

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 <i>post-mortem</i> , 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 <i>post-mortem</i>	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 <i>post-mortem</i>	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*) contribui 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, $5,0 \pm 0,17$ kg) e Carne muito dura (CD, $7,28 \text{ kg} \pm 0,43$). 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 consequentemente, 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).

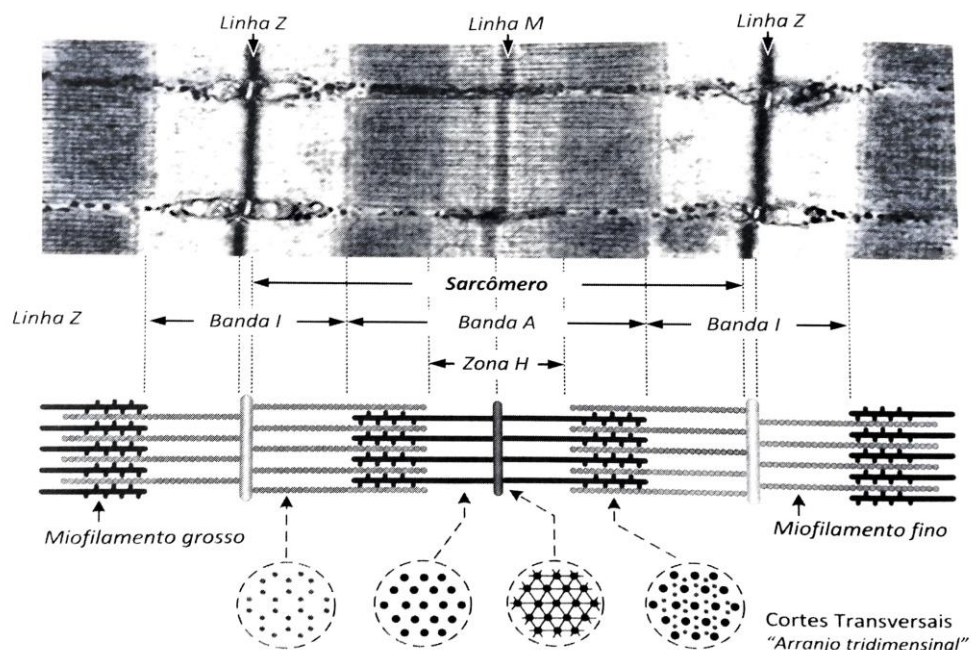


Figura 1: Esquema da organização do sarcômero. Adaptado de Gomide; Ramos; Fontes (2013a).

O complexo das troponinas contribui na estabilidade das fibras musculares e para a contração muscular. Este complexo é composto pelas proteínas troponina T, troponina C e troponina I, localizadas em pontos específicos da tropomiosina, no filamento fino. A troponina C é o local de ligação dos íons cálcio (Ca^{++}), enquanto a troponina I permite a ligação entre os filamentos de actina e a tropomiosina. Já, a troponina T realiza a ligação do complexo das troponinas (troponinas C e I) aos demais componentes dos filamentos finos (tropomiosina e actina) (Figura 2) (WRIGHT et al., 2018).

A proteína miofibrilar desmina está localizada ao redor dos discos Z, sendo importante para a manutenção da integridade estrutural das miofibrilas (BHAT et al., 2018). Quando esta é degradada, durante o *post-mortem*, a integridade e a organização das fibras musculares são perdidas, e com isso, ocorre uma contribuição para o aumento da maciez da carne (FU et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

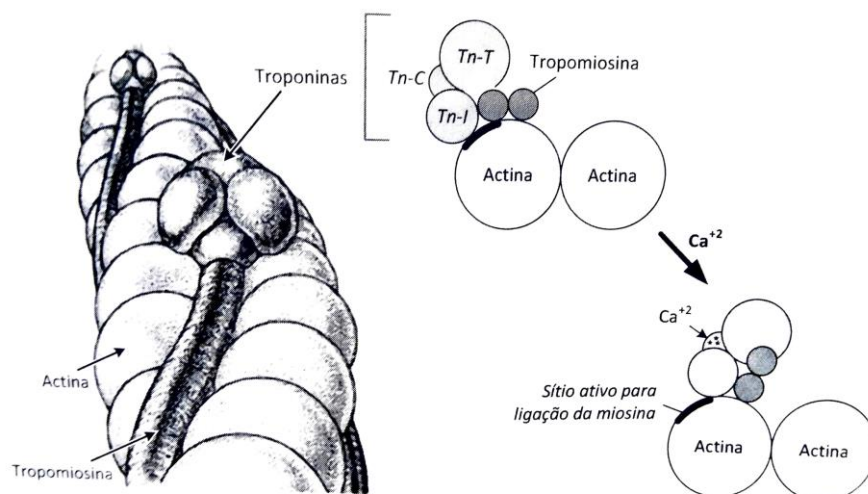


Figura 2: Conformação do complexo das troponinas T, C e I no filamento fino do músculo em repouso (A) e quando na presença de íons cálcio (Ca^{++}). Adaptado de Gomide; Ramos; Fontes (2013b).

3.2 Complexo enzimático calpaínas e calpastatina

Os eventos bioquímicos mediados pela ação de proteases endógenas que ocorrem durante a resolução do *rigor mortis* e a extensão da atividade proteolítica contribuem para a maciez da carne (MORTON et al., 2018).

Diversas enzimas proteolíticas representadas pelas caspases, catepsina e calpaínas exercem função na proteólise muscular (DANG et al., 2020). Entretanto, o sistema enzimático das calpaínas atua na degradação das principais proteínas estruturais das miofibrilas (troponina-T, desmina, nebulina, titina), e está envolvido no enfraquecimento da estrutura miofibrilar (POMPONIO; ERTBJERG, 2012; ZENG; LI; ERTBJERG, 2017).

No músculo esquelético, as proteases cálcio dependentes (μ -calpaína e m-calpaína) e sua inibidora específica, a calpastatina, estão localizadas no sarcoplasma e próximo ao disco Z (KUMAMOTO et al., 1992). Ambas calpaínas são dependentes de íons cálcio livre no sarcoplasma, adequada temperatura e pH para serem ativadas (POMPONIO; ERTBJERG, 2012; YANG; DASHDORJ; HWANG, 2018).

A μ -calpaína é considerada a principal calpaína envolvida no amaciamento da carne. Esta necessita de pouca quantidade de íons cálcio livre para ser ativada (3 a 50 μM) e devido a isso, participa precocemente da proteólise *post-mortem*. A m-calpaína também desempenha função significativa neste processo, porém, de forma mais tardia, já que depende de maior concentração de íons cálcio livre (400 a 800 μM) para ser

ativada, sendo os níveis deste mineral muito baixos para isso no início do *post-mortem* (ZENG; LI; ERTBJERG, 2017; BHAT et al., 2018; COLLE et al., 2018).

No início do *post-mortem*, com a temperatura ainda elevada (38 a 40°C), a ausência de estímulo nervoso e a presença de ATP, os íons cálcio ainda são bombeados (bomba de cálcio) para o interior dos retículos sarcoplasmáticos, onde permanecem armazenados. Como nesta fase as reservas de oxigênio nas fibras musculares não foram totalmente exauridas, ocorre o armazenamento deste mineral também pelas mitocôndrias (JI; TAKAHASHI et al., 2006).

Conforme o tempo *post-mortem* aumenta, juntamente com a queda da temperatura e do pH, e o esgotamento das reservas de ATP e de oxigênio, ocorre aumento da concentração de íons cálcio nas miofibrilas, devido à liberação destes das mitocôndrias para o interior do sarcoplasma e a redução da atividade das bombas de cálcio, resultando na contração muscular irreversível (*rigor mortis*) (DANG et al., 2020).

Animais *Bos taurus indicus* apresentam menor maciez da carne frente aos *Bos taurus taurus* (AROEIRA et al., 2016). Isso se deve, a maior frequência de indivíduos com maior atividade de calpastatina na subespécie *Bos taurus indicus*, o que inibe a ação das calpaínas e ocasionam menor degradação das proteínas miofibrilares (MARTINS et al., 2017; WRIGHT et al., 2018).

Neste cenário, a busca por ferramentas tecnológicas que possam contribuir para a melhoria da qualidade e padronização da maciez da carne de bovinos zebuínos é indispensável para a conquista de novos mercados, maior valorização do produto nacional e aceitação pelos consumidores.

3.3 Estimulação elétrica de carcaças

A estimulação elétrica (EE) é uma ferramenta tecnológica que consiste na aplicação e transmissão de corrente elétrica nas carcaças com o objetivo de melhorar a qualidade final da carne (ŻYWICA et al., 2018).

Foi inicialmente empregada nas indústrias frigoríficas a fim de reduzir a ocorrência do encurtamento dos sarcômeros pelo frio (“*Cold shortening*”) e, consequentemente, o aparecimento de carne firme, seca e escura (DFD - do inglês “*dark, firm and dry*”) (LOCKER; DAINES, 1975).

A EE pode ser dividida em três tipos de sistemas, de acordo com os valores de tensão elétrica (Volt - V) aplicados na carcaça, em baixa (< 100 V), média (100 - 300 V) e alta tensão (> 300 V). Os parâmetros elétricos empregados, também levam em consideração a forma de onda, a frequência de pulso, a taxa de resfriamento, a resistência, a duração e a espécie animal envolvida (ZHANG et al., 2019).

As contrações musculares geradas pela aplicação do estímulo elétrico externo nas carcaças aceleram o consumo das reservas de glicogênio muscular e o acúmulo de grande quantidade de ácido láctico causando o rápido declínio do pH e a antecipação da instalação do *rigor mortis* (KIM et al., 2013; JUÁREZ et al., 2016; BIRAIMA, MOHAMMED, WEBB; 2019).

A EE causa efeito mecânico de ruptura nas fibras musculares e maior liberação de Ca^{++} do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma, gerando condições ideais para a ativação das enzimas proteolíticas responsáveis pelo amaciamento da carne (KIM et al., 2013; CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; JUÁREZ et al., 2016).

Estudos anteriores mostraram menor força de cisalhamento (JUÁREZ et al., 2016; BIRAIMA; MOHAMMED; WEBB, 2019), maior taxa de declínio do pH (KIM et al., 2013; ZHANG et al., 2019) e redução da integridade estrutural das miofibrilas (LUO; ZHU; ZHOU, 2008) das carnes provenientes de carcaças estimuladas eletricamente.

Ao avaliarem o efeito da estimulação elétrica (EE) na atividade da calpastatina, na força de cisalhamento e na avaliação sensorial em amostras de *M. longissimus lumborum* de bovinos de três grupos genéticos (100% Brahman, 50% Brahman / Hereford e 100% Hereford), Ferguson et al. (2000) observaram diminuição na força de cisalhamento (45%) de animais com maior percentagem de genótipo Brahman (100%) se comparada a animais meio sangue taurino e 100% Hereford e que, neste caso, a EE reduziu substancialmente as diferenças de maciez da carne entre as raças.

Os efeitos da EE no sistema calpaína – calpastatina foram mostrados no estudo de Hope-Jones et al. (2010) com bovinos da raça Bonsmara, onde os autores observaram que a EE foi capaz de reduzir a atividade de calpastatina e aumentar a das calpaínas (μ e m – calpaína) nas primeiras 24 horas no grupo de carnes com alta força de cisalhamento (5,8 kg), comparada ao seu controle (4,1 kg) ($P < 0,05$).

Neste contexto, o emprego da estimulação elétrica das carcaças pode ser uma ferramenta de auxílio para possibilitar maior padronização da maciez da carne de bovinos *Bos taurus indicus*.

3.4 Maturação

A maturação é um evento natural que tem início logo após o abate e marca o processo de transformação do músculo em carne, onde proteínas estruturais (nebulina, titina e desmina) e que contribuem para a estabilidade das fibras musculares (troponinas e tropomiosinas) são degradadas pela ação das enzimas proteolíticas (calpaínas, caspases e catepsinas) (POMPONIO; ERTBJERG, 2012; ZENG; LI; ERTBJERG, 2017).

Na indústria, a maturação comercial é rotineiramente empregada, sendo a via úmida a mais utilizada, método onde as carnes *in natura* desossadas são embaladas à vácuo e mantidas refrigeradas em temperatura entre 0° e 2° C por períodos variáveis após o abate (BERGER et al., 2018).

O principal objetivo da maturação comercial é promover o prolongamento da atividade das enzimas proteolíticas (caspases, catepsina e calpaínas) responsáveis pela proteólise muscular e, conseqüentemente, contribuir para a maciez e a suculência da carne (BHAT et al., 2018).

Com o processo de transformação do músculo em carne e a maturação, as calpaínas são ativadas e migram do interior do sarcoplasma para as regiões das linhas Z e das bandas I localizadas nas miofibrilas do músculo estriado esquelético, onde iniciam a atividade proteolítica, gerando a alteração da estrutura e a redução da tensão isométrica do tecido muscular (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016).

Esta redução da tensão isométrica do tecido muscular ocorre em virtude da degradação das proteínas estruturais (titina, desmina, nebulina, troponina – T, entre outras), resultando em ruptura e fragmentação das junções entre as bandas I e as linhas Z e entre estas e o sarcolema (DANG et al., 2020).

Imediatamente após o abate dos animais, a μ -calpaína é a primeira enzima a ser ativada e sua atividade é reduzida gradativamente conforme o tempo *post-mortem* aumenta. Ao avaliarem o comportamento das atividades de μ e m – calpaína no *M. longissimus lumborum* e *M. semimembranosus* de bovinos durante o processo de maturação (2, 3, 4, 14, 28 e 42 dias *post-mortem*), Colle; Doumit (2017), observaram a diminuição gradativa da atividade das duas calpaínas no decorrer dos dias de maturação, porém essa redução não se comportou de forma semelhante em ambos os músculos avaliados.

4. REFERÊNCIAS

AROEIRA, C.N. et al. Freezing, thawing and aging effects on beef tenderness from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Meat Science**, v. 16, p. 118-125, 2016.

BHAT, Z.F. et al. 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**, v. 42, p. 1-10, 2018.

BIRAIMA, A.D.A.; MOHAMMED, A.M.; WEBB, E.C. 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**, v.49, n.5, p. 904-913, 2019.

BERGER, J. et al. Dry-aging improves meat quality attributes of grass-fed beef loins. **Meat Science**, v.145, p. 285–291, 2018.

COLLE, M.J.; DOUMIT, M.E. Effect of extended aging on calpain-1 and -2 activity in beef *longissimus lumborum* and *semimembranosus* muscles. **Meat Science**, v. 131, p. 142–145, 2017.

COLLE, M.J. et al. Strategies to improve beef tenderness by activating calpain-2 earlier postmortem. **Meat Science**, v.135, p. 36-41, 2018.

CONTRERAS-CASTILLO, C.J. et al. The effect of electrical stimulation on post-mortem myofibrillar protein degradation and small heat shock protein kinetics in bull beef. **Meat Science**, v. 113, p. 65-72, 2016.

DANG, D.S. et al. Inhibition of mitochondrial calcium uniporter enhances postmortem proteolysis and tenderness in beef cattle. **Meat Science**, v. 162, p. 1-9, 2020.

FERGUSON, D.M. et al. Effect of electrical stimulation on protease activity and tenderness of *M. longissimus* from cattle with different proportions of *Bos indicus* content. **Meat Science**, v.55, p. 265-272, 2000.

FERRAZ, J.B.S.; FELÍCIO, P.E. Production systems – An example from Brazil. **Meat Science**, v. 84, p. 238-243, 2010.

FU, Q. et al. Influence of modified atmosphere packaging on protein oxidation, calpain activation and desmin degradation of beef muscles. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 4508–4514, 2017.

GOMIDE, L.A.M.; RAMOS, E.M.; FONTES, P.R. Estrutura muscular: músculos e tecidos associados. In:_____. **Ciência e qualidade da carne**. Viçosa: Editora UFV, 2013a, p. 57-78.

GOMIDE, L.A.M.; RAMOS, E.M.; FONTES, P.R. Bioquímica e metabolismo muscular: Bioquímica da contração muscular. In:_____. **Ciência e qualidade da carne**. Viçosa: Editora UFV, 2013b, p. 79-103.

GUYTON, A.C. Contração do músculo esquelético. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Interamericana, 1984, p.103 – 107.

HOPE-JONES, M. et al. The efficiency of electrical stimulation to counteract the negative effects of β -agonists on meat tenderness of feedlot cattle. **Meat Science**, v. 86, 2010, p. 699-705.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **PPM 2019: após dois anos de queda, rebanho bovino cresce 0,4%**, 2019. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/29163-ppm-2019-apos-dois-anos-de-queda-rebanho-bovino-cresce-0-4>>. Acesso em: 28 de dezembro de 2020.

JI, J.R.; TAKAHASHI, K. Changes in concentration of sarcoplasmic free calcium during post-mortem ageing of meat. **Meat Science**, v. 73, p.395 – 403, 2006.

JUÁREZ, M. et al. Relative contribution electrical stimulation to beef tenderness compared to other production factors. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 96, p. 104-107, 2016.

KAIMBAYEVA, L. et al. Evaluation of autolysis induced histologic alterations in skeletal muscle tissue of non-traditional meat animals. **Food Science and Technology**, v. 20, p. 1-5, 2019.

KIM, Y.H.B. et al. Effect of low voltage electrical stimulation on protein and quality changes in bovine muscles during postmortem aging. **Meat Science**, v. 94, p. 289-296, 2013.

KUMAMOTO, T. et al. Localization of the Ca (2+)-dependent proteinases and their inhibitor in normal, fasted, and denervated rat skeletal muscle. **The Anatomical Record**, v. 232, p. 60 – 77, 1992.

LEAL-GUTIÉRREZ, J.D. et al. Association of μ - calpain and calpastatin polymorphisms with meat tenderness in a Brahman-Angus population. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n.56, p. 1-10, 2018.

LEONELLI, F.C.V.; OLIVEIRA, I.R.C. Percepção dos consumidores sobre os açougues *gourmet*: um estudo multicaso. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v.18, n.1, p.79-91, 2016.

LOCKER, R.H.; DAINES, G.J. *Rigor mortis* in beef sternomandibularis muscle at 37°C. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.26, n.11, p. 1721-1733, 1975.

LUO, X.; ZHU, Y.; ZHOU, G. Electron microscopy of contractile bands in low voltage electrical stimulation beef. **Meat Science**, v. 80, p. 948–951, 2008.

MARTINS, T.S. et al. 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**, n. 155, p. 1669–1676, 2017.

- MCMANUS, C. et al. Dynamics of cattle production in Brasil. **PLOS ONE**, v. 11, n.1, p. 1-15, 2016.
- MONTEIRO, E.M.; SHIMOKOMAKI, M. Inter-relação da estrutura muscular e textura da carne. **EMBRAPA – Pecuária Sul, Circular Técnica**, v.18, 35 p., 2000.
- MORTON, J.D. et al. The physical and biochemical effects of pre-rigor high pressure processing of beef. **Meat Science**, v. 143, p.129-136, 2018.
- OLIVEIRA, L.G. et al. Association of calpain and calpastatin activity to postmortem myofibrillar protein degradation and sarcoplasmic proteome changes in bovine *Longissimus lumborum* and *Triceps brachii*. **Meat Science**, v. 155, p. 50-60, 2019.
- POMPONIO, L.; ERTBJERG, P. The effect of temperature on the activity of μ - and m-calpain and calpastatin during post-mortem storage of porcine **longissimus** muscle. **Meat Science**, v. 91, n. 1, p. 50-55, 2012.
- QIAN, S. et al. Effects of low voltage electrostatic field thawing on the changes in physicochemical properties of myofibrillar proteins of bovine *Longissimus dorsi* muscle. **Journal of Food Engineering**, v.261, p. 140-149, 2019.
- RHEE, M.S. et al. Variation in palatability and biochemical traits within and among eleven beef muscles. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 534-550, 2004.
- YANG, J.; DASHDORJ, D.; HWANG, I. Effect of the Calpain System on Volatile Flavor Compounds in the Beef *Longissimus lumborum* Muscle. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v.38, n.3, p. 515-529, 2018.
- WRIGHT, S.A. et al. Brahman genetics influence muscle fiber properties, protein degradation and tenderness in an Angus-Brahman multibreed herd. **Meat Science**, v. 135, p. 84-93, 2018.
- ZENG, Z.; LI, C.; ERTBJERG, P. Relationship between proteolysis and water-holding of myofibrils. **Meat Science**, v.131, p. 48–55, 2017.
- ZHANG, Y. et al. Effect of new generation medium voltage electrical stimulation on the meat quality of beef slaughtered in a Chinese abattoir. **Meat Science**, v. 149, p.47-54, 2019.
- ZHANG, C. et al. Regulation of calpain-1 activity and protein proteolysis by protein nitrosylation in postmortem beef. **Meat Science**, v. 141, p. 44-49, 2018.
- ZYWICA, R. et al. Linear correlation between pH value of stimulated beef and electrical current intensity. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 1386 – 1394, 2018.

CAPÍTULO II

Esta pesquisa resultará em um artigo que será submetido à revista *Meat Science*, ISSN 0309-1740, conforme as suas regras de publicação, disponíveis em: <<https://www.elsevier.com/journals/meat-science/0309-1740/guide-for-authors>>.

EXPRESSÃO GÊNICA DA CALPASTATINA E DUREZA DA CARNE DE BOVINOS NELORE SUBMETIDOS À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA E MATURAÇÃO

Resumo

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 e à maturação. Foram selecionadas 10 carcaças inteiras de uma população de 40 animais. Amostras do *M. longissimus thoracis* das meias carcaças direitas foram colhidas para avaliação de expressão gênica. As meias carcaças esquerdas correspondentes foram submetidas à estimulação elétrica (EE). O pH e a temperatura das meias carcaças foram mensurados durante as primeiras 40 horas *post-mortem* (1, 3, 6, 9, 12, 24 e 40 horas). Posteriormente, 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). Dois grupos experimentais foram formados por meio dos valores de força de cisalhamento (WBSF) das amostras com 48 horas, oriundas das meias carcaças direitas, sendo: Carne moderadamente dura (CMD; n = 5) e carne muito dura (CD; n = 5). Os genes CAST1 e CAST2 apresentaram maior expressão no grupo de CD comparada ao CMD ($P < 0,05$). A expressão de CAST 1 e CAST 2 se mostrou superior ao CAST ($P < 0,05$), independente do grupo experimental. As meias carcaças estimuladas apresentaram menores valores de pH ($P < 0,05$) nas primeiras 9 horas *post-mortem* em relação às suas respectivas meias carcaças não estimuladas, independente do grupo experimental. As meias carcaças não estimuladas do grupo CD apresentaram maior perda de peso por cozimento ($P < 0,05$) com 48 horas após o abate comparada às do grupo CMD. A EE e a maturação influenciaram significativamente ($P < 0,05$) aos 7 e 28 dias a cor (L^* , a^* e b^*), a saturação e a tonalidade da carne de ambos os grupos experimentais. As diferenças de WBSF entre os grupos CD e CMD com o uso da EE foram reduzidas já com 48 horas *post-mortem*. A associação da EE e a maturação antecipou em 7 dias a reclassificação das carnes de bovinos Nelore para macias (WBSF $\leq 4,4$ kg). 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 NELLORE CATTLE MEAT TOUGHNESS SUBMITTED TO ELECTRICAL STIMULATION AND MATURATION

Abstract

The objective of the present study was to associate the expression of the calpastatin gene (*CAST*) and its isoforms (*CAST 1* and *CAST 2*) with Nellore beef evaluated at electrical stimulation and maturation. Ten whole carcasses were selected from a population of 40 animals. Samples of *M. longissimus thoracis* from right half carcasses were collected for gene expression evaluation. The corresponding left half carcasses were subjected to electrical stimulation (EE). Half carcass pH and temperature were measured during the first 40 hours *post-mortem* (1, 3, 6, 9, 12, 24 and 40 hours). Subsequently, made *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). Two experimental groups were formed by means of the shear force values (WBSF) of the 48 hours old, from the right half carcasses, as follows: Moderately tough meat (CMD; n = 5) and very tough meat (CD; n = 5). The *CAST 1* and *CAST 2* genes expressed greater expression in the CD group compared to CMD ($P < 0.05$). The expression of *CAST 1* and *CAST 2* was superior to *CAST* ($P < 0.05$), regardless of the experimental group. The stimulated half carcasses had lower pH values ($P < 0.05$) in the first 9 hours *post-mortem* compared to their best non-stimulated half carcasses, regardless of the experimental group. The unstimulated half carcasses of the CD group dissipated greater weight cooking loss ($P < 0.05$) at 48 hours after slaughter compared to those of the CMD group. The EE and the maturation along the course ($P < 0.05$) at 7 and 28 days the color (L^* , a^* and b^*), the saturation and the hue of the meat of both experimental groups. WBSF differences between CD and CMD groups with the use of EE were reduced as early as 48 hours *post-mortem*. The association of EE and maturation anticipated by 7 days the reclassification of Nellore beef to tender (WBSF ≤ 4.4 kg). The present results obtained 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.

1. INTRODUÇÃO

A maciez da carne representa o atributo sensorial mais desejado pelo consumidor e está diretamente relacionada à sua satisfação e ao seu retorno à compra (Kim et al., 2013; Morton et al., 2018; Zhang et al., 2019).

Fatores intrínsecos e extrínsecos aos animais influenciam a maciez da carne bovina. Dentre os fatores intrínsecos (*ante-mortem*) estão, a raça, o sexo, a idade e a concentração de calpastatina (*CAST*), enquanto os extrínsecos (*post-mortem*) estão relacionados com a temperatura de resfriamento, o declínio do pH e a atividade das enzimas proteolíticas (Ferraz & Felício, 2010; Żywica et al., 2018).

Carnes oriundas de bovinos de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*) são conhecidas por serem menos macias. Isso se deve principalmente à maior concentração e atividade da calpastatina, considerada importante inibidora endógena específica das proteases cálcio dependentes (μ -calpaína e m-calpaína), as quais são responsáveis pelo amaciamento da carne durante a proteólise *post-mortem* (Aroeira et al., 2016; Leal-Gutiérrez et al., 2018; Wright et al., 2018; Oliveira et al., 2019).

A existência de variabilidade na concentração de *CAST* entre indivíduos do mesmo grupo genético (*Bos taurus indicus*) contribui para a falta de padronização da maciez dos cortes cárneos oriundos desses animais e resulta em menor valor agregado ao produto, afetando negativamente a competitividade do setor no mercado mundial (Contreras-Castillo et al., 2016; Leonelli & Oliveira, 2016; Wright et al., 2018).

Estudos anteriores têm demonstrado os efeitos benéficos proporcionados pela estimulação elétrica (EE) para a maciez da carne bovina por causar a aceleração da glicólise e do declínio do pH, otimização das enzimas proteolíticas (Kim et al., 2013; Juárez et al., 2016; Biraima, Mohammed, & Webb, 2019), redução da *CAST* e aumento da atividade de μ e m – calpaína em até 24 horas *post-mortem* (Hope-Jones et al., 2010).

O emprego da EE também foi capaz de minimizar ou até mesmo remover as diferenças de maciez entre animais de genótipos *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* nos estudos de Ferguson et al. (2000), Gursansky et al. (2010) e Highfill et al. (2012).

No estudo de Gursansky et al. (2010), ao compararem carnes de bovinos (100 %) *Bos taurus taurus* e (100 %) *Bos taurus indicus*, observaram maior força de cisalhamento (WBSF) daquelas oriundas das carcaças zebuínas não estimuladas ($P < 0,05$). No entanto, quando foi realizada a EE, a WBSF entre ambos os genótipos passou a ser semelhante ($P > 0,05$).

A maturação comercial também contribui para a melhoria da maciez da carne. Nesta ocorre o prolongamento da atividade das enzimas proteolíticas (caspases, cathepsina e calpaínas) responsáveis pela degradação das proteínas estruturais (nebulina, titina e desmina) e daquelas que contribuem para a estabilidade das fibras musculares (troponinas e tropomiosinas) (Pomponio & Ertbjerg, 2012; Zeng, Li, & Ertbjerg, 2017; Bhat et al., 2018).

O emprego de alternativas capazes de contribuir para a redução das diferenças na maciez da carne entre indivíduos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) permitiria a comercialização de produtos mais homogêneos para os mercados consumidores, com maior valor agregado e utilizando a genética bovina predominante no país.

Neste contexto, o objetivo deste estudo é associar a expressão gênica da calpastatina (*CAST*, *CAST 1* e *CAST 2*) com a dureza da carne de bovinos Nelore e investigar o efeito da estimulação elétrica e da maturação no *M. longissimus thoracis et lumborum* na qualidade da carne.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo (subprojeto) foi avaliado e aceito pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, também, sob o protocolo de nº 0211/2018.

2.1 Animais e formação dos grupos experimentais

Para a realização deste estudo foram utilizadas 10 carcaças bovinas inteiras de uma população inicial de 40 animais da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), machos, não castrados, de mesmo lote de confinamento e propriedade rural, com média de idade de 18 meses e peso médio das carcaças de $266,58 \pm 15,44$ kg.

Os animais foram abatidos em frigorífico localizado na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, distante a 24 km da propriedade de origem.

No momento do abate, cada carcaça inteira foi identificada e dividida ao meio gerando duas meias carcaças cada (direita, $n = 10$ e esquerda, $n = 10$) por animal. Em até 30 minutos após a sangria, foram colhidos com o auxílio de bisturi, fragmentos (10 g/amostra) do *M. longissimus thoracis* na altura da 11ª costela de cada meia carcaça

direita e armazenados individualmente em sacos Nasco Whirl-Pak® identificados, congelados em nitrogênio líquido (-196°C) e mantidos em Biofreezer (-80°C) para posterior realização das avaliações de expressão gênica de calpastatina (CAST) e de suas isoformas (CAST 1 e CAST 2).

As meias carcaças esquerdas (n = 10) de cada animal foram submetidas, no final do abate, à estimulação elétrica de média voltagem com tensão crescente de 20, 40, 60 e 80 V_{RMS}, frequência de 12,5 Hz, amplitude entre 200 e 500 V, durante 52 segundos (13 segundos cada) e por onda senoidal unipolar com picos equidistantes de largura máxima de 8,3 ms, através do contato da mesma com 4 pares de eletrodos, sendo 2 localizados na região da paleta e os outros dois na do garrão. Os parâmetros elétricos do estimulador elétrico foram obtidos com *digital phosphor oscilloscope* (DPO 2014 - Tektronix®)

Em seguida, todas as meias carcaças (n = 20) foram encaminhadas à câmara fria e os valores de pH (potencial hidrogeniônico) e a temperatura foram avaliados (1, 3, 6, 9, 12, 24 e 40 horas) com auxílio de peagômetro (Hanna®, modelo HI98163) e termômetro de penetração (Testo do Brasil®) entre a 12ª e 13ª costela (Kim et al., 2013; Martins et al., 2017).

Após transcorridas 40 horas *post-mortem*, foi colhido todo o *M. longissimus thoracis et lumborum* (13ª vértebra torácica à 6ª vértebra lombar) das meias carcaças direitas (n = 10) e esquerdas (n = 10). Em seguida, cada contrafilé (25 cm) proveniente de cada meia carcaça direita e esquerda, foi dividido em 5 subamostras (bifes) de 2,5 cm cada, as quais foram individualmente embaladas à vácuo. As subamostras com 48 horas *post-mortem* foram congeladas à - 20 °C e as demais foram submetidas à maturação por 7, 14, 21 e 28 dias entre 2 e 4° C em câmara de resfriamento e conforme completavam os tempos de maturação, eram congeladas a - 20 ° C e mantidas a esta temperatura até a realização das avaliações de qualidade da carne.

A formação dos grupos experimentais foi realizada com base nos valores de força de cisalhamento (WBSF, *Warner-Bratzler shear force*) das amostras de carnes com 48 horas *post-mortem* oriundas das meias carcaças direitas (n = 10). Deste modo, foram constituídos dois grupos experimentais, contendo 5 carcaças inteiras cada, sendo: CMD - Carne moderadamente dura (WBSF = 5,0 ± 0,17 kg) e CD - Carne muito dura (WBSF = 7,28 kg ± 0,43) (Malheiros et al., 2018), considerando carne macia quando WBSF ≤ 4,4 kg (American Society for Testing and Materials, 2018), sendo que dentro de cada grupo experimental, as meias carcaças esquerdas (n = 10) foram estimuladas

eletricamente (CMDe e CDe), enquanto as meias carcaças direitas (n = 10), não (CMD e CD).

2.2 Avaliações laboratoriais

Para a realização das avaliações, as subamostras de *M. longissimus thoracis et lumborum* de 48 horas *post-mortem* e de 7, 14, 21 e 28 dias de maturação dos grupos CMD e CD foram descongeladas em incubadora B.O.D. (M4 415 - Marconi®) a 4 ° C por 24 horas.

2.2.1 Expressão gênica de calpastatina e isoformas

Para a avaliação da expressão gênica da calpastatina (*CAST*) e suas isoformas (*CAST 1* e *CAST 2*) foi utilizado o método citado por Malheiros et al. (2018) com algumas modificações.

O RNA total das amostras do *M. longissimus thoracis* colhidos das meias carcaças direitas (n=10) pertencentes aos grupos CMD e CD no tempo de até 30 minutos após a sangria foi extraído por meio da homogeneização de 100 mg do músculo em 1ml de Trizol® (Life Technologies Corporation, EUA). A concentração e a pureza do RNA total extraído foi determinada com auxílio de espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e a integridade por eletroforese em gel de agarose a 1%.

O RNA total extraído foi tratado com o kit DNase turbo DNAfree™ (Ambion, Life Technologies, EUA), para a remoção do DNA genômico contaminante.

Para a síntese de cDNA foi utilizado 1 µg de RNA total para reação de 20 µl, utilizando o High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Foram utilizados quatro pares de primers, sendo três genes candidatos (*CAST*, *CAST1* e *CAST2*) e um endógeno (*GAPDH* - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) (Tabela 1).

A avaliação da estabilidade dos genes de referência foi realizada utilizando o software GeNorm™ e NormFinder®, e, para os ensaios de RT-qPCR, em duplicata, o sistema QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems).

As amostras de cDNA e os primers foram amplificados utilizando o Fast SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Tabela 1. Genes e *primers* utilizados para a avaliação da expressão gênica por RT-qPCR

Gene	Sequência do <i>primer</i> (5' - 3')	Marca
<i>CAST</i> (NELORE <i>CAST</i>)	F: ATG AGG AAA CAG TCC CAT CG R: GGG CTT GGG TTT TTC TTC AG	
<i>CAST 1</i> (NELORE <i>CAST 1</i>)	F: CAC CCA GGA GCA TGT CAG TA R: ACT GCT CCC AAG GCT TGT T	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen®)
<i>CAST 2</i> (NELORE <i>CAST 2</i>)	F: TGC AAG CTG GTG GTA CAA GA R: GAG AGC TGA CTG CTC CCA AG	
<i>GAPDH</i> (NELORE <i>GAPDH</i>)	F: CCG TTC GAC AGA TAG CCG TAA R: CGA CCT TCA CCA TCT TGT CTC A	

CAST: calpastatina, *CAST 1*: calpastatina 1, *CAST 2*: calpastatina 2, *GAPDH*: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, *F*: iniciador, *R*: reverso.

2.2.2 pH e temperatura

O pH e a temperatura das subamostras dos dois grupos experimentais (CMD e CD) também foram obtidos no laboratório, utilizando um medidor portátil de pH e temperatura (Hanna®, modelo HI98163), calibrado com soluções tampões de pH 4,0 e 7,0 (Merck), em temperatura ambiente.

2.2.3 Comprimento do sarcômero

A avaliação do comprimento dos sarcômeros foi realizada por meio da medida indireta, utilizando a difração de raio laser, conforme descrito por Cross, West e Dutson (1981).

Nesta, foram utilizadas as subamostras de *M. longissimus thoracis et lumborum* colhidas das meias carcaças (CMD e CD) direita e esquerda (n = 20) com 48 horas *post-mortem*.

Com o auxílio de uma pinça e bisturi, foram colhidos fragmentos do *M. longissimus thoracis et lumborum* no sentido das fibras musculares de aproximadamente 2 x 2 x 1 cm de cada subamostra e armazenados individualmente em tubos Falcon® contendo solução (pH 7,2) de glutaraldeído (5 %) e 0,1M de Na₂HP0₄ por 4 horas a 10°C para fixação. Em seguida, a

solução foi removida e o fragmento lavado com solução (pH 7,2) de sacarose (0,2 M) a 10 ° C.

Em uma lâmina de microscopia, com auxílio de uma pinça e bisturi, foram depositados 10 miofibrilas oriundas das fibras musculares removidas de cada tubo Falcon®, adicionada uma gota de solução de sacarose e lamínula para posterior leitura e medição dos sarcômeros em equipamento de feixe de laser de hélio e neônio 117A (Spectra Physics Inc®) com 633 nm de comprimento de onda.

Os padrões de difração de 10 miofibrilas / subamostra foram obtidos através da disposição destas sobre a luz do laser e os valores das 10 medições por subamostra em mm (milímetros) mensurados com um paquímetro digital 150mm/6" CD-6" CSX-B – Mitutoyo®, e em seguida, utilizados para o cálculo do CS em micrômetros (µm), através da seguinte equação: [comprimento de sarcômero (µm) = $0,0006328 \times D \times T^2/D^2 + 1 / T$] x 100, onde “D” representa a distância entre o local de medição e a subamostra e, “T” a distância entre 2 bandas de difração (mm).

2.2.4 Exsudação

Subamostras do *M. longissimus thoracis et lumborum* com 48 horas *post-mortem* foram submetidas à avaliação da exsudação da carne, conforme descrito por Kilgannon et al. (2018). A EZ foi obtida pela seguinte equação: [EZ-DripLoss (%) = $(W1 - Wc) \times 100 / (Wt - Wc)$], onde “W1” representa o peso do recipiente contendo o exsudato, “Wc”, o peso do recipiente vazio, e, “Wt” o peso do recipiente contendo a carne e o exsudato.

2.2.5 Cor

A coloração instrumental foi realizada com o auxílio do colorímetro Konica Minolta® DL65, ângulo de visão de 0°, com iluminação difusa e componente especular, modelo CR 410, Câmera Co., Ltd Osaka, Japan e calibrado com padrão cerâmico branco.

Após o descongelamento das subamostras dos dois grupos experimentais (CMD e CD), a superfície fresca da carne foi exposta a 4°C por

30 minutos para permitir a oxigenação. Além disso, foram realizadas três leituras em diferentes pontos da superfície de cada subamostra.

Nestas, foram obtidos os parâmetros L^* , a^* e b^* do sistema CIELab (Commission Internationale de l'Eclairage – CIE, 1976), onde L^* representa a luminosidade ($L^*=0$ preto e $L^*=100$ branco), a^* representa intensidade de vermelho, variando de verde (0 a -60) a vermelho (0 a +60) e b^* intensidade do amarelo, variando de azul (0 a -60) ao amarelo (0 a +60), e, o ângulo de tonalidade (Hue angle) (TON) e a saturação (Chroma) (SAT) obtidos, respectivamente, pelas equações $hab = \arctan b^*/a^*$ e $C = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$ (American Meat Science Association, 2012).

2.2.6 Perda de peso por cozimento

As subamostras (CMD e CD) utilizadas para a avaliação da cor foram pesadas (peso inicial) e em seguida, cozidas em chapa elétrica de dupla resistência modelo Grill Mega 2N (Britânia®) pré-aquecida (170°C). Durante o cozimento, a temperatura interna de cada subamostra foi monitorada com auxílio de termômetro digital Simpla® TE07-AKLA26248. Ao atingirem a temperatura interna de 40°C, as subamostras foram viradas e ao atingirem a temperatura interna de 71 °C foram retiradas do processo de cozimento.

As amostras foram mantidas em temperatura ambiente até atingirem a temperatura superficial de 25 °C (laser Incoterm® -7662.02.0.00), as quais foram novamente pesadas (peso final), embaladas individualmente em papel laminado e mantidas refrigeradas por 12 horas entre 2° e 4° C.

A determinação da diferença percentual entre os pesos pré e pós-cozimento foi obtida através da fórmula $[PPC = (P_i - P_f) / P_i] \times 100$ (Mckenna, King, & Savell, 2004).

2.2.7 Força de cisalhamento

A avaliação da força de cisalhamento foi determinada por meio do método descrito por Savell et al. (1994) nas subamostras colhidas com 48 horas *post-mortem* e daquelas submetidas aos 7, 14, 21 e 28 dias de maturação de ambos os grupos (CMD e CD).

Após o cozimento, oito cilindros 1,27 cm de diâmetro e 2,5 cm de comprimento foram obtidos, no sentido da fibra muscular, através de uma guia

de corte (furadeira de bancada Chiaperini® - CH FB-13 -350W) e analisados em texturômetro modelo 15W- CT3 25K (Brookfield®) equipado com conjunto de lâmina Warner-Bratzler com capacidade de 25 kg e velocidade do seccionador de 20cm/min.

Os resultados obtidos pela média dos valores dos oito cilindros foram expressos em kg, sendo considerada, segundo a American Society for Testing and Materials (2018), carne macia quando $WBSF \leq 4,4$ kg.

2.3 Processamento estatístico dos dados

O gene *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como gene endógeno após avaliação da estabilidade por meio do *software* RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>). A expressão relativa dos genes alvo *CAST*, *CAST1* e *CAST2* foi calculada conforme proposto por Steibel, Poletto, Coussens, & Rosa (2009) e estes genes foram normalizados por meio do *GAPDH*. O modelo abaixo foi utilizando para quantificar a expressão relativa dos genes:

$$Y_{gik} = \mu + \alpha_i + \beta_g + \gamma_k + \epsilon_{gik}$$

Onde: Y_{gijk} = Ct obtido pelo software do termociclador para o gene g (gene endógeno e os genes alvo), no rt poço da placa (referente à replica técnica) proveniente da amostra do animal k pertencente ao grupo i . μ = efeito do grupo i na expressão do gene g . α_i = efeito específico do gene g na maciez da carne do animal k . β_g = efeito específico da amostra (captura as diferenças entre as amostras que são comuns a ambos os genes, particularmente os que afetam a concentração de RNA, tal como extração diferencial ou eficiências de amplificação entre amostras). ϵ_{gik} = refere-se ao resíduo.

Os fenótipos de qualidade da carne entre os dois grupos experimentais foram analisados utilizando o procedimento MIXED disponível no programa estatístico SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) e os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$, pelo teste de Tukey.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Expressão gênica de *CAST*, *CAST 1* e *CAST 2*

A calpastatina (*CAST*) é uma protease endógena sarcoplasmática considerada a principal responsável pela menor maciez da carne de bovinos *Bos taurus indicus*, por inibir a ação proteolítica das enzimas dependentes de cálcio (calpaínas) durante as modificações *post-mortem* (Motter, Corva, & Soria, 2021).

Embora seja relatada na literatura científica significativa associação entre a expressão do gene *CAST* e a dureza da carne bovina (Smith et al., 2009; Giusti et al., 2013; Souza et al., 2019), no presente estudo esta associação não foi observada.

A figura 1 demonstra a expressão relativa (*Log2 fold change*) dos genes *CAST*, *CAST 1* e *CAST 2* do grupo Carne moderadamente dura (CMD) em relação ao Carne muito dura (CD) (CMD – CD) e a comparação da expressão entre estes genes, independente do grupo experimental. O gene *CAST* não apresentou diferença significativa na sua expressão entre os grupos experimentais (CMD – CD), cujas meias carcaças não foram submetidas à estimulação elétrica (direitas) ($P > 0,05$), porém foi inferior à expressão das isoformas *CAST 1* e *CAST 2* ($P < 0,05$). As expressões de *CAST 1* e *CAST 2* foram significativamente maiores no grupo CD em relação ao grupo CMD e ao gene *CAST* ($P < 0,05$).

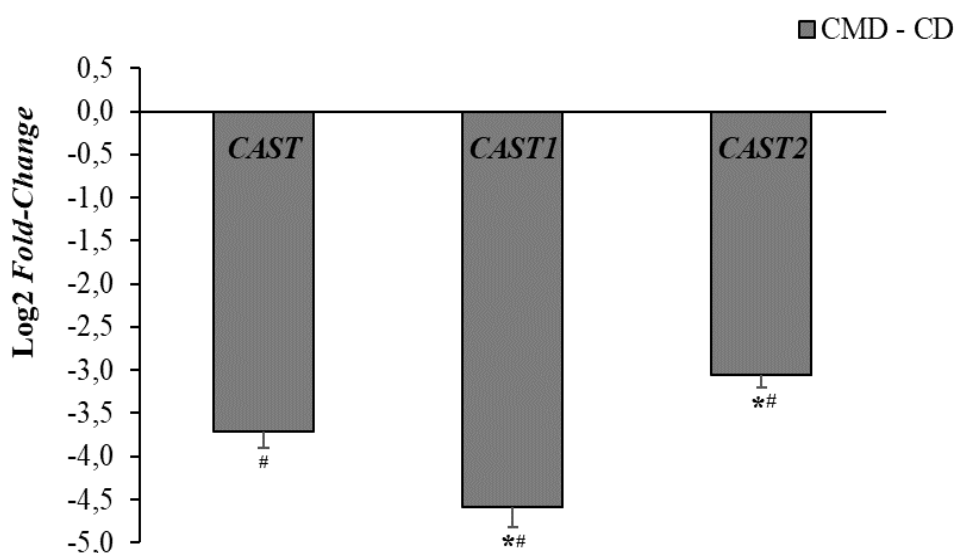


Figura 1. Expressão relativa (*Log2 fold change*) do gene calpastatina (*CAST*) e isoformas (*CAST 1* e *CAST 2*) do *M. longissimus thoracis* de bovinos da raça Nelore, normalizados com o gene de referência GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). *Diferença significativa ($P < 0,05$) na relação 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.

Em bovinos, o gene *CAST* que codifica a enzima calpastatina possui 35 exons (regiões codificantes) e diversos promotores (regiões do DNA onde iniciam as transcrições de RNA) que possibilitam a transcrição de vários mRNAs por meio do processo de *splicing* alternativo, originando diferentes isoformas da proteína, com sequências que diferem quase que completamente umas das outras (Motter, Corva, & Soria, 2021).

A existência de heterogeneidade dessas isoformas determina o mecanismo e o controle da atividade inibitória da *CAST* sobre os vários produtos do gene que codificam as calpaínas. Esta diferenciação da transcrição dos promotores do gene *CAST* e seus diferentes mecanismos de atuação são responsáveis pela variação da expressão da *CAST* e da maciez da carne entre indivíduos da mesma espécie e raça (Raynaud et al., 2005), podendo esta ser, em parte, uma explicação para o comportamento distinto das expressões de *CAST*, *CAST 1* e *CAST 2* encontradas neste estudo, entre os genes e entre os grupos experimentais.

De maneira semelhante ao observado neste estudo, Malheiros et al. (2018) também não encontraram diferença significativa na expressão do gene *CAST* nas carnes de bovinos Nelore com moderada ($5,68 \pm 0,78$ kg) ou alta ($8,04 \pm 1,5$ kg) força de cisalhamento (*Warner-Bratzler shear force* - WBSF). Estes resultados diferem dos observados por Souza et al. (2019), onde a expressão do gene *CAST* ($P < 0,05$) se mostrou superior nas carnes de animais Nelore com alta WBSF (9,65 kg).

Considerando os valores de WBSF de $5,0 \pm 0,17$ kg e $7,20 \pm 0,43$ kg, para os grupos Carne moderadamente dura e Carne muito dura, respectivamente, e a ausência de diferença significativa na expressão do gene *CAST* ($P > 0,05$) entre estes grupos e entre as isoformas *CAST 1* e *CAST 2*, podemos afirmar que, neste caso, as isoformas apresentaram uma relação mais direta com a dureza da carne dos grupos avaliados. Este resultado difere dos de Souza et al. (2019), onde não encontraram diferença ($P > 0,05$) na expressão de *CAST 1* e *CAST 2* entre grupos de bovinos Nelore com alta (9,63 kg) e baixa (3,68 kg) WBSF.

3.2 Declínio do pH e da temperatura muscular no *post-mortem*

3.2.1 pH

O pH do *M. longissimus thoracis* mensurado com 1, 3, 6, 9, 12, 24 e 40 horas *post-mortem* não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) entre as meias carcaças não estimuladas (direitas) e entre as meias estimuladas (esquerdas) dos grupos de Carne

moderadamente dura (CMD) e Carne muito dura (CD). Porém, quando as meias carcaças não estimuladas (direitas) de ambos os grupos experimentais foram comparadas com suas respectivas meias carcaças estimuladas (esquerdas), os valores de pH diferiram até 9 horas após o abate ($P < 0,05$), demonstrando um declínio mais acelerado naquelas submetidas à estimulação elétrica (Figura 2).

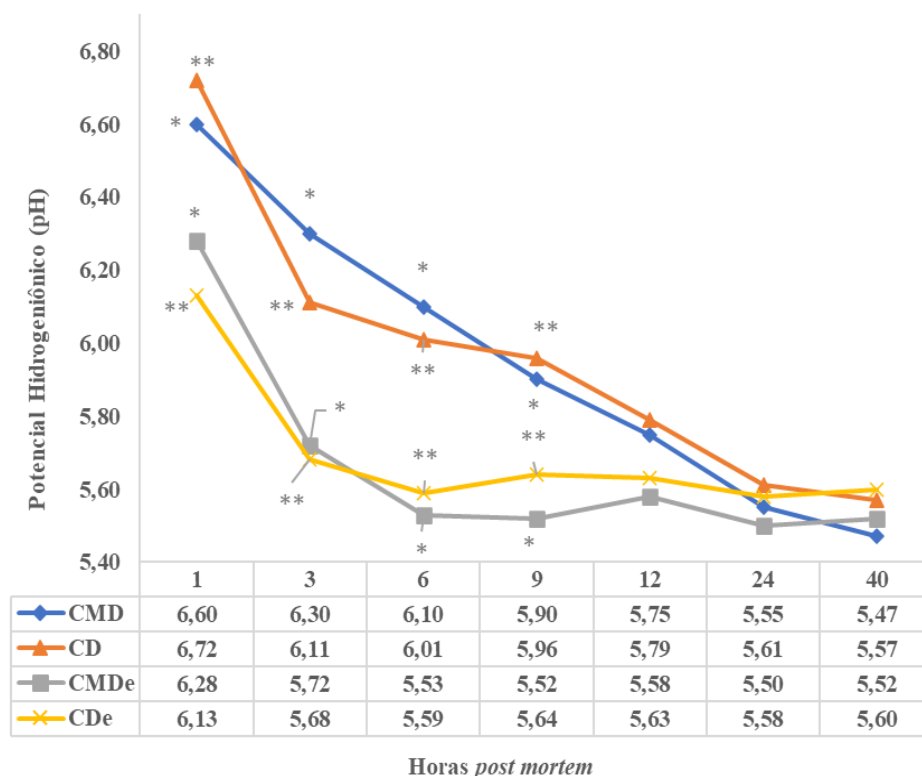


Figura 2. Monitoramento do pH do *M. longissimus thoracis* oriundos das carcaças de bovinos Nelore dos grupos Carne moderadamente dura e Carne muito dura no decorrer das primeiras 40 horas *post-mortem*. Diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre *CMD e CMDe, entre **CD e CDe, entre #CMD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

Este resultado corrobora aos de Kim et al. (2013) e de Balan et al. (2019), onde o emprego da estimulação elétrica (EE) nas carcaças de bovinos foi capaz de acelerar a queda do pH nas primeiras 40 horas *post-mortem* ($P < 0,05$).

As contrações musculares provocadas pela aplicação do estímulo elétrico externo nas carcaças aceleram o consumo das reservas de glicogênio muscular e resultam no acúmulo de grande quantidade de ácido lático, o qual leva ao rápido

declínio do pH e antecipação da instalação do *rigor mortis* (Kim et al., 2013; Juárez et al., 2016; Biraima, Mohammed, & Webb, 2019).

3.2.2 Temperatura muscular

Diferentemente do que foi observado para o pH, nenhuma diferença significativa ($P > 0,05$) foi encontrada para os valores nas médias da temperatura muscular nas primeiras 40 horas *post-mortem*, quando compradas as meias carcaças estimuladas (esquerdas – CMDe x CDe), não estimuladas (direitas – CMD x CD) e entre as estimuladas e não estimuladas (CMD x CMDe, CD x CDe), dos grupos de Carne moderadamente dura e Carne muito dura (Figura 3).

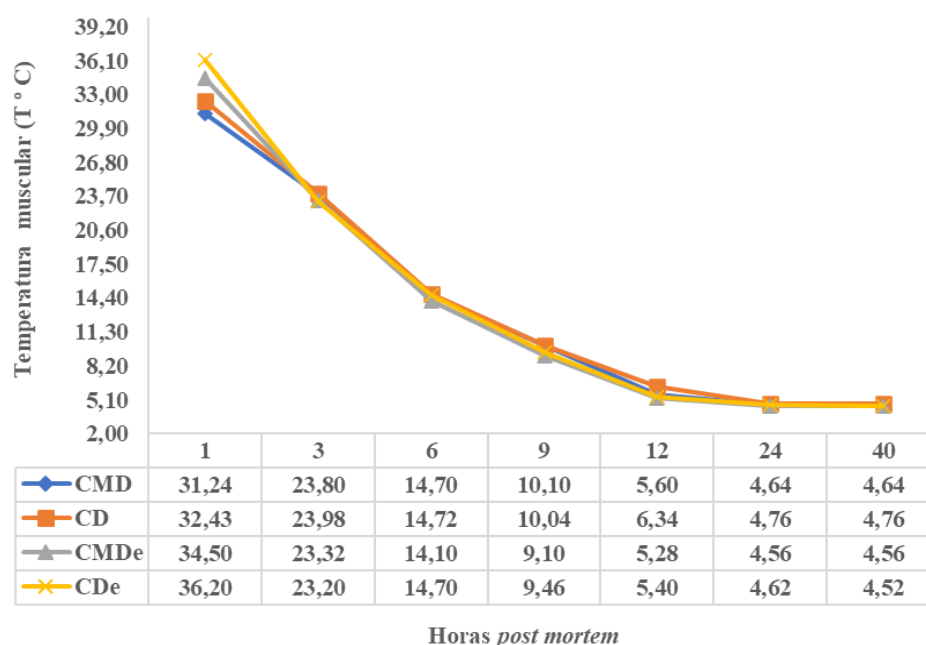


Figura 3. Monitoramento da temperatura do *M. longissimus thoracis* oriundos das carcaças de bovinos Nelore dos grupos Carne moderadamente dura e Carne muito dura no decorrer das primeiras 40 horas *post-mortem*.

CMD: grupo carne moderadamente dura, meias carcaças direitas (não estimuladas).

CD: grupo carne muito dura, meias carcaças direitas (não estimuladas).

CMDe: Meias carcaças esquerdas estimuladas, grupo carne moderadamente dura.

CDe: Meias carcaças esquerdas estimuladas, grupo carne muito dura.

3.2.3 Relação entre o pH e a temperatura muscular

A relação existente entre a velocidade do declínio do pH e da temperatura muscular que antecede a instalação do *rigor mortis* (pH 6,0), tem grande influência nas características de qualidade da carne, principalmente, na maciez (Wu et al., 2014).

Em condições ideais o início do *rigor mortis* deve ocorrer em pH 6,0, em temperatura entre 15 e 20 ° C, e o pH final se estabilizar entre 5,5 e 5,8 dentro de 24 horas após o abate. Nos casos em que o início do *rigor mortis* (pH 6,0) ocorre em temperaturas entre 22 ° a 35 °C, os músculos sofrem encurtamento pelo calor (*High Rigor temperature*), e quando nesta condição de pré-rigor são resfriados a temperaturas inferiores a 12°C, sofrem encurtamento pelo frio (*Cold shortening*). Ambas as situações de *High Rigor temperature* e *Cold shortening*, influenciam negativamente a qualidade da carne, principalmente a maciez (Cadavez, Xavier, & Gonzales-Barron, 2019).

Na figura 4 pode ser observada a importante relação entre o declínio do pH e da temperatura durante a transformação do músculo em carne (*rigor mortis*), além das condições (“janelas”) que desencadeiam o surgimento de *High Rigor temperature* e *Cold shortening*. Nota-se que tanto as meias carcaças não estimuladas (direitas) do grupo Carne moderadamente dura (CMD) quanto às do Carne muito dura (CD) passaram próximo da “janela” do *Cold shortening*, atingindo pH 6,0 em uma faixa de temperatura muscular entre 10° e 15° C. Já, as suas respectivas meias carcaças esquerdas estimuladas (CMDe e CDe) passaram longe das “janelas” de *High Rigor temperature* e *Cold shortening*, com pH 6,0 em temperatura de 25° a 30° C para as do grupo Carne moderadamente dura e de 30 a 35°C para as do Carne muito dura.

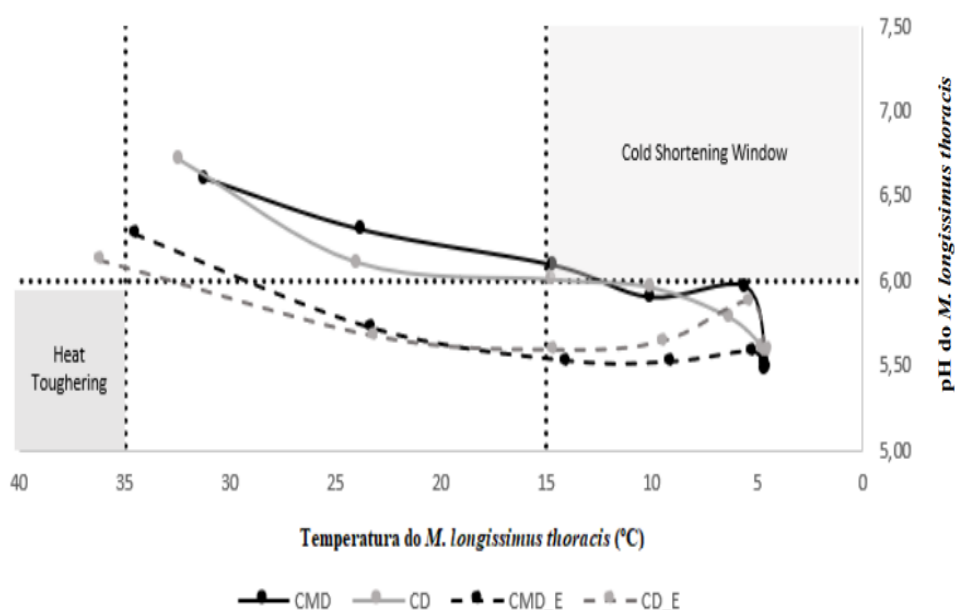


Figura 4. Relação entre o declínio do pH e a temperatura do *M. longissimus thoracis* nos grupos de carne moderadamente dura e muito dura, frente às condições propícias ao surgimento de *Heat Toughening* (*High Rigor Temperature*) e de *Cold Shortening*. CMD: grupo carne moderadamente dura, meias carcaças direitas (não estimuladas). CD: grupo carne muito dura, meias carcaças direitas (não estimuladas). CMD_E: Meias carcaças esquerdas estimuladas, grupo carne moderadamente dura. CDE: Meias carcaças esquerdas estimuladas, grupo carne muito dura

3.3 Características de qualidade da carne com 48 horas *post-mortem*

As características pH, comprimento de sarcômero, cor (L^* , a^* , b^*), tonalidade, saturação e exsudação avaliadas com 48 horas *post-mortem*, não diferiram ($P > 0,05$) entre as meias carcaças não estimuladas (direitas) e entre as meias carcaças estimuladas (esquerdas) dos grupos de Carne moderadamente dura e Carne muito dura. Contudo, as carnes oriundas das meias carcaças não estimuladas (direitas) do grupo experimental Carne muito dura apresentaram para este mesmo período maior WBSF ($7,28 \pm 0,42$ kg) e perda de peso por cozimento ($29,72 \pm 2,46$ %) do que as meias carcaças não estimuladas do grupo Carne moderadamente dura (CMD) ($P < 0,05$) (Tabela 2).

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

Características	CMD ¹	CD ²
pH (laboratório)	5,66 ± 0,07	5,73 ± 0,11
Força de cisalhamento (kg)	5,00 ± 0,17 ^b	7,28 ± 0,42 ^a
Comprimento de sarcômero (μm)	1,82 ± 0,06	1,92 ± 0,13
L* (Luminosidade, CIE)	39,69 ± 1,63	39,25 ± 1,67
a* (Intensidade de vermelho, CIE)	24,14 ± 0,70	23,32 ± 1,01
b* (Intensidade de amarelo, CIE)	8,59 ± 0,86	7,76 ± 1,19
Tonalidade (<i>Hue angle</i>)	0,35 ± 0,02	0,33 ± 0,04
Saturação da cor (<i>Chroma</i>)	25,62 ± 0,95	24,59 ± 1,33
Perda de peso por cozimento (%)	24,94 ± 3,30 ^b	29,72 ± 2,46 ^a
Exsudação (EZ - <i>DripLoss</i> , %)	0,78 ± 0,31	0,47 ± 0,19
Características	CMD ³	CDe ⁴
pH (laboratório)	5,71 ± 0,13	5,70 ± 0,12
Força de cisalhamento (kg)	5,44 ± 0,63	5,34 ± 1,06
Comprimento de sarcômero (μm)	1,87 ± 0,09	1,79 ± 0,04
L* (Luminosidade, CIE)	40,17 ± 1,64	39,35 ± 2,05
a* (Intensidade de vermelho, CIE)	24,19 ± 0,01	24,33 ± 0,54
b* (Intensidade de amarelo, CIE)	8,81 ± 1,02	8,47 ± 0,75
Tonalidade (<i>Hue angle</i>)	0,36 ± 0,03	0,35 ± 0,02
Saturação da cor (<i>Chroma</i>)	25,75 ± 1,29	25,77 ± 0,74
Perda de peso por cozimento (%)	28,85 ± 4,31	26,14 ± 8,33
Exsudação (EZ - <i>DripLoss</i> , %)	1,21 ± 0,65	0,69 ± 0,43

¹CMD: grupo Carne moderadamente dura, meias carcaças direitas (não estimuladas).

²CD: grupo Carne muito dura, meias carcaças direitas (não estimuladas).

³CMD³: grupo Carne moderadamente dura, meias carcaças esquerdas estimuladas.

⁴CDe: grupo Carne muito dura, meias carcaças esquerdas estimuladas.

^{a, b} Valores com letras distintas na linha são diferentes estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.

Neste estudo, os animais que compuseram os grupos experimentais Carne moderadamente dura e Carne muito dura pertenciam a um mesmo grupo genético (raça Nelore), mesma condição sexual (machos não castrados) e passaram por situações semelhantes de criação, manejo e abate. Entretanto, algumas diferenças significativas ($P < 0,05$) foram notadas entre estes grupos (meias carcaças não estimuladas) para a WBSF com 48 horas *post-mortem*.

Como os fatores raça, condição sexual, manejo e abate não foram distintos entre os animais de ambos os grupos experimentais, supõem-se que a diferença de WBSF com 48 horas *post-mortem* ($P < 0,05$) entre estes pode estar relacionada com as variações de expressão de genes (exemplo, calpaínas, *CAST*, *CAST 1* e *CAST 2*) e de

proteínas, como as de choque térmico (HSPs), durante o *post-mortem* (Kim et al., 2008; Baldassini et al., 2015).

As diferenças nas expressões de isoformas de genes entre carnes bovinas classificadas como macias (WBSF $4,11 \pm 0,30$ kg) e duras (WBSF $8,93 \pm 1,23$ kg) foram demonstradas no estudo de Muniz et al. (2020). Os autores relataram maior expressão de isoformas de genes que afetam a velocidade da proteólise muscular no *post-mortem*, como a miotilina (MYOT), a qual protege as proteínas miofibrilares da degradação, a calsequestrina 1 (regula liberação de Ca^{++}), a Sinaptopodina (SYNPO – 201, organizador do citoesqueleto de actina e liberação de Ca^{++}), entre outras, no grupo de carne dura em relação ao de carne macia ($P \leq 0,001$).

As proteínas de choque térmico (HSPs) são outras que também podem influenciar a maciez da bovinos Nelore, já que preservam as proteínas estruturais contra a desnaturação, impedindo assim, a degradação dos componentes estruturais das miofibrilares durante o *post-mortem* (Yang et al., 2012).

Alguns estudos têm demonstrado a influência das HSPs para a maciez da carne de bovinos Nelore. Malheiros et al. (2018), ao avaliarem a associação da expressão de *CAST*, *CAST 1*, *CAST 2* e HSPs com a maciez da carne desses animais, encontraram maior expressão ($P < 0,05$) de *CAST 2* e de HSPB1 (codifica Hsp 27) em carnes com alta WBSF ($8,04 \pm 1,5$ kg). Já, Baldassini et al. (2015), observaram uma tendência de maior expressão de Hsp 27 na carne de bovinos Nelore classificada como dura (WBSF 5,30 - 10,11 kg).

Conforme mencionado anteriormente, o grupo Carne muito dura (meias carcaças não estimuladas - direitas) apresentou, com 48 horas *post-mortem*, maior perda de peso por cozimento ($29,72 \pm 2,46$ %) comparado ao grupo Carne moderadamente dura (meias carcaças não estimuladas – direitas) ($24,94 \pm 3,30$ kg) ($P < 0,05$).

Dentre os prováveis fatores que contribuem para a maior perda de água pela carne estão as alterações no comprimento dos sarcômeros e a velocidade do declínio do pH e da temperatura muscular no *post-mortem* (Geesink et al., 2001; Yuan et al., 2012).

No músculo esquelético, grande parte da água (85%) está localizada nas miofibrilas (entre estas e o sarcolema, entre os feixes musculares e os filamentos de actina e miosina), nas formas livre ou ligada às proteínas. A água ligada às proteínas miofibrilares é a mais afetada durante a transformação do músculo em carne (Gomide, Ramos, & Fontes, 2013).

A alteração das cargas (ponto isoelétrico) das proteínas envolvidas com a ligação da água e a maior desnaturação destas, em virtude do declínio acelerado do pH em temperatura ainda elevada, resulta em maior perda de água pela carne. A redução do espaço entre os filamentos grossos e finos das miofibrilas, com o estabelecimento do *rigor mortis*, também pode resultar em maior expulsão das moléculas de água de entre os filamentos para fora das miofibrilas, fazendo com que a carne elimine mais água (Zeng, Li, & Ertbjerg, 2017).

A maior perda de peso por cozimento observada no grupo Carne muito dura ($29,72 \pm 2,46$ %) (meias carcaças não estimuladas) em relação ao Carne moderadamente dura ($24,94 \pm 3,30$ %) (meias carcaças não estimuladas) ($P < 0,05$), não foi influenciada pelo pH e pela temperatura durante a transformação do músculo em carne, nem pelo comprimento dos sarcômeros, já que estas características não diferiram ($P > 0,05$) entre estes dois grupos experimentais. Portanto, acredita-se que outras modificações *post-mortem* podem ter contribuído para que as carnes de bovinos Nelore com maior WBSF e maior expressão de *CAST 1* e *CAST 2* percam mais água (perda de peso por cozimento com 48 horas *post-mortem*, do que àquelas com maior maciez e menor expressão de *CAST 1* e *CAST 2*).

As carnes oriundas das meias carcaças esquerdas estimuladas dos grupos Carne moderadamente dura e Carne muito dura não apresentam diferenças nas características pH, comprimento do sarcômero, perda de peso por cozimento, cor (L^* , a^* , b^*), saturação, tonalidade e exsudação com 48 horas *post-mortem*, em relação às suas respectivas meias carcaças não estimuladas (direitas) ($P > 0,05$). Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos de Toohey et al. (2008) e Balan et al. (2019) para a perda de peso por cozimento ($P > 0,05$) e por Hopkins et al. (2014) para a exsudação ($P > 0,05$) ao compararem estas características entre carcaças bovinas submetidas ou não à estimulação elétrica.

Entretanto, Biraima, Mohammed, & Webb (2019) demonstraram que as carnes oriundas das carcaças bovinas submetidas à estimulação elétrica apresentaram maior luminosidade ($L^* = 44,26$ CIE) e tonalidade (46,7) e menor intensidade de vermelho ($a^* = 13,74$ CIE) e saturação (20,4), comparada às respectivas meias carcaças não estimuladas ($P < 0,05$).

Embora a EE não tenha apresentado, em nenhum dos grupos experimentais, efeito na maioria das características avaliadas (48 horas *post-mortem*) e citadas anteriormente ($P > 0,05$), foi observada uma contribuição significativa para a redução

da dureza da carne do grupo Carne muito dura, sendo que as carnes oriundas das meias carcaças esquerdas estimuladas deste grupo apresentaram valores inferiores para WBSF ($5,37 \pm 1,06$ kg) comparados às suas respectivas meias carcaças direitas não estimuladas ($7,28 \pm 0,42$ kg) ($P < 0,05$) (Figura 5), não sendo observado o mesmo para o grupo Carne moderadamente dura ($P > 0,05$)

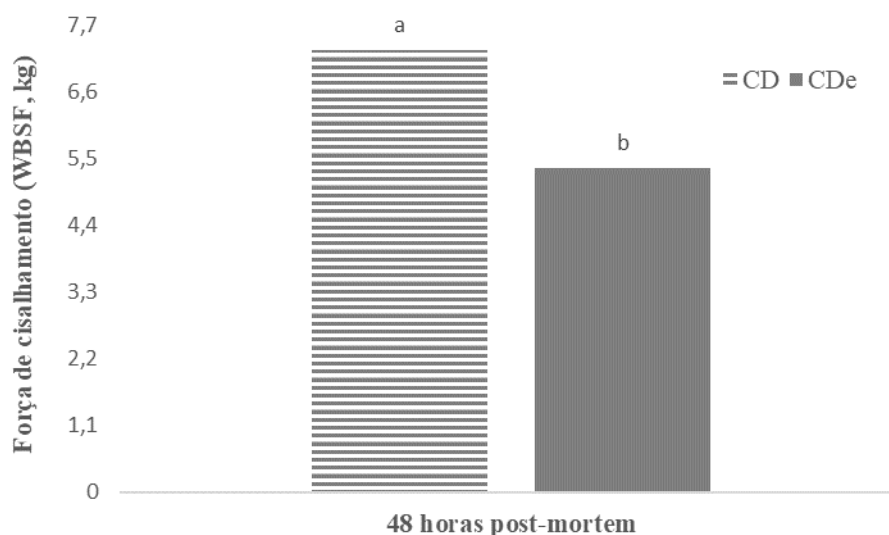


Figura 5. Efeito da estimulação elétrica de média voltagem na redução da dureza da carne de bovinos Nelore pertencentes ao grupo Carne muito dura com 48 horas *post-mortem*. ^{a, b} Letras distintas nas colunas representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

CD: grupo Carne muito dura, meias carcaças direitas (não estimuladas).

CDe: grupo Carne muito dura, meias carcaças esquerdas (estimuladas).

A menor maciez das carnes oriundas de bovinos de genótipo *Bos taurus indicus* é resultante, principalmente, da maior expressão do gene *CAST* e das suas isoformas *CAST 1* e *CAST 2* (Aroeira et al., 2016, Wright et al., 2018, Oliveira et al., 2019).

Neste estudo, o uso da EE mostrou um efeito mais positivo para a melhoria da maciez das carnes (48 horas *post-mortem*) do grupo Carne muito dura. Isso demonstra que embora as isoformas *CAST 1* e *CAST 2* tenham sido mais expressas neste grupo ($P < 0,05$), quando foi realizada a EE (meias carcaças esquerdas) a WBSF reduziu consideravelmente em 1,91 kg ($P < 0,05$), não sendo observado o mesmo para o grupo de Carne moderadamente dura ($P > 0,05$).

No estudo de Hopes-Jones et al. (2010), ao utilizarem bovinos da raça Bonsmara, suplementação com β – agonista (Zipaterol), EE e maturação (3 – 14 dias), os autores encontraram elevada WBSF e atividade de *CAST* (24 horas) no grupo que

recebeu o Zipaterol ($P < 0,05$). No entanto, quando a EE foi realizada, os efeitos desta na redução da WBSF e na atividade de *CAST* e aumento da atividade de m – calpaína (24 horas post-mortem), foram mais pronunciados no grupo Zipaterol comparado ao seu controle ($P < 0,05$).

Comparando as carnes de bovinos de três grupos genéticos (genótipos 100% Brahman, 50% Brahman / Hereford e 100% Hereford), Ferguson et al. (2000) observaram que a WBSF e a atividade de *CAST* (*M. longuissimus*) aumentaram proporcionalmente à medida que aumentavam as porcentagens de genótipo *Bos taurus indicus* ($P < 0,05$). Entretanto, com o emprego da EE encontraram uma redução na atividade de *CAST*, maior atividade de m – calpaína e diminuição de cerca de 45% nas diferenças de WBSF das carnes de Brahmans de raça pura (100%) em relação ao genótipo 100% Hereford ($P < 0,05$).

A diminuição ou até mesmo a remoção das diferenças na maciez das carnes de animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* após a EE das carcaças tem sido demonstrada nos estudos de Ferguson et al. (2000), Gursansky et al. (2010), Hope-Jones et al. (2010), & Highfill et al. (2012).

Ao confrontarem as WBSF das carnes de bovinos com 100% de genótipo *Bos taurus taurus* e 100% *Bos taurus indicus*, cujas carcaças não foram estimuladas, Gursansky et al. (2010) observaram maior dureza ($P < 0,05$) das carnes oriundas das carcaças zebuínas ($P > 0,05$). Após a EE destas (1130 V, 14,28 pulsos sinusoidais bidirecionais de 10 ms / s / por 60 s em até 60 min *post-mortem*), a WBSF passou a ser semelhante à das carcaças taurinas ($P > 0,05$).

3.4 Características de qualidade da carne nos diferentes tempos de maturação

Os valores das médias das características pH, WBSF, L^* , a^* , b^* , tonalidade, saturação e perda de peso por cozimento não apresentaram diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as carnes das meias carcaças não estimuladas (direitas) dos grupos de Carne moderadamente dura e Carne muito dura em nenhum dos períodos de maturação (7, 14, 21 e 28 dias) avaliados.

No entanto, avaliando o comportamento destas características (pH, WBSF, L^* , a^* , b^* , tonalidade, saturação e perda de peso por cozimento) nas amostras de carnes das meias carcaças direitas não estimuladas, em cada grupo experimental e no decorrer de todo o tempo *post-mortem* (48 horas, 7, 14, 21 e 28 dias), observou-se maior perda de

peso por cozimento ($P < 0,05$) nas amostras com 28 dias de maturação pertencentes ao grupo Carne moderadamente dura, comparada às com 7 dias de maturação. Este resultado demonstra efeito do processo de maturação, caracterizado pelo aumento da degradação das proteínas miofibrilares e a redução da capacidade de retenção de água pela carne (Zeng, Li, & Ertbjerg, 2017).

Ainda, os valores das médias de WBSF das amostras de carnes (meias carcaças direitas não estimuladas) pertencentes tanto ao grupo Carne moderadamente dura quanto ao Carne muito dura, diminuíram à medida que o tempo *post-mortem* aumentou ($P < 0,05$), sendo que aos 28 dias de maturação, as carnes de ambos os grupos apresentaram valores compatíveis aos de carne macia ($\text{WBSF} \leq 4,4 \text{ kg}$), segundo a American Society for Testing and Materials (2018) (Tabela 3). Este resultado corrobora aos observados por Wu et al. (2014) e Zhang et al. (2019), onde a WBSF diminuiu conforme aumentou o tempo de maturação, possivelmente em virtude da degradação das principais proteínas estruturais do músculo esquelético (titina, nebulina, filamina e miosina).

As demais características (pH, L^* , a^* , b^* , tonalidade e saturação) não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os períodos de maturação em nenhum dos grupos experimentais avaliados (Tabela 3).

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*

Características	CMD ¹					P valor
	Tempo <i>post - mortem</i>					
	48 horas	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	
pH	5,66 ± 0,07	5,71 ± 0,07	5,73 ± 0,07	5,76 ± 0,08	5,75 ± 0,08	0,2829
Força de cisalhamento (kg, WBSF)	5,00 ± 0,17 ^{ab}	5,91 ± 1,07 ^a	5,27 ± 0,81 ^{ab}	4,73 ± 0,78 ^{ab}	4,08 ± 0,63 ^b	0,0152
L* (Luminosidade, CIE)	39,70 ± 1,62	40,38 ± 2,02	41,21 ± 1,49	41,96 ± 1,30	42,02 ± 1,40	0,1308
a* (Intensidade vermelho, CIE)	24,14 ± 0,70	25,19 ± 1,28	24,73 ± 0,73	25,81 ± 0,72	25,81 ± 1,14	0,0483
b* (Intensidade amarelo, CIE)	8,60 ± 0,86	9,25 ± 1,30	8,98 ± 0,77	10,03 ± 0,51	10,07 ± 1,23	0,1024
Tonalidade (<i>Hue angle</i>)	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,36 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,03	0,1713
Saturação (<i>Chroma</i>)	25,62 ± 0,95	26,84 ± 1,64	26,31 ± 0,91	27,69 ± 0,83	27,71 ± 1,51	0,0571
Perda de peso por cozimento (%)	24,94 ± 3,30 ^b	28,57 ± 3,52 ^{ab}	29,38 ± 1,93 ^{ab}	29,18 ± 2,01 ^{ab}	32,30 ± 2,18 ^a	0,0069
Características	CD ²					P valor
	Tempo <i>post - mortem</i>					
	48 horas	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	
pH	5,73 ± 0,11	5,73 ± 0,10	5,77 ± 0,10	5,83 ± 0,14	5,74 ± 0,10	0,6175
Força de cisalhamento (kg, WBSF)	7,28 ± 0,42 ^a	5,83 ± 0,50 ^{ab}	6,16 ± 0,84 ^a	4,42 ± 1,20 ^{bc}	3,95 ± 0,58 ^c	<.0001
L* (Luminosidade, CIE)	39,25 ± 1,67	39,76 ± 1,72	40,75 ± 2,11	41,06 ± 1,63	42,07 ± 1,10	0,1646
a* (Intensidade vermelho, CIE)	23,32 ± 1,00	24,14 ± 1,18	24,63 ± 0,91	24,77 ± 0,89	25,32 ± 1,01	0,0533
b* (Intensidade amarelo, CIE)	7,76 ± 1,19	8,33 ± 1,11	8,72 ± 0,87	8,88 ± 1,01	9,62 ± 1,15	0,1241
Tonalidade (<i>Hue angle</i>)	0,33 ± 0,03	0,34 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,38 ± 0,03	0,1859
Saturação (<i>Chroma</i>)	24,59 ± 1,33	25,54 ± 1,47	26,13 ± 1,13	26,32 ± 1,18	27,10 ± 1,35	0,0671
Perda de peso por cozimento (%)	29,72 ± 2,46	29,07 ± 3,19	31,40 ± 0,97	26,55 ± 5,86	30,27 ± 2,87	0,2803

¹ Grupo de carne moderadamente dura, meias carcaças direitas não estimuladas (n = 5).

² Grupo de carne muito dura, meias carcaças direitas não estimuladas (n = 5).

^{a, b, c} Valores com letras distintas na linha representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

3.5 Características de qualidade da carne após a estimulação elétrica e maturação

As características pH, WBSF, L* e perda de peso por cozimento não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as carnes oriundas das meias carcaças esquerdas dos grupos Carne moderadamente dura e Carne muito dura em nenhum dos períodos de maturação (7, 14, 21 e 28 dias) avaliados. Porém, as carnes do grupo Carne moderadamente dura (meias carcaças esquerdas estimuladas) apresentaram maior tonalidade ($P < 0,05$) aos 7 dias de maturação que às do grupo Carne muito dura. Neste mesmo período, e também aos 28 dias de maturação, as carnes das meias carcaças esquerdas do grupo Carne moderadamente dura também apresentaram maior intensidade de vermelho (a^*), de amarelo (b^*) e saturação ($P < 0,05$) que às do Carne muito dura (Tabela 4).

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

Características	Com estimulação elétrica e maturação (dias)							
	7d CMDe ¹	7d CDe ²	14d CMDe	14d CDe	21d CMDe	21d CDe	28d CMDe	28d CDe
pH (laboratório)	5,73 ± 0,06	5,74 ± 1,16	5,71 ± 0,11	5,79 ± 0,17	5,74 ± 0,09	5,77 ± 0,11	5,84 ± 0,06	5,80 ± 0,16
Força de cisalhamento (kg)	4,98 ± 0,70	5,35 ± 0,67	4,54 ± 0,90	4,66 ± 0,54	3,61 ± 0,42	3,94 ± 0,63	3,46 ± 0,62	3,55 ± 0,60
L* (Luminosidade, CIE)	41,72 ± 1,53	40,09 ± 2,10	41,99 ± 2,10	41,41 ± 1,82	42,64 ± 1,89	42,71 ± 2,17	42,65 ± 1,86	42,70 ± 1,16
a* (Intensidade vermelho, CIE)	25,74 ± 0,51 ^a	23,61 ± 0,76 ^b	25,30 ± 1,02	24,87 ± 0,80	25,83 ± 0,46	25,06 ± 0,72	26,34 ± 0,52 ^a	25,64 ± 0,14 ^b
b* (intensidade amarelo, CIE)	9,93 ± 0,64 ^a	8,05 ± 0,82 ^b	9,61 ± 1,05	9,17 ± 1,04	10,26 ± 0,68	9,53 ± 0,86	10,62 ± 0,52 ^a	9,85 ± 0,40 ^b
Tonalidade (<i>Hue angle</i>)	0,38 ± 0,02 ^a	0,34 ± 0,03 ^b	0,38 ± 0,03	0,37 ± 0,03	0,40 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,38 ± 0,01
Saturação da cor (<i>Chroma</i>)	27,60 ± 0,70 ^a	24,95 ± 0,95 ^b	27,10 ± 1,31	26,52 ± 1,10	27,80 ± 0,63	26,81 ± 0,96	28,41 ± 0,65 ^a	27,47 ± 0,27 ^b
Perda por cozimento (%)	30,62 ± 0,60	28,15 ± 2,40	27,89 ± 3,35	30,16 ± 1,89	27,67 ± 4,42	30,12 ± 2,12	29,33 ± 4,02	29,38 ± 1,54

¹ Grupo experimental Carne moderadamente dura, meias carcaças esquerdas (estimulação elétrica de média voltagem com tensão crescente de 20, 40, 60 e 80 VRMS, frequência de 12,5 Hz, durante 52 segundos), (n = 5).

² Grupo experimental Carne muito dura, meias carcaças esquerdas (estimulação elétrica de média voltagem com tensão crescente de 20, 40, 60 e 80 VRMS, frequência de 12,5 Hz, durante 52 segundos), (n = 5).

^{a, b} Valores com letras distintas na linha representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste Tukey nas médias entre as meias carcaças esquerdas dos dois grupos, em cada período avaliado.

Durante todo tempo *post-mortem* (48 horas, 7, 14, 21 e 28 dias), apenas as características WBSF, intensidade de vermelho (a^*), intensidade de amarelo (b^*) e saturação demonstraram diferenças significativas ($P < 0,05$) nas amostras de carnes oriundas das meias carcaças esquerdas estimuladas, tanto no grupo Carne moderadamente dura e quanto no Carne muito dura. As carnes das meias carcaças esquerdas estimuladas tanto do grupo Carne moderadamente dura quanto do Carne muito dura apresentaram maior maciez ($WBSF \leq 4,4$ kg) aos 21 e 28 dias *post-mortem*, comparadas às amostras com 48 horas e 7 dias *post-mortem* ($P < 0,05$).

Os valores médios de a^* , b^* e saturação aumentaram com o decorrer do tempo *post-mortem* ($P < 0,05$) tanto nas carnes oriundas das meias carcaças esquerdas estimuladas do grupo Carne moderadamente dura quanto nas do grupo Carne muito dura (Tabela 5).

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*

Características	CMDe ¹					P valor
	Tempo <i>post - mortem</i>					
	48 horas	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	
pH	5,71 ± 0,13	5,73 ± 0,06	5,71 ± 0,11	5,74 ± 0,10	5,84 ± 0,06	0,2225
Força de cisalhamento (kg, WBSF)	5,44 ± 0,63 ^a	4,98 ± 0,70 ^a	4,54 ± 0,90 ^{ab}	3,61 ± 0,42 ^b	3,46 ± 0,62 ^b	0,0005
L* (Luminosidade, CIE)	40,17 ± 1,64	41,73 ± 1,53	42,00 ± 2,10	42,64 ± 1,89	42,65 ± 1,86	0,2253
a* (Intensidade vermelho, CIE)	24,19 ± 1,01 ^b	25,74 ± 0,51 ^a	25,30 ± 1,02 ^{ab}	25,83 ± 0,46 ^a	26,35 ± 0,52 ^a	0,0027
b* (Intensidade amarelo, CIE)	8,81 ± 1,02 ^b	9,93 ± 0,64 ^{ab}	9,61 ± 1,05 ^{ab}	10,26 ± 0,68 ^{ab}	10,62 ± 0,52 ^a	0,0224
Tonalidade (<i>Hue angle</i>)	0,36 ± 0,03	0,38 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,40 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,0925
Saturação (<i>Chroma</i>)	25,75 ± 1,29 ^b	27,60 ± 0,68 ^a	27,07 ± 1,31 ^{ab}	27,80 ± 0,63 ^a	28,41 ± 0,65 ^a	0,0041
Perda de peso por cozimento (%)	28,85 ± 1,30	30,62 ± 1,57	27,90 ± 3,35	27,67 ± 4,42	29,33 ± 4,02	0,7212

Características	CDe ²					P valor
	Tempo <i>post - mortem</i>					
	48 horas	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	
pH	5,70 ± 0,12	5,74 ± 0,16	5,80 ± 0,17	5,80 ± 0,11	5,79 ± 0,16	0,8254
Força de cisalhamento (kg, WBSF)	5,37 ± 1,06 ^a	5,35 ± 0,67 ^a	4,66 ± 0,54 ^{ab}	3,94 ± 0,63 ^b	3,55 ± 0,60 ^b	0,0018
L* (Luminosidade, CIE)	39,35 ± 2,05	40,09 ± 2,10	41,41 ± 1,82	42,71 ± 2,17	42,70 ± 1,16	0,0346
a* (Intensidade vermelho, CIE)	24,33 ± 0,54 ^{bc}	23,60 ± 0,76 ^c	24,87 ± 0,80 ^{ab}	25,06 ± 0,72 ^{ab}	25,64 ± 0,14 ^a	0,0009
b* (Intensidade amarelo, CIE)	8,47 ± 0,75 ^{ab}	8,05 ± 0,82 ^b	9,17 ± 1,04 ^{ab}	9,53 ± 0,86 ^{ab}	9,85 ± 0,40 ^a	0,0114
Tonalidade (<i>Hue angle</i>)	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,03	0,37 ± 0,03	0,38 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,0416
Saturação (<i>Chroma</i>)	25,77 ± 0,74 ^{bc}	24,94 ± 0,95 ^c	26,52 ± 1,10 ^{abc}	26,81 ± 0,96 ^{ab}	27,47 ± 0,27 ^a	0,0017
Perda de peso por cozimento (%)	26,14 ± 8,33	28,15 ± 2,40	30,16 ± 1,89	30,12 ± 2,12	29,38 ± 1,54	0,5192

1 Grupo carne moderadamente dura, meias carcaças esquerdas estimuladas (estimulação elétrica de média voltagem com tensão crescente de 20, 40, 60 e 80 VRMS, frequência de 12,5 Hz, durante 52 segundos), (n = 5).

2 Grupo de carne muito dura, meias carcaças esquerdas estimuladas (estimulação elétrica de média voltagem com tensão crescente de 20, 40, 60 e 80 VRMS, frequência de 12,5 Hz, durante 52 segundos), (n = 5).

a, b, c Valores com letras distintas na linha representam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Quando as características pH, WBSF, L*, a*, b*, tonalidade, saturação e perda de peso por cozimento foram avaliadas entre as meias carcaças esquerdas estimuladas e as suas meias carcaças direitas correspondentes não estimuladas, de cada grupo experimental (Carne moderadamente dura e Carne muito dura) e no decorrer de todo o período *post-mortem*, houve diferença significativa, somente, para a WBSF do grupo Carne muito dura, sendo que as meias carcaças esquerdas estimuladas deste grupo apresentaram carnes mais macias com 48 horas *post-mortem* e aos 14 dias de maturação, comparadas às suas meias carcaças não estimuladas (direitas correspondentes) (Figura 6).

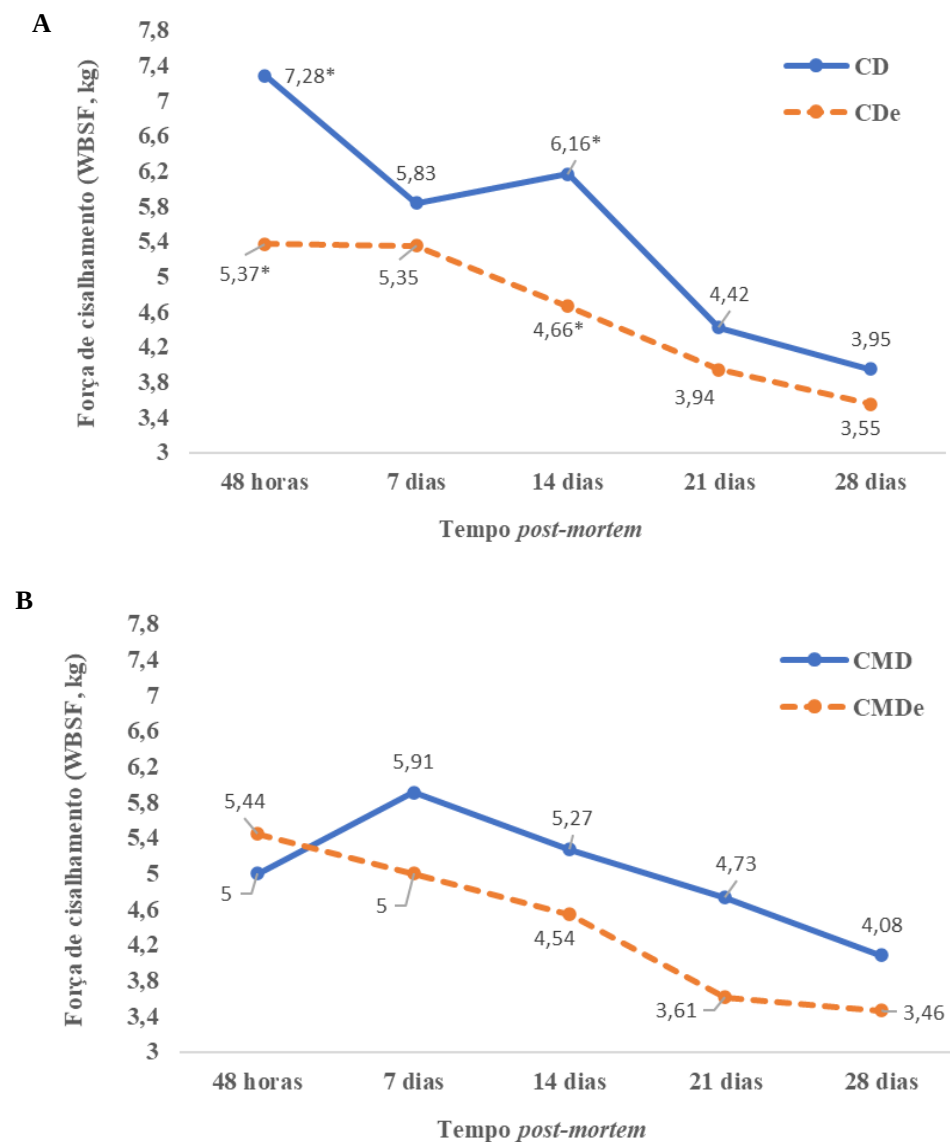


Figura 6. Valores médios de força de cisalhamento (WBSF, kg) da carne de bovinos Nelore com meias carcaças submetidas (esquerdas) ou não submetidas (direitas) à estimulação elétrica. A - grupo Carne muito dura (CD e CDe); B - grupo Carne moderadamente dura (CMD e CMDe). *Diferença estatística significativa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

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: 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 from *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.

Highifill, 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.

Toohy, 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.