletronarcose. Assim, é admissível se supor que a letargia induzida pelo frio em rãs promova uma perda do potencial de membrana nas fibras nervosa e, ou, muscular, fazendo com que a condução do estímulo elétrico não ocorra quando se usa baixas voltagens (CHRYSTALL e DEVINE, 1985). Esta idéia encontra suporte na observação de que, durante a aplicação da estimulação elétrica, as rãs insensibilizadas por termonarcose não apresentavam resposta muscular aparente. Assim, é possível que, em se pretendendo e, ou, necessitando aplicar estimulação elétrica em rãs insensibilizadas por termonarcose, deve-se optar pela utilização de altas voltagens.

O princípio da aplicação da estimulação elétrica é a indução, pela passagem da corrente elétrica, de uma contração muscular, ocasionando um consumo mais rápido das reservas de ATP de forma a acelerar a glicólise e, conseqüentemente, o início do rigor (STIFFLER et al., 1982; CHRYSTALL e DEVINE, 1985; PEARSON e DUTSON, 1985). Um maior consumo de ATP nas rãs estimuladas após insensibilização por eletronarcose foi evidenciado pelo aumento substancial nos valores R durante a estocagem pós-abate. Nestes animais também foi observado um aumento (cerca de 4 vezes) na taxa de queda do pH *post-mortem* em músculos estimulados ($10,3 \times 10^{-3}$ unidades pH/hora) em relação àquela de músculos não-estimulados ($2,7 \times 10^{-3}$ unidades pH/hora). Assim, nas rãs insensibilizadas por

eletroanestesia, o efeito da estimulação elétrica foi mais pronunciado do que o observado em músculos bovinos, onde a taxa de queda no pH aumenta de 1,5 a, no máximo, 2,0 vezes em músculos de carcaças estimuladas (CHRYSTALL e DEVINE, 1985). Este resultado, aparentemente, contradiz a efetividade, anteriormente discutida, da estimulação elétrica em rãs insensibilizadas por eletroanestesia na agilização do rigor. Por outro lado, embora a taxa de declínio do pH tenha sido exacerbadamente alta, a diferença de pH inicial ($\Delta\text{pH} = 0,28$) entre os músculos estimulados e não estimulados de rã-touro foi similar ao observado ($\Delta\text{pH} = 0,22$) por JANZ et al. (2001) em músculos de bisão submetidos à baixa voltagem (21 V). No entanto, CHRYSTALL e DEVINE (1985) citam que, em músculos de bovinos, a aplicação de 200 V por 2 minutos pode gerar um ΔpH maior que 0,7 unidades, conforme observado ($\Delta\text{pH} = 0,77$) por JARRET e HOLAND (1998) em músculos de salmão estimulados (15 V) por 3,33 minutos. Esta diferença pode ser oriunda justamente de diferenças nos parâmetros de estimulação, conforme anteriormente citado. Ressalta-se, ainda, que tais parâmetros são dependentes da espécie animal, não existindo estudos desta natureza para os anfíbios.

Por outro lado, confirmando os resultados anteriormente discutidos, o efeito da estimulação elétrica no metabolismo muscular não foi observado nos animais insensibilizados por termonestesia. De fato, nestes músculos a taxa de queda no pH *post-mortem* praticamente não se alterou (média de $7,1 \times 10^{-3}$ unidades pH/hora) em função da aplicação da estimulação elétrica, ocorrendo, apenas, uma diferença de cerca de 0,1 unidade de pH a menos para os valores médios em músculos estimulados, quando comparado com os não-estimulados. Para o valor R, os músculos não-estimulados apresentaram valores médios maiores, embora numa taxa de aumento menor, do que os músculos estimulados. Este comportamento, no entanto, não pôde ser explicado.

A ausência do efeito da estimulação elétrica sobre músculos tratados por termonestesia é substanciada pela observação, durante a etapa de estimulação, de que estes animais não respondiam ao estímulo elétrico com tanta veemência quanto os tratados por eletroanestesia. Durante a aplicação da corrente, observa-se uma flexão dos membros anteriores e extensão das pernas traseiras da rã, podendo-se perceber a movimentação subcutânea da musculatura contraída. Este comportamento, no entanto, foi bem menos intenso em animais submetidos à termonestesia, de forma tal que após poucos segundos de estimulação as contrações não mais ocorriam. Esta menor resposta ao estímulo elétrico pode estar relacionado com as características metabólicas dos músculos da rã-touro quando submetidas a temperaturas sub-zero. Em baixas temperaturas, a taxa metabólica muscular é bem menor (FIGUEIREDO, 1996) e os músculos da perna não trabalham (STOREY e STOREY, 1986), o que explicaria

as menores contrações e, conseqüentemente, a ineficiência da estimulação elétrica no músculo destes animais.

Os dados referentes ao comprimento do sarcômero (Figura 4.4) evidenciaram interação significativa ($P < 0,05$) entre os métodos de insensibilização, aplicação da estimulação elétrica e o período de estocagem refrigerada. Para cálculo do percentual de encurtamento do sarcômero, assumiu-se um comprimento médio de sarcômero de $2,40 \mu$, já que, segundo SQUIRE (1981), o comprimento médio do sarcômero de músculos *sartorius* da coxa de rãs em repouso situa-se entre $2,20$ e $2,40 \mu$.

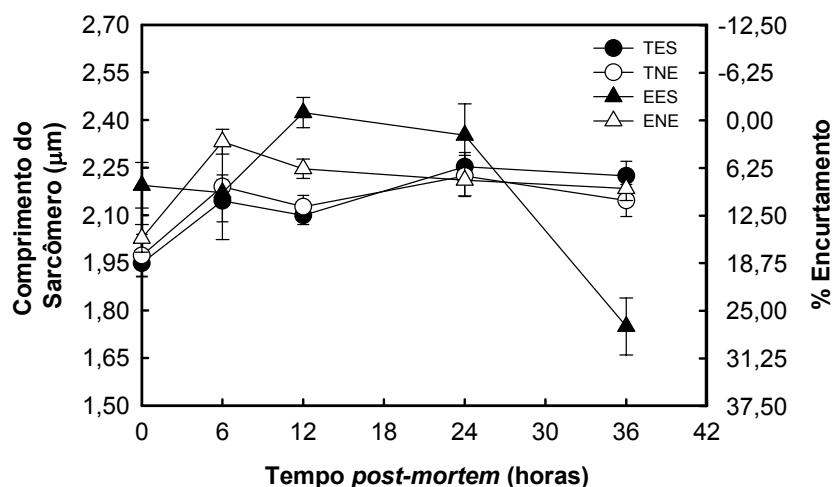


Figura 4.4. Efeito da insensibilização e estimulação elétrica no tamanho médio e percentual de encurtamento dos sarcômeros (considerando um valor médio de $2,40 \mu$ para músculos em repouso) de músculos da coxa de rãs-touro mantidas durante 36 horas *post-mortem* a $6 \pm 2^\circ\text{C}$. Valores médios \pm erro padrão da média. TES = Termonarcose estimulado; TNE = Termonarcose não-estimulado; EES = Eletronarcose estimulado; e ENE = Eletronarcose não-estimulado.

Pela Figura 4.4, observa-se que para o tratamento EES há um relaxamento muscular nas primeiras 12 horas, quando o pH atinge cerca de 6,2. A partir deste tempo, um novo encurtamento muscular tem início, tornando-se bem mais pronunciado após 24 horas, quando o pH atinge valores próximos de 6,0. Segundo WHITING (1980), a mitocôndria é a primeira organela a perder a habilidade de seqüestrar cálcio *post-mortem* quando o músculo é submetido a baixas temperaturas, ocorrendo quando o pH se encontra entre 6,5 e 6,0. Apenas quando o pH muscular se encontra entre 6,0 e 5,5 é que o retículo sarcoplasmático (RS) perde esta capacidade. Desta forma, é provável que em valores de pH menores que 6,0, o efeito do Encolhimento pelo Frio tenha se agravado, devido à liberação do cálcio do RS, acarretando em uma maior contração muscular. Este comportamento é condizente com a mudança na

tensão isométrica, em que se observa um aumento constante a partir de 18 horas (Figura 1), e reforça a hipótese do encurtamento ser oriundo do fenômeno de Encolhimento pelo Frio.

Um ponto intrigante é que a tensão isométrica máxima ocorre próximo das 21 horas e, a partir daí, se observa uma queda constante até atingir valores de tensão iguais aos do início da fase rápida (Figura 4.2), o que ocorre cerca de 26 horas *post-mortem*. No entanto, o comprimento médio do sarcômero continua a reduzir após este período. Uma vez que os dados de comprimento de sarcômero apresentaram uma grande variação, é provável que esta discrepância com os dados de tensão isométrica seja oriunda do fato de que nem todas as fibras musculares encurtam durante o Encolhimento pelo Frio (BENDALL, 1973; GREASER, 1986; LAWRIE, 1998).

Para os músculos de animais insensibilizados por eletronarcose e não-estimulados (tratamento ENE) o comprimento médio do sarcômero aumentou nas primeiras 6 horas *post-mortem* até valores próximos de 2,30 μm , e reduziu lentamente no período seguinte, mas não apresentou queda sensível como observadas para as amostras de animais insensibilizados por eletronarcose e estimuladas (EES). Já para os animais insensibilizados por termonarcose, estimulados (TES) ou não (TNS), o aumento do comprimento médio do sarcômero foi contínuo desde o tempo zero até 24 horas pós-abate, quando parece ter atingido um valor constante. Este comportamento corrobora a hipótese de menor taxa metabólica nos músculos tratados por termonarcose. Vale ressaltar que, embora exista uma diferença entre estes três tratamentos (ENE, TNE e TES) quanto ao encurtamento *post-mortem*, as médias não apresentam diferença significativa ($P > 0,05$) na maioria dos tempos avaliados.

Qualidade da Carne

A Tabela 4.2 compara os atributos de qualidade obtidos a partir de rãs submetidas a diferentes formas de insensibilização e aplicação da estimulação elétrica. De todos os atributos avaliados apenas o pH_{24} apresentou interação significativa ($P < 0,05$) entre a insensibilização e a estimulação elétrica.

O índice de luminosidade (L^*) foi afetado ($P < 0,05$) pelo tipo de insensibilização aplicada, com as carnes de rãs insensibilizadas por eletronarcose apresentando-se mais pálidas/claras (maiores valores de L^*) que aquelas provenientes de animais insensibilizados por termonarcose.

A aplicação de estimulação elétrica afetou ($P < 0,05$) as formas químicas dos pigmentos, o índice de vermelho (a^*) e a tonalidade (h^*) das carnes de rãs, com rãs

estimuladas apresentando carnes com coloração mais avermelhada, conforme indicado pelos maiores valores de **a*** e menores valores de **h***.

Tabela 4.2. Valores médios (\pm desvio padrão) dos índices de cor, proporções relativas dos pigmentos heme¹, maciez objetiva², pH e comprimento do sarcômero da carne de rã-touro após 24 horas a $6 \pm 2^\circ\text{C}$

Índices	Termo	Eleto	Sign.	Controle	Estimulado	Sign.
Luminosidade (L*)	55,70 \pm 0,52	58,47 \pm 0 11	*	57,23 \pm 1,64	56,94 \pm 2,27	<i>ns</i>
Índice de vermelho (a*)	3,73 \pm 0,09	3,30 \pm 0,95	<i>ns</i>	3,15 \pm 0,73	3,89 \pm 0,13	*
Índice de amarelo (b*)	3,38 \pm 1,37	3,75 \pm 0,36	<i>ns</i>	3,92 \pm 0,61	3,21 \pm 1,13	<i>ns</i>
Saturação (C*)	5,25 \pm 0,84	5,07 \pm 0,91	<i>ns</i>	5,13 \pm 1,00	5,18 \pm 0,75	<i>ns</i>
Tonalidade (h*)	39,77 \pm 11,0	47,30 \pm 4,27	<i>ns</i>	48,95 \pm 1,95	38,13 \pm 8,71	*
Mb ⁺ (%)	10,12 \pm 6,86	6,66 \pm 7,52	<i>ns</i>	5,20 \pm 5,99	11,58 \pm 7,23	*
O ₂ Mb (%)	57,20 \pm 5,82	60,40 \pm 6,23	<i>ns</i>	61,44 \pm 4,70	56,16 \pm 6,41	*
MMb (%)	32,68 \pm 1,28	32,94 \pm 1,52	<i>ns</i>	33,36 \pm 1,51	32,26 \pm 1,03	*
Maciez (kg)	0,99 \pm 0,18	1,42 \pm 0,36	*	1,01 \pm 0,21	1,39 \pm 0,40	*
Maciez (g/cm ²)	0,54 \pm 0,12	0,79 \pm 0,22	*	0,55 \pm 0,13	0,79 \pm 0 23	*
Comp. Sarcômero (μm)	2,24 \pm 0,02	2,28 \pm 0,10	<i>ns</i>	2,22 \pm 0,01	2,30 \pm 0,07	<i>ns</i>

	Termonarcose			Eletronarcose		
	Controle (TNE)	Estimulado (TES)	Sign.	Controle (ENE)	Estimulado (EES)	Sign.
pH ₂₄	6,79 \pm 0,09	6,72 \pm 0,09	<i>ns</i>	6,72 \pm 0,08	6,00 \pm 0,11	*

* Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade

ns Não-significativo, pelo teste F a 5% de probabilidade

¹As proporções relativas dos pigmentos heme referem-se às formas químicas da mioglobina e hemoglobina, mas serão descritas como: oximioglobina (O₂Mb), mioglobina reduzida (Mb⁺) e metamioglobina (MMb).

²Força de cisalhamento (Kg), obtida com lâmina Warner Bratzler, de amostras cozidas a uma temperatura interna de 72°C. Quando expressa em g/cm², refere-se à força de cisalhamento por área de seção transversal, estimada pelo maior diâmetro muscular medido e considerando o músculo como um cilindro.

À exceção da diferença verificada para luminosidade (**L***), a ausência de efeito ($P > 0,05$) do tipo de insensibilização quanto às formas químicas dos pigmentos e quanto aos índices de cor também foi anteriormente evidenciada (RAMOS et al.,2004). A diferença na luminosidade entre carnes de rãs insensibilizadas por eletronarcose e termonarcose pode ser atribuída à diferença do tempo de avaliação dos índices de cor, uma vez que no presente experimento a luminosidade foi avaliada após 24 horas enquanto que no trabalho anterior (RAMOS et al., 2004) a luminosidade foi avaliada logo após o abate. Embora MOURA (2000) tenha reportado maior ($P < 0,05$) luminosidade (**L**, Hunter Lab) em rãs

insensibilizadas por termonarcole, este observou que a diferença de luminosidade se torna mais proeminente e significativa com o tempo pós-abate. Isto também se justifica pelo fato de diversos autores (JOO et al., 1995; PIETRZAK et al., 1997; BOULIANNE e KING, 1998; ABRIL et al., 2001; BENEVENUTO JUNIOR, 2001; BREWER, 2001) terem demonstrado que a luminosidade se correlaciona negativa e significativamente com pH avaliado após 24 horas do abate e não com pH avaliado nos tempos iniciais pós-abate.

Entretanto, nos dados obtidos neste experimento, não se observou correlações significativas ($P > 0,05$) entre L^* e pH_{24} quando os dados dos tratamentos são analisados agrupados. Apenas para o tratamento EES foi observado uma correlação significativa ($r = 0,80$, $n = 7$; $P < 0,05$) entre pH_{24} e L^* . Isto, no entanto, está em consonância com a observação de que quando o pH é superior a 6,1-6,0, a sua correlação com índices de cor não é tão forte (RÜBENSAM, 2000; WARRISS e BROWN, 1987), uma vez que o único tratamento em que tal pH foi alcançado é justamente o tratamento EES. Ainda assim, a correlação positiva entre L^* e pH_{24} não pode ser explicada.

Outros trabalhos também não observaram efeito da estimulação elétrica sobre o índice de luminosidade, ou encontraram relação inversa. MAKI e FRONING (1987) reportaram que a estimulação elétrica não surtiu efeito sobre a luminosidade de músculos de peito de peru desossados 24 horas *post-mortem*, também observado por OWENS e SAMS (1997). Já FRONING e UIJTENBOOGART (1988) verificaram menores valores de L^* em filés de peito de frango estimulados eletricamente do que naqueles não estimulados. CRAIG et al. (1999) também observaram uma redução nos valores de L^* em amostras de peito de frango submetidas à eletronarcole, quando comparadas com o controle (animais não insensibilizados), e quando do uso da estimulação elétrica, não havendo diferenças significativas entre os valores de pH dos tratamentos.

Os maiores valores dos índices de vermelho (a^*) observados nos músculos de rãs estimuladas ($P < 0,05$) estão em consonância com os resultados reportados para músculos de peitos de perus (MAKI e FRONING, 1987) e frangos (FRONING e UIJTENBOOGART, 1988; CRAIG et al., 1999) em que foi aplicada a estimulação elétrica. No entanto, mesmo para rãs não estimuladas, os valores de a^* são bem maiores do que os reportados por RAMOS et al. (2004). MOURA (2000) relata uma dependência do índice de vermelho com o tempo de estocagem pós-abate, embora este autor tenha observado uma redução com tempo.

A insensibilização não afetou significativamente ($P > 0,05$) os valores de índice de amarelo (b^*) e saturação (C^*), o que está de acordo com o reportado por RAMOS et al. (2004). Também não houve efeito significativo ($P > 0,05$) da aplicação da estimulação elétrica nestes índices, mas os valores de b^* encontrados estão próximos dos valores de a^* , o

que reforça a importante participação do índice de amarelo na avaliação da cor da carne obtida de rãs-touro.

Conforme esperado, com o aumento dos valores de a^* e manutenção dos valores de b^* para amostras estimuladas, o ângulo de tonalidade (h^*) foi menor para amostras tratadas por estimulação elétrica. Por outro lado, as mudanças no valor a^* não foram suficientes para alterar a saturação (C^*) das amostras analisadas. As diferenças observadas nos valores médios dos índices a^* e b^* , quando comparados com os resultados reportados por RAMOS et al. (2004), provavelmente se devem à diferença de tempo *post-mortem* (24 horas) em que as amostras foram analisadas.

Nenhuma correlação significativa ($P > 0,05$) foi observada entre o índice de vermelho (a^*) e os conteúdos relativos dos pigmentos heme na carne de rã-touro, tanto para os dados analisados agrupados quanto para os tratamentos individuais. No entanto, o aumento nos valores de a^* para amostras estimuladas e concomitante aumento na forma relativa de mioglobina reduzida (Mb^+) e redução na forma química de oximioglobina (O_2Mb), estão de acordo com resultados reportados por RAMOS et al. (2004), onde os valores de a^* apresentaram correlação negativa com o teor de O_2Mb e alta correlação positiva com o teor de Mb^+ . As mudanças observadas nas formas relativas da mioglobina, presentes na superfície da carne, também indicam o favorecimento da redução da O_2Mb à Mb^+ na superfície das coxas analisadas, em detrimento à forma relativa de metamioglobina (MMb), pela aplicação da estimulação elétrica.

Já para o índice de amarelo (b^*), foram observadas correlações significativas ($P < 0,05$) com os diferentes estados relativos dos pigmentos heme em todos os dados analisados, sejam agrupados ou para cada tratamento individual. Os valores de b^* apresentaram elevada correlação positiva com o conteúdo relativo de metamioglobina (MMb) e oximioglobina (O_2Mb), e elevada correlação negativa com o conteúdo de Mb^+ . Exceto pela correlação significativa com a Mb^+ , estes resultados estão em consonância com os reportados por RAMOS et al. (2004).

As mudanças observadas nos índices a^* com a aplicação da estimulação elétrica e a ausência de mudanças no índice b^* , favoreceram a reflexão da luz na região do vermelho. Isto é especialmente perceptível ao observarmos a redução ($P < 0,05$) no ângulo de tonalidade (h^*) quando da aplicação da estimulação elétrica (Tabela 4.2) e está de acordo com a observação de que músculos de bovinos submetidos à estimulação elétrica apresentam melhora na coloração vermelha brilhante, tornando-se mais clara e atrativa (STIFFLER et al., 1982; SMITH, 1985; EIKELNBOOM et al., 1985). Acredita-se que as reações *post-mortem* são necessárias para se alcançar uma cor desejável no músculo e, desta forma, ao acelerar a

glicólise, a estimulação elétrica simplesmente faz com que a cor da carne esteja mais próxima do que estaria no final do processo (STIFFLER et al., 1982; SMITH, 1985). Isto explica as diferenças observadas nas correlações entre os índices a^* e b^* e a proporção dos pigmentos relativos da mioglobina daqueles reportados por RAMOS et al. (2004), sendo, portanto, oriundas do período *post-mortem*.

Outrossim, RAMOS et al. (2004) postularam que a luminosidade, o índice de vermelho e o índice de amarelo são os principais indicadores dos teores relativos de O_2Mb , Mb^+ e MMb , respectivamente. Entretanto, após 24 horas *post-mortem*, os índices de vermelho não se correlacionam com nenhuma destas formas químicas. Embora a luminosidade continue apresentando elevada correlação com a O_2Mb , o índice de amarelo se apresenta como principal indicador de todas as formas relativas da mioglobina em músculos de rãs-touro avaliado 24 horas pós-abate, uma vez que apresenta uma elevada correlação positiva com a O_2Mb e MMb , e uma elevada correlação negativa com a Mb^+ .

A carne de rã-touro se apresentou com uma tonalidade rosada-cremosa, que muitas vezes é considerada equivalente ao branco-cremoso indicado pelo CODEX ALIMENTARIUS (1984) como característica da carne de rãs. De forma geral, a qualidade baseada na cor objetiva da carne de rã-touro foi favorecida pela aplicação da estimulação elétrica, tornando-a mais clara e de cor mais uniforme (Figura 4.5). Ao induzir a redução da O_2Mb à Mb^+ na superfície das coxas analisadas, a estimulação elétrica favoreceu a cor rosada-cremosa devido à maior participação do pigmento de Mb^+ , de cor vermelho-púrpura, e menor participação dos pigmentos O_2Mb e MMb , de cor vermelho-cereja e marrom, respectivamente.

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) na maciez objetiva dos músculos de rã-touro devido à insensibilização. Isto está de acordo com os resultados reportados por MOURA (2000), que observou maiores valores de força de cisalhamento, 24 horas pós-abate, em rãs insensibilizadas por eletronarcose (3,70 kg), quando comparada com aquelas submetidas à termonarcose (2,62 kg). O autor, no entanto, não pode estabelecer a natureza desta diferença, mas nossos resultados parecem indicar que as carnes de animais insensibilizados por eletronarcose se apresentam mais duras 24 horas pós-abate provavelmente devido a uma maior tensão muscular a que se encontra o músculo, tensão esta alcançada pela redução do tempo para o desenvolvimento do rigor (Figura 4.2.). Neste período de tempo, a tensão isométrica ainda não começou a se desenvolver nos músculos de rãs insensibilizadas por termonarcose.

Os dados de força de cisalhamento reportados por MOURA (2000) apontam, ainda, valores bem maiores do que o observado neste experimento. As diferenças observadas nos valores absolutos entre os resultados reportados por este auto e aqueles observados neste

experimento, são oriundas de variações referentes à metodologia de análise, especialmente a forma de cozimento, diâmetro dos músculos e velocidade de cisalhamento utilizada. Segundo WHELLER et al. (1997) e HONIKEL (1998), a execução de um protocolo padronizado é imperativo para se obter medidas de força de cisalhamento acuradas e com repetibilidade, sendo que pequenas diferenças inviabilizam o uso de valores absolutos para comparações e definições de padrões de maciez da carne.

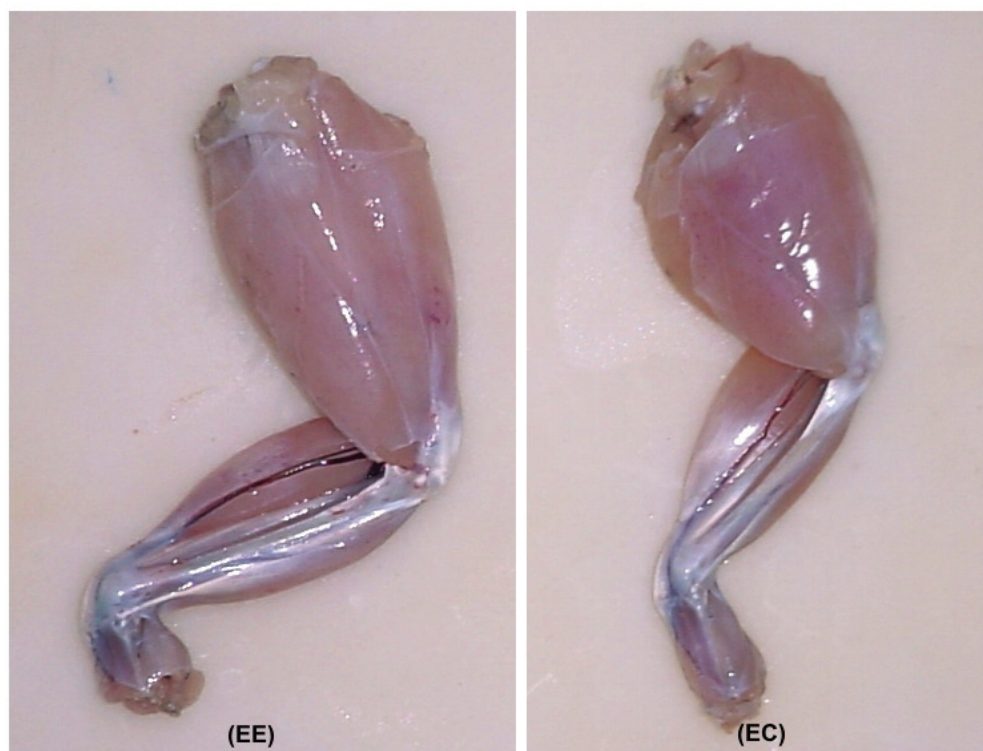


Figura 4.5. Coloração de coxas de rãs-touro estimuladas (EE) e não-estimuladas (EC) 24 horas (mantidas a 9°C) após insensibilização por eletronarcose.

Rãs estimuladas eletricamente forneceram carnes com menor maciez (maior força de cisalhamento; $P < 0,05$) do que as carnes de rãs que não sofreram a etapa estimulação elétrica. Esta maior dureza em carnes de rãs estimuladas está de acordo com o baixo valor de pH_{24} ($P < 0,05$) evidenciado nos músculos de rãs insensibilizadas por eletronarcose e estimuladas eletricamente (tratamento EES). Segundo FLETCHER (1999) e van LAACK (2001), elevados valores de pH_u (geralmente medidos 24 horas *post-mortem*) estão positivamente associados com várias características desejáveis, incluindo baixa perda por gotejamento, cor mais escura (até um determinado limite) e maior firmeza e maciez. No entanto, o pH_{24} não apresentou correlação significativa ($P > 0,05$) com a força de cisalhamento nem com o comprimento do sarcômero, sendo que este último não diferiu ($P > 0,05$), no tempo de 24 horas, para os diferentes tratamentos.

O grau de contração muscular pode ser medido pelo comprimento do sarcômero e tem relação com a maciez oriunda do componente miofibrilar, mas a implicação de que sarcômeros maiores geram carnes mais macias ainda não está claramente definida (JANZ et al., 2001; SØRHEIM e HILDRUM, 2002). Em músculos de ovinos, BOUTON et al. (1973b) observaram maior tamanho no comprimento do sarcômero e menor força de cisalhamento nos músculos *longissimus*, *semimembranosus*, *gluteus medius* e *biceps femoris*, mas, embora os músculos *semitendinosus* apresentassem sarcômeros maiores, estes não eram mais macios. OWENS e SAMS (1997) reportaram que músculos do peito de perus submetidos ao processo de estimulação elétrica e desossados 2 horas *post-mortem*, apresentavam sarcômeros maiores; entretanto, não foi observada diferença significativa na força de cisalhamento. SWARTZ et al. (1993), trabalhando com carne bovina, reportam que para comprimentos de sarcômero menores que 2,70 μm , a quantidade de actina e miosina ligadas é essencialmente a mesma. Para comprimentos de sarcômeros entre 1,8 e 3,0 μm , a força de cisalhamento é bastante similar (SWARTZ et al., 1993; WHEELER e KOOHMARAIE, 1999). De fato, vários autores (MÜLLER e VESTERGAARD, 1987; JOHNSON et al., 1990; SMULDERS et al., 1990; TAYLOR, 2003) têm questionado a validade do uso do comprimento do sarcômero como única forma de prever a maciez da carne, principalmente devido à baixa correlação que se tem observado entre a maciez medida pela força de cisalhamento e o tamanho do sarcômero (POLIDORI et al., 2000).

É provável que a explicação para a observação de diferentes forças de cisalhamento em músculos que o comprimento do sarcômero não difere dos demais tratamentos seja baseada nos resultados reportados por HAMM (1982 e 1986). Segundo este autor, o rigor induzido pelo frio (Encolhimento pelo Frio) não tem efeito significativo na perda de água (*drip loss*) muscular nas primeiras 24 horas, não havendo mudança significativa no volume muscular neste período. Após 24 horas, no entanto, o encolhimento ocorre e a perda de água aumenta com a contração muscular.

Embora a menor maciez objetiva observada nas carnes de animais em que se aplicou a estimulação elétrica pareça contradizer a efetividade desta etapa na melhoria da maciez, conforme citado por vários autores (CROSS, 1979; STIFFLER et al., 1982; CALKINS et al., 1980 e 1982; LOCKER, 1985; PEARSON e DUTSON, 1985), ela pode ser perfeitamente explicável. Da mesma forma que o observado na insensibilização por eletronarcose, a estimulação elétrica também contribuiu para a redução do tempo para o encurtamento muscular. Assim, as carnes de animais estimulados se apresentam mais firmes 24 horas pós-abate, provavelmente devido a uma maior tensão muscular neste período, como se pode observar pela Figura 4.2 para rãs insensibilizadas por eletronarcose (tratamento EES). Em

outras palavras, para rãs não estimuladas e insensibilizadas por termonarcolese e estimuladas (tratamento TES), a tensão isométrica ainda não começou a se desenvolver e, portanto, a carne se apresenta mais macia. Neste sentido, a qualidade da carne pode ser favorecida, uma vez que esta se apresenta mais firme (Figura 4.6), embora a percepção sensorial, especialmente a referente à maciez, não tenha sido avaliada neste experimento.

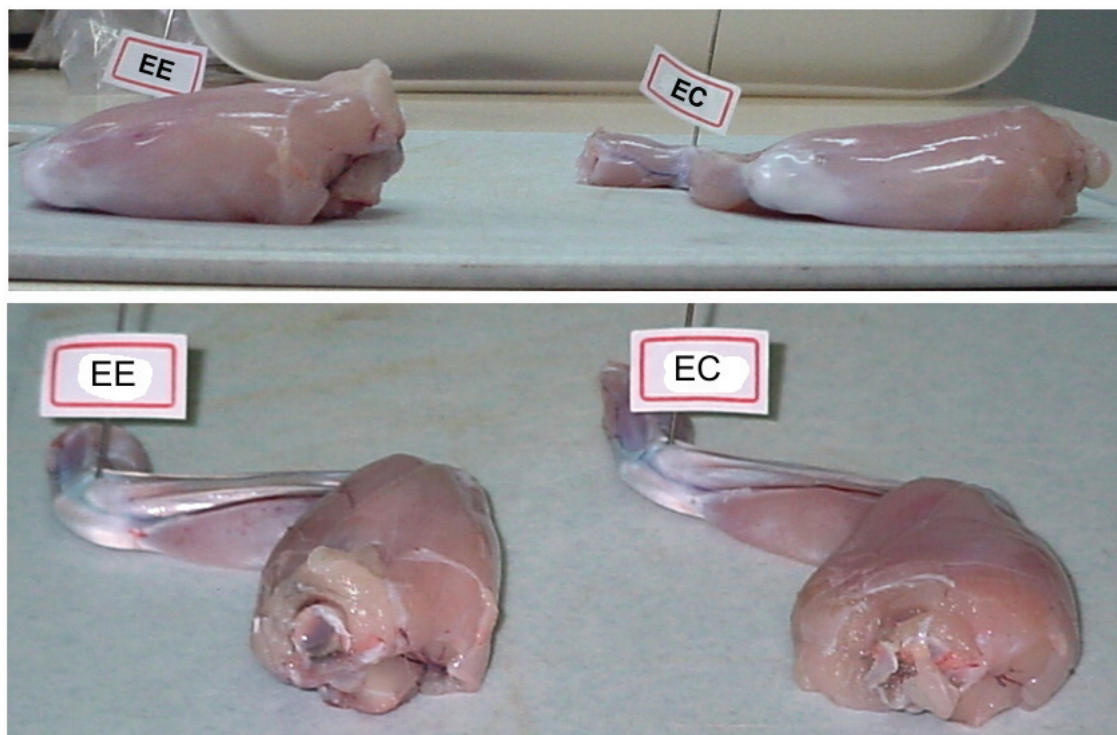


Figura 4.6. Diferença na firmeza de coxas de rãs-touro estimuladas (EE) e não-estimuladas (EC) 24 horas (mantidas a 9°C) após insensibilização por eletronarcolese.

Por fim, o pH_{24} apresentou interação significativa ($P < 0,05$) entre a insensibilização e a estimulação elétrica, sendo que apenas rãs insensibilizadas por eletronarcolese apresentaram um pH mais baixo ($P < 0,05$) 24 horas *post-mortem*. Isto está de acordo com as observações anteriores de que o metabolismo muscular *post-mortem* dos animais insensibilizados por termonarcolese parece não ter sido afetado pela aplicação da estimulação elétrica, como ocorreu com os animais insensibilizados por eletronarcolese.

CONCLUSÕES

A estimulação elétrica contribuiu para a redução no tempo para início do rigor em animais insensibilizados por eletronarcolese, mas, baseado no valor R e pH, surtiu pouco efeito

em animais insensibilizados por termonarcore. Constatou-se ainda que o rigor desenvolvido nas rãs se deve, provavelmente, ao fenômeno de encolhimento pelo frio.

A falta de resposta à estimulação elétrica de rãs insensibilizadas por termonarcore aponta para uma possível indicação do uso de altas voltagens para que a estimulação seja efetiva em animais insensibilizados por termonarcore.

A qualidade da carne 24 horas pós-abate foi afetada pela estimulação elétrica apenas em animais insensibilizados por eletronarcore. A aplicação da estimulação elétrica favoreceu a cor rosada-cremosa, devido à maior participação do pigmento de Mb⁺, de cor vermelho-púrpura, e menor participação dos pigmentos O₂Mb e MMb, de cor vermelho-cereja e marrom, respectivamente. Nos animais estimulados, a cor apresentou-se mais uniforme e numa tonalidade rósea mais associada com a especificada de qualidade da carne de rãs feita pelo CODEX ALIMENTARIUS.

Ambos os índices de vermelho (**a***) e de amarelo (**b***) têm participação representativa na avaliação da cor da carne de rãs-touro. A luminosidade (**L***), avaliada 24 horas *post-mortem*, apresentou elevada correlação positiva com a O₂Mb, mas o índice de amarelo se apresenta como principal indicador das formas relativas da mioglobina, por apresentar elevada correlação positiva com a MbO₂ e MMb, e elevada correlação negativa com a Mb⁺.

O tipo de insensibilização não afetou a maciez objetiva da carne de rã-touro, mas as rãs insensibilizadas por eletronarcore e estimuladas eletricamente apresentaram carnes menos flácidas e com maior força de cisalhamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERLE, E.D., FORREST, J.C., GERRARD, D.E., MILLS, E.W. **Principles of Meat Science**. 4 ed. New York: Kendall/Hunt Publishing Company, 2001. 354p.

ABRIL, M., CAMPO, M.M., ÖNENÇ, A., SAÑUDO, C., ALBERTÍ, P., NEGUERUELA, A.I. Beef colour evolution as a function of ultimate pH. **Meat Science**, v.58, p.69-78, 2001.

ALBINATI, F. L. **Avaliação de diferentes métodos de insensibilização e sangria de rãs**. Viçosa: UFV, 1994. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 1994.

AMSA Guidelines for Meat Color Evaluation. In: 44th ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE. American Meat Science Association. June 9-12, 1991, Manhattan. **Proceedings...** Manhattan: National Live Stock and Meat Board, p.232-249, 1991.

BENDALL, J.R. Post-Mortem Changes in Muscle. In: BOURNE, G.H. **The Structure and Function of Muscle**. 2 ed. New York: Academic Press, p.243-309, 1973a.

- BENEVENUTO JR., A.A., GOMIDE, L.A.M., LOPES, P.S., GUIMARÃES, S.E.F., PIRES, A.V., NASCIMENTO, W.C.A. Avaliação da eficiência de alguns indicadores na avaliação da qualidade da carne suína. In: 1º CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, São Pedro, 22 a 25 de outubro de 2001. **Anais ...**, São Pedro, pp.199-200. 2001.
- BOULIANNE, M., KING, A.J. Meat Color and Biochemical Characteristics of Unacceptable Dark-colored Broiler Chicken Carcasses. **Journal of Food Science**, v.63, n.5, p.759-762, 1998.
- BOUTON, P.E., FISHER, A.L., HARRIS, P.V., BAXTER, R.I. A Comparison of the Effects of Some Post-Slaughter Treatments on the Tenderness of Beef. **Journal of Food Technology**, v.8, p.39-49. 1973a.
- BOUTON, P.E., HARRIS, P.V., SHORTHOSE, W.R., BAXTER, R.I. A comparison of the effects of ageing, conditioning and skeletal restraint on the tenderness of mutton. **Journal of Food Science**, v.38, p.932-937, 1973b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria da Defesa Agropecuária (SDA). Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). Divisão de Normas Técnicas. Aprova o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). **Decreto no. 30.691, de 29 de março de 1952**, alterado pelos Decretos no.s 1.255 de 25-06-1962, 1.236 de 02-09-1994, no. 1.812 de 08-02-1996 e no. 2.244 de 04-06-1997. Brasília, 1997.
- BREWER, M. S., ZHU, L. G., BIDNER, B., MEISINGER, D. J., MCKEITH, F. K. Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. **Meat Science**. V.57, p.169-176, 2001.
- BUSCH, W.A., GOLL, D.E., PARRISH JR., F.C. Molecular Properties of Postmortem Muscle. Isometric Tension Development and Decline in Bovine, Porcine and Rabbit Muscle. **Journal of Food Science**, v.37, p.289-299, 1972.
- CALKINS, C.R., DUTSON, T.R., SMITH, G.C., CARPENTER, Z.L. Concentration of creatine phosphate, adenine nucleotides and their derivatives in electrically stimulated and nonstimulated beef muscle. **Journal of Food Science**, v.47, p.1350, 1982
- CALKINS, C.R., SAVELL, J.W., SMITH, G.C., MURPHEY, C.E. Quality-indicating characteristics of beef muscle as affected by electrical stimulation and postmortem chilling time. **Journal of Food Science**, v.45, p.1330, 1980.
- CODEX ALIMENTARIUS. Recommended international code of hygienic practice for the processing of frog legs. Rome, FAO, **Codex Alimentarius Commission**, 1984. v.c.
- CHRYSTALL, B.B., DEVINE, C.E. Electrical Stimulation: Its Early Development in New Zealand. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R., (Eds.) **Advances in Meat Research**, v.1 (Electrical Stimulation), New York: Blackie Academic & Professional, p.73-120, 1985.
- 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, 1979.
- EIKELENBOOM, G., SMULDERS, F.J.M., RUDERUS, H. The effect of high and low electrical stimulation on beef quality. **Meat Science**, v.15, p.247-254, 1985.

- FIGUEIREDO, M. R. C. **Influência dos fatores ambientais sobre o desempenho da rã-touro (*Rana catesbiana*, Shaw 1802)**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 151p. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa. 1996.
- FLECHER, D.L. Poultry Meat Colour. In: RICHARDSON, R.I., MEAD, G.C. (eds) **Poultry Meat Science**. (Poultry Science Symposium Series, v.25) England: CABI Publishing, p.159-175, 1999.
- FRONING, G.W., UIJTENBOOGART, T.G. Effect of postmortem electrical stimulation on color, texture, pH, and cooking losses of hot and cold deboned chicken broiler breast meat. **Poultry Science**, v.67, p.1536-1544, 1988.
- CRAIG, E.W., FLETCHER, D.L., PAPINAHU, P.A. The Effects of Antemortem Electrical Stunning and Postmortem Electrical Stimulation on Biochemical and Textural Properties of Broiler Breast Meat. **Poultry Science**, v.78, p.490-494, 1999.
- GREASER, M.L. Conversion of Muscle to Meat. In: BECHTEL, P.J. **Muscle as food**. New York: Academic Press, p.37-102, 1986.
- HAMM, R. Post Mortem Changes in Muscle with Regard to Processing of Hot-Boned Beef. **Food Technology**, v.36, n.11, p.105-115, 1982.
- HAMM, R. Functional Properties of the Myofibrillar System and Their Measurements. In: BECHTEL, P.J. **Muscle as food**. New York: Academic Press, p.37-102, 1986.
- HEINEMANN, R.J.B., PINTO, M.F., PONSANO, E.H.G., PERRI, S.H.V. Método Simples para Estimar Encurtamento pelo Frio em Carne Bovina. **Ciência Rural**, v.32, n.2, p.335-339, 2002.
- HERTZMAN, C., OLSSON, U., TORNBERG, E. The Influence of High Temperature, Type of Muscle and Electrical Stimulation on the Course of Rigor, Ageing and Tenderness of Beef Muscle, **Meat Science**, v.35, p.119-141, 1993.
- HONIKEL, K.O. Reference Methods for the Assessment of Physical Characteristics of Meat. **Meat Science**, v.49, n.4, p.447-457, 1998.
- HONIKEL, K.O., FISCHER, C. A rapid method for the detection of PSE and DFD porcine muscle. **Journal of Food Science**, v.42, n.6, p.1633-1636, 1977.
- HONIKEL, K.O., RONCALES, P., HAMM, R. The Influence of Temperature on Shortening and Rigor Onset in Beef Muscle. **Meat Science**, v.8, n.3, p.221-241, 1983.
- HUFF-LONERGAN, E. The Role of Carcass Chilling in the Development of Pork Quality. **Facts (Pork Quality)**. National Pork Producers Council & American Meat Science Association, 2001. 8p.
- JAMES, S.J., JAMES, C. **Meat Refrigeration**. New York: CRC Press, 2002. 347p.
- JANZ, J.A.M., AALHUS, J.L., PRICE, M.A. Blast chilling and low voltage electrical stimulation influences on bison (*Bison bison bison*) meat quality. **Meat Science**, v.57, p.403-411, 2001.

- JERRET, A.R., HOLLAND, A.J. Rigor Tension Development in Excised “Rested”, “Partially Exercised” and “Exhausted” Chinook Salmon White Muscle. **Journal of Food Science**, v63, n.1, p.48-52, 1998.
- JERRET, A.R., HOLLAND, A.J., CLEAVER, S.E. Rigor Contractions in “Rested” and “Partially Exercised” Chinook Salmon White Muscle as Affected by Temperature. **Journal of Food Science**, v63, n.1, p.53-56, 1998.
- JOO, S -T., KAUFFMAN. R. G., KIM, B - C., KIM, C – J. The relationship between color and water-holding capacity in postrigor porcine longissimus muscle. **Journal of Muscle Foods**, v. 6, p. 211-226, 1995.
- JOO, S.T., KAUFFMANN, R.G., KIM, B.C., PARK, G.B. The relationship of sarcoplasmic and myofibrillar protein solubility to colour and water-holding capacity in porcine *longissimus* muscle. **Meat Science**, v.52, p.291-297, 1999.
- JOHNSON, M.H., CALKINS, C.R., HUFFMAN, R.D., JOHNSON, D.D., HARGROVE, D.D. Differences in cathepsin B+L and calcium-dependent protease activities among breed type and their relationship to beef tenderness. **Journal of Animal Science**, v.68, p.2371-2379, 1990.
- KRZYWICKI, K. Assessment of Relative Content of Myoglobin, Oxymyoglobin and Metmyoglobin at the Surface of Beef. **Meat Science**, v.3, p.1-10, 1979.
- LAWRIE, R.A. **Lawrie’s Meat Science**. 6 ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 1998. 336p.
- LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. **A criação de rãs**. Rio de Janeiro: Globo, 1988. 187p.
- LIMA, S.L., CRUZ, T.A., MOURA, O.N. **Ranicultura: análise da cadeia produtiva**. Viçosa: Folha de Viçosa. 1999. 172p.
- LOAIZA, J.F.U. **Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de carne de rã (*Rana catesbeiana*) estocada sob refrigeração e congelamento**. Viçosa: UFV, 1996. 125p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- LOCKER, R.H. Degree of Muscular Contraction as a Factor in Tenderness of Beef. **Food Research**, v.25, n.2, p.304-307, 1960.
- LOCKER, R.H. Cold-induced Toughness of Meat. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (eds.) **Advances in Meat Research**. v.1 (Electrical Stimulation). New York: AVI Books, p.1-44, 1985.
- MAKI, A., FRONING, G.W. Effect of post-mortem electrical stimulation on quality of turkey meat. **Poultry Science**, v.66, p.1155-1157, 1987.
- MARIBO, H., ERTBJERG, P., ANDERSSON, M., BARTON, G.P., MOLLER, A.J. Electrical stimulation of pigs - effect on pH fall, meat quality and cathepsin B+L activity. **Meat Science**, v.52, p.179-187, 1999.
- MOURA, F.F., GOMIDE, L.A.M., RAMOS, E.M. Efeito do Jejum Pré-Abate Sobre a Qualidade da Carne de Rã-Touro (*Rana catesbeiana*). In. I CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 2001, São Pedro, SP, **Anais...**, p.114-115, 2001.

- MOURA, O.M. **Efeito de métodos de insensibilização e sangria sobre características de qualidade da carne de rã-touro e, perfil das indústrias de abate.** Viçosa: UFV, 2000. 205p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- MÜLLER, A.J., VESTERGAARD, T. Effect of delay time before chilling on toughness in pork with high or low initial pH. **Meat Science**, v.19, p.27-37, 1987.
- OWENS, C.M., SAMS, A.R. Muscle Metabolism and Meat Quality of Pectoralis from Turkeys Treated with Postmortem Electrical Stimulation. **Poultry Science**, v.76, p.1047-1051, 1997.
- PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. Scientific Basis for Electrical Stimulation. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (Eds.). **Advances in Meat Research**, v.1 (Electrical Stimulation) New York: Elsevier Applied Science, p.185-218, 1985.
- PIETRZAK, M., GREASER, M.L., SOSNICKI, A.A. Effect of Rapid Rigor Mortis Processes on Protein Functionality in *Pectoralis Major* Muscle of Domestic Turkeys. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2106-2116, 1997.
- POLIDORI, P., TRABALZA MARINUCCI, M., FANTUZ, F., RENIERI, C., POLIDORI, F. Tenderization of wether lambs meat through pre-rigor infusion of calcium ions. **Meat Science**, v.55, p.197-200, 2000.
- RAMOS, E.M., GOMIDE, L.A.M., FONTES, P.R., RAMOS, A.L.S., PETERNELLI, L.A. Meat Color Evaluation and Pigment Levels in Bullfrog (*Rana catesbeiana*) Slaughtered by Different Methods. **Aquaculture** (no prelo). 2004.
- ROSENVOLD, K., ANDERSEN, H.J. Factors of significance for pork quality - a review. **Meat Science**, v.64, p.219-237, 2003.
- RUBENSAM, J. M. Transformações post mortem e qualidade da carne suína. In: I CONFERÊNCIA VIRTUAL INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA. 16 de Novembro a 16 de dezembro de 2000 - **Via Internet**. Disponível em: <[Http://www.cnpsa.embrapa.br.html](http://www.cnpsa.embrapa.br.html)>. Acessado em: 26 de junho de 2001.
- SAMS, A.R. Commercial Implementation of Postmortem Electrical Stimulation. **Poultry Science**, v.78, p.290-294, 1999.
- SMITH, G.C. Effects of Electrical Stimulation on Meat Quality, Color, Grade, Heat Ring and Palatability. In: PEARSON, A.M., DUTSON, T.R. (Eds.). **Advances in Meat Research**, v.1 (Electrical Stimulation) New York: Elsevier Applied Science, p.121-158, 1985.
- SMULDERS, F.J.M., MARSH, B.B., SWARTZ, D.R., RUSSELL, R.L., HOENECKE, M.E. Beef tenderness and sarcomere length. **Meat Science**, v.28, p.349-363, 1990.
- SQUIRE, J. **The Structural Basis of Muscular Contraction**. New York: Plenum Press, 1981. 698p.
- SWARTZ, D.R., GREASER, M.L., MARSH, B.B. Structural studies of rigor bovine myofibrils using fluorescence microscopy. II. Influence of sarcomere length on the binding of myosin subfragment-1, α -actinin and G-actin to rigor myofibrils. **Meat Science**, v.33, p.157-190. 1993.

- SØRHEIM, O., HILDRUM, K.I. Muscle stretching techniques for improving meat tenderness. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.127-135, 2002.
- STIFFLER, D.M., SAVELL, J.W., SMITH, G.C., DUTSON, T.R., CARPENTER, Z.L. Electrical Stimulation: Purpose, Application and Results. **Texas Agricultural Extension Service Bulletin (B-1375)**, 1982. 10p.
- STOREY, K.B., STOREY, J.M. Freeze tolerant frogs: cryoprotectants and tissue metabolism during freeze-thaw cycles. **Canadian Journal of Zoology**, v.64, p.49-56, 1986.
- TAYLOR, R.G. Meat Tenderness: Theory and Practice. **Brazilian Journal of Animal Science**, Special Issue (49th ICoMST), p.56-66, 2003.
- van LAACK, R.L.J.M., STEVENS, S.G., STALDER, K.J. The influence of ultimate pH and intramuscular fat content on pork tenderness and tenderization. **Journal of Animal Science**, v.79, p.392-397, 2001.
- WARRIS, P. D., BROWN, S. N. The relationships between initial pH, reflectance and exudation in pigs muscle. **Meat Science**. , v.20, p.65-74, 1987.
- WHEELER, T.L., KOOHMARAIE, M. A. The extent of proteolysis is independent of sarcomere length in lamb *longissimus* and *psoas* muscle. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2444-2451, 1999.
- WHEELER, T.L., SHACKELFORD, S.D., JOHNSON, L.P., MILLER, M.F., MILLER, R.K., KOOHMARAIE, M. A Comparison of Warner-Bratzler Shear Force Assessment Within and Among Institutions. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2423-2432, 1997.
- WHITING, R.C. Calcium uptake by bovine muscle mitochondria and sarcoplasmic reticulum. **Journal of Food Science**, v.45, p. 288-292, 1980.

Efeito do Método de Insensibilização na Diferenciação de Carnes Frescas e Descongeladas de Rã-Touro Baseado na Atividade da β -Hidroxiacil-CoA-Desidrogenase

Eduardo M. RAMOS¹, Lúcio A.M. GOMIDE^{1,*}, Alcinéia L.S. RAMOS¹, Luiz Alexandre PETERNELLI²

Publicado (Apêndice B): Effect of stunning methods on the differentiation of frozen-thawed bullfrog meat based on the assay of β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase. **Food Chemistry**, v.87, n.4, p.607-611, 2004.

¹ Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa (UFV). Av. PH Rolfs, s/n, Campus Universitário. CEP: 36571-000, Viçosa – MG, Brazil.

² Departamento de Informática, Setor de Estatística, DPI/UFV

* Tel: 55 (31) 3899-1754; Fax: 55 (31) 3899-2208; E-mail: lagomide@ufv.br

RESUMO

Investigou-se a atividade da β -Hidroxiacil-CoA-Desidrogenase (HADH), extraída pelo método de imersão em tampão fosfato, de músculos *gastrocnemius* de rã-touro, frescos e descongelados, mantidos sob gelo picado. Avaliou-se, também, o efeito do método de insensibilização e do tempo de estocagem congelada (-18°C) sobre a atividade da HADH. O método de insensibilização e o tempo de manutenção sob gelo picado não afetaram significativamente ($P > 0,05$) a atividade da HADH. Entretanto, os valores de HADH aumentaram ($P < 0,05$) com o tempo de estocagem congelada avaliado (90 dias). Foi, no entanto, possível estabelecer valores de HADH limites, que permitam diferenciar amostras frescas das descongeladas. Carnes de rã-touro com valores de HADH menores que 65 podem ser classificadas como frescas e aquelas com valores maiores que 69 como descongeladas. As carnes que apresentarem valores de HADH entre 65 e 69 são consideradas incertas. Usando estes limites foi possível distinguir carnes de rã-touro frescas das descongeladas com um elevado nível de acerto (96,5%).

Palavras-Chave: Insensibilização; armazenamento; diferenciação; carne de rã fresca; carne de rã congelada.

INTRODUÇÃO

A carne de rã não apreciada apenas pelo seu sabor e textura requintado, mas também por ser citada como fonte de proteína de boa qualidade e de alto valor biológico (VIEIRA, 1993). Embora no Brasil se comercialize carcaças inteiras, no mercado internacional a carne de rã é tradicionalmente comercializada como coxas frescas ou congeladas, obtendo-se um maior preço pelas coxas frescas (PAVLOV et al., 1994; LIMA et al., 1999). Além disso, países como Estados Unidos, Canadá e França também importam animais vivos, devido à preferência de seus consumidores por carne fresca (LIMA et al., 1999).

De fato, mesmo na comercialização de carnes tradicionais, os consumidores preferem carnes resfriadas apesar de seu maior custo e vida-útil limitada. Por esta razão, é prática comum a venda de carne descongelada como fresca, especialmente as de aves e de pescados. Entretanto, esta prática é nociva para os consumidores uma vez que a carne descongelada é mais susceptível à contaminação e deterioração microbiana, devendo ser rapidamente consumida. Como as propriedades sensoriais da carne descongelada são similares à carne fresca, torna-se praticamente impossível ao consumidor distingui-las. Para combater este tipo de fraude, métodos rápidos, seguros e acurados que permitam diferenciar carnes frescas das descongeladas têm sido propostos, permitindo a fiscalização da carne comercializada.

GOTTESMANN e HAMM (1983) desenvolveram um método enzimático para diferenciar carne fresca das descongeladas avaliando a enzima β -Hydroxiacil-CoA-Desidrogenase (HADH, EC 1.1.1.35), liberada da mitocôndria para o sarcoplasma durante os processos de congelamento e descongelamento. Neste método, a enzima foi extraída por prensagem da carne entre duas placas de acrílico. A atividade da HADH após extração foi usada com sucesso na diferenciação de carnes descongeladas em animais de diferentes espécies (GOTTESMANN e HAMM, 1983; CHEN et al., 1988; TOLDRÁ et al., 1991; BILLINGTON et al., 1992). Entretanto, a extração por prensagem mostrou-se insatisfatória para o uso em músculo de pescados (GOTTESMANN e HAMM, 1983).

Mais recentemente, GARCIA DE FERNANDO et al. (1992) propuseram uma nova forma de extração da enzima HADH pela imersão das amostras de carne em solução tampão de fosfato, permitindo a diferenciação de carnes descongeladas das resfriadas em pescados. Esta nova metodologia de análise foi posteriormente avaliada por grupos de pesquisas e validada em pescados de diferentes espécies (HOZ et al., 1992; HOZ et al., 1993; PAVLOV

et al., 1994; FERNÁNDEZ et al., 1999). Além disso, o método de extração da HADH proposto por GARCIA de FERNANDO et al. (1992) é muito mais simples de ser conduzido e apresentou uma melhor diferenciação de carnes de rã (*Rana esculenta*) resfriadas das descongeladas (PAVLOV et al., 1994).

O Brasil é pioneiro na criação de rãs em cativeiro, tendo desenvolvido sistemas de criação em cativeiro, difundido, inclusive, esta tecnologia em países onde a produção de carne de rã era baseada unicamente no extrativismo (LIMA et al., 1999). Nosso grupo de pesquisa tem desenvolvido e avaliado técnicas específicas para o processo de abate de rãs.

Os métodos de insensibilização atualmente utilizados no abate comercial de rãs no Brasil podem ser divididos em dois grupos: por termonarcore, ou seja, por imersão em água gelada e, ou, soluções salinas concentradas; e por eletronarcore (LONGO, 1986; LIMA e AGOSTINHO, 1988; ALBINATI, 1994). A utilização de eletronarcore para o abate de rãs é mais recente (AYAPPAN PILLAI, 1986; ALBINATI, 1994) e tem mostrado ser mais adequado ao processo de abate do que os métodos de insensibilização tradicionais (ALBINATI, 1994). Entretanto, em levantamento realizado por LIMA et al. (1999) naquele ano, todos os abatedouros em operação no país aplicavam o processo de termonarcore, efetuada em tinas com água e gelo.

Das espécies de rã utilizadas na criação intensiva no Brasil, a que apresentou melhor capacidade de adaptação, precocidade, prolificidade e produtividade foi a rã-touro (*Rana catesbeiana*), o que a tornou a mais utilizada pela maioria dos ranicultores do País (LONGO, 1986; MELLO, 1995). Durante períodos de hibernação, a rã-touro e a rã-madeira (*Rana sylvatica*) podem produzir crioprotetores para garantir seu metabolismo energético, como observado pelo aumento na concentração de glicose sanguínea e do fígado nestes animais (STOREY e STOREY, 1984 e 1985; CONSTANZO e LEE, 1993; STEINER et al., 2000). Assim, no caso de uma possível estimulação da produção de crioprotetores pela insensibilização por termonarcore, é possível que a diferenciação de músculos descongelados, baseada na atividade da HADH, leve a uma interpretação equivocada da condição desta carne. Os animais submetidos à insensibilização por termonarcore podem gerar carnes que, quando congeladas e posteriormente descongeladas, apresentem atividade da enzima HADH similar tanto para a carne fresca como descongelada.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos dois principais métodos de insensibilização utilizados no abate de rãs sobre a atividade da HADH, extraída em tampão fosfato, a fim de verificar a validade de seu uso na diferenciação de carnes resfriadas das descongeladas de rã-touro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Abate

Foram utilizadas 136 rãs da espécie *Rana catesbeiana*, de peso vivo médio de 217 ± 41 gramas, obtidas no Ranário da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos em jejum hídrico de 24 horas (MOURA et al., 2001), divididos aleatoriamente em dois grupos, pesados e abatidos. Um grupo foi insensibilizado por termonarcolese, realizada pela imersão dos animais em água e gelo (1:1) por 15 minutos, e o outro por eletronarcolese (60 V, 60 Hz) durante sete segundos (ALBINATI, 1994). Em seguida, os animais foram sangrados pelo corte das veias cardíacas (ALBINATI, 1994) e suas carcaças evisceradas pelo método alternativo proposto por LOIAZA (1996). Imediatamente após o abate, os músculos *gastrocnemius* foram retirados, individualmente embalados em sacos plásticos e identificados.

Estocagem das Amostras

Para se avaliar o efeito do tempo de estocagem congelada sobre a atividade da HADH, 28 animais de cada grupo de insensibilização tiveram um dos músculos *gastrocnemius* congelados. Após estocagem congelada (-18°C) por dois, 30, 65 e 90 dias, as amostras foram descongeladas em geladeira (a 4°C) por cerca de 12 horas e a atividade da enzima HADH determinada. O efeito da estocagem em gelo picado foi avaliado nos 80 animais restantes. Um músculo *gastrocnemius* de cada animal foi separado, congelado a -18°C , estocado por dois dias à mesma temperatura e descongelado por cerca de 12 horas a 4°C antes de serem mantidos em gelo picado. O outro músculo *gastrocnemius* de cada animal foi diretamente estocado em gelo picado. A atividade da HADH das amostras foi avaliada, aleatoriamente, após zero, dois, quatro e seis dias de estocagem sob gelo picado.

Análise da Atividade da HADH

Cerca de dois gramas de amostra (*gastrocnemius*) foram transferidos para tubos de ensaio e imersos em dois volumes (cerca de 4 mL) de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0). Nenhum exsudado superficial foi intencionalmente removido ou incluído durante o corte e pesagem do músculo. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 25°C por 15 minutos e o extrato obtido, filtrado em papel de filtro Whatman No. 2. A atividade da enzima HADH foi avaliada segundo o método de GARCIA DE FERNANDO et al. (1992), com pequenas

modificações. Em uma cubeta de quartzo, misturou-se 34 µL de extrato, 70 µL de EDTA (34,4 mM) e 860 µL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0). A mistura foi mantida em temperatura ambiente por três minutos antes da adição de 40 µL de NADH (1,5 mM) e 20 µL de acetoacetil-CoA (5,9 mM). Imediatamente após a adição destes compostos, a absorvância a 340 nm foi medida a cada 30 segundos, durante um período de três minutos. O valor de HADH foi calculado multiplicando-se a inclinação da reta, obtida por regressão linear das leituras espectrofotométricas, pelo fator -10^4 .

Análise Estatística

Para a estocagem congelada (-18°C), os tratamentos foram dispostos em esquema de parcelas subdivididas, com o tipo de insensibilização (eletronarcole e termonarcole) na parcela e o tempo de armazenamento na subparcela. Para o efeito da estocagem em gelo picado, utilizou-se o esquema de parcelas sub-subdivididas, com o tipo de insensibilização (eletronarcole e termonarcole) na parcela, tratamento (fresca e descongelada) na subparcela e tempo de armazenamento na sub-subparcela. Ambas as análises foram feitas em um delineamento inteiramente casualizado. As análises de variância e de regressão foram conduzidas no programa SAS[®] System for Windows[™], versão 8.0 (SAS Institute Inc.), considerando um nível de significância de 5%.

O intervalo de 95% de confiança para a média foi usado para estabelecer os limites máximos e mínimos do valor de HADH que permitam distinguir as carnes frescas das descongeladas sob as condições do experimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de HADH dos músculos *gastrocnemius* de rã-touro não foram afetados ($P > 0,05$) pelo método de insensibilização, o que sugere que a termonarcole não induz a uma diferença significativa na quantidade de crioprotetores eventualmente produzidos neste músculo. Isto pode ser devido ao pequeno tempo (15 minutos) a que os animais são submetidos à baixa temperatura durante a insensibilização, comparado com o tempo em que as rãs sobrevivem no inverno. Neste caso, é provável que não tenha havido tempo hábil para induzir a um aumento nos níveis de glicose muscular, como observado no sangue e fígado de rãs (STOREY e STOREY, 1984 e 1985; CONSTANZO e LEE, 1993; STEINER et al., 2000). Embora no Capítulo 3 a concentração de glicose na carne de rãs abatidas por termonarcole tenha apresentado valores menores ($0,86 \mu\text{mol.g}^{-1}$) nos primeiros momentos pós-abate do que

em rãs abatidas pela eletronarcose ($1.33 \mu\text{mol.g}^{-1}$), é plausível considerar que não houve a produção de crioprotetores suficientes para evitar a liberação da HADH para o sarcoplasma.

Uma vez que a atividade da enzima HADH também não foi afetada ($P > 0,05$) pelo tempo de estocagem em gelo picado, as médias dos diferentes tempos e métodos de insensibilização foram analisadas em conjunto para se estabelecer limites superiores e inferiores de valores de HADH que permitam diferenciar a carne fresca da descongelada de rã-touro (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Valores de HADH (média \pm desvio-padrão) de carnes frescas e descongeladas de rã-touro, para diferentes métodos de insensibilização

Tratamento	Valor de HADH		
	Eletronarcose	Termonarcose	Média Geral
Fresca ^a	42,9 \pm 10,9 ^x	46,7 \pm 18,0 ^x	44,6 \pm 14,9
Descongelada ^a	119,9 \pm 31,4 ^y	110,1 \pm 28,2 ^y	114,5 \pm 29,9

$n = 40$ amostras para cada tratamento.

^a Nenhuma diferença significativa ($P > 0,05$) foi encontrada, na mesma linha.

Letras diferentes (^{x,y}) para o mesmo método de insensibilização são diferentes ($P < 0,05$).

As médias observadas em nosso experimento (Tabela 5.1) foram diferentes daquelas reportadas por PAVLOV et al. (1994) para coxas (com osso) de rã-madeira. Os valores de HADH obtidos para a carne fresca de rã-touro foram maiores do que os reportados por estes autores. Do contrário, os valores de HADH obtidos para a carne descongelada de rã-touro foram menores do que os reportados para a rã-madeira. Esta diferença, no entanto, pode ser oriunda da variação entre as espécies de rãs, assim como do tipo de músculo avaliado em cada experimento.

Usando a média geral dos valores de HADH (Tabela 5.1), e considerando um intervalo de confiança de 95% e que as amostras estão normalmente distribuídas com diferentes desvios-padrões, a carne de rã-touro pode ser classificada como frescas quando os valores de HADH forem menores que 65. Para valores maiores que 69 a carne pode ser classificada como descongelada. Amostras que apresentarem valores de HADH entre 65 e 69 devem ser classificadas como incertas. Utilizando-se este critério, 96,5% das amostras utilizadas no experimento foram classificadas corretamente, 2,8% classificadas erroneamente (1,4% das amostras frescas foram classificadas como descongeladas e 1,4% das amostras descongeladas classificadas como frescas) e apenas 0,7% consideradas incertas.

O nível de acerto na classificação de carnes de rã-touro, realizada pelos limites de valores de HADH propostos neste estudo, é muito similar àqueles reportados na literatura

para outras espécies. Para pescados, uma classificação correta foi obtida em 95% (HOZ et al., 1992) e 84% (HOZ et al., 1993) das amostras. PAVLOV et al. (1994) estabeleceram limites de HADH que permitiu classificar corretamente 100% das amostras de carnes de rã-madeira.

Do contrário dos resultados reportados por PAVLOV et al. (1994), que não encontraram diferença significativa entre os valores de HADH de coxas de rã-madeira estocadas congeladas por dois e 30 dias, o tempo de estocagem congelada (-18°C) possui ($P < 0,05$) um efeito quadrático positivo na atividade da enzima HADH de carnes de rã-touro (Figura 5.1). HOZ et al. (1993) também não acharam nenhuma diferença significativa nos valores de HADH de músculos de camarão (*Penaeus japonicus*) após 30 e 120 dias de estocagem a -18°C.

Embora a atividade da enzima HADH tenha aumentado com o tempo de estocagem congelada, ainda é possível diferenciar carnes de rã-touro frescas das descongeladas, uma vez que as amostras frescas sempre apresentaram valores de HADH menores ($P < 0,05$) do que as amostras descongeladas. Assim, maiores tempos de estocagem congelada apenas tornam mais fácil diferenciar a carne fresca da descongelada.

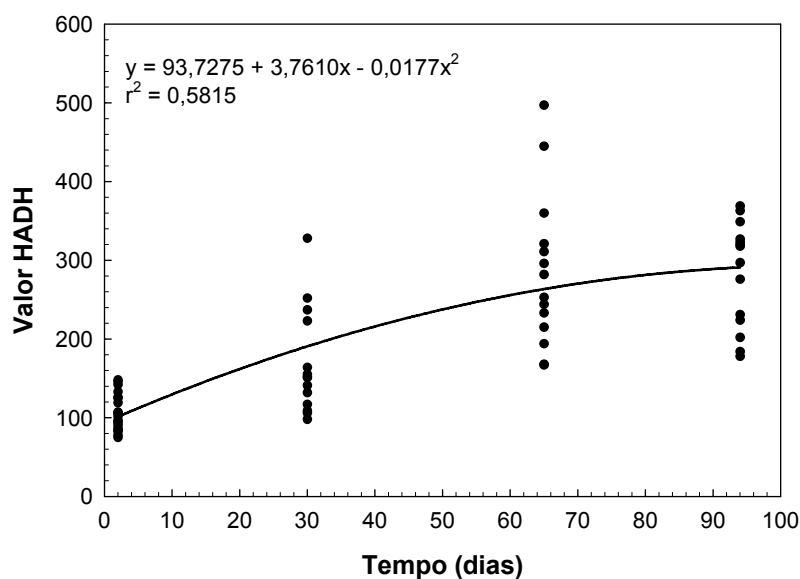


Figura 5.1. Mudança nos valores de HADH em músculos *gastrocnemius* de rã-touro, ao longo da estocagem congelada (-18°C).

CONCLUSÕES

O método de insensibilização e o tempo de estocagem em gelo picado não interferem na atividade da enzima HADH extraída de músculos *gastrocnemius* de rã-touro em tampão

fosfato. No entanto, o tempo de estocagem congelada afeta positivamente os valores de HADH.

Mesmo para amostras mantidas em estocagem congelada antes da estocagem em gelo picado, foi possível estabelecer limites aceitáveis que permitiram diferenciar, com um alto grau de sucesso, carnes de rã-touro frescas das descongeladas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINATI, F.L. **Avaliação de diferentes métodos de insensibilização e sangria de rãs.** Viçosa: UFV. 1994. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. 1994.

AYYAPPAN PILLAI, S. Development of an apparatus for humane method of killing TECHNOLOGY frogs for frog leg processing industry. **Seafood Export Journal.** In: FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY ABSTRACTS. v.18, n.9, p.177, 1986.

BILLINGTON, M., BOWIE, H., SCOTTER, S., WALKER, H., WOOD, R. The differentiation of fresh and frozen-thawed poultry meat by the determination of the beta-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) activity of chicken breast press juice: Collaborative trial. **Journal Association of Public Analysts**, v.28, p.103-116, 1992.

CHEN, M.T., YANG, W.D., GUO, S.L. Differentiation Between Fresh Beef and Thawed Frozen Beef. **Meat Science**, v.24, p.223-226, 1988.

COSTANZO, J.P., LEE, R.E. Cryoprotectant production capacity of the freeze-tolerant wood frog. *Rana sylvatica*. **Canadian Journal of Zoology**, v.71, p.71-75, 1993.

GARCIA DE FERNANDO, G.D., FERNANDEZ, M., DIAZ, O., ORDOÑEZ, J.A., HOZ, L. An Objective Method to Differentiate Between Fresh and Thawed Trout Meat (*Salmo gairdneri*). **Archiv. Für Lebensmittelhygiene**, v.43, p.13-14, 1992.

GOTTESMANN, P., HAMM, R. New Biochemical Methods of Differentiating Between Fresh meat and Thawed. Frozen Meat. **Fleischwirtschaft**, v.63, n.2, p.219-221, 1983.

FERNÁNDEZ, M., MANO, S., GARCÍA de FERNANDO, G.D., ORDÓÑEZ, J.A., HOZ, L. Use of β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH) Activity to Differentiate Frozen from Unfrozen Fish and Shellfish. **European Food Research and Technology**, v.209, p.205-208, 1999.

HOZ, L., FERNÁNDEZ, M., DIÁZ, O., ORDÓÑEZ, J.A., PAVLOV, A., GARCIA DE FERNANDO, G.D. Differentiation of Unfrozen and Frozem-thawed Kuruma Prawn (*Penaeus japonicus*) from the activity of β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH) in Aqueous Extracts. **Food Chemistry**, v.48, p.127-129, 1993.

HOZ, L., YUSTES, C., CAMARA, J.M., RAMOS, M.A., GARCIA DE FERNANDO, G.D. β -Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (HADH) Differentiates Unfrozen from Frozem-thawed Crawfish (*Procambarus clarkii*) and Trout (*Salmo gairdneri*) meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v.27, p.133-136, 1992.

LIMA, S.L., AGOSTINHO, C.A. **A criação de rãs.** Rio de Janeiro: Globo. 1988. 187p.

- LIMA, S.L., CRUZ, T.A., MOURA, O.N. **Ranicultura: análise da cadeia produtiva**. Viçosa: Folha de Viçosa. 1999. 172p.
- LOAIZA, J.F.U. **Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de carne de rã (*Rana catesbeiana*) estocada sob refrigeração e congelamento**. Viçosa: UFV. 1996. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa. 1996.
- LONGO, A.D. **Manual de ranicultura: uma nova opção da pecuária**. 3 ed. São Paulo: Ícone. 1986. 221p.
- MELLO, S.C.R.P. Situação da ranicultura e do mercado de carne de rãs no Brasil. In: I INTERNATIONAL MEETING OF FROG RESEARCH AND TECHNOLOGY & VIII ENAR - ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA. **Anais...** ABETRA/UFV: Viçosa, 1995, v.2, pp.15-22.
- MOURA, F.F., GOMIDE, L.A.M., RAMOS, E.M. Efeito do Jejum Pré-Abate Sobre a Qualidade da Carne de Rã-Touro (*Rana catesbeiana*). In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES. 2001. São Pedro. SP. **Anais...**, p.114-115. 2001.
- PAVLOV, A., GARCIA DE FERNANDO, G.D., ORDONEZ, J.A., HOZ, L. β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) Activity of Unfrozen and Frozen-Thawed Frog (*Rana esculenta*) legs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.64, p.141-143, 1994.
- STEINER, A.A., PETENUSCI, S.O., BRENTGANI, L.G., BRANCO, L.G.S. The Importance of Glucose for the Freezing Tolerance/Intolerance of the Anuran Amphibians *Rana catesbeiana* and *Bufo paracnemis*. **Revista Brasileira de Biologia**, v.60, n.2, p.321-328, 2000.
- STOREY, J.M., STOREY, K.B. Triggering of cryoprotectant synthesis by the initiation of ice nucleation in the freeze tolerant frog *Rana sylvatica*. **Journal of Comparative Physiology**, v.B156, p.191-195, 1985.
- STOREY, K.B., STOREY, J.M. Biochemical adaptation for freezing tolerance in the wood frog. *Rana sylvatica*. **Journal of Comparative Physiology**, v.B155, n.1. p.29-36, 1984.
- TOLDRÁ, F., TORRERO, Y., FLORES, J. Simple Test for Differentiation Between Fresh Pork and Frozen/Thawed Pork. **Meat Science**, v.29, p.177-181, 1991.
- VIEIRA, M.I. **Rã-touro gigante: características e reprodução** (4th ed.). São Paulo: INFOTEC. 1993.

Conclusões Gerais

A presente pesquisa evidenciou que:

A etapa de sangria mostrou ser eficiente na melhoria da qualidade final da carne de rãs, tornando-a mais clara em função do menor conteúdo de hemoglobina no músculo de animais sangrados e de maior peso vivo ao abate.

Não há diferença no conteúdo de pigmentos heme e na proporção relativa de suas formas químicas na carne de rãs obtidas a partir de animais insensibilizados por termo ou eletronarcese, resultando na ausência de efeito do tipo de insensibilização sobre os índices de cor objetiva de carnes de rãs.

O músculo de rãs-touro torna-se mais oxidativo e apresenta maior concentração de pigmentos totais com o desenvolvimento do animal. Ainda assim, as fibras musculares da rã-touro criada em cativeiro são predominantemente glicolíticas.

O tipo de insensibilização e a aplicação da estimulação elétrica na carcaça afetam as mudanças bioquímicas *post-mortem* e a qualidade da carne de rã-touro.

Músculos de rãs insensibilizadas por termonarcese apresentam uma menor taxa metabólica *post-mortem*, que se traduz em um rigor mais tardio do que o observado em rãs insensibilizadas por eletronarcese. No entanto, o desenvolvimento de tensão nos músculos de rãs insensibilizadas por eletronarcese foi, provavelmente, ocasionado pelo fenômeno de Encolhimento pelo Frio.

Em rãs insensibilizadas por eletronarcese, a aplicação, imediatamente após o abate, de estimulação elétrica de baixa voltagem (60 V, 60 Hz por 60 segundos) de carcaças acelera o metabolismo muscular, produzindo um aumento na taxa de queda de pH e de aumento de valor R e antecipando o início do desenvolvimento de tensão isométrica. Entretanto, para rãs insensibilizadas por termonarcese, a aplicação de estimulação elétrica de baixa voltagem não provocou alteração sensível na taxa metabólica *post-mortem*. Este resultado aponta para uma possível indicação do uso de altas voltagens para a estimulação de animais insensibilizados por termonarcese.

A aplicação da estimulação elétrica favoreceu a cor da carne de rã-touro, avaliada 24 horas, por induzir um aumento na proporção relativa do pigmento heme reduzido (Hb^+ e Mb^+) e redução na proporção relativa das demais formas químicas (O_2Mb , O_2Hb , MMb e MHb),

além de induzir um aumento no índice de vermelho (valor a^*) e redução na ângulo de tonalidade (h^*), gerando uma carne de coloração mais avermelhada e uniforme.

Embora sem diferir quanto ao comprimento do sarcômero, os músculos estimulados de rãs-touro insensibilizadas por eletronarcose apresentaram menor pH_{24} , maior força de cisalhamento e textura mais firme do que os demais tratamentos.

O método de insensibilização e o tempo de manutenção sob gelo picado e estocagem congelada não afetaram o teste da atividade da HADH, sendo possível diferenciar carne de rã-touro resfriada da descongelada.

Baseado no índice HADH, e independente do tempo de exposição, estabeleceu-se que carnes de rã-touro apresentando valores de HADH inferiores a 65 podem ser classificadas como frescas, e aquelas com valores de HADH maiores que 69 podem ser classificadas como carnes previamente congeladas, com o que foi possível distinguir carnes de rã-touro frescas das descongeladas com um elevado nível de acerto (96,5%).

Tabelas

Tabela 1A. Resumo da análise de variância para glicose-6-fosfato (G-6-P), adenosina-5'-trifosfato (ATP) e fosfocreatina (CP) em músculos de rãs-touro mantidos a 6°C

Fonte de Variação	GL	QM		
		G-6-P	ATP	CP
TRAT	1	59,24	50,30	11,00
E(a)	18	1,15	1,36	0,32
TEMPO	6	0,48	10,30	3,99
TRAT*TEMPO	6	1,43*	9,81*	2,30*
TEMPO/ELETRO	6	0,63 ^{ns}	17,11*	3,14*
TEMPO/TERMO	6	1,21*	3,52*	2,77*
E(b)	103	0,29	1,16	0,38

* Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

^{ns} Não-significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Tabela 2A. Resumo da análise de variância para glicogênio, glicose e ácido láctico em músculos de rãs-touro mantidos a 6°C

Fonte de Variação	Glicogênio		Glicose		Ac. Láctico	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
TRAT	1	7,49 ^{ns}	1	10,51*	1	2661,60*
ERRO (a)	18	4656,47	18	0,28	18	17,23
TEMPO	6	226,74 ^{ns}	6	2,88*	6	99,48*
TRAT*TEMPO	6	320,77 ^{ns}	6	0,25 ^{ns}	6	9,68 ^{ns}
ERRO (b)	105	138,39	97	0,18	105	8,79

* Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

^{ns} Não-significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Tabela 3A. Valores médios de glicose-6-fosfato (G-6-P), adenosina-5'-trifosfato (ATP), fosfocreatina (CP) em músculos de rã-touro para cada tratamento em função do tempo *post-mortem* a 6°C e respectivos valores-P para teste da diferença entre tratamentos

Tempo (horas)	G-6-P (μmol/g)			ATP (μmol/g)			CP (μmol/g)		
	Eletro	Termo	Pr >F	Eletro	Termo	Pr >F	Eletro	Termo	Pr >F
0	2,75	2,09	0,0136	3,32	2,53	0,1829	1,00	0,82	0,2241
3	3,49	1,28	<0,0001	7,13	3,56	<0,0001	2,39	1,33	0,0014
6	3,14	1,40	<0,0001	5,00	3,05	0,0002	2,54	1,20	<0,0001
9	3,01	1,54	<0,0001	5,04	3,11	0,0002	2,29	1,33	0,0015
12	3,02	1,61	<0,0001	4,93	3,67	0,0025	2,69	1,71	0,0321
24	3,30	2,15	0,0005	3,89	3,61	0,3330	2,09	1,77	0,0452
36	2,87	2,06	0,0472	3,39	4,70	0,0539	1,97	2,75	0,0381

Eletro = Insensibilização por eletronarcese.

Termo = Insensibilização por termonarcese.

Tabela 4A. Valores médios de glicogênio, glicose e ácido láctico em músculos de rã-touro para cada tratamento em função do tempo *post-mortem* a 6°C e respectivos valores-P para teste da diferença entre tratamentos

Tempo (horas)	Glicogênio (mg/g)			Glicose (μmol/g)			Ac. Láctico (μmol/g)		
	Eletro	Termo	Pr >F	Eletro	Termo	Pr >F	Eletro	Termo	Pr >F
0	44,90	49,61	0,6762	1,33	0,86	<0,0001	20,35	12,70	<0,0001
3	55,88	57,16	0,9247	1,15	0,73	0,0003	16,85	9,48	<0,0001
6	59,05	53,90	0,7053	1,40	0,84	0,0006	16,55	7,99	<0,0001
9	61,25	47,58	0,3052	1,40	1,16	0,2180	17,65	6,34	<0,0001
12	55,36	56,02	0,9571	1,66	1,00	<0,0001	19,41	9,40	<0,0001
24	53,14	56,30	0,8234	2,30	1,43	0,0114	22,58	13,05	<0,0001
36	53,49	63,22	0,0091	2,61	1,68	0,0760	20,08	12,61	0,4025

Eletro = Insensibilização por eletronarcese;
Termo = Insensibilização por termonarcese.

Tabela 5A. Resumo da análise de variância para a regressão do pH (1º grau) e valor R (2º grau) em músculos de rãs-touro, em função do tempo *post-mortem* a 6°C

Fonte de Variação	pH		Valor R	
	GL	QM	GL	QM
Eletronarcese				
REGRESSÃO	1	1,1016*	2	0,0513*
LOF	35	0,0297 ^{ns}	34	0,0053*
ERRO	30	0,0172	33	0,0013
Termonarcese				
REGRESSÃO	1	1,3977*	2	0,0083*
LOF	32	0,0420 ^{ns}	32	0,0023 ^{ns}
ERRO	31	0,0375	31	0,0015

LOF = Falta de ajuste

* Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

^{ns} Não-significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Tabela 6A. Resumo da análise de variância para a capacidade tamponante de músculos de rãs-touro mantidos a 6°C

Fonte de Variação	GL	QM
TRAT	1	356,58 ^{ns}
ERRO (a)	8	95,06
TEMPO	6	37,93*
TRAT*TEMPO	6	30,27 ^{ns}
ERRO (b)	48	17,37

* Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

^{ns} Não-significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Tabela 7A. Resumo da análise de variância para a regressão linear do pH e valor R em músculos de rês-touro, para cada tratamento, em função do tempo *post-mortem* a 6°C

Fonte de Variação	ENE		EES		TNE		TES	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
pH								
REGRESSÃO	1	0,0727*	1	1,2866*	1	0,2861*	1	0,3005*
LOF	25	0,0103 ^{ns}	22	0,0075 ^{ns}	29	0,0113 ^{ns}	24	0,0077 ^{ns}
ERRO	8	0,0048	11	0,0026	4	0,0055	9	0,0037
Valor R								
REGRESSÃO	1	0,0425*	1	0,6269*	1	0,0185*	1	0,0315*
LOF	25	0,0010*	22	0,0043*	29	0,0012*	24	0,0005 ^{ns}
ERRO	8	0,0003	11	0,0013	4	0,0001	9	0,0006

LOF = Falta de ajuste;

ENE = eletronarcese não-estimulado; EES = eletronarcese estimulado; TNE = termonarcese não-estimulado; TES = termonarcese estimulado.

* Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

^{ns} Não-significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Tabela 8A. Resumo da análise de variância para o comprimento do sarcômero de músculos de rês-touro mantidos a 6°C

Fonte de Variação	GL	QM
INS	1	0,1097
EST	1	0,0034
INS*EST	1	0,0051
ERRO (a)	24	0,0412
TEMPO	4	0,2728
TEMPO*INS	4	0,1969
TEMPO*EST	4	0,1048
TEMPO*INS*EST	4	0,1591*
TEMPO/ENE	4	0,0870*
TEMPO/EES	4	0,4800*
TEMPO/TNS	4	0,0654*
TEMPO/TES	4	0,1011*
ERRO (b)	96	0,0248

ENE = eletronarcese não-estimulado; EES = eletronarcese estimulado; TNE = termonarcese não-estimulado; TES = termonarcese estimulado.

* Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

^{ns} Não-significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Tabela 9A. Valores médios do comprimento do sarcômero (μm) em músculos de rês-touro, em função do tempo *post-mortem* a 6°C

Tempo (horas)	ENE	EES	TNE	TES
0	2,03ab	2,19a	1,97ab	1,95b
6	2,33a	2,17a	2,19a	2,14a
12	2,25b	2,42a	2,13bc	2,10c
24	2,21a	2,35a	2,22a	2,25a
36	2,18a	1,75b	2,15a	2,22a

ENE = eletronarcese não-estimulado; EES = eletronarcese estimulado; TNE = termonarcese não-estimulado; TES = termonarcese estimulado.

^{a, b} Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 10A. Resumo da análise de variância para os índices de cor objetiva de músculos de rãs-touro após 24 horas de estocagem a 6°C

Fonte de Variação	GL	QM				
		L*	a*	b*	C*	h*
INS	1	53,5996*	1,2943 ^{ns}	0,9472 ^{ns}	0,2268 ^{ns}	397,3582 ^{ns}
EST	1	0,5945 ^{ns}	3,7889*	3,5500 ^{ns}	0,0175 ^{ns}	819,7232*
INS*EST	1	1,3817 ^{ns}	2,5925 ^{ns}	10,5044 ^{ns}	10,7137 ^{ns}	159,9388 ^{ns}
ERRO	24	2,6647	0,6426	3,1026	2,4615	155,5972

* Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

^{ns} Não-significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Tabela 11A. Resumo da análise de variância para as formas relativas dos pigmentos heme de músculos de rãs-touro após 24 horas de estocagem a 6°C

Fonte de Variação	GL	QM		
		O ₂ Mb	Mb ⁺	MMb
INS	1	0,0076 ^{ns}	0,0093 ^{ns}	0,0001 ^{ns}
EST	1	0,0196*	0,0270*	0,0010*
INS*EST	1	0,0014 ^{ns}	0,0006 ^{ns}	0,0001 ^{ns}
ERRO	24	0,0030	0,0044	0,0002

O₂Mb = oximioglobina; Mb⁺ = mioglobina reduzida; MMb = metamioglobina

* Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

^{ns} Não-significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Tabela 12A. Resumo da análise de variância para os atributos de qualidade maciez, comprimento de sarcômero e pH₂₄ de músculos de rãs-touro após 24 horas de estocagem a 6°C

Fonte de Variação	GL	QM		GL	QM	
		Maciez (kg)	Maciez (g/cm ²)		Comp. Sarc.	pH ₂₄
INS	1	2,01x10 ^{6*}	0,6825*	1	0,0130 ^{ns}	1,1080*
EST	1	1,59x10 ^{6*}	0,6336*	1	0,0509 ^{ns}	1,0922*
INS*EST	1	1,90x10 ^{5ns}	0,0582 ^{ns}	1	0,0222 ^{ns}	0,7200*
EST/ELETRO	-	-	-	1	-	1,7929*
EST/TERMO	-	-	-	1	-	0,0193 ^{ns}
ERRO	40	1,01x10 ⁵	0,0304	24	0,0322	0,0083

* Significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

^{ns} Não-significativo pelo teste F, a 5% de probabilidade.

Tabela 13A. Coeficientes de correlação entre os índices avaliados para os dados agrupados

	L*	a*	b*	C*	h*	Mb ⁺	O ₂ Mb	MMb	pH ₂₄	R	Sarc.	M1
a*	-0,30 ^{ns}											
b*	0,24 ^{ns}	0,22 ^{ns}										
C*	0,01 ^{ns}	0,66**	0,87**									
h*	0,46*	-0,37 ^{ns}	0,80**	0,42**								
Mb⁺	-0,46*	0,22 ^{ns}	-0,81**	-0,51*	-0,88**							
O₂Mb	0,50*	-0,19 ^{ns}	0,81**	0,53**	0,87**	-0,99**						
MMb	0,21 ^{ns}	-0,27 ^{ns}	0,70**	0,43*	0,77**	-0,86**	0,81**					
pH₂₄	0,25 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	0,06 ^{ns}	-0,13 ^{ns}				
R	-0,36 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	0,02 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,29 ^{ns}	-0,27 ^{ns}			
Sarc.	0,33 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	-0,18 ^{ns}	0,24 ^{ns}	-0,91**		
M1	0,50*	-0,06 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,06 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	0,09 ^{ns}	-0,70**	0,64**	
M2	0,41*	0,03 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,10 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	0,09 ^{ns}	-0,71**	0,67**	0,97**

*P < 0,05; **P < 0,01; ^{ns} diferença não significativa.

Sarc. = comprimento do sarcômero; M1 = maciez (kg); M2 = Maciez (g/cm²).

Tabela 14A. Coeficientes de correlação entre os índices avaliados para o tratamento ENE

	L*	a*	b*	C*	h*	Mb⁺	O₂Mb	MMb	pH₂₄	R	Sarc.	M1
a*	0,37 ^{ns}											
b*	0,54 ^{ns}	0,85*										
C*	0,51 ^{ns}	0,92**	0,99**									
h*	0,70 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,78*	0,68 ^{ns}								
Mb⁺	-0,50 ^{ns}	-0,66 ^{ns}	-0,95**	-0,90**	-0,87*							
O₂Mb	0,59 ^{ns}	0,67 ^{ns}	0,95**	0,90**	0,88*	-0,99**						
MMb	0,07 ^{ns}	0,67 ^{ns}	0,83*	0,82*	0,59 ^{ns}	-0,85*	0,78*					
pH₂₄	0,55 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,43 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	0,18 ^{ns}	-0,26 ^{ns}				
R	0,53 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,75 ^{ns}	0,70 ^{ns}	0,76*	-0,70 ^{ns}	0,68 ^{ns}	0,69 ^{ns}	-0,11 ^{ns}			
Sarc.	-0,34 ^{ns}	-0,67 ^{ns}	-0,48 ^{ns}	-0,55 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	0,28 ^{ns}	-0,36 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	0,00 ^{ns}	-0,11 ^{ns}		
M1	-0,71 ^{ns}	-0,42 ^{ns}	-0,59 ^{ns}	-0,56 ^{ns}	-0,57 ^{ns}	0,62 ^{ns}	-0,69 ^{ns}	-0,37 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	-0,44 ^{ns}	0,05 ^{ns}	
M2	-0,82*	-0,25 ^{ns}	-0,45 ^{ns}	-0,40 ^{ns}	-0,59 ^{ns}	0,47 ^{ns}	-0,54 ^{ns}	-0,20 ^{ns}	-0,27 ^{ns}	-0,52 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,98**

*P < 0,05; **P < 0,01; ^{ns} diferença não significativa.Sarc. = comprimento do sarcômero; M1 = maciez (kg); M2 = Maciez (g/cm²).**Tabela 15A.** Coeficientes de correlação entre os índices avaliados para o tratamento EES

	L*	a*	b*	C*	h*	Mb⁺	O₂Mb	MMb	pH₂₄	R	Sarc.	M1
a*	-0,25 ^{ns}											
b*	0,50 ^{ns}	0,28 ^{ns}										
C*	0,24 ^{ns}	0,68 ^{ns}	0,89**									
h*	0,71 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	0,85*	0,53 ^{ns}								
Mb⁺	-0,52 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-0,85*	-0,55 ^{ns}	-0,94**							
O₂Mb	0,48 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	0,86*	0,58 ^{ns}	0,92**	-1,00**						
MMb	0,48 ^{ns}	-0,49 ^{ns}	0,66 ^{ns}	0,27 ^{ns}	0,91**	-0,91**	0,89**					
pH₂₄	0,80*	-0,41 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,68 ^{ns}	-0,41 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,55 ^{ns}				
R	-0,06 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,12 ^{ns}	-0,01 ^{ns}			
Sarc.	-0,42 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	-0,43 ^{ns}	-0,35 ^{ns}	-0,45 ^{ns}	0,50 ^{ns}	-0,54 ^{ns}	-0,41 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	-0,62 ^{ns}		
M1	-0,11 ^{ns}	0,53 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	0,19 ^{ns}	-0,39 ^{ns}	0,44 ^{ns}	-0,45 ^{ns}	-0,66 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,60 ^{ns}	0,62 ^{ns}	
M2	-0,16 ^{ns}	0,59 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,23 ^{ns}	-0,40 ^{ns}	0,46 ^{ns}	-0,46 ^{ns}	-0,68 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,49 ^{ns}	0,60 ^{ns}	0,92**

*P < 0,05; **P < 0,01; ^{ns} diferença não significativa.Sarc. = comprimento do sarcômero; M1 = maciez (kg); M2 = Maciez (g/cm²).

Tabela 16A. Coeficientes de correlação entre os índices avaliados para o tratamento TNS

	L*	a*	b*	C*	h*	Mb⁺	O₂Mb	MMb	pH₂₄	R	Sarc.	M1
a*	-0,35 ^{ns}											
b*	-0,29 ^{ns}	0,17 ^{ns}										
C*	-0,38 ^{ns}	0,55 ^{ns}	0,92 ^{**}									
h*	-0,09 ^{ns}	-0,35 ^{ns}	0,86*	0,59 ^{ns}								
Mb⁺	-0,19 ^{ns}	0,08 ^{ns}	-0,84*	-0,68 ^{ns}	-0,83*							
O₂Mb	0,22 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,83*	0,71 ^{ns}	0,77*	-0,99 ^{**}						
MMb	0,09 ^{ns}	-0,32 ^{ns}	0,79*	0,55 ^{ns}	0,92 ^{**}	-0,93 ^{**}	0,86*					
pH₂₄	-0,03 ^{ns}	0,53 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,43 ^{ns}	0,35 ^{ns}	-0,31 ^{ns}	-0,42 ^{ns}				
R	0,22 ^{ns}	0,80*	-0,15 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-0,53 ^{ns}	0,13 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,40 ^{ns}	0,71 ^{ns}			
Sarc.	-0,57 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,51 ^{ns}	0,47 ^{ns}	-0,43 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,55 ^{ns}	0,02 ^{ns}	-0,22 ^{ns}		
M1	0,66 ^{ns}	-0,93 ^{**}	-0,17 ^{ns}	-0,52 ^{ns}	0,32 ^{ns}	-0,18 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,34 ^{ns}	-0,40 ^{ns}	-0,54 ^{ns}	-0,31 ^{ns}	
M2	0,50 ^{ns}	-0,95 ^{**}	-0,12 ^{ns}	-0,47 ^{ns}	0,40 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,42 ^{ns}	-0,33 ^{ns}	-0,62 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	0,96 ^{**}

*P < 0,05; **P < 0,01; ^{ns} diferença não significativa.

Sarc. = comprimento do sarcômero; M1 = maciez (kg); M2 = Maciez (g/cm²).

Tabela 17A. Coeficientes de correlação entre os índices avaliados para o tratamento TES

	L*	a*	b*	C*	h*	Mb⁺	O₂Mb	MMb	pH₂₄	R	Sarc.	M1
a*	-0,62 ^{ns}											
b*	0,69 ^{ns}	-0,61 ^{ns}										
C*	0,10 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,42 ^{ns}									
h*	0,77*	-0,76*	0,97 ^{**}	0,22 ^{ns}								
Mb⁺	-0,71 ^{ns}	0,56 ^{ns}	-0,95 ^{**}	-0,41 ^{ns}	-0,95 ^{**}							
O₂Mb	0,75 ^{ns}	-0,54 ^{ns}	0,95 ^{**}	0,44 ^{ns}	0,94 ^{**}	-1,00 ^{**}						
MMb	0,37 ^{ns}	-0,46 ^{ns}	0,92 ^{**}	0,48 ^{ns}	0,85*	-0,89 ^{**}	0,87*					
pH₂₄	0,15 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,06 ^{ns}	-0,14 ^{ns}				
R	0,49 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,62 ^{ns}	-0,69 ^{ns}	0,70 ^{ns}	0,60 ^{ns}	-0,38 ^{ns}			
Sarc.	-0,28 ^{ns}	-0,46 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	-0,69 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,26 ^{ns}	-0,29 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	-0,41 ^{ns}	-0,39 ^{ns}		
M1	-0,09 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,06 ^{ns}	-0,29 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,35 ^{ns}	-0,63 ^{ns}	
M2	-0,18 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,55 ^{ns}	0,13 ^{ns}	-0,39 ^{ns}	0,34 ^{ns}	0,49 ^{ns}	0,30 ^{ns}	0,38 ^{ns}	-0,57 ^{ns}	0,96 ^{**}

*P < 0,05; **P < 0,01; ^{ns} diferença não significativa.

Sarc. = comprimento do sarcômero; M1 = maciez (kg); M2 = Maciez (g/cm²).

Artigos Publicados



Meat color evaluation and pigment levels in bullfrog (*Rana catesbeiana*) slaughtered by different methods

E.M. Ramos^a, L.A.M. Gomide^{a,*}, P.R. Fontes^a, A.L.S. Ramos^a, L.A. Peternelli^b

^aDepartamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa (UFV),
Campus Universitário, CEP: 36571-000, Viçosa-MG, Brasil

^bDepartamento de Informática (DPI), Setor de Estatística, UFV, Brasil

Received 29 September 2004; received in revised form 10 December 2004; accepted 15 December 2004

Abstract

This work aimed to evaluate the muscle color and heme pigment content of bullfrog muscles after electrical or thermal stunning and use or not of bleeding. Stunning method did not influence ($P>0.05$) the instrumental color or the total heme pigment content of the meat or the relative chemical forms of heme pigments. However, muscle myoglobin content was lower in electrically stunned frogs ($P<0.05$). Overall, the myoglobin content of bullfrog meat was similar to that of avian white muscles. Bleeding enhanced the final quality of the meat. Meat from bled animals was whiter and had an important contribution of the b^* value (yellowness) to its color. Muscle hemoglobin content of bled frogs was lower ($P<0.05$) than that of un-bled frogs, and negatively correlated ($P<0.05$) with slaughter weight. Oxy-myoglobin, reduced myoglobin, and metmyoglobin contents were, respectively, highly correlated with lightness (L^*), redness (a^*), and yellowness (b^*).

© 2004 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Stunning; Bleeding; Bullfrog; Hemoglobin; Myoglobin; Color

1. Introduction

The major requirement to obtain and maintain meat quality aiming at its conservation, appearance, and even flavor is to remove the highest possible amount of blood from the carcass (Lawrie, 1998).

Fresh meat color is mainly due to the concentration and chemical condition of myoglobin (Mb) and,

partially, hemoglobin (Hb) which remains in the tissue as residual blood. Muscular areas containing high concentration of hemoglobin show a more rapid discoloration, especially during freezing, causing an undesirable product appearance (Hunt and Kropf, 1987). Contusions, hemorrhages, and other residual blood consequences are seen as the worst flaws in meats, with the inadequate removal of blood justifying carcass rejection or its classification as of inferior quality (Beraquet, 1994).

Besides changes in appearance and flavor, shelf-life of meat from inadequately bled animals becomes

* Corresponding author. Tel.: +55 31 3899 1754; fax: +55 31 3899 2208.

E-mail address: lagomide@dta.ufv.br (L.A.M. Gomide).

limited undergoing fast putrefaction (Aberle et al., 2001) as a result of microbial growth due to its high protein content and high pH (7.35 to 7.45).

Although the majority of the hemoglobin in live muscles is removed when the animal is slaughtered, the hemoglobin content remaining in the meat is highly dependent on both stunning and bleeding time, methods and conditions (Lawrie, 1998; Ahn and Maurer, 1989).

The technological development of frog slaughtering and processing for human consumption has attracted increasing attention. Today, Codex Alimentarius (1984) recommendations are being adopted worldwide as quality criterion. In Brazil the quality standards are defined by the Sanitary and Industrial Inspection Regulation of Animal Products (RIISPOA) of the Ministry of Agriculture and Land Reform (Brasil, 1997), which defines frog meat within the generic denomination of “fish”.

The stunning methods currently utilized in commercial frog slaughter in Brazil can be divided into two groups: immersion in cold-water and, or in concentrated saline solution and electrical stunning (Albinati, 1994). The use of the latter in frog slaughter is more recent and has been found to be more adequate to the slaughter process than the traditional stunning methods (Albinati, 1994). However, an assessment carried out by Lima et al. (1999) has shown that all the slaughterhouses under operation in the country or in the process of being registered at the federal (SIF) or state (SIE) inspection level, applied the thermal stunning process, performed in tubs with water and ice.

According to the Codex Alimentarius (1984) guidelines for slaughter and processing of frog legs, bleeding is performed through a cut in the pelvic waist region and posterior immersion of the legs in a cold saline solution. In Brazil, the use of the whole frog carcass has forced the application of other bleeding methods in order to minimize the risk of meat contamination (Loaiza, 1996).

Based on RIISPOA norms, Brazilian frog slaughterhouses have used a 3-min bleeding time although Albinati (1994) has found a final bleeding time of, respectively, 4 and 6 min for electrically and thermally stunned animals.

In thermally stunned (water and ice) frogs bleeding is made difficult by the animal cooling process

leading to a lower volume of blood collection after bleeding (Albinati, 1994). Greater blood retention in thermally stunned frogs corroborates the observations of Storey and Storey (1984, 1985) on *Rana sylvatica*. According to them, when submitted to cold environments, these animals become lethargic and do not seem to breathe, nor bleed, with the organs appearing pale, apparently bloodless, whereas blood seems to have accumulated in the sinuses above the heart. Thermally stunned bullfrogs have been described by Moura (2000) as displaying a visual blood accumulation in the internal body cavity and apparently almost total blood absence in the musculature. These aspects were also observed by Ramos (2000).

This work aimed to evaluate the meat color and residual hemoglobin content of electrically and thermally stunned bullfrog (*Rana catesbeiana*) slaughtered with and without bleeding.

2. Material and methods

2.1. Slaughtering

The treatments were arranged in a 2×2 factorial scheme (stunning×bleeding) in a completely randomized design.

Forty female and male Bullfrogs (*Rana catesbeiana*), with mean live weight of 220±33 g were utilized. The frogs were randomly sampled and divided into 4 groups of 10 animals, according to the following slaughter methods:

- Group 1: thermally stunned and bled animals;
- Group 2: thermally stunned and un-bled animals;
- Group 3: electrically stunned and bled animals;
- Group 4: electrically stunned and un-bled animals.

Before slaughter, the animals were kept off their feed for 24 h, receiving only water. They were then weighed and stunned. Thermal stunning was performed by immersing the animals in a tub containing water and ice (1:1) for 15 min, after which they were hung by their hind legs. In the electrical stunning method, the frogs were hung by the hind legs and stunned by application of an electric shock (60 V, 60 Hz) through its body (leg to nose) for 7 s (Albinati, 1994). The stunned animals were bled by cutting the

cardiac veins (Albinati, 1994). After bleeding for a minimum period of 3 min, evisceration, skin removal, and continuous carcass washing under gushes of water were performed (Loaiza, 1996).

2.2. Heme pigment determination

Immediately following carcass washing, the musculature of one leg of each animal was removed, identified, packed and frozen in liquid nitrogen, and kept at $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a NUAIRE ultra-freezer for posterior analysis. During the maximum period of 1 week, the muscle tissues were left to thaw in a domestic refrigerator ($\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) for a 12-h period. Five grams samples were taken and homogenized in 25 mL of phosphate buffer 0.04 M (pH 6.8; Warriss, 1979), with the help of a MARCONI ultraturrax type grinder. No superficial drippings (minimal due to the high water holding capacity of bullfrog meat) were intentionally removed nor included before muscle sampling. The homogenates were centrifuged at 3000 *G* for 10 min. An aliquot of the supernatant obtained was used to determine the total heme pigments (Warriss, 1979) by converting pigments into the cyanmet form (cyanmethemoglobin and cyanmetmyoglobin). In another aliquot, hemoglobin was precipitated by the addition of lead acetate (Rickansrud and Henrickson, 1967) and total myoglobin content was evaluated according to procedure proposed by Warriss (1979). Molecular weight used to calculate total heme and myoglobin pigment was 17,000 g/mol, with extract's hemoglobin content being obtained by difference (total heme pigments minus myoglobin).

2.3. Objective color evaluation

One leg of each animal was randomly chosen and used for objective color evaluation, immediately after slaughter, by using the Color Quest II Sphere spectrophotometer (Hunter Lab, Reston, VA), connected to a computer provided with the Universal System software. For color index calculation the following settings were used: illuminant A; observer angle of 10° ; and the CIELAB color system with reflectance specular included (RSIN). L^* , a^* , and b^* color indexes were obtained considering the average values of five readings performed in different locations of the surface of the deboned frog legs. Chroma

(c^*) and hue angle (h^*) were calculated from the following formulas: $c^*=(a^{*2}+b^{*2})^{1/2}$ e $h^*=\tan^{-1}(b^*/a^*)$ (AMSA, 1991).

2.4. Reflectance spectrum analysis

The relative content of the pigments, expressed as oxymyoglobin (O_2Mb), reduced myoglobin (Mb), and metmyoglobin (MMb), on the surface of the meat, was calculated based on the reflectance curve obtained from the objective analysis of the color (Krzywicki, 1979). The spectral reflectance curves were determined in the visible wavelength region between 400 and 700 nm, at intervals of 10 nm. The intermediary values (473, 525, and 572 nm) were calculated by linear interpolation.

2.5. Statistical analysis

The experimental data were submitted to analysis of variance using the program SAS[®] System for Windows[™], version 8.0 (SAS Institute Inc.), considering a significance level of 5%.

3. Results and discussion

None of the color parameters was affected by interaction ($P>0.05$) between the stunning and bleeding methods. These results differ from those of Moura (2000), who reported the interaction effect between the stunning and bleeding methods on lightness (L), redness (a), and yellowness (b) in frog meat stored at $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. However, lightness values (L^*) found in this work are rather similar to those initially reported by Moura (2000), although the latter applied the Hunter Lab scale instead of the CIELAB scale.

Stunning methods had no influence ($P>0.05$) on both total pigments and hemoglobin content. They also did not affect ($P>0.05$) the relative ratio of the myoglobin chemical forms or CIELAB indexes of frog meat color (Table 1). However, muscle myoglobin concentration varied ($P<0.05$) with the type of stunning applied.

Higher muscle myoglobin contents in frogs slaughtered after thermal stunning were not expected since all the animals had similar weight and age, originated from the same lot and were submitted to the same

Table 1
Mean values (\pm standard deviation) of the evaluated color indexes, heme pigment content, and its relative ratios^a

Indexes	Thermal stunning		Electrical stunning	
	Bled	Un-bled	Bled	Un-bled
Total pigments (mg/g)	0.422 \pm 0.124a	0.618 \pm 0.207b	0.488 \pm 0.182a	0.746 \pm 0.270b
Hemoglobin (mg/g)	0.397 \pm 0.128a	0.592 \pm 0.204b	0.469 \pm 0.181a	0.731 \pm 0.266b
Myoglobin (mg/g)	0.025 \pm 0.012a	0.026 \pm 0.007a	0.018 \pm 0.005b	0.015 \pm 0.005b
Lightness (L^*)	57.84 \pm 1.98a	57.11 \pm 1.54b	57.99 \pm 1.66a	56.37 \pm 1.96b
Redness (a^*)	2.42 \pm 1.15a	2.60 \pm 0.73b	1.94 \pm 0.96a	2.96 \pm 1.20b
Yellowness (b^*)	1.24 \pm 0.75a	0.46 \pm 0.92b	0.95 \pm 0.81a	0.01 \pm 1.05b
Chroma (c^*)	2.85 \pm 1.05a	2.79 \pm 0.70a	2.33 \pm 0.86a	3.14 \pm 1.16a
Hue (h^*)	28.95 \pm 19.06a	7.84 \pm 21.76b	27.03 \pm 24.69a	-2.00 \pm 21.55b
Mb ⁺ (%)	16.97 \pm 4.82a	20.01 \pm 4.15b	15.41 \pm 4.94a	21.67 \pm 3.38b
O ₂ Mb (%)	51.83 \pm 4.21a	49.41 \pm 3.73b	52.72 \pm 4.44a	47.83 \pm 2.54b
MMb (%)	31.20 \pm 0.79a	30.15 \pm 1.55b	31.87 \pm 0.78a	30.50 \pm 1.22b

Means followed by same letter in a row do not differ ($P>0.05$).

^a The relative pigment proportions refer to the chemical forms of myoglobin and hemoglobin but will be described as: oxymyoglobin (O₂Mb), reduced myoglobin (Mb⁺), and metmyoglobin (MMb).

environmental and nutritional conditions. However, although no explanation was provided, Roça et al. (2001) also observed variations in the muscular myoglobin levels in beef obtained from different stunning methods.

Difference in the myoglobin content as a function of the stunning method may be due to a difference in the initial pH, which was not measured in this experiment. However, Moura (2000) observed lower initial pH values (6.9) in the meat of electrically stunned frogs, as compared to pH 7.3 in thermally stunned frogs. It is possible that pH values, associated to a higher body temperature in electrically stunned frogs, may have contributed to a higher denaturation of meat pigments, making the process of myoglobin extraction difficult and masking the results obtained for electrically stunned frog meat. However, frog muscle initial pH that we have obtained in previous experiments (6.7 to 7.3) is far above those reported by Lawrie (1998) to induce beef protein denaturation. According to Lawrie (1998) at 0 °C sarcoplasmic protein precipitation is of about 0.4% in pH 7.1 and 0.6% in pH 6.5. At 10 °C these values are, respectively, 0.4% and 0.8%.

Stunning method had no effect ($P>0.05$) on the relative concentrations of various myoglobin chemical forms, thus not providing any evidence of its effects on the muscular reducing systems and metabolism.

Absence of stunning effect on color indexes and on the chemical forms of myoglobin and hemoglobin pigments indicates that frog meat color is not affected by this stage of the slaughter process, since myoglobin, the only component affected, has a relatively small contribution (0.9%) to the final pigment concentration of frog meat.

Absence of difference due to stunning methods in the muscle's total pigments and hemoglobin contents is in accordance with the results of Albinati (1994), who also did not observe variation in the muscular iron content (used by the author to indirectly estimate the total residual levels of pigments in meat) due to stunning methods during bullfrog slaughtering. It is also in accordance with the lack of effect of stunning methods on different parts of chicken broilers (Heath, 1984).

Although not differing ($P>0.05$) as to the myoglobin content within a stunning method, contrary to results reported by Heath (1984) in chicken broilers, un-bled frog muscles had ($P<0.05$) higher total pigments and hemoglobin contents than bled frogs. Likewise, differences were observed in the relative concentrations of the various chemical forms of pigments and in the color indexes, except in saturation (c^*), influencing the final aspect and quality of frog meat.

The absence of difference in the myoglobin content in the bled and un-bled muscles within the same stunning method can be ascribed to the fact that

animals of similar genetic load, submitted to the same diet and reared during the same period, were slaughtered at the same age and weight.

The myoglobin concentration found in the frog meat is equivalent to those found (Ahn and Maurer, 1989) in white avian muscles (0.01 to 0.58 mg/g), due to the predominance of white fibers in the muscles of bullfrogs (Ramos et al., 2003). This concentration is considered low, and similarly to what occurs in birds (Ahn and Maurer, 1989), cytochrome concentration *c* may be relatively higher, playing an important role in frog meat pigmentation.

Lower L^* values in the muscles of un-bled frogs corroborate literature results. Boulianne and King (1998) verified a high negative correlation between the content of total pigments and lightness (L^*) in chicken breasts, and Guzman et al. (1995) reported that lightness (L^*) reduction in meat products is more pronounced with increasing amounts of blood addition. Such fact is supported by the concept that adding a higher pigment amount leads to darkening of the color of a food or surface.

The a^* values found in the bullfrog muscles are similar to those reported by van Laack et al. (2000) for chicken breast, possibly due to the higher proportion of white fibers in muscles of these animals (Ramos et al., 2003). Conversely, the higher a^* values observed in the muscles of un-bled frogs agree with the results reported by Moura (2000) for muscles of un-bled bullfrogs. Boulianne and King (1998) also reported higher a^* values in chicken muscles with higher content of total pigments.

Finally, higher muscle redness (a^* values) in un-bled frogs show the need for the bleeding procedure in frog slaughtering.

The higher b^* values observed in the muscles of bled frogs contradict the results of Moura (2000) for yellowness (b) and seems to point to a relative participation of other chromophores, such as flavones, vitamin B12, cytochromes, oxydases, and catalases in the color of frog meat, as it occurs in avian meat (von Elbe and Schwartz, 1996). Lower b^* values in the muscle of un-bled frogs is in accordance with observations (Boulianne and King, 1998; Guzman et al., 1995) that higher blood content (total pigment) induces yellowness reduction in fresh and processed meats.

Jeremiah et al. (1972) verified that the b^* value plays an important role in meat color evaluation, and

Insausti et al. (1999) concluded that small changes in b^* values are as important as big changes in other color indexes in determining beef color stability. It should be emphasized that the b^* values found for bullfrogs correspond to around 50% of the a^* values, which is not observed in chicken breast muscles (van Laack et al., 2000), whose b^* values are around two to four times higher than their a^* values.

Regardless of the stunning and bleeding method used, frog meat color may be considered equivalent to the creamy-white color indicated by Codex Alimentarius (1984) as characteristic of frog meat and also verified by Moura (2000). This may be because, although significant, the alterations caused by bleeding in the color indexes, are small or null. Thus, meat lightness in bled animals is only around 1.3% higher than that of un-bled animals, whereas the increase in a^* value of un-bled frogs tend to be offset by a decrease in the b^* values.

Live weight (LW) at slaughter presented a negative correlation ($P < 0.05$) with the amount of hemoglobin retained in the muscle and a strong positive correlation ($P < 0.01$) with yellowness and the relative MMb content in the animals' muscle (Table 2).

Lower ($P < 0.05$) total pigments (TP) and hemoglobin retention in the meat of heavier animals (negative correlation TP×LW) is in complete opposition to the results of Roça et al. (2001) in cattle and to our previous findings (Ramos et al., 2003) with frogs. However, in this previous work of ours, animals of broader live weight range (100 to 300 g) were used and we guaranteed that heavier animals were older. In the present experiment live weight was not related to animal age, but probably to animal dominance in the population as reported by Ramos (2000). That is, independent of live weight (190 to 250 g), all animals used were of approximately the same age and as such lack of difference in pigment concentration should be expected. Also, as we have not separated male from female animals it is possible that females were heavier due to the fact that they were ovulating (Ramos, 2000). Still, the observed negative correlation between LW and pigment content was unexpected and cannot be explained at this time.

Also, the decrease in muscle hemoglobin and total pigment retention in heavier animals is consistent with the observed increase ($P > 0.05$) in muscle yellowness (b^* values) of these animals. It should be pointed out

Table 2
Correlation coefficients among the evaluated parameters

	TP	Hb	Mb	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>c</i> *	<i>h</i> *	%O ₂ Mb	%Mb ⁺	%MMb
Hb	0.9992**										
Mb	0.0063 ^{ns}	-0.0332 ^{ns}									
<i>L</i> *	-0.1513 ^{ns}	-0.1496 ^{ns}	-0.0495 ^{ns}								
<i>a</i> *	0.2744 ^{ns}	0.2681 ^{ns}	0.1617 ^{ns}	-0.4555**							
<i>b</i> *	-0.2615 ^{ns}	-0.2651 ^{ns}	0.1095 ^{ns}	0.3862*	-0.0214 ^{ns}						
<i>c</i> *	0.2149 ^{ns}	0.2068 ^{ns}	0.1990 ^{ns}	-0.3258*	0.9471**	0.1974 ^{ns}					
<i>h</i> *	0.1589 ^{ns}	0.1564 ^{ns}	0.0280 ^{ns}	-0.2217 ^{ns}	-0.0852 ^{ns}	-0.6805**	-0.1117 ^{ns}				
%O ₂ Mb ^a	-0.1537 ^{ns}	-0.1516 ^{ns}	-0.0582 ^{ns}	0.9988**	-0.4919**	0.3555*	-0.3676*	-0.1976 ^{ns}			
%Mb ⁺ ^a	0.2821 ^{ns}	0.2761 ^{ns}	0.1333 ^{ns}	-0.4624**	0.9474**	-0.1733 ^{ns}	0.8765**	0.0679 ^{ns}	-0.4946**		
%MMb ^a	-0.2688 ^{ns}	-0.2716 ^{ns}	0.0981 ^{ns}	0.3944*	-0.0843 ^{ns}	0.9880**	0.1282 ^{ns}	-0.6882**	0.3677*	-0.2704 ^{ns}	
LW	-0.3241*	-0.3240*	0.0273 ^{ns}	0.4241**	-0.2121 ^{ns}	0.9269**	0.0178 ^{ns}	-0.6091**	0.4045**	-0.3929*	0.9531**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; ^{ns}No significant difference.

TP=Total pigments; Hb=hemoglobin; Mb=myoglobin; *L**=lightness; *a**=redness; *b**=yellowness; *c**=chroma; *h**=hue; %O₂Mb=relative oxymyoglobin; %Mb⁺=relative reduced myoglobin; %MMb=relative metmyoglobin; LW=live weight at slaughter.

^a Relative proportions of heme pigments refer to the various chemical forms of both myoglobin and hemoglobin.

that, although live weight at slaughter has significantly correlated with total heme pigment retention in frogs' muscles, weight did not correlate ($P > 0.05$) with myoglobin content.

The high correlation between the relative MMb content and the frogs' live weight seems to indicate a change in muscle metabolism or reduction in the efficiency of the metmyoglobin reductase system in the muscles of heavier frogs. We have demonstrated (Ramos et al., 2003) that muscles of heavier frog tend to become more oxidative and the literature shows that more oxidative muscles are more prone to meat discoloration. Ledward (1985) reported that beef muscles with higher metmyoglobin reducing activity had higher color stability. However, Echevarne et al. (1990) and Renner and Labas (1987) demonstrated that beef fast-twitch white muscles, such as *Tensor fasciae latae*, are more color stable than slow-twitch red muscles, such as *Diafragma medialis*. These authors showed that fast-twitch muscles had lower haeminic iron content, lower cytochrome *a* (+*a*₃) activity and oxygen consumption rate and, although having lower metmyoglobin reductase activity, yielded less amount of metmyoglobin after storage. Although showing higher metmyoglobin reducing activity in the *longissimus dorsi* muscle, O'Keefe and Hood (1982) also verified that more oxidative (higher SDH activity) *M. psoas major* has higher oxygen consumption rate (OCR) and is less color stable than the less oxidative *M. longissimus dorsi*. They stated that a higher OCR in more oxidative

muscles leads to higher conversion of oxymyoglobin to reduced myoglobin and, since this later pigment is more prone to oxidation, this is responsible for faster meat discoloration. Though there was no difference ($P > 0.05$) in Mb content due to live weight, according to Trout (2003), muscles with higher myoglobin level, as occurs with older and heavier animals (Lawrie, 1998), are more prone to myoglobin oxidation because they generate larger amounts of reactive oxygen species.

No significant correlation was found between redness and the pigment contents in bullfrog meat. Low correlations between redness and pigment content were also observed in swine meat (Tam et al., 1998), suggesting that other factors, besides pigment content, are important for the perception of red color in meats (Lindahl et al., 2001). However, the *a** values had a negative correlation ($P < 0.01$) with the O₂Mb content and a highly positive correlation ($P < 0.01$) with Mb⁺ content, present on the meat surface.

Muscle yellowness (*b** value) did not have any significant correlation ($P > 0.05$) with either pigment content, which reinforces the concept (Tam et al., 1998; Lindahl et al., 2001) that the chemical forms of the pigment, rather than its concentrations, are important for yellowness variation. Thus, *b** values had a high ($P < 0.01$) positive correlation with muscle MMb content and lower ($P < 0.05$) correlation with muscle O₂Mb content. Strong correlation between *b** values and muscle MMb concentration is supported by the results of Carpenter et al. (2001) who stated

that brown color perception is associated with increased b^* values in beef stored under an atmosphere containing low oxygen concentration.

Lindahl et al. (2001) reported that both pigment content and the relative proportion of its chemical forms are important in the variation of muscles' lightness (L^*). In this experiment, the L^* value had a significant correlation with the different myoglobin chemical states present on the frog meat surface, being highly correlated with the relative content of O_2Mb . However, muscle lightness showed a small ($P>0.05$) negative correlation with the Hb and Mb pigments. Tam et al. (1998) also reported low correlations between muscle L^* value and pork pigment content.

According to Lindahl et al. (2001), chroma (saturation) and the hue angle are both based on the a^* and b^* values and, consequently, influenced by both the pigment content and the heme pigment chemical form. However, our results do not show significant correlations between heme pigments content and these indexes.

4. Conclusions

Thermal and electric stunning did not influence frog meat heme pigment content and instrumental color, while bleeding stage during frog slaughter lead to a smaller hemoglobin retention in the muscle yielding whiter and less red (pinkish tone) meat.

For frog meat, both a^* and b^* values play a representative role in the evaluation of meat color, which appears to be due to the lower content of heme pigments in frogs' muscle.

For frog meats, the MMB relative content has a high correlation with weight at slaughter, with lightness, redness, and yellowness being the main indicators of the relative contents of MbO_2 , Mb, and MMB, respectively.

References

- Aberle, E.D., Forrest, J.C., Gerrard, D.E., Mills, E.W., 2001. Principles of Meat Science, 4th ed. Kendall/Hunt Publishing Company, New York. 354 pp.
- Ahn, D.U., Maurer, A.J., 1989. Effects of added pigments, salt, and phosphate on color, extractable pigment, total pigment, and oxidation–reduction in turkey breast meat. *Poult. Sci.* 68, 1088–1099.
- Albinati, F.L., 1994. Avaliação de diferentes métodos de insensibilização e sangria de rãs. MS Thesis, Universidade Federal de Viçosa. 69 pp. (In Portuguese).
- AMSA, 1991 (9–12 June). Guidelines for meat color evaluation. Proceedings of the 44th Ann. Rec. Meat Conf. National Live Stock and Meat Board and American Meat Science Association, Manhattan, pp. 232–249.
- Beraquet, N.J., 1994. Abate e evisceração. In: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas (Ed.), Abate e processamento de Frangos. FACTA, Campinas, pp. 19–24.
- Boulianne, M., King, A.J., 1998. Meat color and biochemical characteristics of unacceptable dark-colored broiler chicken carcasses. *J. Food Sci.* 63, 759–762.
- Brasil, 1997. Ministério da Agricultura (MA). Secretaria da Defesa Agropecuária (SDA). Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). Divisão de Normas Técnicas. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Aprovado pelo Decreto no. 30.691, de 29-03-52, alterado pelos Decretos nos. 1.255 de 25-06-62, 1.236 de 02-09-94, no. 1.812 de 08-02-96 e no. 2.244 de 04-06-97. Brasília.
- Carpenter, C.H., Cornforth, D.P., Whittier, D., 2001. Consumer preferences for beef color and packaging did not affect eating satisfaction. *Meat Sci.* 57, 359–363.
- Codex Alimentarius, 1984. Recommended international code of hygienic practice for the processing of frog legs. FAO/Codex Alimentarius Commission, Rome. 16 pp.
- Echevarne, C., Renner, M., Labas, R., 1990. Metmyoglobin reductase activity in bovine muscles. *Meat Sci.* 27, 161–172.
- Guzman, J.C., McMillin, K.W., Bidner, T.D., Dugas-Sims, S., Godber, J.S., 1995. Texture, color and sensory characteristics of ground beef patties containing bovine blood proteins. *J. Food Sci.* 60, 657–660.
- Heath, G.B.S., 1984. The slaughter of broiler chickens. *World's Poult. Sci. J.* 40, 151–159.
- Hunt, M.C., Kropf, D.H., 1987. Color and appearance. In: Pearson, A.M., Dutson, T.R. (Eds.), Advances in meat research, vol. 3. AVI Books, New York, pp. 125–159.
- Insausti, K., Beriain, M.J., Purroy, A., Alberti, P., Lizaso, L., Hernandez, B., 1999. Colour stability of beef from different Spanish native cattle breeds stored under vacuum and modified atmosphere. *Meat Sci.* 53, 241–249.
- Jeremiah, L.E., Carpenter, Z.L., Smith, G.C., 1972. Beef colour as related to consumer acceptance and palatability. *J. Food Sci.* 37, 476–479.
- Krzywicki, K., 1979. Assessment of relative content of myoglobin, oxymyoglobin and metmyoglobin at the surface of beef. *Meat Sci.* 3, 1–10.
- Lawrie, R.A., 1998. Lawrie's Meat Science, 6th ed. Woodhead Publishing Limited, England. 313 pp.
- Ledward, D.A., 1985. Post-slaughter influences on the formation metmyoglobin in beef muscles. *Meat Sci.* 15, 149–171.
- Lima, S.L., Cruz, T.A., Moura, O.M., 1999. Ranicultura: Análise da Cadeia Produtiva. Folha de Viçosa, Viçosa. 172 pp.

- Lindhahl, G., Lundstrom, K., Tornberg, E., 2001. Contribution of pigment content, myoglobin forms and internal reflectance to the colour of pork loin and ham from pure breed pigs. *Meat Sci.* 59, 141–151.
- Loaiza, J.F.U., 1996. Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de carne de rã (*Rana catesbeiana*) estocada sob refrigeração e congelamento. MS Thesis, Universidade Federal de Viçosa. 112 pp. (In Portuguese).
- Moura, O.M., 2000. Efeito de métodos de insensibilização e sangria sobre características de qualidade da carne de rã-touro e perfil das indústrias de abate. DS Thesis, Universidade Federal de Viçosa. 208 pp. (In Portuguese).
- O'Keefe, M., Hood, D.E., 1982. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation on beef from muscles of differing color stability. *Meat Sci.* 7, 209–228.
- Ramos, E.M., 2000. Características alométricas, químicas e bioquímicas da rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802). MS Thesis, Universidade Federal de Viçosa. 104 pp. (In Portuguese).
- Ramos, E.M., Gomide, L.A.M., Peternelli, L.A., 2003. Glycolytic and oxidative activities of bullfrog (*Rana catesbeiana*) skeletal muscles during post-metamorphosis growth. Proceedings of the 49th International Congress of Meat Science and Technology, 31 August–5 September 2003, Campinas, Brazil, pp. 101–102.
- Renner, M., Labas, R., 1987. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. *Meat Sci.* 19, 151–165.
- Rickansrud, D.A., Henrickson, R.L., 1967. Total pigments and myoglobin concentration in four bovine muscles. *J. Food Sci.* 32, 57–61.
- Roça, R.O., Padovani, C.R., Filipi, M.C., Schwach, E., Uemi, A., Shinkai, R.T., Biondi, G.F., 2001. Efeitos dos métodos de abate de bovinos na eficiência da sangria. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 21, 244–248.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 1984. Biochemical adaptation for freezing tolerance in the wood frog *Rana sylvatica*. *J. Comp. Physiol., B* 155, 29–36.
- Storey, J.M., Storey, K.B., 1985. Triggering of cryoprotectant synthesis by the initiation of ice nucleation in the freeze tolerant frog *Rana sylvatica*. *J. Comp. Physiol.* 156, 191–195.
- Tam, L.G., Berg, E.P., Gerrard, D.E., Sheiss, E.B., Tan, F.J., Okos, M.R., Forrest, J.C., 1998. Effect of halothane genotype on porcine meat quality and myoglobin autoxidation. *Meat Sci.* 49, 41–53.
- Trout, G.R., 2003. Biochemistry of lipid and myoglobin oxidation in postmortem muscle and processed meats—effects on rancidity. *Braz. J. Food Technol.*, 50–55. Especial Issue (lectures at the 49th International Congress of Meat Science and Technology).
- van Laack, R.L.J.M., Liu, C.H., Smith, M.O., Loveday, H.D., 2000. Characteristics of pale, soft, exudative broiler breast meat. *Poult. Sci.* 79, 1057–1061.
- von Elbe, J.H., Schwartz, S.J., 1996. Colorants. In: Fennema, O.W. (Ed.), *Food chemistry*. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 651–722.
- Warriss, P.D., 1979. The extraction of heme pigments from fresh meat. *J. Food Technol.* 14, 75–80.

Effect of stunning methods on the differentiation of frozen-thawed bullfrog meat based on the assay of β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase

Eduardo M. Ramos^a, Lúcio A.M. Gomide^{a,*}, Alcinéia L.S. Ramos^a,
Luiz Alexandre Peternelli^b

^a Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), Universidade Federal de Viçosa (UFV). Av. PH Rolfs, s/n, Campus Universitário, Viçosa – MG CEP: 36571-000, Brazil

^b Departamento de Informática, Setor de Estatística, DPHUFV, Brazil

Received 5 September 2003; received in revised form 8 January 2004; accepted 8 January 2004

Abstract

The effect of electrical or thermal stunning was investigated by β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) assay after extraction in phosphate buffer to segregate unfrozen (stored in crushed ice) from frozen-thawed bullfrog (*Rana catesbeiana*) *gastrocnemius* muscles. Also investigated were possible influences of the type and time of storage on the upper and lower limits of the HADH assay.

Stunning method and time of storage in crushed ice did not affect ($P > 0.05$) the HADH activity in unfrozen or frozen-thawed muscles. However, HADH values of the frozen ($-18\text{ }^{\circ}\text{C}$) samples increased ($P > 0.05$) over the evaluated period. Nevertheless, it was possible to establish upper and lower HADH values leading to the differentiation of unfrozen from frozen-thawed samples. Samples with HADH values lower than 65 were classified as unfrozen and those with HADH values higher than 69 were classified as frozen-thawed. Samples with HADH values between 65 and 69 were considered as uncertain. Using these limits, a high level of success (96.5%) was attained in distinguishing unfrozen from frozen-thawed bullfrog meat.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Stunning method; Storage type; Differentiation; Unfrozen frog meat; Thawed frog meat

1. Introduction

Frog meat is not only appreciated for its exquisite flavour and texture but also as a source of protein of high biological value (Vieira, 1993). Although, in Brazil, frogs are market as whole carcass, frog meat is usually commercialized as fresh or frozen legs in the international market, with unfrozen legs obtaining higher prices (Lima, Cruz, & Moura, 1999; Pavlov, Garcia de Fernando, Ordonez, & Hoz, 1994). Furthermore, countries such as the United States, Canada and France import live animals, due to the consumers' preference for fresh meat (Lima et al., 1999).

In fact, even in regard to traditional meats, many consumers prefer fresh meat despite its higher cost and lower shelf life. For this reason, selling thawed meat as unfrozen meat, especially poultry and fish, has become a common practice. However, this practice is harmful to the consumers since thawed meat must be quickly consumed, as it is more susceptible to microbial contamination and deterioration. Since the sensory properties of thawed meats are very similar to those of fresh meats, it is almost impossible to distinguish them sensorially. To avoid this type of fraud, research has been conducted on methods for sorting frozen from unfrozen meats.

Gottesmann and Hamm (1983) developed an enzymatic assay to differentiate unfrozen from frozen-thawed meat, using the β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH, EC 1.1.1.35) enzyme released from the mitochondria to the sarcoplasm during the freeze-thawing

* Corresponding author. Tel.: +55-31-3899-1754; fax: +55-31-3899-2208.

E-mail address: lagomide@ufv.br (L.A.M. Gomide).

process. In their method, the enzyme was extracted by pressing the meat between two plexiglass plates. The activity of the HADH enzyme, after extraction by this pressing method, has been successfully used in sorting frozen-thawed from unfrozen meats in different animal species (Billington, Bowie, Scotter, Walker, & Wood, 1992; Chen, Yang, & Guo, 1988; Gottesmann & Hamm, 1983; Toldrá, Torrero, & Flores, 1991). However, it was found unsatisfactory for fish meat (Gottesmann & Hamm, 1983).

More recently, Garcia de Fernando, Fernandez, Diaz, Ordóñez, and Hoz (1992) proposed a new HADH extraction procedure by immersing meat samples in phosphate buffer, which proved to be efficient in sorting unfrozen from frozen-thawed fish. Their method was further tested and validated in fish, and other seafood, by other research groups (Fernández, Mano, García de Fernando, Ordóñez, & Hoz, 1999; Hoz, Fernández, Díaz, Ordóñez, Pavlov, & Garcia de Fernando, 1993; Hoz, Yustes, Camara, Ramos, & Garcia de Fernando, 1992; Pavlov et al., 1994). Furthermore, The HADH extraction method proposed by Garcia de Fernando et al. (1992) is much easier in practice and showed better results in differentiating fresh from thawed frog (*Rana esculenta*) meat (Pavlov et al., 1994).

Brazil is a pioneer country in frog rearing, having developed and disseminated a frog farming system in countries where frogs were obtained by hunting (Lima et al., 1999). Our research group has been conducting research to improve the frog slaughtering process.

The stunning methods presently used in the Brazilian commercial frog slaughtering can be divided into two groups: thermal stunning, i.e., immersing live frogs in a cold water or salt solution bath, and electrical stunning (Albinati, 1994; Lima & Agostinho, 1988; Longo, 1986). The electrical stunning method is more recent (Albinati, 1994; Ayyappan Pillai, 1986) and was found to be more appropriate for frog slaughtering than the traditional stunning methods (Albinati, 1994). However, in a survey conducted by Lima et al. (1999), all frog slaughterhouses operating in Brazil use the thermal stunning method by immersing the frogs in tubs with water and ice.

Most frogs raised in Brazil belong to the bullfrog (*Rana catesbeiana*) species, which has shown the best adaptation capacity and productivity (Longo, 1986; Mello, 1995). During hibernation periods, bullfrog (*R. catesbeiana*) and wood frog (*Rana sylvatica*) are able to produce glucose as a cryoprotective agent in order to protect their energetic metabolism, as shown by the increase of their blood and liver glucose concentrations (Costanzo & Lee, 1993; Steiner, Petenusci, Brentegani, & Branco, 2000; Storey & Storey, 1984, 1985). Therefore, with the likelihood of cryo-protector production stimulation during thermal stunning, differentiating unfrozen from frozen frog muscles by HADH activity may lead to a mistaken interpretation of the storage conditions of

this meat. In this regard, thermally stunned frogs could generate meats with similar HADH activity from both the unfrozen and frozen-thawed samples.

Thus, this research was undertaken to evaluate the effects of the two major frog stunning methods on the phosphate buffer-extracted HADH assay, and to show how this could influence the differentiation of unfrozen from frozen-thawed bullfrog meat.

2. Material and methods

2.1. Animals and slaughtering

One hundred and thirty six bullfrogs (*R. catesbeiana*), of 217 ± 41 g live weight, were harvested at the frog farm system of Universidade Federal de Viçosa and maintained off feed for 24 h (Moura, Gomide, & Ramos, 2001), then separated into two groups, weighed and slaughtered. One group was slaughtered after stunning by immersion in water and ice (1:1) for 15 min (thermal stunning) and the other after electrical stunning (60 V, 60 Hz) for seven seconds (Albinati, 1994). Afterwards, bleeding was accomplished by cutting the frog's cardiac veins (Albinati, 1994) and their carcasses were eviscerated by the alternative method proposed by Loaiza (1996). The *gastrocnemius* muscles were removed and placed in labelled plastic bags.

2.2. Sample storage

To evaluate whether time of frozen storage could lead to incorrect results due to a possible decrease in HADH activity, 28 animals from each stunning group had one of the *gastrocnemius* muscles excised and frozen. After storage (-18 °C) for 2, 30, 65 and 90 days, the frozen samples were thawed overnight at 4 °C and the HADH activity was determined. The effect of the storage time in crushed ice on the HADH activity of unfrozen and frozen-thawed muscles was evaluated in the remaining 80 animals. One *gastrocnemius* muscle, from each animal, was excised, frozen at -18 °C, and stored for two days at the same temperature and thawed overnight at 4 °C before storage in crushed ice. The other *gastrocnemius* muscle, from each animal, was directly stored in crushed ice. Sampling was performed after zero, two, four and six days of storage in crushed ice.

2.3. Assay for HADH activity

Portions of the *gastrocnemius* samples (around 2 g) were weighed, transferred to glass tubes and immersed in two volumes (around 4 ml) of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0). No superficial drippings (minimal due to the high WHC of bullfrog meat) were intentionally removed nor included before muscle cutting and weighing. The

tubes were then kept in a water bath at 25 °C for 15 min and the buffered meat juice was filtered through Whatman paper No. 2. The HADH activity was measured according to the method reported by Garcia de Fernando et al. (1992), slightly modified. The filtrate was assayed for HADH activity by mixing 34 µl of the filtrate in a quartz cuvette with 70 µl of EDTA (34.4 mM) and 860 µl of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.0). The mixture was maintained at room temperature for 3 min before the addition of 40 µl of NADH (1.5 mM) and 20 µl of acetoacetyl-CoA (5.9 mM). Immediately thereafter, the absorbance was measured every 0.5 min up to 3 min, at 340 nm. The HADH value was calculated by multiplying the slope of the linear regression obtained from the spectrophotometric measures by -10^4 .

2.4. Statistical analysis

The four frozen storage data sets were submitted to analysis of variance in a split-plot scheme, with stunning (electro and thermal) method as the main plot and the frozen storage time as the sub-plot, in a complete randomized design. Data for crushed ice storage were submitted to analysis of variance in a split-split-plot scheme, with stunning (electro and thermal) method as the plot, treatment (frozen and unfrozen) as the sub-plot, and crushed ice storage time as the sub-sub-plot, in a complete randomized design. The variance and regression analysis were conducted using the SAS[®] System for Windows[™], v. 8.0 (SAS Institute Inc.), with a significance level of 5%. The 95% confidence limits for the mean were used to establish the upper and lower limits, leading to distinguishing the unfrozen from the frozen-thawed state, under the work conditions.

3. Results and discussion

Bullfrog *gastrocnemius* HADH activity values were unaffected by stunning methods ($P > 0.05$), suggesting that thermal stunning did not induce any significant difference in the amount of cryoprotectants produced in its muscles. This may be due to the short time the animals were subjected to cold temperatures with this stunning

method, compared to the time that frogs survive in cold weather. In this case there may not have been enough time to induce an increase in muscle glucose level, as has been shown in frog's liver and blood (Costanzo & Lee, 1993; Steiner et al., 2000; Storey & Storey, 1984, 1985). Therefore, there would not be enough muscle cryoprotectant to allow minimization of mitochondrial membrane rupture, due to the prevention of formation of large ice crystals by glucose molecules, which would diminish the amount of HADH released in the sarcoplasm. On the contrary, initial results (unpublished data) we have obtained with another set of bullfrog samples show that thermally stunned frogs have lower ($0.86 \mu\text{mol g}^{-1}$) initial post-slaughter muscle glucose levels than electrically stunned frogs ($1.33 \mu\text{mol g}^{-1}$).

Since HADH activity values were not affected ($P > 0.05$) by storage time in crushed ice or by stunning methods, their means were pooled to establish the upper and lower HADH limits leading to the differentiation of unfrozen from frozen-thawed bullfrog meat (Table 1).

The means in Table 1 are different from those reported by Pavlov et al. (1994) for legs (bone-in) of *R. esculenta*. The HADH values obtained for unfrozen bullfrog meat were higher than those reported by these authors, while those obtained for frozen-thawed bullfrog meats were lower. These differences may be due to variations between frog species as well as type of muscle analyzed in each experiment.

Using the average HADH activity (Table 1), and considering a 95% confidence interval, as well as the fact that the samples were normally distributed with different standard deviations, bullfrog meat may be classified as unfrozen when sample HADH values are lower than 65. For HADH values higher than 69 the bullfrog meat should be classified as frozen. Samples showing HADH values ranging from 65 to 69 should be considered as uncertain. With this criterion, 96.5% of the experimental samples were correctly classified, 2.8% were erroneously classified (1.4% fresh samples were classified as frozen and 1.4% thawed samples were classified as unfrozen) and 0.7% was considered uncertain.

The correct classification of bullfrog meat obtained with the HADH limits proposed in this study is very similar to those reported in the literature. In fish meat,

Table 1
HADH activity (means \pm standard deviation) of unfrozen and frozen-thawed bullfrog *gastrocnemius* meat

Treatment	HADH Value		
	Electrical stunning	Thermal stunning	Overall means
Unfrozen ^a	42.9 \pm 10.9 ^x	46.7 \pm 18.0 ^x	44.6 \pm 14.9
Frozen-thawed ^a	119.9 \pm 31.4 ^y	110.1 \pm 28.2 ^y	114.5 \pm 29.9

$n = 40$ samples for each treatment.

Different letters (x, y) within a column of the same stunning method are different ($P > 0.05$).

^a No significance differences ($P > 0.05$) were found within rows.

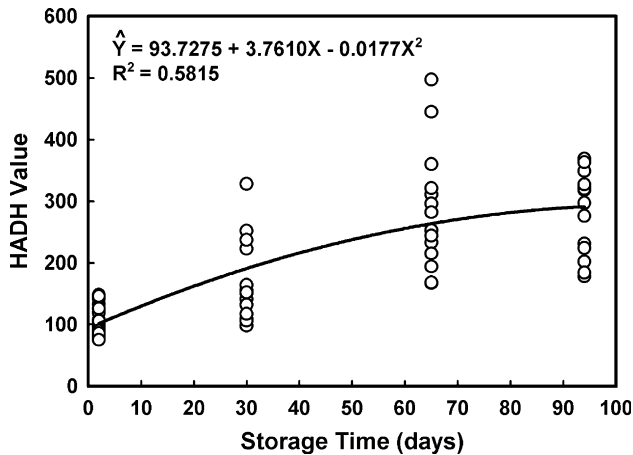


Fig. 1. Change in HADH activity of bullfrog *gastrocnemius* muscle during frozen storage at -18°C .

correct classification was obtained in 95% (Hoz et al., 1992) and 84% (Hoz et al., 1993) of the samples. Pavlov et al. (1994) established HADH limits that allowed 100% correct classification of *R. esculenta* meats.

Contrary to Pavlov et al. (1994), who did not find significant difference in the HADH activity of *R. esculenta* samples between two and thirty days of storage, the storage time at -18°C had ($P > 0.05$) a positive quadratic effect on the bullfrog meat HADH activity (Fig. 1). Hoz et al. (1993) did not find any significant difference in the HADH activity of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) meats between one and six months of storage at -18°C .

Despite the increase in HADH activity with frozen storage time, it was still possible to differentiate between unfrozen and frozen-thawed samples, since unfrozen samples always had smaller ($P > 0.05$) HADH activity values than those of frozen-thawed samples. Thus, longer frozen storage times would only make it easier to differentiate between frozen and unfrozen samples.

4. Conclusions

Stunning method and time of storage in crushed ice do not interfere in the HADH activity of bullfrog *gastrocnemius* muscles, while time of frozen storage positively affects HADH values.

Even for samples previously kept on frozen storage it was possible to establish acceptable limits leading to a high level of success in distinguishing fresh from frozen-thawed bullfrog meat by measuring the HADH activity, of bullfrog *gastrocnemius* muscle, extracted by immersion in phosphate buffer.

References

- Albinati, F.L., 1994. Avaliação de diferentes métodos de insensibilização e sangria de rãs. M.S. Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- Ayyappan Pillai, S. (1986). Development of an apparatus for humane method of killing frogs for frogleg processing industry. (*In Seafood Export Journal*) *Food Science and Technology Abstracts*, 18(9), 177.
- Billington, M., Bowie, H., Scotter, S., Walker, H., & Wood, R. (1992). The differentiation of fresh and frozen-thawed poultry meat by the determination of the β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) activity of chicken breast press juice: collaborative trial. *Journal Association of Public Analysts*, 28, 103–116.
- Chen, M. T., Yang, W. D., & Guo, S. L. (1988). Differentiation between fresh beef and thawed frozen beef. *Meat Science*, 24, 223–226.
- Costanzo, J. P., & Lee, R. E. (1993). Cryoprotectant production capacity of the freeze-tolerant wood frog. *Rana sylvatica*. *Canadian Journal of Zoology*, 71, 71–75.
- García de Fernando, G. D., Fernández, M., Díaz, O., Ordóñez, J. A., & Hoz, L. (1992). An objective method to differentiate between fresh and thawed trout meat *Salmo gairdneri*. *Archiv Für Lebensmittelhygiene*, 43, 13–14.
- Gottesmann, P., & Hamm, R. (1983). New biochemical methods of differentiating between fresh meat and thawed, frozen meat. *Fleischwirtschaft*, 63(2), 219–221.
- Fernández, M., Mano, S., García de Fernando, G. D., Ordóñez, J. A., & Hoz, L. (1999). Use of β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase HADH activity to differentiate frozen from unfrozen fish and shellfish. *European Food Research and Technology*, 209, 205–208.
- Hoz, L., Fernández, M., Díaz, O., Ordóñez, J. A., Pavlov, A., & García de Fernando, G. D. (1993). Differentiation of unfrozen and frozen-thawed kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) from the activity of β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) in aqueous extracts. *Food Chemistry*, 48, 127–129.
- Hoz, L., Yustes, C., Camara, J. M., Ramos, M. A., & García de Fernando, G. D. (1992). β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) differentiates unfrozen from frozen-thawed crawfish (*Procambarus clarkii*) and trout (*Salmo gairdneri*) meat. *International Journal of Food Science and Technology*, 27, 133–136.
- Lima, S. L., & Agostinho, C. A. (1988). *A criação de rãs*. Rio de Janeiro: Editora Globo.
- Lima, S. L., Cruz, T. A., & Moura, O. N. (1999). *Ranicultura: análise da cadeia produtiva*. Viçosa: Folha de Viçosa.
- Loaiza, J.F.U., 1996. Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de carne de rã (*Rana catesbeiana*) estocada sob refrigeração e congelamento. M.S. Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.
- Longo, A. D. (1986). *Manual de ranicultura: uma nova opção da pecuária* (3rd ed.). São Paulo: Ícone.
- Mello, S.C.R.P., 1995. Situação da ranicultura e do mercado de carne de rãs no Brasil. In *Proceedings of the first international meeting of frog research and technology & VIII ENAR – Encontro Nacional de Ranicultura*, vol. 2 (pp.15–22). Viçosa: ABETRA/UFV.
- Moura, F.F., Gomide, L.A.M., & Ramos, E.M., 2001. Efeito do jejum pré-abate sobre a qualidade da carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*). In *Anais do congresso brasileiro de ciência e tecnologia de carnes* (pp.114–115), São Pedro: CTC/ITAL.
- Pavlov, A., García de Fernando, G. D., Ordóñez, J. A., & Hoz, L. (1994). β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) activity of unfrozen and frozen-thawed frog (*Rana esculenta*) legs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 64, 141–143.
- Steiner, A. A., Petenusci, S. O., Brentegani, L. G., & Branco, L. G. S. (2000). The importance of glucose for the freezing tolerance/

- intolerance of the anuran amphibians *Rana catesbeiana* and *Bufo paracnemis*. *Revista Brasileira de Biologia*, 60(2), 321–328.
- Storey, K. B., & Storey, J. M. (1984). Biochemical adaptation for freezing tolerance in the wood frog *Rana sylvatica*. *Journal of Comparative Physiology*, B155(1), 29–36.
- Storey, J. M., & Storey, K. B. (1985). Triggering of cryoprotectant synthesis by the initiation of ice nucleation in the freeze tolerant frog *Rana sylvatica*. *Journal of Comparative Physiology*, B156, 191–195.
- Toldrá, F., Torrero, Y., & Flores, J. (1991). Simple test for differentiation between fresh pork and frozen/thawed pork. *Meat Science*, 29, 177–181.
- Vieira, M. I. (1993). *Rã-touro gigante: características e reprodução* (4th ed.). São Paulo: INFOTEC.