

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/07/2023

At the author's request, the full text of this thesis / dissertation will not be available online until July 6, 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

EXPRESSÃO GÊNICA DA CALPASTATINA E CARACTERÍSTICAS
QUALITATIVAS EM CARNES DE BOVINOS NELORE SUBMETIDAS À
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E MATURAÇÃO

BRUNA DOMENEGHETTI SMANIOTTO

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia, Campus de
Botucatu, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutora.

BOTUCATU, SP
Julho de 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

EXPRESSÃO GÊNICA DA CALPASTATINA E CARACTERÍSTICAS
QUALITATIVAS EM CARNES DE BOVINOS NELORE SUBMETIDAS À
ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E MATURAÇÃO

BRUNA DOMENEGHETTI SMANIOTTO

Médica Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça

Coorientador: Dr. Guilherme Sicca Lopes Sampaio

Coorientadora: Dr^a Cyntia Ludovico Martins

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia, Campus de
Botucatu, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutora.

BOTUCATU, SP
Julho de 2021

S635e Smaniotto, Bruna Domeneghetti
Expressão gênica da calpastatina e características qualitativas em carnes de bovinos nelore submetidas à estimulação elétrica e maturação. / Bruna Domeneghetti Smaniotto. -- Botucatu, 2021
61 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu
Orientador: Roberto de Oliveira Roça
Coorientador: Guilherme Sicca Lopes Sampaio; Cyntia Ludovico Martins

1. Bovinos. 2. Qualidade da carne. 3. Expressão gênica. 4. Matadouros. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

BIOGRAFIA

Bruna Domeneghetti Smaniotto nasceu em 19 de setembro de 1989 na cidade de Bauru – SP, filha de Sivaldo Vanderlei Smaniotto (*in memoriam*) e Vera Lúcia Domeneghetti Smaniotto. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Paulista, Campus Bauru (2008 - 2012). Residência em Medicina Veterinária na área de Patologia Aviária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ (2013 - 2015), Botucatu - SP. Mestrado em Zootecnia na área de Produção Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ (2015 - 2017), Botucatu - SP, com destaque para as áreas de produção de bovinos de corte, manejo racional, bem-estar animal e qualidade da carne bovina. Atualmente é professora no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Paulista - UNIP, Bauru – SP. Em março de 2018 iniciou o doutorado em Zootecnia pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ, Campus Botucatu – SP, sob a orientação do professor Dr. Roberto de Oliveira Roça e coorientação do Dr. Guilherme S. L. Sampaio e Dr^a Cyntia Ludovico Martins.

“Nas tuas asas existem marcas de quem caiu ao tentar voar, mas se as quedas não te destruíram o sonho, mais tarde ou mais cedo esse céu será definitivamente teu. As falhas que outrora foram o teu entrave, tornar-se-ão na tua bússola para que saibas qual a direção a seguir. Far-te-ás sábia das partículas do teu suor, amadurecerás em cada sarar das tuas feridas. A perseverança e a determinação não se esgotarão sem que vejas surgir a tua devida recompensa, porque quem faz da crença a sua força de vontade, é capaz de vergar o muro, e de correr o mundo até que lhe conceda a sua derradeira oportunidade.”

(O menino junto ao rio - Miguel Ribeiro)

Dedicatória

*Aos meus pais, pelo amor, dedicação, apoio e incentivo em todas as minhas
escolhas;*

Ao meu pai Sivaldo, meu amor por você viverá para sempre. Eterna saudade!

A minha mãe Vera, o meu mais puro amor e meu maior orgulho!

A minha irmã Aline e ao meu namorado Junior, todo carinho e amor que existe!

Agradecimentos

Agradeço imensamente minha família, amigos e colegas que acompanharam essa minha jornada. Se vocês estão lendo esta página é porque eu consegui. E acreditem, não foi nada fácil chegar até aqui. Desse longo caminho percorrido nada foi fácil, nem tão pouco tranquilo.

Agradeço com toda a pureza do meu coração aos meus pais, por terem me dado a vida, educação, valores e o verdadeiro significado da palavra “AMOR”.

Ao meu pai Sivaldo (*in memoriam*), que onde quer que esteja, quero que saiba que serei eternamente grata por tudo. Muito obrigada por me amar e confiar em mim. Pai, meu eterno amor. Sei que está e esteve sempre comigo durante todos os momentos desafiadores que vivi até aqui.

Minha mãe, Vera, meu exemplo de vida, minha grande amiga, pela torcida, companheirismo e amor. Meu mais puro amor.

A vocês (pai e mãe) que por inúmeras vezes renunciaram aos teus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, partilho toda a alegria dessa e de tantas outras conquistas. Muito obrigada, mesmo! Amo muito vocês.

Ao meu namorado Junior, pelo amor, companheirismo e incentivo. Amo-te.

Minha irmã Aline, pelo amor e companhia de sempre. Amo-te, irmã.

Ao meu cunhado William pela ajuda e amizade.

À Cláudia da seção de Pós-Graduação em Zootecnia da FMVZ, pelos serviços prestados, pela torcida e amizade. Muito obrigada.

Ao meu orientador professor Roberto de Oliveira Roça e coorientador Guilherme S. L. Sampaio, pela ajuda, compreensão e amizade. Muito obrigada.

À Jéssica Malheiros e Bruno Duran pela grande ajuda e amizade. Agradeço imensamente por tudo.

À professora Maeli Dal Pai pelo apoio laboratorial. À Janaína pela ajuda no desenvolvimento deste projeto. Muito obrigada.

Ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, pela oportunidade concedida de estudar em um curso de excelência.

A todos que de alguma maneira, contribuíram para a realização deste sonho que hoje concretizo. Com vocês, compartilho a alegria desta experiência.

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

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

- Tabela 1.** Genes e primers utilizados para a avaliação de expressão gênica por RT-qPCR 21
- Tabela 2.** Média e desvio padrão das características de qualidade das carnes de bovinos Nelore dos grupos Carne moderadamente dura e Carne muito dura, avaliadas com 48 horas *post-mortem*, submetidas ou não à estimulação elétrica..... 31
- Tabela 3.** Média e desvio padrão das características de qualidade das carnes de bovinos Nelore pertencentes aos grupos Carne moderadamente dura e Carne muito dura oriundas de bovinos Nelore, no decorrer do tempo *post-mortem* 37
- Tabela 4.** Média e desvio padrão das características de qualidade da carne de bovinos Nelore oriunda das meias carcaças submetidas à estimulação elétrica dos grupos experimentais Carne moderadamente dura e Carne muito dura, nos diferentes tempos de maturação 39
- Tabela 5.** Média e desvio padrão das características de qualidade da carne de bovinos Nelore provenientes das meias carcaças submetidas à estimulação elétrica dos grupos experimentais Carne moderadamente dura e Carne muito dura, no decorrer do tempo *post-mortem*..... 41

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Esquema da organização do sarcômero. Adaptado de Gomide; Ramos; Fontes (2013a).....5

Figura 2. Conformação do complexo das troponinas T, C e I no filamento fino do músculo estriado esquelético em repouso (A) e quando na presença de íons cálcio (Ca^{++}). Adaptado de Gomide; Ramos; Fontes (2013b)6

Capítulo II

Figura 1. Expressão relativa (*Log2 fold change*) do gene calpastatina (*CAST*) e isoformas (*CAST 1* e *CAST 2*) do *M. longissimus thoracis* de bovinos da raça Nelore, normalizados com o gene de referência GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). *Diferença significativa ($P < 0,05$) na relação entre os grupos de carne moderadamente dura (CMD) e carne muito dura (CD) (CMD – CD). #Diferença significativa entre os genes *CAST*, *CAST 1* e *CAST 2* ($P < 0,05$), independente do grupo experimental.....25

Figura 2. Monitoramento do pH do *M. longissimus thoracis* oriundos das carcaças de bovinos Nelore dos grupos Carne moderadamente dura e Carne muito dura no decorrer das primeiras 40 horas *post-mortem*. Diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre *CMD e CMDe, entre **CD e CDe, entre #CMD e CD e entre \$CMDe e CDe.....27

Figura 3. Monitoramento da temperatura do *M. longissimus thoracis* oriundos das carcaças de bovinos Nelore dos grupos Carne moderadamente dura e Carne muito dura no decorrer das primeiras 40 horas *post-mortem*. Diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre *CMD e CMDe, entre **CD e CDe, entre #CMD e CD e entre \$CMDe e CDe.....28

Figura 4. Relação entre o declínio do pH e a temperatura do *M. longissimus thoracis* nos grupos de carne moderadamente dura e muito dura, frente às condições propícias ao surgimento de *Heat Toughening* (*High Rigor Temperature*) e de *Cold Shortening*.....30

Figura 5. Efeito da estimulação elétrica de média voltagem na redução da dureza da carne de bovinos Nelore pertencentes ao grupo Carne muito dura com 48 horas *post-mortem*. Letras distintas na linha nas colunas representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.....34

Figura 6. Valores médios de força de cisalhamento (WBSF, kg) da carne de bovinos Nelore com meias carcaças submetidas (esquerdas) ou não submetidas (direitas) à estimulação elétrica. A - grupo Carne muito dura (CD e CDe); B - grupo Carne moderadamente dura (CMD e CMDe). *Diferença estatística significativa ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.....42

SUMÁRIO

	Página
Capítulo I	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Músculo estriado esquelético	4
3.2 Complexo enzimático calpaínas e calpastatina	6
3.3 Estimulação elétrica de carcaças	7
3.4 Maturação	9
4. REFERÊNCIAS	10
Capítulo II	13
Resumo	15
Abstract	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 Animais e formação dos grupos experimentais	18
2.2 Avaliações laboratoriais	20
2.2.1 Expressão gênica de calpastatina e isoformas	20
2.2.2 pH e temperatura	21
2.2.3 Comprimento do sarcômero	21
2.2.4 Exsudação	22
2.2.5 Cor	22
2.2.6 Perda de peso por cozimento	23
2.2.7 Força de cisalhamento	23
2.3 Processamento estatístico dos dados	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
3.1 Expressão gênica de <i>CAST</i> , <i>CAST 1</i> e <i>CAST 2</i>	25
3.2 Declínio do pH e da temperatura muscular no <i>post-mortem</i>	26
3.2.1 pH	26
3.2.2 Temperatura muscular	28
3.2.1 Relação entre o pH e a temperatura muscular	29
3.3 Características de qualidade da carne com 48 horas <i>post-mortem</i>	30
3.4 Características de qualidade da carne nos diferentes tempos de maturação	35
3.5 Características de qualidade da carne após a estimulação elétrica e maturação	38
4. CONCLUSÃO	43
5. REFERÊNCIAS	43
Capítulo III	48
Implicações	49

EXPRESSÃO GÊNICA DA CALPASTATINA E CARACTERÍSTICAS QUALITATIVAS EM CARNES DE BOVINOS NELORE SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E MATURAÇÃO

Resumo

A existência de variabilidade na concentração de calpastatina entre indivíduos do mesmo grupo genético (*Bos taurus indicus*) contribuiu para a falta de padronização da maciez dos cortes cárneos oriundos desses animais e resulta em menor valor agregado ao produto, o que afeta negativamente a competitividade do setor brasileiro no mercado mundial. A estimulação elétrica das carcaças e a maturação tem sido importantes ferramentas tecnológicas utilizadas com o intuito de melhorar a maciez da carne bovina. O objetivo do presente estudo foi associar a expressão do gene da calpastatina (*CAST*) e suas isoformas (*CAST 1* e *CAST 2*) com a dureza da carne de bovinos Nelore submetidos à estimulação elétrica (EE) e à maturação. Foram selecionadas 10 carcaças inteiras, onde as meias carcaças esquerdas foram estimuladas eletricamente, enquanto as suas respectivas direitas, não. Dois grupos experimentais foram formados com base nos valores de força de cisalhamento (WBSF, Warner-Bratzler shear force) das amostras de carnes com 48 horas *post-mortem* (meias carcaças direitas), sendo: Carne moderadamente dura (CMD, 5,0 ± 0,17 kg) e Carne muito dura (CD, 7,28 kg ± 0,43). Amostras do *M. longissimus thoracis et lumborum* de ambas meias carcaças foram submetidas à maturação (7, 14, 21 e 28 dias) e análise da qualidade da carne (48 horas, 7, 14, 21 e 28 dias). Amostras de *M. longissimus thoracis* das meias carcaças direitas foram utilizadas para avaliação da expressão gênica de *CAST*, *CAST 1* e *CAST 2*. As expressões gênicas de *CAST 1* e *CAST 2* foram maiores no grupo de CD comparada ao CMD ($P < 0,05$) e se mostraram superiores à *CAST* ($P < 0,05$), independente do grupo experimental. A EE acelerou o declínio do pH nas primeiras 9 horas *post-mortem*, influenciou ($P < 0,05$) os parâmetros L*, a*, b*, saturação e tonalidade da carne de ambos os grupos experimentais e eliminou as diferenças de WBSF entre os grupos CD e CMD já com 48 horas *post-mortem*. Os presentes resultados sugerem que a EE e maturação contribuem para a redução da dureza da carne de bovinos Nelore mesmo daquelas que apresentam maior expressão de *CAST 1* e *CAST 2*.

Palavras-chave: *Bos indicus*, maciez, padronização, *post-mortem*, proteólise.

GENE EXPRESSION OF CALPASTATIN AND QUALITATIVE CHARACTERISTICS IN NELORE BEEF SUBMITTED TO ELECTRICAL STIMULATION AND MATURATION

Abstract

The existence of variability in the concentration of calpastatin among individuals of the same genetic group (*Bos taurus indicus*) contributes to the lack of standardization of the tenderness of meat cuts from these animals and results in lower added value to the product, which negatively affects the competitiveness of the sector Brazilian market in the world. The electrical stimulation of carcasses and maturation have been important technological tools used in order to improve the tenderness of beef. The aim of the present study was to associate the expression of the calpastatin gene (*CAST*) and its isoforms (*CAST 1* and *CAST 2*) with the toughness of meat from Nellore cattle submitted to electrical stimulation (EE) and maturation. Ten whole carcasses were selected, where the left half carcasses were electrically stimulated, while their respective right half carcasses were not. Two experimental groups were formed based on the values of shear force (WBSF, Warner-Bratzler shear force) of meat samples with 48 hours post-mortem (right half carcasses), as follows: Moderately tough meat (CMD, 5.0 ± 0.17 kg) and Very tough meat (CD, $7.28 \text{ kg} \pm 0.43$). Samples of *M. longissimus thoracis et lumborum* from both half carcasses were submitted to maturation (7, 14, 21 and 28 days) and meat quality analysis (48 hours, 7, 14, 21 and 28 days). Samples of *M. longissimus thoracis* from the right half carcasses were used to evaluate the gene expression of *CAST*, *CAST 1* and *CAST 2*. Gene expressions of *CAST 1* and *CAST 2* were higher in the CD group compared to CMD ($P < 0.05$) and were superior to *CAST* ($P < 0.05$), regardless of the experimental group. The EE accelerated the pH decline in the first 9 hours post-mortem, influenced ($P < 0.05$) the parameters L^* , a^* , b^* , saturation and meat hue of both experimental groups and eliminated the WBSF differences between CD and CMD groups with 48 hours post-mortem. The present results suggest that EE and maturation contribute to the reduction of meat toughness in Nellore cattle, even those with higher expression of *CAST 1* and *CAST 2*.

Keywords: *Bos indicus*, post-mortem, proteolysis, standardization, tenderness.

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo com cerca de 214,7 milhões de cabeças (IBGE, 2019). Deste, 90% são de animais *Bos taurus indicus*, com destaque para a raça Nelore, a qual corresponde a aproximadamente 80% do rebanho de corte nacional (AROEIRA et al., 2016; MCMANUS et al., 2016).

Embora, o Brasil apresente destaque no mercado mundial com grandes volumes de carne bovina exportados anualmente, existem desafios industriais como a falta de padronização da maciez dos cortes cárneos, principalmente, dos oriundos de raças zebuínas (RHEE et al., 2004; CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; LEONELLI; OLIVEIRA, 2016).

A raça Nelore é constantemente utilizada criações e cruzamentos, em razão principalmente da adaptação ao clima e aos sistemas produtivos empregados no país. Em virtude de distintos fatores, dentre eles a atividade de calpastatina presente no músculo durante as modificações *post-mortem*, existe elevada variação na maciez da carne desses animais (AROEIRA et al., 2016; WRIGHT et al., 2018).

Dentre as características intrínsecas de qualidade da carne, a maciez representa o atributo sensorial mais desejado pelo consumidor e está diretamente relacionada à sua satisfação e ao retorno à compra (KIM et al., 2013; MORTON et al., 2018; ZHANG et al., 2019).

A maciez da carne é resultante de inúmeros fatores que se estendem por toda a cadeia produtiva, os quais estão relacionados à raça, nutrição, manejo, técnicas e tecnologias de abate, características das fibras musculares, comprimento dos sarcômeros e atividade das enzimas proteolíticas (FERRAZ; FELÍCIO, 2010; ŻYWICA et al., 2018).

As μ e m-calpaínas estão relacionadas à degradação das proteínas estruturais (nebulina, titina e desmina), as quais contribuem para a estabilidade das fibras musculares (troponinas e tropomiosinas). Entretanto, a atividade proteolítica das calpaínas pode ser controlada por sua inibidora endógena específica, a calpastatina (LEAL-GUTIÉRREZ et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019).

A maior concentração da calpastatina observada nos animais zebuínos, se comparada à dos taurinos, causa impactos negativos na maciez da carne, devido a

menor atividade proteolítica das calpaínas durante o *post-mortem*, e conseqüentemente, menor valor agregado do produto, o que afeta a competitividade do setor no mercado mundial (AROEIRA et al., 2016; WRIGHT et al., 2018)

O emprego de ferramentas capazes de otimizar os processos bioquímicos no *post-mortem*, como a estimulação elétrica (EE) das carcaças e a maturação, tem sido cada vez mais frequente nas indústrias do ramo, pois melhoram a maciez da carne através da maximização e o prolongamento da ação das enzimas proteolíticas (BHAT et al., 2018; ŻYWICA et al., 2018).

Neste contexto, a busca por alternativas que ajudam eliminar as diferenças na maciez da carne entre indivíduos da raça Nelore se faz necessária para a obtenção de produtos mais homogêneos e com maior valor agregado para os mercados consumidores, além de permitir maior valorização da genética bovina predominante no país.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Associar a expressão gênica da calpastatina (*CAST*, *CAST 1* e *CAST 2*) com a dureza da carne e investigar o efeito da estimulação elétrica e maturação no *M. longissimus thoracis et lumborum*.

2.2 Objetivos Específicos

- (1)** Determinar a expressão gênica da calpastatina (*CAST*) e de suas isoformas (*CAST 1* e *CAST 2*) nos grupos (relação) de Carne moderadamente dura e Carne dura de bovinos Nelore e a expressão entre estes genes, independente do grupo experimental avaliado.
- (2)** Avaliar o declínio do pH e da temperatura muscular durante *post-mortem* (1, 3, 6, 9, 12, 24 e 40 horas) nos grupos de Carne moderadamente dura e Carne muito dura de bovinos Nelore.
- (3)** Avaliar a qualidade da carne de bovinos Nelore nos distintos grupos experimentais com 48 horas *post-mortem*.

- (4) Avaliar a qualidade da carne com 48 horas *post-mortem* de carcaças submetidas à estimulação elétrica com tensão crescente e média voltagem nos distintos grupos experimentais.
- (5) Avaliar a qualidade da carne dos distintos grupos experimentais durante o período de maturação (7, 14, 21 e 28 dias).
- (6) Avaliar a qualidade das carnes das meias carcaças submetidas à estimulação elétrica (tensão crescente e média voltagem) e maturação (7, 14, 21 e 28 dias) dos dois grupos experimentais.
- (7) Avaliar o efeito da estimulação elétrica (tensão crescente e média voltagem) nas características de qualidade da carne das meias carcaças esquerdas dos dois grupos experimentais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Músculo estriado esquelético

O músculo estriado esquelético é formado por fascículos que apresentam em seu interior as fibras musculares, as quais são envolvidas por uma membrana de tecido conjuntivo chamada endomísio (KAIMBAYEVA et al., 2019). Estas fibras musculares são constituídas por células longas, cilíndricas, multinucleadas (miofibrilas) e possuem unidades funcionais contráteis e repetidas, chamadas sarcômeros (MONTEIRO; SHIMOKOMAKI, 2000).

Nas miofibrilas, a presença alternada de faixas claras e escuras resultantes da disposição dos filamentos (actina e miosina) no sarcômero concede a aparência estriada ao músculo esquelético (QIAN et al., 2019).

As faixas claras, denominadas bandas I, são compostas por filamentos finos, formados pelas proteínas actina, tropomiosina e pelo complexo das troponinas, enquanto, as faixas escuras (bandas A), são constituídas por filamentos grossos, na sua maioria por miosina. No centro de cada banda I existe uma linha escura nomeada de zona ou disco Z, a qual delimita os limites laterais do sarcômero, onde estão ancorados os filamentos finos (Figura 1) (GUYTON, 1984).

4. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que a dureza da carne de bovinos Nelore está relacionada à expressão das isoformas da calpastatina (*CAST 1* e *CAST 2*). O uso da estimulação elétrica gerou maior taxa de declínio do pH *post-mortem* e reduziu as diferenças de força de cisalhamento entre os grupos já com 48 horas *post-mortem*. A associação da estimulação elétrica com a maturação comercial torna as carnes de bovinos Nelore macias (WBSF \leq 4,4 kg) aos 21 dias, enquanto as apenas maturadas, aos 28 dias. As carnes com maior dureza e expressão de *CAST 1* e *CAST 2* apresentam resposta mais eficiente à estimulação elétrica e à maturação.

5. REFERÊNCIAS

American Meat Science Association. AMSA Meat Color Measurement Guidelines (Updated December 21, 2012), Champaign, Illinois USA: American Meat Science Association, 2012. 136p. Disponível em: Acesso em: Acesso em: 15 ago. 2018.

American Society for Testing and Materials. ASTM F2925-11, Standard specification for tenderness marketing claims associated with meat cuts derived from beef. ASTM International, West Conshohocken, PA, 2018, www.astm.org./ Reapproved 2018.

Aroeira, C.N., Torres Filho, R.A.; Fontes, P.R.; Gomide, L.A.M.; Ramos, A.L.S.; Ladeira, M.M.; R... (2016). Freezing, thawing and aging effects on beef tenderness form *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Meat Science*, 16, 118-125.

Baldassini, W.A.; Braga, C.P.; Chardulo, L.A.L.; Silva, J.A.V.; Malheiros, J.M.; Albuquerque, L.G.; F... (2015). Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine longissimus thoracis muscle tissue with different grades of meat tenderness in the Nelore breed (*Bos indicus*). *Food Chemistry*, 169, 65 – 72.

Balan, P.; Farouk, M.M; Stuart, A.D.; Kemp, R.; Staincliff, M.; Craige, C.; K... (2019). Effects of electrical stimulation and pre-rigor conditioning temperature on aging potential of hot-boned beef *M. longissimus lumborum*. *Anim Science Journal*, 90, 1050–1059.

Bhat, Z.F., Morton, J.D., Mason, S.L., & Bekhit, A.E.D. (2018). Calpain activity, myofibrillar protein profile, and physicochemical properties of beef Semimembranosus and Biceps femoris from culled dairy cows during aging. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, 1 – 10.

Biraima, A.D.A.; Mohammed, A.M.; Webb, E.C. (2019). Effects of electrical stimulation and age at slaughter on carcass and meat quality of two Sudanese Baggara beef types. *South African Journal of Animal Science*, 49, 904 – 913.

Cadavez, V.A.P., Xavier, C., & Gonzales-Barron, U. (2019). Classification of beef carcasses from Portugal using animal characteristics and pH/temperature decline descriptors. *Meat Science*, *153*, 94–102.

Contreras-Castillo, C.J., Lomiwes, D., Wu, G., Frost, D., & Farouk, M.M. (2016). The effect of electrical stimulation on post-mortem myofibrillar protein degradation and small heat shock protein kinetics in bull beef. *Meat Science*, *113*, 65-72.

Cross, H. R., West, R. L., & Dutson, T. R. (1981). Comparison of methods for measuring sarcomere length in beef semitendinosus muscle. *Meat science*, *5*, 261-266.

Ferguson, D.M., Jiang, S.T., Hearnshaw, H., Rymill, S.R., & Thompson, J.M. (2020). Effect of electrical stimulation on protease activity and tenderness of *M. longissimus* from cattle with different proportions of *Bos indicus* content. *Meat Science*, *55*, 265-272.

Ferraz, J.B.S., & Felício, P.E. (2010). Production systems – An example from Brazil. *Meat Science*, *84*, 238-243.

Geesink, G.H., Mareko, M.H.D., Morton, J.D., Bickerstaffe, R. (2001). Electrical stimulation - when more is less. *Meat Science*, *57*, 145 – 151.

Giusti, J., Castan, E., Dal Pai, M., Arrigoni, M.B., Baldin, S.R., & Oliveira, H.N. (2013). Expression of genes related to quality of Longissimus dorsi muscle meat in Nellore (*Bos indicus*) and Canchim (5/8 *Bos taurus* × 3/8 *Bos indicus*) cattle. *Meat Science*, *94*, 247–252.

Gomide, L.A.M., Ramos, E.M., & Fontes, P.R. (2013). Propriedades da carne fresca: Localização da água muscular. In: _____. Ciência e qualidade da carne. Viçosa: Editora UFV, *1*, 156-158.

Gursansky, B, O'Halloran, J.M., Egan, A., & Devine, C.E. Tenderness enhancement of beef from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle following electrical stimulation. (2010). *Meat Science*, *86*, 635-641.

Highfill, C.M., Esquivel-Font, O., Dikeman, M.E., & Kropf, D.H. Tenderness profiles of ten muscles from F1 *Bos indicus* × *Bos taurus* and *Bos taurus* cattle cooked as steaks and roasts. (2012). *Meat Science*, *90*, 881-886.

Hope-Jones, M., Strydom, P.E., Frylinck, I., & Weeb, E.C. (2010). The efficiency of electrical stimulation to counteract the negative effects of β -agonists on meat tenderness of feedlot cattle. *Meat Science*, *86*, 699-705.

Hopkins, D.L.; Ponnampalam, E.N.; Van De Vem, R.J.; Warner, R.D. (2014). The effect of pH decline rate on the meat and eating quality of beef carcasses. *Animal Production Science*, *54*, 407- 413.

- Juárez, M., Basarab, J.A., Baron, V.S., Valera, M., López-Campos, Ó., Larsen, I., & Aalhus, J.L. (2016). Relative contribution electrical stimulation to beef tenderness compared to other production factors. *Canadian Journal of Animal Science*, *96*, 104-107.
- Kilgannon, A. K., Holman, B., Mawson, J., Campbell, M., Collins, D., & Hopkins, D. (2018). Optimising the ez-drip method for aged beef drip loss determination. In: International Congress of Meat Science and Technology (ICOMST), 64, Melbourne. Summary in Annals of Congress. (2018).
- Kim, N.K; Cho, S.; Lee, S.H.; Park, H.R.; Lee, C.S; Cho, Y.M.; C... (2008). Proteins in *longissimus muscle* of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Science*, *80*, 1068-1073.
- Kim, Y.H.B., Lonergan, S.M., Grubbs, J.K., Cruzen, S.M., Fritchen, A.N., Della Malva, A., M... (2013). Effect of low voltage electrical stimulation on protein and quality changes in bovine muscles during *post-mortem* aging. *Meat Science*, *94*, 289-296.
- Leal-Gutiérrez, J.D., Elzo, M.A., Johnson, D.D., Scheffler, T.L., Scheffler, J.M., & Mateescu, R.G. (2018). Association of μ - calpain and calpastatin polymorphisms with meat tenderness in a Brahman-Angus population. *Frontiers in Genetics*, *9*, 1-10.
- Leonelli, F.C.V., & Oliveira, I.R.C. (2016). Percepção dos consumidores sobre os açougues *gourmet*: um estudo multicaso. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, *18*, 79-91.
- Malheiros, J.M., Enríquez-Valencia, C.E., Duran, B.O.S., Paula, T.G., Curi, R.A., & Silva, J.A.I.I.V., D... (2018). Association of *CAST2*, *HSP90AA1*, *DNAJA1* and *HSPB1* genes with meat tenderness in Nellore cattle. *Meat Science*, *138*, 49–52.
- Martins, T.S., Sanglard, L.M.P., Silva, W., Chizzotti, M.L., Ladeira, M.M., & Serão, N.V.L., P... (2017). Differences in skeletal muscle proteolysis in Nellore and Angus cattle might be driven by Calpastatin activity and not the abundance of Calpain/Calpastatin. *Journal of Agricultural Science*, *155*, 1669–1676.
- Mckenna, D. R., King, D. A., & Savell, J. W. (2004). Comparison of clam-shell cookers and electric broilers and their effects on cooking traits and repeatability of Warner-Bratzler shear force values. *Meat Science*, *66*, 225-229.
- Motter, M.M, Corva, P.M., & Soria, L.A. (2021). Expression of calpastatin isoforms in three skeletal muscles of Angus steers and their association with fiber type composition and proteolytic potential. *Meat Science*, *171*, 108267.
- Morton, J.D., Lee, H.Y.Y., Pearson, R.G., & Bickerstaffe, R. (2018). The physical and biochemical effects of pre-rigor high pressure processing of beef. *Meat Science*, *143*, 129-136.

Muniz, M.M.M., Fonseca, L.F.S., Silva, D.B.S., Oliveira, H.R., Baldi, F., Chardulo, A.L., F... (2020). Identification of novel mRNA isoforms associated with meat tenderness using RNA sequencing data in beef cattle. *Meat Science*, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108378>

Oliveira, L.G., Delgado, E.F., Steadham, E.M., Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S.M. (2019). Association of calpain and calpastatin activity to postmortem myofibrillar protein degradation and sarcoplasmic proteome changes in bovine *Longissimus lumborum* and *Triceps brachii*. *Meat Science*, *155*, 50-60.

Pomponio, L.; Ertbjerg, P. (2012). The effect of temperature on the activity of μ - and m-calpain and calpastatin during post-mortem storage of porcine longissimus muscle. *Meat Science*, *91*, p. 50-55.

Raynaud, P, Jayat-Vignoles, C., Laforêt, M.P., Levéziel, H., & Amarger, V. (2005). Four promoters direct expression of the calpastatin gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *437*, p. 69–77.

Savell, J. et al. (1994). Standardized Warner-Bratzler shear force procedures for genetic evaluation. In: National Beef Tenderness Plan Conference, 1-3.

Smith, T., Thomas, M.G., Bidner, T.D., Paschal, J.C., & Franke, D.E. (2009). Single nucleotide polymorphisms in Brahman steers and their association with carcass and tenderness traits. *Genetics and Molecular Research*, *8*, 39-46.

Souza, G.M., Coutinho, M.A.S., Ramos, P.M., Oliveira, G.M., Lonergan, S.M., & Delgado, E.F. (2019). Tough aged meat presents greater expression of calpastatin, which presents postmortem protein profile and tenderization related to Nellore steer temperamento. *Meat Science*, *156*, 131–138.

Steibel, J. P., Poletto, R., Coussens, P. M., Rosa, G. J. M. (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RTPCR data. *Genomics*, *94*, p. 146–152.

Toohey, E.S., Hopkins, D.L., Stanley, D.F., Nielsen, S.G. (2008). The impact of new generation pre-dressing medium-voltage electrical stimulation on tenderness and colour stability in lamb meat. *Meat Science*, *79*, 683 – 691.

Wu, G., Farouk, M.M., Clerens, S., & Rosenvold, K. (2014). Effect of beef ultimate pH and large structural protein changes with aging on meat tenderness. *Meat Science*, *98*, 637–645

Wright, S.A., Ramos, P., Johnson, D.D., Scheffler, J.M., Elzo, M.A., & Mateescu, R.G. (2018). Brahman genetics influence muscle fiber properties, protein degradation and tenderness in an Angus-Brahman multibreed herd. *Meat Science*, *135*, 84-93.

Yuan, H., Kim, B., Stuart, A., Nygaard, G., Rosenvold, K. (2012). High pre rigor temperature limits the ageing potential of beef that is not completely overcome by electrical stimulation and muscle restraining. *Meat Science*, *91*, 62 – 68.

Zeng, Z., Li, C., & Ertbjerg, P. (2017). Relationship between proteolysis and water-holding of myofibrils. *Meat Science*, *131*, 48 – 55.

Zhang, Y., Ji, X., Mao, Y., Luo, X., Zhu, L., & Hopkins, D.L. (2019). Effect of new generation medium voltage electrical stimulation on the meat quality of beef slaughtered in a Chinese abattoir. *Meat Science*, *149*, 47-54.

Zywica, R., Modzelewska- Kapitula, M., Banach, J.K., Tkacz, K. (2018). Linear correlation between pH value of stimulated beef and electrical current intensity. *International Journal of Food Properties*, *21*, 1386 – 1394.

CAPÍTULO III

IMPLICAÇÕES

A falta de padronização da maciez da carne brasileira, oriunda de bovinos de raças zebuínas, e a predominância do abate de animais da raça Nelore, notoriamente conhecidos por apresentarem menor maciez da carne, representam dois dos grandes desafios encontrado nas indústrias do ramo, onde a busca por ferramentas capazes de otimizar os processos bioquímicos no *post-mortem*, como a estimulação elétrica das carcaças e a maturação comercial, tem sido cada vez mais frequentes (BHAT et al., 2018; ŻYWICA et al., 2018).

Estudos como este que buscam alternativas para melhorar a qualidade da carne, mais precisamente a maciez, de animais que apresentam genética *Bos taurus indicus*, popularmente conhecida por produzirem carne “dura” (WBSF > 4,4 kg), se tornam de extrema importância na busca por carnes com maciez mais homogênea para os mercados consumidores, além de permitir maior valorização da genética bovina predominante no país.

Este estudo demonstrou resultados satisfatórios na redução da dureza da carne de bovinos da raça Nelore quando na utilização da estimulação elétrica e da maturação.

Resultado relevante neste estudo, foi a variação na expressão gênica de *CAST 1* e *CAST 2* entre indivíduos do mesmo grupo genético, idade, sexo e criação, e, que estas isoformas estavam mais relacionadas à dureza da carne desses do que o gene completo da calpastatina (*CAST*). Além disso, as carnes que apresentaram maior dureza com 48 horas *post-mortem* ($7,28 \pm 0,42$ kg) e expressão de *CAST 1* e *CAST 2* ($P < 0,05$) aparentemente apresentaram resposta mais eficiente à estimulação elétrica e à maturação.

Na literatura, alguns estudos também encontraram resultados semelhantes, porém a maioria observou a relação da dureza da carne de bovinos da raça Nelore com apenas uma isoforma do gene calpastatina (*CAST*).

Com os resultados observados neste estudo supõe-se que os mecanismos que ocorrem durante o *post-mortem* e a resposta aos efeitos da estimulação elétrica e da maturação sejam distintos em carnes com maior dureza e expressão de *CAST* e / ou das suas isoformas, demonstrando a complexidade dos fatores determinantes para esta característica na carne destes animais.