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

ABORDAGEM BIOANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA DA QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS NELORE (*Bos indicus*) SELECIONADOS PARA PRODUÇÃO

WELDER ANGELO BALDASSINI

Dissertação apresentada como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia para obtenção do título de Mestre

BOTUCATU-SP
Junho-2013

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

ABORDAGEM BIOANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA DA QUALIDADE DE CARNE EM BOVINOS NELORE (*Bos indicus*) SELECIONADOS PARA PRODUÇÃO

WELDER ANGELO BALDASSINI
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Pedro de Magalhães Padilha

Coorientador: Prof. Dr. Luis Artur Loyola Chardulo

Dissertação apresentada como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia para obtenção do título de Mestre

BOTUCATU-SP
Junho-2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
– SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA
- LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Baldassini, Welder Angelo, 1989-
B175a Abordagem bioanalítica e físico-química da qualidade de carne em bovinos Nelore (*Bos indicus*) selecionados para produção / Welder Angelo Baldassini. – Botucatu : [s.n.], 2013
vii, 58 f. : il. color., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2013
Orientador: Pedro de Magalhães Padilha
Coorientador: Luis Artur Loyola Chardulo
Inclui bibliografia

1. Bovino de corte. 2. Bovino de corte – Carcaças. 3. Carne - Qualidade. 4. Zebu. 5. Proteínas de ligação do cálcio. 6. Proteômica. 7. *Shear force*. I. Padilha, Pedro de Magalhães. II. Chardulo, Luis Artur Loyola. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

Ofereço

A Deus por toda proteção divina!

Dedico

Aos meus pais, Angelo Baldassini Neto e Clarinda Gonçalves dos Anjos Baldassini, pela educação, princípios e amor concedido. Obrigado pelo suporte e apoio familiar.
A minha tia, Sueli Baldassini, pelo incentivo desde o início desse trabalho.
A minha avó, Maria Benedita Baldassini, por toda preocupação e carinho.
Aos irmãos Wellington Baldassini, Weverton Baldassini e Bruna Baldassini pela força.
Aos grandes amigos Ricardo Zerlin, Murillo Longo, Felipe Santos, Jorge Portinho e Dani Bruno Grossklauss por se tornarem minha segunda família.

Agradecimento especial

Aos professores orientadores Dr. Pedro de Magalhães Padilha e Dr. Luis Artur Loyola Chardulo pelos ensinamentos, conselhos e pela parceria construída nesses anos de trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por todo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)/ UNESP/ Botucatu, pela oportunidade.

Ao professor Dr. Josineudson Augusto II Vasconcelos da Silva por toda ajuda com os resultados obtidos.

A professora Dra. Lúcia Galvão de Albuquerque pelo vínculo concedido ao projeto temático de sua coordenação.

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1..... 01

CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... 01

INTRODUÇÃO..... 02

REVISÃO DE LITERATURA..... 05

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 12

CAPÍTULO 2..... 15

Métodos bioanalíticos para estudo metaloproteômico do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos Nelore contrastantes para maciez da carne... 16

RESUMO..... 16

ABSTRACT..... 17

INTRODUÇÃO..... 18

MATERIAL E MÉTODOS..... 19

RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 24

CONCLUSÃO..... 35

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA..... 36

CAPÍTULO 3..... 39

Efeitos das variações na espessura de gordura subcutânea sobre as características de qualidade da carne de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) machos selecionados para produção..... 40

RESUMO..... 40

ABSTRACT..... 40

INTRODUÇÃO..... 41

MATERIAL E MÉTODOS..... 42

RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 44

CONCLUSÃO..... 53

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA..... 53

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES..... 58

ÍNDICES DE TABELAS

Página

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Análise qualitativa de cálcio em spots proteicos por Espectrometria de Fluorescência de raio-X com Radiação Syncrotron (SR-XRF)..... 28

Tabela 2. Proteínas identificadas por espectrometria de massas com ionização por eletrosspray (ESI-MS) nos géis (12,5% e faixa de pH 3-10) obtidos dos três grupos experimentais: M = Bovinos Nelore com carne macia; D = Bovinos Nelore com carne dura; e P = Bovinos da raça Piemontês..... 33

CAPÍTULO 3

Tabela 1**.** Número de animais e médias da espessura de gordura subcutânea (EGS), força de cisalhamento (FC), área de olho de lombo (AOL), índice de fragmentação miofibrilar (MFI) e teor de lipídeos totais (LT) dos grupos de bovinos da raça Nelore distribuídos nas diferentes classes fenotípicas de espessura de gordura subcutânea EGS-1 (< 4,0 mm), EGS-2 (≥ 4,0 ≤ 5,0 mm) e EGS-3 (> 5,0 mm)..... 45

Tabela 2. Coeficientes de correlações fenotípicas estimadas (r) entre as características força de cisalhamento (FC), área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS), índice de fragmentação miofibrilar (MFI) e teor de lipídeos totais (LT) de 1076 bovinos Nelore..... 52

ÍNDICES DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 Página

Figura 1**.** Desenho esquemático das diferentes etapas do estudo de proteoma de bovinos com o uso de 2D-PAGE e espectrometria de massas..... 10

CAPÍTULO 2

Figura 1. Géis 12,5% (m/v) de amostras do músculo *L. dorsi* de bovinos da raça Nelore - grupo M. (A) com faixa de pI de 3-10 e (B) com faixa de pI de 4-7, ambos com MM de 14-97 kDa. 25

Figura 2. (A) Correlação entre o volume normalizado (%V) dos spots presentes nos géis dos grupos M (Bovinos Nelore carne macia) e D (Bovinos Nelore carne dura); (**B**) entre o %V dos spots presentes nos géis dos grupos M e P (Bovinos Piemontês)..... 27

Figura 3. (A) Spots proteicos (destacados em vermelho) que apresentam íons cálcio após a análise por SR-XRF; (B) Exemplo de espectro do spot proteico 12 do grupo M obtidos por SR-XRF. Gel 12,5% (m/v) de amostras do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos da raça Nelore - grupo M - com faixa de pI de 4-7 e MM de 14-97 kDa..... 30

Figura 4. Localização das proteínas identificadas por espectrometria de massas nos géis obtidos dos grupos D, M e P em faixa de pH 3 a 10..... 32

Figura 5. Spots proteicos obtidos de amostras do músculo *L. dorsi* dos grupos experimentais M (Bovinos Nelore com carne macia), D (Bovinos Nelore com carne dura) e P (Bovinos Piemontês). O spot 7 (destacado em verde) corresponde a proteína piruvato quinase identificada por ESI-MS..... 34

CAPÍTULO 3

Figura 1. Médias de força de cisalhamento (FC), espessura de gordura subcutânea (EGS) e área de olho de lombo (AOL) de bovinos da raça Nelore produzidos em dez fazendas (representadas pelas letras A até J) do estudo.....

46

Figura 2. Relação entre o Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) e a Força de Cisalhamento (FC) de bovinos Nelore nas três classes fenotípicas de espessura de gordura subcutânea: EGS-1 (< 4,0 mm), EGS-2 (≥ 4,0 ≤ 5,0 mm) e EGS-3 (> 5,0 mm)..... 48

Figura 3. Resultados da espessura de gordura subcutânea (EGS) e do teor de lipídeos totais (LT) de bovinos Nelore distribuídos nas três classes fenotípicas de espessura de gordura subcutânea: EGS-1 (< 4,0 mm), EGS-2 (≥ 4,0 ≤ 5,0 mm) e EGS-3 (> 5,0 mm)..... 51

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-PAGE – Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

AOL – Área de olho de lombo

CHAPS – Sulfato de 3-[(3-cloroaminopropil)-dimetilamônio]-1-propano

EGS – Espessura de gordura subcutânea

FC – Força de cisalhamento

I% - Intensidade relativa

IEF – Focalização isoelétrica

IM – Índice de Marmorização

kDa – quilo Dalton

kV – quilo volt

ESI-MS – Espectrômetro de massa com fonte ESI (eletrospray ionisation)

LT – Teor de lipídeos totais

mA – miliampere

MFI – Índice de fragmentação miofibrilar

MM – Massa molar

MS – Espectrometria de Massa

pI – Ponto isoelétrico

SDS – Dodecil-sulfato de sódio

SDS PAGE – Eletroforese denaturante em gel de poliacrilamida

CAPÍTULO 1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

INTRODUÇÃO

Indiscutivelmente os números da pecuária de corte são impactantes em relação às atividades que norteiam a economia do país. Os índices de produção de carne bovina colocaram o Brasil em segundo lugar no cenário mundial no ano de 2008, com um acumulado de 9,7 milhões de toneladas em equivalente de carcaça (CWE). Nesse mesmo ano, os Estados Unidos produziram pouco mais de 12 milhões de toneladas, a União Europeia em torno de 8,1 milhões, a Austrália e Argentina produziram entre 2 e 3 milhões, e a Índia cerca de 2,5 milhões de toneladas em CWE (ABIEC, 2009; FERRAZ & FELICIO, 2010). Os sistemas brasileiros convencionais de produção são de ciclo completo (cria, recria e engorda) sobre condições de pastagens, e um rebanho composto majoritariamente (80%) por animais da subespécie *Bos indicus,* e por produtos de seu cruzamento com animais da subespécie *Bos taurus*.

Em 2010 foram abatidas 29,265 milhões de cabeças de bovinos, representando aumento de 4,3% em relação ao ano anterior. No acumulado do ano, o Centro-Oeste respondeu por 34,7% do abate de bovinos, o Sudeste por 22,3%, o Norte por 19,4%, o Sul por 13,4% e o Nordeste por 10,7%. Mato Grosso é o Estado líder no abate de bovinos, totalizando 14,0% do total, seguido por São Paulo (12,1%) e Mato Grosso do Sul (11,3%) (IBGE 2011).

Os aspectos qualitativos da carne bovina são importantes para os consumidores e existem diferenças nas características de qualidade para diferentes raças, especialmente pelo uso de animais *Bos indicus*, Diversos estudos no Brasil foram conduzidos para avaliar essas variações, e as conclusões gerais convergem para a existência de influência da raça (e também do sexo) na qualidade da carne bovina (BONIN, 2008; HADLICH, MORALES, SILVEIRA, OLIVEIRA, & CHARDULO, 2006).

Essa diferenciação pode ser determinada por fatores como palatabilidade, cor, capacidade de retenção de água e valor nutricional, sendo que a importância com que esses fatores são descritos na literatura podem variar tanto em diferentes músculos e carcaças como em diferentes raças e espécies (HOLLUNG et al., 2007). O mecanismo global que estabelece essa diferenciação da qualidade não é totalmente esclarecido. Entretanto, com o rápido avanço da Bioquímica, Biologia Molecular, Proteômica, Metalômica e ciências afins, diversos fatores envolvidos na fisiologia dessas características se tornaram conhecidos e outros são implicados de tempos em tempos.

A palatabilidade da carne é determinada por três características: sabor, suculência e maciez. Todavia, a importância de cada uma dessas características depende do tipo de carne e também do perfil do consumidor. Um exemplo disso é que,

na Alemanha, os consumidores selecionam a carne suína baseada no conteúdo de gordura e cor. Quando o assunto é carne bovina, 50% dos consumidores dos Estados Unidos relataram que a maciez é a característica de qualidade mais importante (HOLLUNG & VESETH-KENT, 2012).

A maciez da carne está diretamente ligada à satisfação de consumidores e, consequentemente, ao aumento ou diminuição do consumo de produtos cárneos. A demanda por qualidade é uma realidade notável, pois a inconsistência na maciez gera problemas de comercialização para a cadeia produtiva.

Nesse âmbito, a maciez é a característica central da ciência da carne e muitas pesquisas têm sido desenvolvidas durante as ultimas décadas para entender o que contribui para a variação dessa característica. Variações significativas na maciez da carne podem ser visualizadas quando se comparam diferentes músculos nos animais, e também o mesmo músculo em diferentes raças e espécies.

Ao considerar a fisiologia do músculo destaca-se que a maciez da carne é resultado da contribuição de dois principais componentes musculares, sendo eles tecido conectivo e perda no *post mortem* da integridade estrutural do sarcômero, principal aparato de contração do músculo esquelético (SAWDY et al., 2004).

As fibras musculares possuem estruturas chamadas de miofibrilas que formam a base do sistema contrátil dos músculos, e a unidade básica desse sistema é o sarcômero. O sarcômero é formado por actinas sobrepostas ou entrelaçadas e filamentos de miosina delimitados pelo disco Z, sendo esta unidade repetida ao longo de toda a miofibrila. As miofibrilas são conectadas umas as outras por uma rede tridimensional, com os filamentos intermediários ao redor do disco Z, e outra rede estrutural, o costameri, junta as miofibrilas a membrana plasmática (NELSON & COX, 2011).

Após o abate dos animais o músculo esquelético tenta manter o ambiente interno balanceado fisiologicamente, e muitos dos eventos que ocorrem dentro das células no período *post mortem* são resultados diretos dos mecanismos que buscam a homeostase. Após a sangria, o transporte de nutrientes e outros produtos cessam, e quando o suprimento de oxigênio acaba o metabolismo muda de aeróbico para anaeróbico e começa a produzir e acumular ácido lático. A produção de ácido lático continua até que se esgotem os estoques de glicogênio do músculo, o que resulta na queda de pH do músculo no período *post mortem*, tipicamente de 7 para 5,6 (HOLLUNG & VESETH-KENT, 2012).

A queda do pH junto com outras mudanças bioquímicas e queda de temperatura, durante o resfriamento das carcaças, levam ao desenvolvimento do

chamado *rigor mortis.* O *rigor mortis* é descrito como o enrijecimento da carcaça e ocorre junto com as mudanças no período *post mortem* afetando o aparato contrátil (GREASER & GUO, 2012).

A maciez da carne sabidamente aumenta durante a estocagem das carcaças nas câmaras frias, e em 1917 foi sugerido que estas mudanças eram principalmente devido as atividades enzimáticas (HOAGLAND et al. 1917). A fase de amaciamento da carne tem recebido mais atenção na ciência da carne, sendo de conhecimento geral que o amaciamento é resultado de uma degradação chave das miofibrilas e proteínas associadas, cuja principal função é a manutenção da integridade estrutural das miofibrilas. Logo que algumas dessas proteínas são degradadas, a estrutura rígida das miofibrilas é enfraquecida e a carne se torna mais macia. Portanto, muito se tem debatido em torno dos sistemas proteolíticos que fazem parte desse processo de degradação, todavia, há evidencias substanciais de que o sistema proteolítico das calpaínas desempenha o papel principal nesse processo.

Com base nesses aspectos surgiu a proposta deste trabalho que tem como objetivos: Desenvolver e validar métodos bioanalíticos visando o fracionamento/separação de proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) em amostras de tecido muscular (*Longissimus dorsi*); Investigar por fluorescência de raio-X (SR-XRF) os íons cálcio nos spots proteicos; Caracterizar as proteínas presentes nos mesmos por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS); Bem como avaliar a influência das variações na espessura de gordura subcutânea da carcaça nas características de qualidade de carne, de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) selecionados para a produção.

O Capítulo 2, intitulado "**Métodos bioanalíticos para estudo metaloproteômico no músculo *Longissimus dorsi* de bovinos Nelore contrastantes para maciez da carne"** foi redigido de acordo com as normas da Revista *Meat Science* (ISSN: 0309-1740). O Capítulo 3, intitulado "**Efeitos das variações na espessura de gordura subcutânea sobre as características de qualidade da carne de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) machos selecionados para produção**" foi redigido de acordo com as normas da Revista *The International Journal of Animal Bioscience* (ISSN: 1751-7311). O Capítulo 4 apresenta as implicações do trabalho.

REVISÃO DE LITERATURA

Proteômica e Metaloproteômica

Uma análise abrangente em alta-escala das proteínas é o objetivo da ciência do proteoma, a proteômica. Sua área de atuação é ampla, pois engloba a identificação e quantificação de proteínas nas células, tecidos e fluidos biológicos, bem como a análise de mudanças na expressão das proteínas por eletroforese. Com a proteômica é possível fazer a caracterização de modificações pós-traducionais por espectrometria de massas, estudos de interações proteína-proteina, entre outras aplicações (SARKA, 2003).

A proteômica é uma das mais promissoras áreas da pesquisa nas áreas biológicas, pois sua aplicação permite: (a) descobrir vias metabólicas nas diversas etapas celulares, gerando um conhecimento sem precedentes na biologia celular e na bioquímica; (b) identificar novas moléculas bioativas em extratos biológicos naturais, levando ao desenvolvimento de, por exemplo, novos medicamentos; (c) identificar e caracterizar marcadores biológicos, ou seja, proteínas endógenas ou exógenas específicas de um determinado fenótipo (NELSON & COX, 2011).

O campo de pesquisa que estuda os metalomas e suas correlações com genomas e proteomas é referido como metalômica. A metalômica tem como objetivos a verificação da distribuição das espécies metálicas e metalóides, bem como a elucidação dos aspectos fisiológicos e funcionais das biomoléculas que contêm íons metálicos em suas estruturas, tais como as metaloproteínas e as proteínas ligadas a metais (GÓMEZ-ARIZ et al., 2004). O estudo de metaloma pode fornecer informações tais como: (i) elemento (espécie metálica ou metalóide) distribuído entre os compartimentos celulares de determinado tipo de célula; (ii) seu meio de coordenação (à qual biomolécula está incorporado ou a qual bioligante está complexado); (iii) as concentrações das espécies metálicas individuais presentes; e (iv) a estrutura da biomolécula (SZPUNAR et al., 2004).

As metaloproteínas são consideradas diferentes das proteínas ligadas a metais. Elas constituem um grupo de proteínas que contêm um cofator metálico incorporado por meio de ligações específicas, caracterizando-se pela alta afinidade da interação metal-proteína (tal como as calpaínas com íons cálcio). Já as proteínas ligadas a metais constituem um grupo de proteínas em que os íons metálicos são incorporados por ligações não-específicas, caracterizando-se pela baixa afinidade da

ligação metal-proteína e, consequentemente, pela quebra fácil dessa ligação (VERBI et al., 2005).

Eletroforese bidimensional

Uma das ferramentas mais utilizadas para o estudo de proteomas e/ou metalomas é a eletroforese bidimensional (2D), proposta por O'Farrel (1975). Embora seja uma técnica antiga, recentemente tornou-se o método preferido na geração de mapas proteicos a partir de amostras complexas, atraindo os pesquisadores pelo seu alto poder de resolução, podendo separar teoricamente até 10.000 spots por gel (O'FARREL, 1975).

Para se entender como ocorre a separação das proteínas pela técnica 2D-PAGE, faz-se necessário compreender que na eletroforese com focalização isoelétrica o objetivo é separar as proteínas de acordo com seus respectivos ponto isoelétricos (pIs), ou seja, a proteína irá migrar pelo gel com gradiente de pH (formado pela migração rápida de substâncias poliméricas – ex: anfólitos) até que sua carga de rede seja nula; neste ponto, o pI da proteína será igual ao pH do gradiente. Na eletroforese em condições denaturantes (SDS PAGE), o surfactante (SDS) atua de modo a normalizar a carga e a forma das proteínas, de modo que o elemento de distinção entre elas passa a ser sua respectiva massa molar (MM). Esta normalização se dá pelo aumento de cargas negativas nas proteínas provenientes do SDS e pela presença de agentes redutores (DTT), os quais rompem ligações de sulfeto na estrutura proteica facilitando o acesso do SDS e conferindo uma forma similar ao conjunto de proteínas (SILVA Jr, 2001). Logo, fica claro que a 2D-PAGE é a combinação entre a focalização isoelétrica (IEF) e a SDS PAGE.

As faixas de pH utilizadas podem ser lineares ou não lineares, "amplas" (ex: 3 - 10), "médias" (ex: 4 - 7) "estreitas" (ex: 4,5 - 5,5) e "ultra-estreitas" (ex: 4,9 - 5,3). As faixas amplas de pH permitem uma visão geral das proteínas expressas, mas elas não proporcionam a resolução espacial necessária para uma separação eficiente das proteínas em um proteoma complexo (SILVA, 2009).

Para se aproveitar da alta resolução da 2D-PAGE, as proteínas da amostra devem ser desnaturadas, desagregadas, reduzidas e solubilizadas para promover a ruptura das interações moleculares e garantir que cada spot represente um polipeptídeo individual (SHAO-EN & PANDEY, 2001). Nesse sentido, é uma técnica de destaque, pois a alta resolução permite realizar uma separação eficiente e, devido as características inerentes a mesma (obtenção de um gel bidimensional), há a

possibilidade de se realizar estudos comparativos, os quais podem facilitar a identificação de candidatos a biomarcadores por meio de comparação entre os spots dos géis (BANDOW et al., 2008).

Em se tratando de simplicidade e reprodutibilidade, seria altamente desejável que o processo de extração das proteínas tivesse uma única etapa, mas não há um método único de preparo de amostras que possa ser aplicado universalmente a todos os tipos de amostras analisadas por 2D-PAGE. Embora um grande número de protocolos padrão tenha sido publicado, eles têm que ser adaptados para cada tipo de amostra e para a proteína de interesse. Duas recomendações gerais, entretanto, podem ser feitas: o preparo deve ser o mais simples possível e modificações na proteína devem ser evitadas (GÖRG et al., 2004).

A comparação em larga-escala das diferenças nas expressões das proteínas não seria possível sem a capacidade de se manipular grandes conjuntos de dados gerados por múltiplas corridas eletroforéticas e, por isso, a análise das imagens dos géis por um software é fundamental. Desta maneira, proteínas podem ser quantificadas e os spots em múltiplos géis podem ser combinados e comparados. A análise estatística pode ser feita em grupos de spots em conjuntos de géis, e variações, diferenças e similaridades podem ser avaliadas (SHAO-EN & PANDEY, 2001; SARKA et al., 2003)

A alta variação que existe entre os géis é o principal problema nos estudos comparativos, decorrentes da variabilidade extrínseca de amostras biológicas e outros fatores, como, o método empregado para a marcação das proteínas no gel, o preparo de amostra, a quantidade de proteína total aplicada, e provavelmente a polimerização do gel. No entanto, inúmeros fatores podem influenciar como a temperatura em que ocorre a polimerização, a pureza e a concentração dos reagentes, tempo de formação do polímero, e outros (RABILLOUD & LELONG, 2011). Devem ser tomados cuidados adicionais para realizar uma análise comparativa confiável. Um exemplo disso é a uniformidade da densidade de fundo no gel, a qual deve ser baixa em relação à densidade dos spots (BERTH et al., 2007).

Fluorescência de raios-X com radiação Síncrotron (SR-XRF)

A espectrometria de fluorescência de raios-X é uma técnica não destrutiva, na qual o preparo da amostra prévio à análise é simples e rápido. Esta técnica é multi-elementar, sendo capaz de identificar os elementos com números atômicos maiores que o do oxigênio (VAN LANGEVELD & VIS, 1991).

Existem poucos trabalhos na literatura que fazem o uso da SR-XRF como técnica de detecção após a separação eletroforética de proteínas. Recentemente, foi feito o mapeamento de proteínas provenientes de amostras vegetais obtidas a partir de calos embriogênicos de *Citrus*, previamente separadas por SDS-PAGE, utilizando a microfluorescência de raios-X com fonte de radiação síncrotron. A quantificação dos íons metálicos Ca^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, K^{+} e Zn^{2+} foi realizada empregando-se a SR-XRF; dos íons metálicos Mg^{2+} e Ca^{2+}, empregando-se a espectrometria de absorção atômica (FAAS). As análises, qualitativa e quantitativa, mostraram concordância entre os resultados, sendo que o Fe^{2+} e o Mg^{2+} foram detectados em apenas duas bandas de proteínas, indicando que estes íons metálicos devem ter um papel importante em processos bioquímicos, nos quais estas proteínas participam (VERBI et al., 2005).

Espectrometria de Massas (MS)

O princípio básico da espectrometria de massas (MS) é gerar íons de compostos inorgânicos e orgânicos por qualquer método apropriado, para separá-los pela sua razão massa-carga (*m/z*) e detectá-los qualitativa e quantitativamente pela sua *m/z* e abundância.

A espectrometria com fonte ESI (do inglês, *electrospray ionization*) é uma técnica branda que realiza a transferência de íons da solução para a fase gasosa, sendo extremamente útil para a análise de moléculas grandes, não voláteis e que podem adquirir carga, tal como as proteínas. Na ESI-MS, a solução é composta de um solvente volátil contendo o analito iônico em concentrações bastante baixas, tipicamente 10^{-6} a 10^{-4} mol/L. Além disso, a transferência de íons da fase condensada até a fase gasosa começa a pressão atmosférica e gradualmente prossegue para o alto vácuo do analisador de massas (GROSS, 2011).

Calpaínas e Calpastatina

O sistema das calpaínas é formado por proteases ativadas por cálcio, a μ-calpaína e a m-calpaína, juntamente com seu inibidor endógeno, a calpastatina. Acredita-se que a ação proteolítica das calpaínas no *post mortem*, nas fibras musculares, se dá pelo enfraquecimento da interação filamentos finos/disco-Z do sarcolema das fibras musculares, os quais apresentam as maiores relações com o amaciamento pós abate. A ação das calpaínas no disco-Z, concentra-se

especificamente nas proteínas titina, nebulina, filamina e troponina T, onde encontram seu sítio de ligação nos referidos substratos (DRANSFIELD, 1994).

Sabe-se que a diferença entre as calpaínas está na quantidade de íons cálcio necessários para a sua ativação, no qual geralmente a µ-calpaína requer entre 5 e 65 µM Ca^{2+} para se tornar ativa, enquanto a m-calpaína requer entre 300 e 1000 µM Ca^{2+} (GOLL et al., 1992). Outra característica importante é que essas proteases são capazes de realizar autólise com a presença de íons cálcio e isso leva a uma redução das chamadas subunidades da molécula. Assim, estudos demonstram que a µ-calpaína vai de 80 para 76 kDa, já a m-calpaína vai de 80 para 78 kDa (LONERGAN et al., 2010).

A calpastatina é negativamente associada ao amaciamento e maciez final da carne, uma vez que inibe a ação das calpaínas (GOLL et al., 2003). A presença dessa enzima inibidora tem sido alvo de diversos estudos com bovinos de corte e outras espécies produtoras de carne (Ilian et al., 2004). Pesquisadores relataram a existência de uma relação positiva entre a maior porcentagem de genes zebuínos (*Bos indicus*) no animal e a menor maciez da carne (WHEELER et al., 1994). Uma das explicações para este fato é que animais zebuínos devem apresentar níveis mais elevados de calpastatina, o que possivelmente resulta no decréscimo da maciez da carne (O'CONNOR et al., 1997).

Proteômica na Ciência da Carne

A maciez da carne bovina tem sido alvo de diversos estudos descritos na literatura, em linhas de pesquisa que englobam a proteômica e metaloproteômica, com o uso de técnicas como a 2D-PAGE, associadas geralmente com a espectrometria de massas (MS), conforme as etapas ilustradas na Figura 1. Os estudos tentam desvendar os conhecimentos sobre os mecanismos fisiológicos por trás dessa característica, com o intuito de identificar proteínas como potenciais biomarcadores que possam ser usados na sua predição.

Com o uso mais frequente dessas técnicas avançadas, torna-se necessário assegurar que o modelo biológico do experimento permita uma análise minuciosa e detalhada dos resultados obtidos. Além disso, a escolha dos métodos de extração de proteínas é determinante para que essas possam ser estudadas, e aquelas não extraídas devem ser desconsideradas (HOLLUNG et al., 2007).

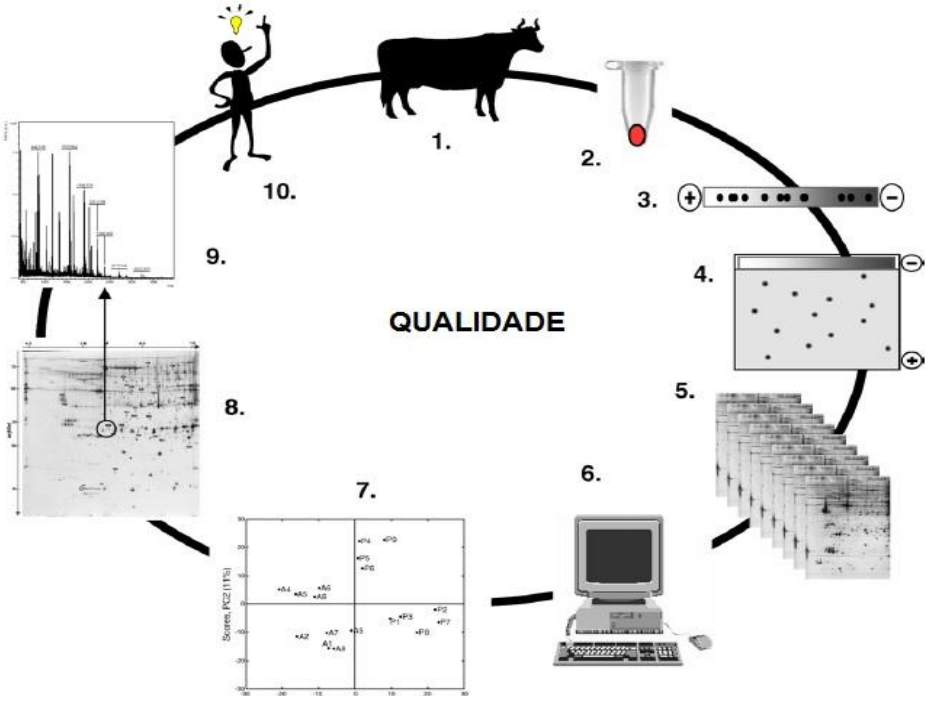

Figura 1. Desenho esquemático das diferentes etapas do estudo de proteoma de bovinos com o uso de 2D-PAGE e espectrometria de massas. (1) Escolha dos animais ou amostras para as análises; (2) Extração das proteínas; (3) Focalização isoelétrica (IEF); (4) SDS PAGE, eletroforese bidimensional; (5) Sobreposição e comparação das imagens dos géis; (6) Análise dos dados; (7) Interpretação e seleção das proteínas com diferentes expressões; (8) Extração dos spots proteicos diferentes; (9) Identificação das proteínas por espectrometria de massas; (10) Interpretação de todos os resultados (Adaptada de Hollung et al., 2007).

Os estudos proteômicos que combinam o uso das técnicas 2D-PAGE e MS devem considerar ainda que apenas uma parte das proteínas presentes nas amostras terá de ser analisada pelas técnicas de MS, por causa da demanda por tempo para obtenção e tratamento dos dados. Isso é especialmente válido para estudos comparativos entre animais ou grupos experimentais, devido às repetições dos géis do estudo em questão (RABILLOUD & LELONG, 2011).

Usando a eletroforese em primeira dimensão (SDS PAGE) e a MS para a “impressão digital” de proteínas, sete bandas proteicas foram encontradas em amostras do músculo *Longissimus dorsi* coletadas 36h após o abate, sendo que estas em conjunto poderiam explicar 82% das variações na força de cisalhamento (FC) após sete dias de estocagem da carcaças (SAWDI et al., 2004). Duas dessas bandas foram identificadas como fragmentos de miosina de cadeia pesada, e o nível desses fragmentos foi mais elevado 36h após o abate em carnes mais macias.

De forma semelhante, bandas proteicas de amostras do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos coletadas 36h após o abate foram correlacionadas com a FC mensurada 3 e 14 (maturação) dias após o abate, e a diferenças entre esses tempos

de medidas da maciez (ZAPATA et al., 2009). Todavia, os mesmos autores propuseram uma aplicação mais detalhada por 2D-PAGE, e verificaram que a *succinato desidrogenase* (SDH), uma enzima mitocondrial do ciclo de Krebs envolvida com a produção de ATP, foi identificada como possível biomarcador para maciez sensorial (por painel treinado) do músculo *Longissimus thoracis* avaliada em amostras maturadas por 14 dias. A abundância do spot proteico da SDH no estudo foi capaz de explicar 66% e 58% da variação inicial e final da maciez, respectivamente. Assim, Jia et al. (2006) ao examinar por 2D-PAGE e MS as mudanças que ocorrem em proteínas do citosol (enzimas metabólicas) dos músculos *Longissimus dorsi* e *Semitendinosus,* indicaram que, enquanto cinco proteínas (*cofilin, lactoylglutathione lyase, SP-22, HSP27,* e *HSP20*) sofrem alteração nas primeiras 24h do período *post mortem*, outras quinze proteínas sofrem mudanças de expressão em ambos os músculos, durante o mesmo período.

O grau de maciez da carne no período *post mortem* é primariamente causado pela µ-calpaína, mediado por uma degradação chave de proteínas estruturais (titina e nebulina principalmente) do músculo esquelético. Posteriormente, a m-calpaína exerce efeito sobre o amaciamento da carne no *post mortem*, porém em menor escala. Existe ainda uma terceira isoforma, a calpaína 3 que pode contribuir, aumentando a maciez da carne após o estabelecimento do *rigor mortis*. Nessa ótica, o estudo de Ilian et al. (2004) submeteu amostras do músculo *Longissimus thoracis* de ovinos a técnicas de SDS-PAGE e *Western blotting,* afim de verificar mudanças no grau de maciez, no índice de fragmentação miofibrilar (MFI), na proteólise de proteínas estruturais e ainda na autólise da calpaína 3, em diferentes tempos de estocagem *post mortem.* Os autores constataram que a enzima foi associada com a fragmentação miofibrilar e autólise gradativa durante a maturação da carne. A cinética do processo de autólise foi significativamente associada ao amaciamento da carne ($r = 0,921$; $P<0,001$) e a proteólise da nebulina ($r = 0,930$; $P<0,001$).

Enquanto a maioria dos estudos (ZAPATA et al., 2009; Jia et al. 2006; Ilian et al. 2004) foram desenvolvidos com amostras coletadas após o abate, amostras obtidas por biópsias do músculo *Longissimus dorsi* coletadas quatro dias antes do abate foram analisadas por 2D-PAGE, para identificar biomarcadores para FC mensurada com sete dias de maturação (JIA et al., 2009). Esse estudo revelou que sete spots proteicos diferiram antes do abate entre as carnes dura e macia, entretanto, uma única proteína, a peroxiredoxina-6, foi confirmada com a técnica *Western blotting*. A peroxiredoxina-6 é uma enzima que desempenha um papel de proteção contra o estresse oxidativo, e níveis elevados dessa enzima no grupo de carne macia também

foram encontradas em amostras retiradas uma hora após o abate dos mesmos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC (2009). Disponível em <http://www.abiec.com.br/estatisticas>. Acesso em 03/02/2012.

BANDOW, J. E.; BAKER, J. D.; BERTH, M.; et al. Improved image analysis workflow for 2-D gels enables large-scale 2D gel-based proteomics studies – COPD biomarker discovery study. **Proteomics,** v. 8, p. 3030-3041, 2008

BERTH, M.; MOSER, F.M.; KOLBE, M.; et al. The state of the air in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images, **Applied Microbiology Biotechnology,** v. 76, p. 1223-1243, 2007.

BONIN, M. N. Estudo da influência de touro e de genearca da raça Nelore nos aspectos quantitativos e qualitativos de carcaça e da carne. **Tese do Doutorado**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. (<http://www.teses.usp.br/5554028.pdf>).

DRANSFIELD, E. Modelling post-mortem tenderization v. inactivation of calpains. **Meat Science**, v. 37, p. 391–409, 1994.

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

GOLL, D. E.; THOMPSON, V. F.; LI, H. Q; et al. The calpain system. **Physiological Reviews,** v. 83, p. 731-801, 2003

GOLL, D. E.; THOMPSON, V. F.; TAYLOR, R. G.; et al. Role of the calpain system in muscle growth. **Journal of Biochemistry**, v. 74, p. 225−237. 1992.

GOMEZ-ARIZ, J. L.; GARCIA-BARRERA, T.; LORENZO, F. Use of mass spectrometry techniques for the characterization of metal bound to proteins (metallomics) in biological systems. **Analytical Chemistry**, v. 524, p. 15-22, 2004.

GÖRG, A.; WEISS, W.; DUNN, M.; et al. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics,** v. 4, p. 3665-3685, 2004.

GREASER, M. L.; GUO, W. **Handbook of Meat and Meat Processing.** Second Edition. CRC Press, p. 63-78, 2012.

GROSS, J. **Eletrospray Ionization.** In: GROSS, J. **Mass Spectrometry: A Textbook.** 2ed. Springer, p. 560-620, 2011.

HADLICH, J. C., MORALES, D. C., SILVEIRA, A. C., OLIVEIRA, H. N., & CHARDULO, L. A. L. Efeito do colágeno na maciez da carne de bovinos de distintos grupos genéticos. **Acta Science and Animal Science Maringá,** v. 28, n. 1, p. 57–62, 2006.

HOAGLAND, R.; McBRYDE, C. N.; POWICK, W. C.; et al. Changes in fresh beef during cold storage above freezing. **USDA Bull,** v. 433, p. 1–100, 1917.

HOLLUNG, K.; et al. Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. **Meat Science,** v. 77, p. 97-104, 2007.

HOLLUNG, K.; VEISETH-KENT, E. **Omics Techonologies**: Tools for food science. Noureddine Benkeblia, *University of the West Indies, Kingston, Jamaica.* CRC Press, p. 313-338, 2012.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Estatística da Produção Pecuária:** Março 2011, São Paulo, p. 28, 2011.

ILIAN, M. A.; BECKHIT, A. E.; BICKERSTAFFE, R. et al. The relationship between meat tenderization, myofibril fragmentation and autolysis of calpain 3 during post-mortem aging. **Meat Science,** v. 66, p. 387-397, 2004.

JIA, X.; HILDRUM, K. I.; WESTAD, F.; et al. Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early post mortem period in longissimus thoracis bovine muscle analyzed by proteomics. **Journal of Proteome Research,** v. 5, p. 1763–1769, 2006.

JIA, X.; VEISETH-KENT, E.; GROVE, H.; et al. Peroxiredoxin-6 - A potential protein marker for meat tenderness in bovine *longissimus thoracis* muscle. **Journal of Animal Science,** v. 87, p. 2391–2399, 2009.

LONERGAN, E. H.; ZHANG, W.; LONERGAN, S. M.; et al. Biochemistry of postmortem muscle — Lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, v. 86, p. 184-195, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios da Bioquímica de Lehninger:** Coordenação de tradução: Fabiana Horn. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

O'CONNOR, S. F.; TATUM, J. D.; WULF, R. D.; et al. Genetic effects on beef tenderness in Bos indicus composite and Bos taurus cattle. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1822-1830, 1997.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry,** Bethesda, USA, v. 250, p. 4007-4021, 1975.

RABILLOUD, T.; LELONG, C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial. **Journal of Proteomics,** v. 74, p. 1829-1841, 2011.

SARKA, B. G. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n.5, 2003.

SAWDY, J. C.; KAISER, S. A.; ST-PIERRE, N. R.; et al. Myofibrillar 1-D fingerprints and myosin heavy chain MS analyses of beef loin at 36 h postmortem correlate with tenderness at 7 days. **Meat Science,** v. 67, p.421–426, 2004.

SHAO-EN, O. e PANDEY, A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. **Biomolecular Engineering,** v. 18, p. 195-205, 2001.

SILVA, F. **Avaliação de Selênio em spots protéicos de plasma e tecidos muscular e hepático de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) por SRXRF após separação por 2DPAGE**. 2009. 21 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu. 2009.

SILVA Jr,, J. G. **Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático.** Interciência. Rio de Janeiro, 2001.

SZPUNAR, J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 54-56, 2004.

VAN LANGEVELD, F.; VIS, R. D. Trace-element determinations using a 15-keV synchrotron X-ray microprobe. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 2253-2259, 1991

VERBI, F. M.; ARRUDA, S. C. C.; RODRÍGUEZ, A. P. M.; et al. Metal-binding proteins scanning and determination by combing gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 62, p. 97-109, 2005.

WHEELER, T. L.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M.; et al. Effect of marbling degree on beef palatability in Bos taurus and Bos indicus cattle. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 3145-3151, 1994.

ZAPATA, I.; ZERBY, H. N.; WICK, M.; et al. Functional proteomic analysis predicts beef tenderness and the tenderness differential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry***,* v. 57, p. 4956–4963, 2009.

CAPÍTULO 2

MÉTODOS BIOANALÍTICOS PARA ESTUDO METALOPROTEÔMICO DO MÚSCULO *Longissimus dorsi* DE BOVINOS NELORE (*Bos indicus*) CONTRASTANTES PARA MACIEZ DA CARNE

Métodos bioanalíticos para estudo metaloproteômico do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos Nelore (*Bos indicus*) contrastantes para maciez da carne

RESUMO: O presente trabalho retrata estudo metaloproteômico no tecido muscular de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) contrastantes para a característica de maciez da carne baseado em métodos de separação de proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE), identificação dos íons cálcio nos spots proteicos por fluorescência de raio-X (SR-XRF) e caracterização das proteínas por espectrometria de massas (ESI-MS). Os animais selecionados para compor o grupo M (carne macia) expressaram valores de força de cisalhamento (FC) entre 3,39 e 3,98 kg, já os animais selecionados para o grupo D (carne dura) expressaram valores de FC entre 7,11 e 7,45 kg. Foi incluído um terceiro grupo (P) de animais da raça Piemontês (*Bos taurus*) como modelo comparativo do grau de maciez da carne. O número médio de spots proteicos encontrados nas repetições dos géis dos grupos M, D e P foram de 186 ± 20, 146,5 ± 16,5 e 175 ± 15, respectivamente. As correlações obtidas nas repetições dos géis indicaram que os procedimentos de extração da proteína total foram eficientes e preservaram a estrutura metal-proteína. A maior detecção (56%) qualitativa de cálcio por SR-XRF nos spots proteicos de animais com carne macia é um indicativo da ocorrência da atividade proteolítica no tecido muscular durante o período *post mortem*. A 2D-PAGE foi eficiente no fracionamento das proteínas presentes em amostras de tecido muscular (*Longissimus dorsi*). As correlações obtidas nas repetições dos géis indicaram que os procedimentos de extração da proteína total foram eficientes e preservaram a estrutura metal-proteína.

Palavras-chave: 2D-PAGE, cálcio, ESI-MS, força de cisalhamento, SR-XRF

Bioanalytical methods for the metalloproteomics study of bovine *Longissimus dorsi* muscle tissue contrasting for meat tenderness in the Nellore breed (*Bos indicus*)

ABSTRACT: The present article describes a metalloproteomics study of bovine muscle tissue with different grades of meat tenderness from animals of the Nellore breed (*Bos indicus*) based on protein separation by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE), the identification of calcium ions in protein spots by Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence (SR-XRF) and the characterization of proteins by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). The meat from the animals selected to form the Te group (tender meat) expressed shear force (SF) values ranging from 3.39 to 3.98 kg, and the meat from the animals selected for the To group (tough meat) expressed values ranging from SF 7.11 to 7.45 kg. A third group (P) of Piedmontese animals (*Bos taurus*) was included as a comparative model for the level of meat tenderness. The mean number of protein spots found in the gel replicates of the Te, To and P groups were 186 ± 20, 146.5 ± 16.5 and 175 ± 15, respectively. The correlations found in the gel replicates indicated that the total protein extraction procedures were efficient and preserved the metal-protein structure. The higher qualitative detection of calcium (56%) by SR-XRF in the protein spots of animals with tender meat was indicative of the occurrence of proteolytic activity in the muscle tissue during the *post mortem* period. The 2D-PAGE was efficient fractionation of proteins present in muscle tissue samples (*Longissimus dorsi*). The correlations obtained in repetitions of the gels indicated that the procedures for extraction of total protein were efficient and preserved the structure metal-protein.

Keywords: 2D-PAGE, calcium, ESI-MS, shear force, SR-XRF

1. Introdução

Na ciência da carne, a aplicação de conhecimentos sobre o proteoma dos músculos é de longe uma nova ferramenta. Todavia, nos últimos anos, diversos estudos foram publicados com dados proteômicos que elucidaram diferentes aspectos que incluem tanto os processos de estocagem e maturação como respostas a diferentes condições de processamento da carne (JIA et al., 2009; LONERGAN et al., 2010; HOLLUNG & VEISETH-KENT, 2012). Na maioria desses estudos, a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) tem sido usada em combinação com a espectrometria de massas para identificação de proteínas específicas.

Em estudos proteômicos, a identificação de diferenças quanto à expressão de proteínas e/ou a verificação de spots novos ou ausentes e, portanto, de possíveis biomarcadores, é uma de suas principais aplicações da 2D-PAGE (BANDOW et al., 2008). As proteínas fracionadas por 2D-PAGE podem então ser identificadas com base em características únicas que são medidas por espectrometria de massas (MS). A MS é uma ferramenta analítica indispensável em química, bioquímica e ciência biológicas afins. Entre as várias finalidades, a MS é usada para a análise de bibliotecas combináveis, células e sequenciamento de biomoléculas em tecidos (GROSS, 2011).

No âmbito da proteômica, o maior desafio para melhorar a qualidade dos produtos cárneos seria entender quais variações acometem a maciez das espécies produtoras de carne. Nesse segmento, mudanças no metabolismo energético no proteoma do músculo *Longissimus thoracis* de bovinos avaliados nos períodos pré e pós abate (*ante mortem* e *post mortem)* foram verificadas por Jia et al. (2006). As amostras deste estudo foram coletadas por biópsia quatro dias antes do abate e 60 minutos após o abate. Os resultados sugerem que 24 proteínas exibem mudanças significativas entre os períodos avaliados, sendo essas as proteínas envolvidas com a via glicolítica, e/ou proteínas de choque térmico (*heat shock proteins – HSP*).

Sabidamente as calpaínas são proteases cálcio dependentes envolvidas com amaciamento da carne durante o período *post mortem,* juntamente com a degradação chave das miofibrilas e proteínas estruturais. Com o intuito de aumentar o número de informações sobre esse sistema na degradação de proteínas miofibrilares durante o *post mortem,* Lametsch et al. (2004) utilizaram técnicas de SDS-PAGE e 2D-PAGE combinadas com a MS. Os autores verificaram que a isoforma μ-calpaína é responsável pela degradação das proteínas actina, miosina de cadeia pesada (MHC), miosina de cadeia leve I, tropomiosina α4, tropomiosina α1, CapZ, piruvato quinase e

thioredoxina. Os autores ainda classificam a actina e a MHC como os principais substratos da μ-calpaína, pois quando esses sofrem menor degradação exercem influência sobre a maciez da carne.

Já no estudo de Kim et al. (2008), os autores relataram que, enquanto a expressão da α-actina foi maior para os animais submetidos ao padrão A de qualidade (carne macia e com alta marmorização), a expressão de proteínas do complexo T, proteína de choque térmico (*heat shock protein - HSP27*) e a inositol 1,4,5-trifosfato receptor tipo 1 (IP3R1) foi mais elevada para os animais do padrão B (carne dura e sem marmorização). Essa pesquisa foi conduzida com o intuito de explorar o uso dessas proteínas como biomarcadores para maciez e marmorização da carne, e a expressão quantitativa da HSP27 e IP3R1 foram correlacionadas com a marmorização, maciez e níveis de cálcio livres, o que sugere que tais proteínas podem ser utilizadas como biomarcadores para qualidade de carne de bovinos Hanwoo.

Contudo, poucos estudos são desenvolvidos com animais do gênero *Bos indicus*. Além disso, os propósitos desses estudos geralmente estão associados a investigações que buscam respostas sobre as variações da maciez da carne devido a fatores ambientais ou por influência de grupos genéticos. Entretanto, destaca-se uma vertente que busca identificar animais dentro de determinada raça, que expressem potencial genético para produção de carne com características organolépticas de importância econômica, tal como a maciez. Em vista do exposto acima, esse trabalho objetiva realizar a separação de proteínas do músculo *Longissimus dorsi* (*L. dorsi*) por eletroforese bidimensional (2D-PAGE), bem como a identificação dos íons cálcio nos spots proteicos por fluorescência de raio-X (SR-XRF) e a caracterização das proteínas por espectrometria de massas (ESI-MS) de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) contrastantes quanto a maciez de carne.

2. Material e Métodos

2.1. Animais e colheita de amostras

Foram utilizados 1084 bovinos da raça Nelore, machos inteiros, com idade entre 20 a 24 meses, todos com informações de desempenho e genealogia disponíveis. Esses animais foram terminados em confinamento por um período mínimo de 90 e máximo de 120 dias. O abate dos animais ocorreu nos anos de 2010, 2011 e 2012 em frigoríficos colaboradores de acordo com as normas estipuladas para o abate humanitário de bovinos (BRASIL, 2000). As carcaças foram resfriadas por 24h e após esse período, foram colhidas amostras do músculo *L. dorsi* entre a 12ª e 13ª costelas,

em sentido cranial de cada meia carcaça, para a realização dos ensaios laboratoriais. Do total de animais abatidos foram selecionados 40 indivíduos divididos em dois grupos experimentais contrastantes quanto à maciez da carne: (D) animais com carne dura e (M) animais com carne macia. Foi incluído um terceiro grupo (P) de animais da raça Piemontês (*Bos taurus*) para servir como modelo comparativo do grau de maciez da carne, assim como do crescimento acelerado e hipertrófico do tecido muscular.

Os animais dos grupos D e M foram selecionados de acordo com os resultados obtidos de análises físicas feitas no músculo *L. dorsi,* pela determinação da força de cisalhamento (FC) proposta por Wheeler et al. (1995). Também foram considerados os resultados de análises físico-químicas da carne como área de olho de lombo e espessura de gordura subcutânea (*USDA - Quality and Yield Grade*, 2000), coloração instrumental (RENERRE, 1982), índice de fragmentação miofibrilar (CULLER et al., 1978) e teor de lipídeos totais (BLIGH & DYER, 1959), informações que refinaram a escolha dos animais e auxiliaram na identificação de possíveis interferentes nos valores da FC. Foram pesadas aproximadamente 5 g de amostra fresca do músculo *L. dorsi* de cada animal selecionado para compor o *pool* de amostras dos três grupos experimentais. Essas amostras de tecido muscular foram homogeneizadas em um triturador de carne durante 2 minutos, sendo depois transferidas para tubos Falcon® de 45 mL e armazenadas e freezer a -80º C.

2.2. Extração, precipitação e ressolubilização das proteínas

Cerca de 3 g de tecido muscular do *pool* de cada grupo experimental (pesados em triplicata) foram triturados com 30 mL de água deionizada com Ultra-turrax com haste de cisalhamento (Marconi - MA102/E) a 20000 rpm duas vezes por 30 segundos. Os extratos contendo as proteínas foram separados da parte sólida por centrifugação a 9000 rpm e 4° C em ultracentrífuga refrigerada. Os extratos proteicos obtidos dessas amostras foram transferidos para tubos Eppendorf ® e depois usados para quantificação das proteínas totais e separações eletroforéticas. O conteúdo de proteínas desses extratos proteicos foi precipitado com uma solução de acetona gelada 80% (v/v), numa proporção de amostra para acetona de 1:4. Essa precipitação foi conduzida por 2-3h em geladeira a -20° C, para garantir que esse procedimento ocorresse quantitativamente. As proteínas precipitadas foram centrifugadas a 13000 rpm a 4° C em ultracentrífuga por 10 minutos, e então o sobrenadante foi removido. As proteínas precipitadas foram lavadas duas vezes com a mesma solução usada no procedimento de precipitação. Posteriormente, parte dessas proteínas precipitadas

foram ressolubilizadas em NaOH 0,50 mol.L^{-1} para a quantificação das proteínas totais. Outra parte foi ressolubilzada em um tampão específico contendo 7 mol L^{-1}, tioureia a 2 mol L^{-1}, 2% (m/v) de 3-[(3-cloroamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS), 0,5% (m/v) de anfolitos de pH 3 e 0,02% de azul de bromofenol. Posteriormente, 2,8 mg de 1,4-ditiotreitol (DTT) foram adicionados a este tampão, sendo essa mistura usada nas separações eletroforéticas (LIMA et al., 2010).

2.3. Quantificação da proteína

A concentração de proteínas totais das amostras de tecido muscular bovino foi determinada pelo método do Biureto (GORNALL et al., 1949). Curvas analíticas de calibração foram construídas com concentrações de 10 a 100 g.L^{-1} a partir de uma solução estoque de albumina (100 g.L^{-1}). Foi utilizada uma massa de proteína de aproximadamente 250 µg de cada amostra usada para a primeira etapa da eletroforese bidimensional.

2.4. Separações eletroforéticas (2D-PAGE)

Foram aplicados aproximadamente 250 µg de proteínas dos extratos proteicos de tecido muscular bovino em fitas para focalização isoelétrica de 13 cm, que continham o gel pré-fabricado com os anfólitos imobilizados de pH 3 a 10. Foram utilizados também fitas de 13 cm com anfólitos imobilizados de pH 4 a 7. As corridas em primeira dimensão foram feitas adaptando-se os procedimentos descritos por Lima et al. (2010) e Santos et al. (2011). Na segunda etapa do processo eletroforético (SDS-PAGE), as fitas foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 12,5% (m/v), adaptando-se os procedimentos recentes descritos por Lima et al. (2010) e Santos et al. (2011).

2.5. Tratamento de Imagens

Os géis dos três grupos experimentais foram escaneados e as imagens analisadas pelo software ImageMaster Platinum v. 7.0 para a obtenção de parâmetros como número de spots, porcentagem de *matching* entre os géis, ponto isoelétrico (pI) e massa molar (MM) dos spots proteicos. O tratamento das imagens foi efetuado para os géis de tecido muscular bovino, obtidos de um mesmo processo de separação eletroforética, ou seja, sobre as mesmas condições analíticas. As imagens passaram

por um processo de edição automática e manual para a retirada de falsos spots e, após a limpeza, foram obtidos dados como número de spots por gel, pI e MM dos spots e quantidade de proteínas presente em cada um destes. Efetuou-se o cálculo do grau de similaridade entre os géis dos diferentes amostras para evidenciar a equivalência entre os spots dos géis, processo denominado de *matching.* Por fim, os spots dos géis foram comparados quanto a sua distribuição, volume, intensidade relativa, pIs e MM.

2.6. Investigação Qualitativa do Cálcio em Spots Proteicos por SR-XRF

Os spots proteicos dos géis obtidos do tecido muscular bovino, entre os diferentes grupos experimentais foram levados ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron em Campinas-SP para a análise dos íons cálcio por fluorescência de raios-X com radiação síncrotron (SR-XRF). Devido a dificuldade em se analisar todos os spots de todos os géis pelas técnicas SR-XRF, para a avaliação e detecção dos íons cálcio foram escolhidos aleatoriamente os spots proteicos mais intensos e devidamente separados por pI e MM. A área do gel escolhida para seleção dos spots foi a de massa molar entre 20 e 97 kDa, critério adotado em função das informações da literatura sobre as isoformas da molécula das calpaínas que geralmente são compostas por uma larga subunidade de 80 kDa com quatro domínios, e uma pequena subunidade regulatória de 30 kDa com dois domínios. A calpastatina por sua vez é constituída de isoformas que variam de 68 a 170 kDa (TODD et al., 2003).

Os spots foram recortados dos géis com a ponta de uma ponteira e armazenados previamente em tubos Eppendorf®. Posteriormente, os spots foram secos em temperatura ambiente com auxílio de uma lâmpada fria, sendo em seguida fixados em uma plataforma de alumínio para a realização das medidas. Finalmente, após estabilizar as condições analíticas (Energia armazenada no anel, 1,37 Gev; Energia do fóton incidente, 32,5 keV; Fluxo de fóton, 10^{10} fóton.s^{-1}) esses spots proteicos foram irradiados com um feixe de 500 mícrons, que incidiu na amostra por 200 segundos em dois pontos. Os resultados dos espectros foram processados pelo programa AXIL®, ajustando a intensidade da variação do feixe de luz e utilizando os valores das áreas dos picos normalizados dos espectros de SR-XRF (após desconto do branco analítico – gel sem spot proteico).

2.7. Digestão dos spots proteicos e caracterização das proteínas por ESI-MS

Para a caracterização das proteínas pelas técnicas ESI-MS foram escolhidos aleatoriamente os spots proteicos mais intensos e devidamente separados por pI e MM, juntamente com aqueles onde os íons cálcio foram qualitativamente detectados. Inicialmente, os spots de proteínas a serem caracterizados por espectrometria de massas foram recortados do gel de poliacrilamida e cada um deles foi colocado em um pocinho de uma placa, denominada *Zip Plate* (Millipore), na qual foi feita a digestão tríptica. A digestão tríptica foi feita com o uso de um kit especifico (*In-Gel Digest$_{ZP}$ Kit*) que, além de digerir a proteína, purifica os peptídeos obtidos.

A detecção dos peptídeos foi feita de forma *online* pelo espectrômetro de massas, configurado para operar em modo de aquisição dependente de dados (DDA), contendo uma função de MS (*fullscan* de *m/z* 200 a 2000), três funções de MS/MS e uma função de padrão externo de calibração (*lockmass*). Como demais parâmetros do espectrômetro de massas estão voltagem do capilar 3,0 kV, voltagem do cone 30 V, temperatura da fonte 100°C, fluxo do gás de nanoESI 0,5 L h^{-1}, energias de colisão das celas *Trap* e *Transfer* respectivamente em 6 e 4 eV, detector em 1700 V. Os espectros de MS (*fullscan*) e MS/MS (espectro de íons fragmentos por dissociação induzida por colisão) foram adquiridos a uma taxa de 1 espectro s^{-1}. Previamente às análises, o instrumento foi calibrado com oligômeros de ácido fosfórico (solução de H_3PO_4 0,05% v/v em H_2O/MeCN 50:50) de *m/z* 90 a 1960. Argônio a uma pressão de $9{,}7.10^{-3}$ mbar foi utilizado como gás de colisão.

As corridas de LC-ESI-MS foram processadas pelo software ProteinLynx Global Server v.2.2. (Waters) e analisadas por busca em banco de dados empregando-se o sistema MASCOT v.2.2. (Matrix Science Ltd) Como parâmetros da busca foram selecionados digestão com tripsina com até 1 sítio de clivagem ignorado, oxidação em resíduos de metionina como modificação variável e tolerância de massa de peptídeos e fragmentos ambos em ±0,5 Da. As buscas foram feitas no banco de dados NCBI.

2.8. Análise Estatística

Após a verificação da consistência e distribuição dos dados, as características de qualidade de carne foram avaliadas utilizando-se o procedimento GLM (SAS, 2011). O modelo proposto utilizou a característica FC como variável dependente. Os efeitos fixos considerados foram: fazenda de criação e ano de abate, já as covariáveis

lineares foram a AOL, EGS e MFI. Os valores médios ajustados foram comparados pelo Teste de Tukey-Kramer (SAS, 2011). Os dados de FC foram ajustados pelo modelo de maior coeficiente de determinação e efeitos significativos. Após o procedimento GLM do SAS (2011) foram solicitados os valores preditos (comando *Predicted*) com base no modelo. Os valores preditos foram classificados de forma crescente e marcados os 20 animais com menores valores de FC preditos, assim como os 20 animais com maiores valores de FC preditos. As amostras destes 40 animais foram coletadas para os procedimentos das análises proteômicas. O procedimento FREQ (SAS, 2011) foi usado para testar as diferenças entre as frequências de incidência de cálcio nos spots proteicos pelo teste Qui-Quadrado. As frequências esperadas puderam ser estimadas com o uso das frequências de sucesso (presença de cálcio) em todos os grupos.

3. Resultados e discussão

3.1. Qualidade da carne bovina

Observou-se que os efeitos de fazenda (ex: condições da pastagem), ano de abate, AOL e MFI alteraram significativamente ($P<0,001$) a média da FC dos animais avaliados. O modelo empregado permitiu verificar diferenças no grau de maciez da carne dos animais. As variáveis EGS, LT e coloração instrumental não alteraram ($P>0,05$) a maciez da carne. Assim, após o ajuste dos dados com o uso de todas as informações descritas anteriormente, os animais selecionados para compor o grupo M (carne macia) expressaram valores de FC entre 3,39 e 3,98 kg, já os animais selecionados para o grupo D (carne dura) expressaram valores de FC entre 7,11 e 7,45 kg.

3.2. Proteína total e Separações eletroforéticas

Com base no resultado da concentração de proteína total presente nas amostras de tecido muscular bovino, foi possível calcular o volume de extrato proteico (obtido da solubilização do precipitado acetônico) a ser adicionado nas fitas na etapa de hidratação que antecede à focalização isoelétrica. As concentrações de proteínas nos extratos dos grupos M, D e P foram de 28,403 ± 0,970, 36,046 ± 0,841 e 23,803 ± 1,521 $g.L^{-1}$, respectivamente. O cálculo da massa de proteína de 250 µg foi usado devido à fita de 13 cm utilizada na etapa de focalização isoelétrica (GE HEALTHCARE, 2007).

Os experimentos com a 2D-PAGE sobre as amostras de tecido muscular bovino foram sempre desenvolvidos com no mínimo três repetições por grupo. A Figura 1 ilustra dois géis representativos obtidos de amostras do músculo *L. dorsi.* Os géis das corridas eletroforéticas apresentaram boa resolução (*matching* ≥ 50%), o que demonstra que a separação de proteínas foi eficiente (LIMA et al., 2010). Existe uma grande diversidade de spots proteicos, sendo válido destacar que os géis produzidos em gradiente de pH 4-7 proporcionaram também uma boa separação das proteínas nessa faixa de ponto isoelétrico (pI). Observa-se ainda que a maioria dos spots proteicos estão distribuídos principalmente na faixa de MM de 20 a 66 kDa, com pIs mais frequentes na faixa de 5 a 7, aproximadamente. Contudo, é válido destacar também a presença de spots proteicos com massa molecular mais elevada (MM > 66 kDa).

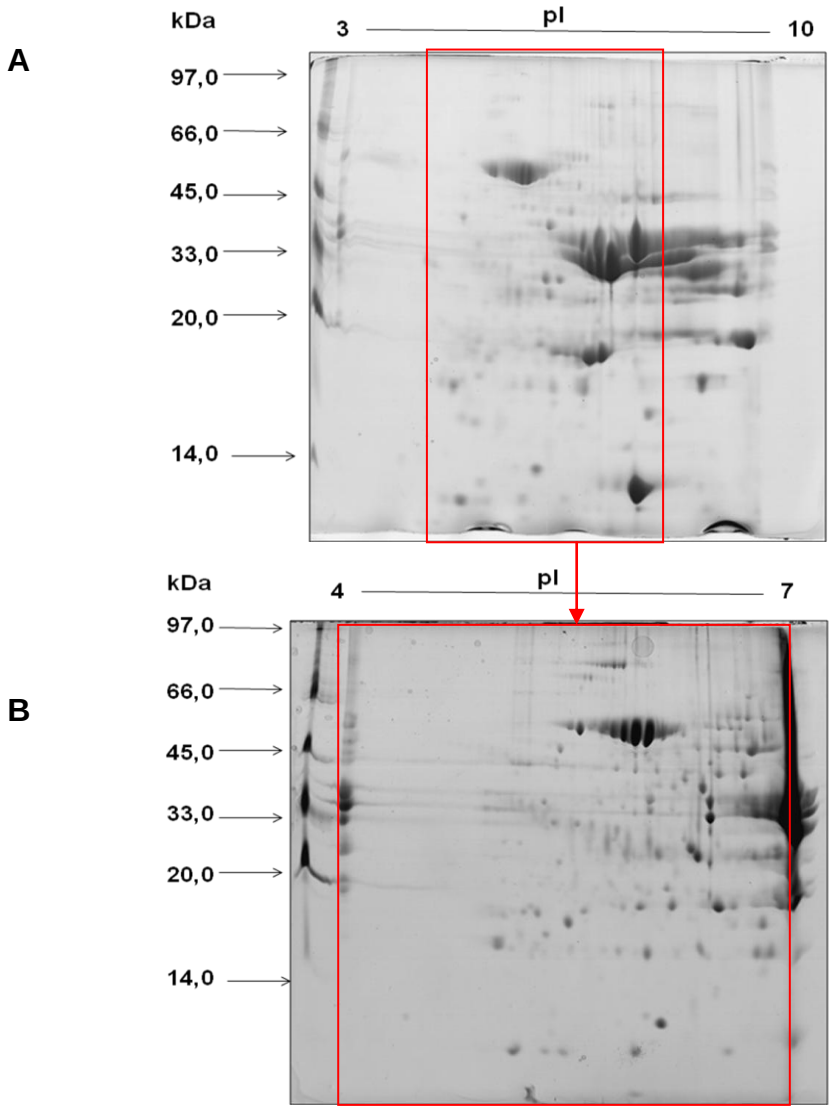

Figura 1. Géis 12,5% (m/v) de amostras do músculo *L. dorsi* de bovinos da raça Nelore - grupo M. (**A**) com faixa de pI de 3-10 e (**B**) com faixa de pI de 4-7, ambos com MM de 14-97 kDa.

Nota-se que ocorreu uma melhor separação no gradiente de pH 4 a 7 no conjunto de proteínas de MM de 20 – 97 kDa, comprovando assim, que se deve trabalhar com dois gradientes de pH no fracionamento das proteínas das amostras objeto de estudo.

3.3. *Estudo de imagem*

O estudo das imagens entre os pares de géis foi feita por comparação do processo de *matching* do programa ImageMaster Platinum (v. 7.0) , que consiste em identificar quais spots são equivalentes entre estes pares. Após tal procedimento, o programa faz a comparação entre o par de géis considerando os demais spots, identificando assim os spots que são equivalentes. O resultado desse processo de tratamento das imagens permitiu obter a correlação entre os pares de géis.

O tratamento de imagem das corridas eletroforéticas dos grupos M, D e P revelou uma correlação entre os géis (n = 3) de 73%, 56% e 58%, respectivamente. Nesse sentido, isso significa que os spots proteicos estavam presentes nas três repetições desses géis. O número médio de spots proteicos encontrados nas repetições dos géis dos grupos M, D e P foram de 186 ± 20, 146,5 ± 16,5 e 175 ± 15, respectivamente. Esse desvio padrão abaixo de 12% pode ser considerado como um bom indicativo no fracionamento de proteínas por 2D-PAGE (BRANDÃO et al., 2010).

No estudo das imagens dos géis, foram estimadas as correlações entre os spots proteicos dos diferentes grupos experimentais, considerando o volume normalizado - %V (Figura 2), permitindo assim, a avaliação de uma possível correlação de expressão entre as proteínas para o conjunto de spots proteicos analisados.

Para tal procedimento, o gel do grupo M foi usado para comparação com os grupos D e P. Na Figura 2, cada ponto dos gráficos representa a relação entre o volume normalizado dos spots correlacionados durante o processo de *matching* (SUSSULINI et al., 2007). Observou-se que a correlação variou entre os spots proteicos dos géis dos grupos M e D ($r > 0,84$) e dos géis dos grupos M e P ($r > 0,95$) considerando a %V.

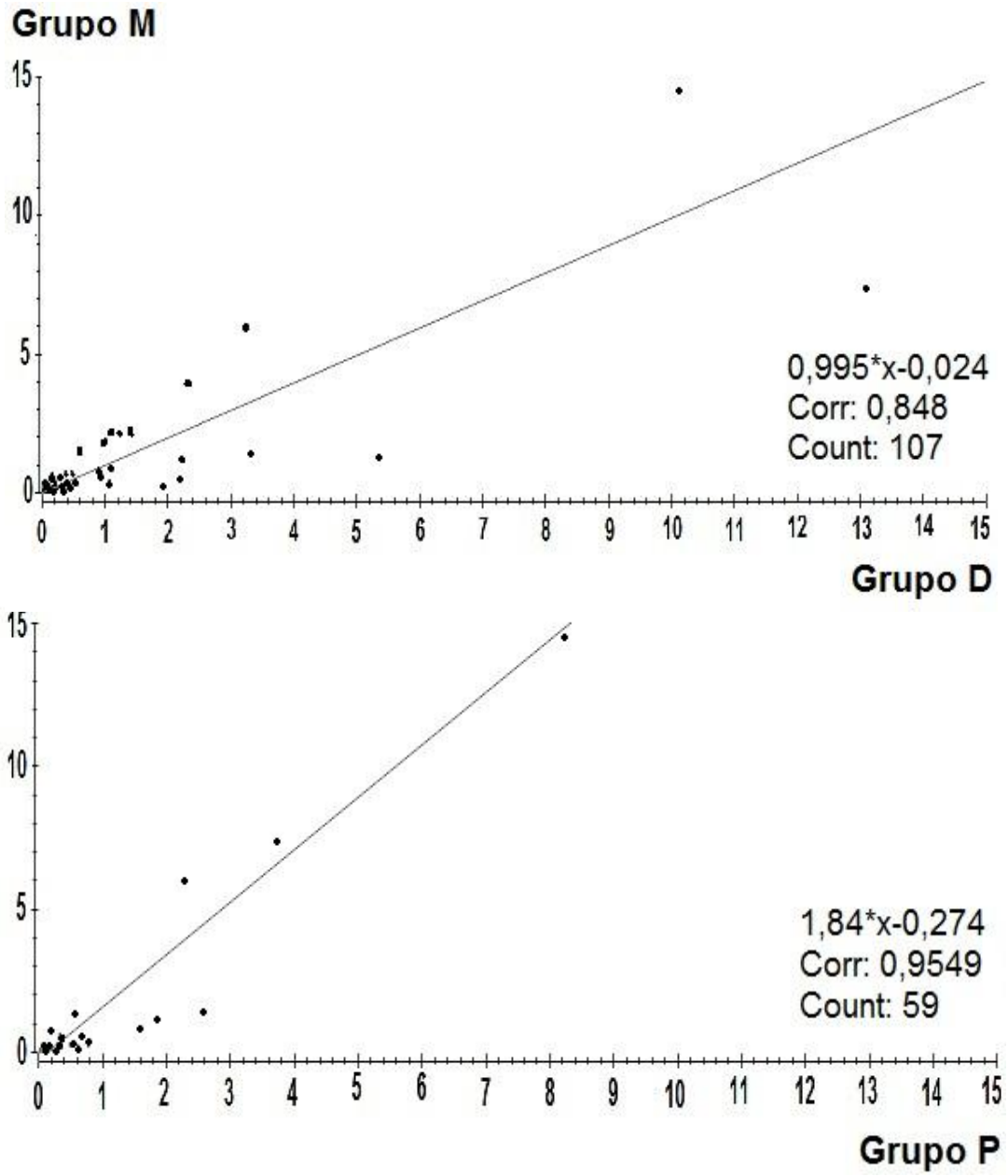

Figura 2. (**A**) Correlação entre o volume normalizado (%V) dos spots presentes nos géis dos grupos M (Bovinos Nelore carne macia) e D (Bovinos Nelore carne dura); (**B**) entre o %V dos spots presentes nos géis dos grupos M e P (Bovinos Piemontês).

Em outras palavras, isso significa que o perfil proteômico do grupo M é mais próximo ao perfil do grupo P, em comparação ao grupo D. Com base nessas informações, possivelmente a expressão das proteínas do tecido muscular dos animais da raça zebuína Nelore com carne macia é mais semelhante à expressão das proteínas do tecido muscular dos animais da raça taurina Piemontês, esta última usada como modelo de comparação para características de qualidade de carne.

3.4. Análise qualitativa de cálcio em spots proteicos por SR-XRF

Os resultados da detecção dos íons cálcio nos spots proteicos dos diferentes grupos experimentais foram descritos na Tabela 1. Com base nesses resultados a maior detecção (56%) qualitativa de cálcio por SR-XRF nos spots proteicos de animais com carne macia pode ser um indicativo da ocorrência da atividade proteolítica no tecido muscular após o abate desses animais (período *post mortem*).

Table 1. Análise qualitativa de cálcio em spots proteicos por Espectrometria de Fluorescência de raio-X com Radiação Syncrotron (SR-XRF).

Grupo Experimental[1]	Quantidade de spots analisados	Quantidade de spots com cálcio	Quantidade de spots sem cálcio
M	107	60	47
D	109	26	83
P	47	22	25
Estatística[2]	Graus de liberdade	Valor	Probabilidade
	2	23,9437	< 0,001

[1] Pool de amostras dos três grupos experimentais: M = Bovinos Nelore (*Bos indicus*) com carne macia; D = Bovinos Nelore (*Bos indicus*) com carne dura; P = Bovinos Piemontês (*Bos taurus*).
[2] Para o respectivo nível de significância ($\alpha = 0.001$) e graus de liberdade (3 - 1 = 2), o χ^2 valor crítico ($P < 0,001$) é de 13,815. O valor calculado (23,9437) é maior que o valor crítico, portanto, pode-se concluir que a detecção de cálcio difere entre os três grupos experimentais.

Ressalta-se que a espectrometria de fluorescência de raio-X é uma técnica não destrutiva que envolve um preparo simples e rápido das amostras que serão analisadas, sendo uma técnica multielementar com a qual é possível identificar elementos de alto número atômico tal como o oxigênio (VERBI et al., 2005).

Com relação aos resultados obtidos pelas técnicas SR-XRF, a possível presença de proteínas cálcio dependentes nesses spots é um fator que pode estar relacionado com a maciez da carne uma vez que trabalhos demonstram maior atividade do sistema proteolítico das calpaínas quando há maior presença de íons cálcio no tecido muscular (HEINEMANN & PINTO, 2003).

Em estudos das variações genéticas das calpaínas e calpastatinas em bovinos tem-se observado uma maior ou menor atividade do sistema em relação às diferenças existentes, principalmente no domínio IV da calpastatina, domínio este fortemente

associado à ligação com a calpaína e íons cálcio (CHUNG & DAVIS, 2012). Os mesmos autores concluem que as variantes genéticas no sítio de ligação com o cálcio podem explicar o papel fisiológico da calpastatina sobre a calpaína, em termos de proteólise (CHUNG & DAVIS, 2012). A Figura 3 ilustra um gel representativo do grupo M, na qual foram circundados em vermelho os spots proteicos com íons cálcio, detectados SR-XRF.

Os espectros correspondentes ao spot 12, do grupo M, escolhido aleatoriamente, são apresentados na Figura 3. Verificaram-se os picos referentes às emissões α e β do nível eletrônico K de vários elementos. A razão pela qual não se detecta sempre a emissão β é porque ela é mais fraca do que a α.

Outros elementos, como argônio, silício e enxofre estão presentes ou porque fazem parte das soluções usadas na eletroforese bidimensional, ou porque são necessários para a técnica de SR-XRF, ou seja, presentes no ambiente de análise (ex: argônio) e também nos aparatos necessários para as leituras (ex: o silício da fita adesiva de sílica, usada para fixar os spots).

Além disso, observa-se na Figura 3 que os espectros apresentam fundos contínuos. Tais fundos devem-se, principalmente, ao espalhamento *Compton* dos raios-X incidentes sobre a matriz do gel, o qual pode por vezes mascarar os sinais do elemento de interesse (VERBI et al., 2005). Dessa forma, utilizando os valores das áreas dos picos normalizados dos espectros de SR-XRF (após desconto do branco analítico – gel sem spot proteico), foi possível identificar o elemento cálcio (kα = 3,621 e kβ = 4,012 keV), em alguns spots selecionados aleatoriamente nos géis otimizados dos diferentes grupos experimentais.

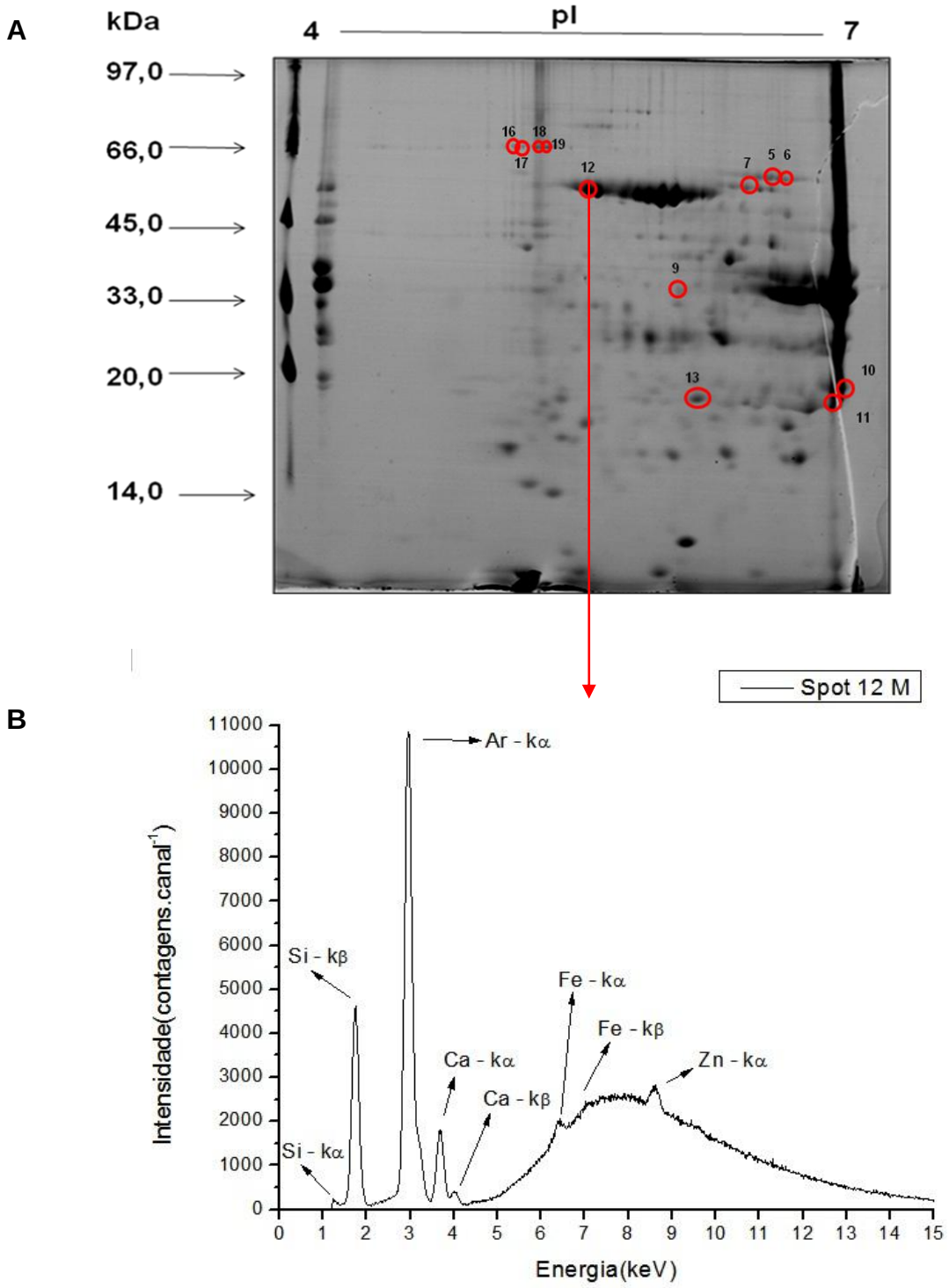

Figura 3. (A) Spots proteicos (destacados em vermelho) que apresentam íons cálcio após a análise por SR-XRF. (B) Exemplo de espectro do spot proteico 12 do grupo M (Bovinos Nelore com carne macia) obtido por Espectrometria de Fluorescência de raio-X com Radiação Syncrotron (SR-XRF). Gel 12,5% (m/v) de amostras do músculo *Longissimus dorsi* com faixa de pI de 4-7 e MM de 14-97 kDa.

.

3.5. Espectrometria de Massas (ESI-MS)

Os spots proteicos caracterizados e as proteínas identificadas por ESI-MS podem ser visualizados na Figura 4 e na Tabela 2, respectivamente. Os spots proteicos selecionados e submetidos à caracterização das proteínas por ESI-MS foram aqueles onde se fez a detecção de íons cálcio. Foram selecionados também os spots proteicos mais intensos e melhor separados pelo processo 2D-PAGE.

O estudo completo das diferenças de expressão de proteínas (com base no volume normalizado – V% e/ou intensidade normalizada – I%) entre os géis dos grupos D, M e P está em estágio inicial. Tal procedimento auxilia na escolha dos spots proteicos "diferentes" e com presença de íons cálcio entre os géis dos grupos experimentais. Entretando, após a identificação das proteínas, o estudo parcial de expressão dos spots caracterizados foi conduzido. Verificou-se que apenas as proteínas *piruvato quinase* (identificada no spot 7, grupo P) e a*lbumina* (identificada no spot 1, grupo P) variaram a expressão em V% e I% entre os grupos experimentais.

A literatura ainda não apresenta claramente quanto deve ser a diferença de expressão entre spots diferentes para que se possa garantir que, realmente, há uma significativa variação entre as expressões das proteínas (ERAVCI et al., 2007). O problema da análise de expressão é que há uma variação intrínseca entre os géis devido a vários fatores como o preparo da amostra, a quantidade de proteínas totais aplicadas e a polimerização do gel (CUTLER et al., 2003). Considerou-se uma variação significativamente diferente entre as grandezas de V% e I%, aquela que fosse igual ou superior a 90% conforme procedimentos descritos por Brandão (2010).

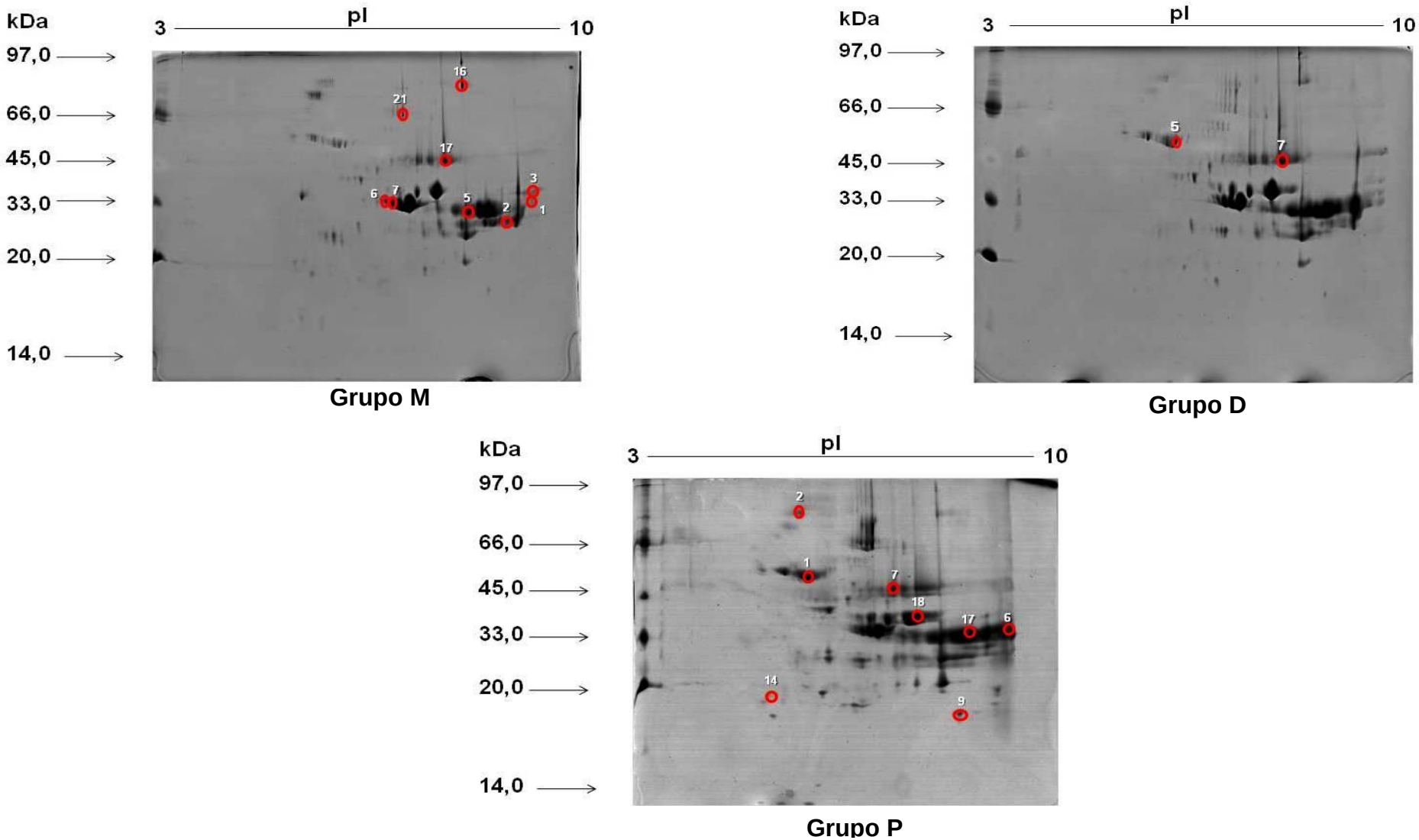

Figura 4. Localização das proteínas identificadas por espectrometria de massas com ionização por eletrosspray (ESI-MS) nos géis (12,5% e faixa de pH 3-10) obtidos dos três grupos experimentais: M = Bovinos Nelore com carne macia; D = Bovinos Nelore com carne dura; e P = Bovinos da raça Piemontês.

Tabela 2. Proteínas identificadas por espectrometria de massas com ionização por eletrosspray (ESI-MS) nos géis (12,5% e faixa de pH 3-10) obtidos dos três grupos experimentais: M = Bovinos Nelore com carne macia; D = Bovinos Nelore com carne dura; e P = Bovinos da raça Piemontês.

Spot	Grupo	Proteína	Acesso (NCBI)[1]	Score	pI/ MW (Da)	Cobertura (%)
5	D	Heat shock 70 kDa protein 1B – HSPA 1B	Q27965	525	5,68/ 70475	26
7	D	Pyruvate kinase isoenzyme M1/M2	P11974	376	7,62/ 58533	17
5	M	Fructose-biophosphate aldolase C-A (*Bos taurus*)	NP_001095385 XP_873164	358	8,45/ 39933	29
6	M	Immunoglobulin light chain	BAF64541	410	6,97/ 23670	52
16	M	L-lactate dehydrogenase A chain (*Bos taurus*)	NP_776524	253	8,12/ 36922	21
17	M	Piruvate kinase, muscle (*Bos taurus*)	NP_001192656 XP_590109	273	7,96/ 58492	19
21	M	Hemoglobin subunit beta-A	P04346	428	6,36/ 16012	73
1	P	Albumin	754920A	360	5,76/ 68118	12
2	P	Hemoglobin beta	0711214B	354	6,58/ 16017	64
4	P	Heat shock cognate 71 kDa	P19378	532	5,24/ 70993	27
6	P	Aspartate aminotransferase mitochondrial (*Bos taurus*)	NP_777231 XP_614810	394	9,19/ 47889	20
7	P	Pyruvate kinase	CAA39849	101	7,58/ 58421	7
9	P	Adenylate kinase isoenzime 1	P00571	192	8,38/ 21741	28
14	P	Glycerol dehydrogenase	P50173	59	4,80/ 38640	4
17	P	Fructose-biphosphate aldolase C-A (*Bos taurus*)	NP_001095385 XP_873164	322	8,45/ 39933	29
18	P	Beta-enolase isoform 1	NP_031959 XP_001471657	525	6,73/ 47343	26

[1] Banco de dados (National Center for Biotechnology Information)

A piruvato quinase (PK) é classificada como uma das principais proteínas sarcoplasmáticas do músculo esquelético. Ela é uma enzima glicolítica que catalisa a transferência do grupo fosforil do fosfoenolpiruvato (PEP) para a formação do ATP (trifosfato de adenosina) a partir de uma molécula de ADP (difosfato de adenosina) e do ácido pirúvico, como produtos finais. A maior intensidade na concentração e de atividade da PK denota claramente um maior metabolismo glicolítico do tecido muscular, característica esta de tecidos com maior proporção de fibras musculares de contração rápida e de metabolismo glicolítico, as fibras FG (*fast glicolytic*) ou *Type IIx*. Animais com crescimento hipertrófico muscular acelerado possuem maior concentração de fibras do tipo IIx, consequentemente maior maciez de carne no *post mortem* (PICARD & CASSAR-MALEK, 2009). A Figura 5 ilustra de forma tridimensional (programa ImageMaster Platinum v. 7.0) a diferença de expressão observada da proteína piruvato quinase nos géis dos três grupos experimentais.

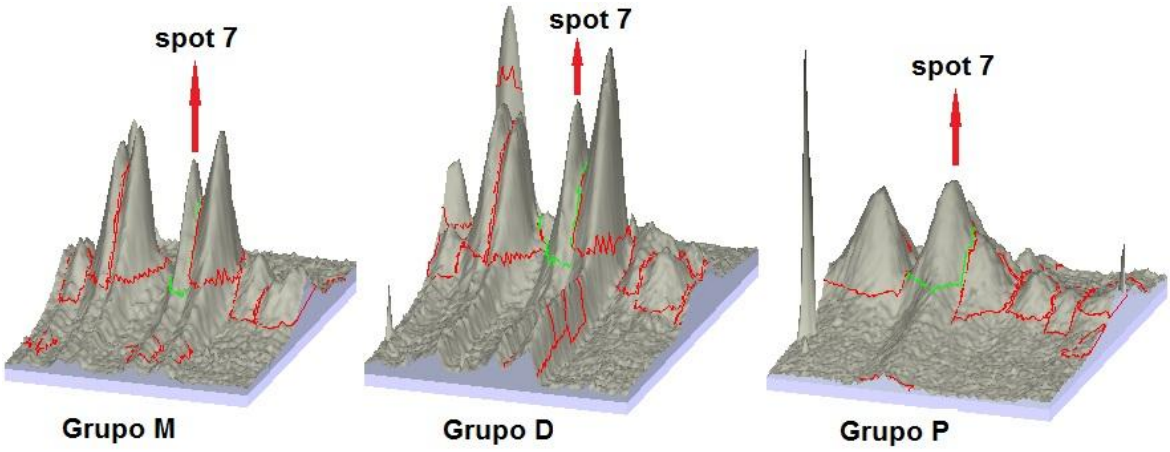

Figura 5. Spots proteicos obtidos de amostras do músculo *L. dorsi* dos grupos experimentais M (Bovinos Nelore com carne macia), D (Bovinos Nelore com carne dura) e P (Bovinos Piemontês). O spot 7 (destacado em verde) corresponde a proteína piruvato quinase identificada por ESI-MS.

Já a albumina é uma proteína com diversas funções fisiológicas como manutenção da pressão osmótica, transporte de hormônios da tireóide e de ácidos graxos mobilizados do tecido adiposo aos hepatócitos. No metabolismo lipolítico, os ácidos graxos de cadeia longa ligam-se a albumina na corrente sanguínea, diminuindo assim seus efeitos citotóxicos. A maior mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo sugere, em balanço energético positivo, uma maior utilização dos lipídeos como substrato de oxidação pelo aumento da taxa metabólica, como o crescimento acentuado do tecido muscular esquelético (BUKOWIECKI et al. 1981; LEHNINGER, NELSON & COX, 2002; WANG et al. 2008).

As proteínas do complexo calpaína-calpastatina não foram identificadas, porém as informações obtidas são importantes para os objetivos propostos inicialmente. Os estudos geralmente identificam por MS os fragmentos de proteínas estruturais, que são produtos da degradação das calpaínas. Nesse sentido, a literatura destaca biomarcadores detectados durante as primeiras 48h pós-abate que incluem proteínas estruturais (actina, miosina e troponina T), assim como enzimas metabólicas como mioquinase, piruvato quinase e glicogênio fosforilase (LAMETSCH et al., 2002). O acúmulo específico de enzimas metabólicas, bem como fragmentos de actina e miosina observados foram relacionados com a maciez da carne (LAMETSCH et al., 2003). Essa situação é semelhante à proteína identificada no presente estudo, pois a PK tem expressão diferente entre os grupos experimentais.

Atrelado a isso, o desenvolvimento da maciez no período *post mortem* é um processo essencialmente relacionado com a degradação dos componentes miofibrilares, e o papel das enzimas metabólicas como marcadores de maciez da carne não tem recebido muita atenção, porém existem dados proteômicos que indicam enzimas metabólicas como excelentes biomarcadores para a maciez da carne. Todavia, esses estudos precisam buscar um ponto de partida, e no futuro os mesmos necessitam desvendar os mecanismos complexos que regulam o metabolismo no *post mortem* de músculos e carnes (BENDIXEN, 2005).

4. Conclusão

No estudo metaloproteômico com bovinos Nelore a 2D-PAGE foi eficiente no fracionamento das proteínas presentes em amostras de tecido muscular (*Longissimus dorsi*) dos dois grupos contrastantes para a maciez da carne. As correlações obtidas nas repetições dos géis indicaram que os procedimentos de extração da proteína total foram eficientes e preservaram a estrutura metal-proteína, possibilitando a detecção de cálcio nos spots proteicos por SR-XRF numa determinada faixa de massa molar de 14 a 97 kDa.

Entre as proteínas caracterizadas, não foi possível identificar as do sistema das calpaínas. Contudo, pode-se inferir que ao menos duas proteínas, a piruvato quinase e a albumina, tem relação com as diferenças observadas na carne dos grupos contrastantes, o que possivelmente explica parte da variação da maciez da carne dos animais utilizados.

5. Referências bibliográficas

BANDOW, J. E., BAKER, J. D., BERTH, M., PAINTER, C., SEPULVEDA, O. J., CLARK, K. A., KILTY, I., & VANBOGELEN, R. A. (2008). Improved image analysis workflow for 2-D gels enables large-scale 2D gel-based proteomics studies – COPD biomarker discovery study. *Proteomics*, *8*, 3030-3041.

BENDIXEN, E. The use of proteomics in meat science (2005). *Meat Science*, *71*, 138–149, 2005.

BLIGH, E. G., & DYER, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry Physiology*, *37*, 911.

BRANDÃO, A. R., BARBOSA, H. S., ARRUDA, M. A. Z. (2010). Image analysis of two-dimensional gel electrophoresis for comparative proteomics of transgenic and non-transgenic soybean seeds. *Journal of Proteomics, 73*, 1433-1440.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa no . 3, de 07 de janeiro de 2000. Regulamento técnico de métodos de insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue. S.D.A./M.A.A. Diário Oficial da União, Brasília, p.14-16, 24 de janeiro de 2000, Seção I. Disponível em
< www.agricultura.gov.br/das/dipoa/Anexo%20Abate.html> Acesso em 15/06/2013.

BUKOWIECKI, L. J., FOLLEA, N., LUPIEN, J., & PARADIS, A. (1981). Metabolic relationships between lipolysis and respiration in rat brown adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *256*, 12840-12848.

CHUNG, H., & DAVIS, M. (2012). Effects of genetic variants for the calpastatin gene on calpastatin activity and meat tenderness in Hanwoo (Korean cattle). *Meat Science*, *90*, 711-714.

CULLER, R. D., JR, F. C. P., SMITH, G. C. & CROSS, H. R. (1978), Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine Longissimus muscle. *Journal of Food Science*, 43, 1177–1180.

ERAVCI, M., FUXIUS, S., BROEDEL, O., WEIST, S., ERAVCI, S., MANSMANN, U., SCHLUTER, H., TIEMANN, J., & BAUMGARTNER, A. (2007). Improved comparative proteome analysis based on two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*, *33*, 513-523.

GE HEALHCARE (2007). *User's manual*, 11-0034-38, Image master 2D platinum 7.0, Edition AA.

GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. J., & DAVID, M. M. (1949). Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *Journal Biology and Chemistry*, *177*, 751-766.

GROSS, J. (2011). *Eletrospray Ionization*. In: GROSS, J. (2011) *Mass Spectrometry: A Textbook* (2th ed.). Springer, 560-620.

HEINEMANN, R. J. B., & PINTO, M. F. (2003). Effect of the injection of different concentrations of calcium chloride on the texture and acceptability of aged beef. *Science and Food Technology*, *23*, 146-150.

HOLLUNG, K., & VEISETH-KENT, E. (2012). Omics Techonologies: Tools for food science. Noureddine Benkeblia, University of the West Indies, Kingston, Jamaica*. CRC Press*, 313-338.

JIA, X., HOLLUNG, K., THERKILDSEN, M., HILDRUM, K. I., & BENDIXEN, E. (2006). Proteome analysis of early post-mortem changes in two bovine muscle types: M. longissimus dorsi and M. semitendinosis. *Proteomics***,** *6*, 936–944.

KIM, N. K., CHO, S., LEE, S. H., PARK, H. R., LEE, C. S., CHO, Y. M., CHOY, Y. H., YOON, D., IM, S. K., & PARK, E. W. (2008). Proteins in longissimus muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. *Meat Science***,** *80*, 1068–1073.

LAMETSCH, R., ROEPSTORFF, P., MOLLER, H. S., & BENDIXEN, E. (2004). Identification of myofibrillar substrates for µ-calpain, *Meat Science*, *68*, 515.

LAMETSCH, R., KARLSSON, A., ROSENVOLD, K., ANDERSEN, H. J., ROEPSTORFF, P., & BENDIXEN, E. (2003). Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***,** *51*, 6992–6997.

LAMETSCH, R., ROEPSTORFF, P., & BENDIXEN, E. (2002). Identification of protein degradation during post-mortem storage of pig meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry***,** *50*, 5508–5512.

LIMA, P. M., NEVES, R. C. F., SANTOS, F. A., PÉREZ, C. A., SILVA, M. O. A., ARRUDA, M. A. Z., CASTRO, G. R., & PADILHA, P. M. (2010). Analytical approach to the metallomic of Nile tilapia (Oreochromis niloticus) liver tissue by SRXRF and FAAS after 2D-PAGE separation: Preliminary results. *Talanta*, *82*, 1052-1056.

LONERGAN, E. H., ZHANG, W., & LONERGAN, S. M. (2010). Biochemistry of postmortem muscle — Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, 86, 184-195.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., & COX, M. M. (2002). *Lehninger Biochemistry Principles: Translation by Arnold Antônio Simões, Wilson Roberto Navego Lodi.* (3rd ed.). São Paulo: Macmillan.

PICARD, B., & CASSAR-MALEK, I. (2009). Evidence for expression of IIb myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of Blonde d'Aquitaine bulls. *Meat Science***,** *82*, 30-36.

RENERRE, M. La coleur de la viande et sa mesure (1982). *Bulletin Technique Centre de Recherches Zootechniques et Veterinaires de Theix*, *47*. 47-54.

SANTOS, F. A., LIMA, P. M., NEVES, R. C. F., MORAES, P. M., PÉREZ, C. A., SILVA, M. O. A., ARRUDA, M. A. Z., CASTRO, G. R., & PADILHA, P. M. (2011). Metallomic study of plasma samples from Nile tilapia using SR-XRF and GFAAS after separation by 2D-PAGE: initial results. *Mikrochimica Acta* (1966. Print), *173*, 43-49.

SAS – *Statistical Analysis System* (2011). User's guide. Version 9.0. Cary: Statistical Analysis System Institute Inc.

SUSSULINI, A., SOUZA, G. H. M. F., ERBELIN, M. N., & ARRUDA, M. A. Z., (2007). Comparative metallomics for transgenic and non-transgenic soybeans. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *22*, 1–6.

TODD, B., MOORE, D., DEIVANAYAGAN, C. C. S., LIN, G., CHATTOPADHYAY, D., MAKI, M., WANG, K. K. W., & NARAYANA, S. V. L. (2003). A structural model for the inhibition of calpain by calpastatin: Crystal structures of the native domain VI of calpain and its complexes with calpastatin peptide and a small molecule Inhibitor. *Journal of Molecular Biology*, *328*, 131-146.

USDA. United States Standards for Grades of Feeder Cattle (2000). *Agricultural Marketing Service***.** Livestock and Seed Program, USDA. Washington, DC.

VERBI, F. M., ARRUDA, S. C. C., RODRÍGUEZ, A. P. M., PÉREZ, C. A., & ARRUDA, M. A. Z. (2005). Metal-binding proteins scanning and determination by combing gel electrophoresis, synchrotron radiation X-ray fluorescence and atomic spectrometry. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *62*, 97-109.

WANG, S., SONI, K. G., SEMACHE, M., CASAVANT, S., FORTIER, M., PAN, L., & MITCHELL, G. A. (2008). Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism, 95*, 117-126.

WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M., & SHACKELFORD, S. D. (1995). Standardized Warner-Bratzler Shear Force Procedures for Meat Tenderness Measurement. Roman L. Hruska U. S. *Meat Animal Research Center*. USDA, Clay Center, NE.

6. Agradecimentos

Os autores agradem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo 2011/14850-0) e a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo suporte financeiro.

CAPÍTULO 3

Efeitos das variações na espessura de gordura subcutânea sobre as características de qualidade da carne de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) machos selecionados para produção

Título: Efeitos das variações na espessura de gordura subcutânea sobre as características de qualidade da carne de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) machos selecionados para produção de carne

RESUMO: Foram utilizados dados de 1104 bovinos da raça Nelore, machos inteiros, idade entre 20 a 24 meses, produzidos em dez fazendas do Brasil e alimentados em confinamento por período aproximado de 90 a 100 dias. A espessura de gordura subcutânea (EGS) medida na amostra de *Longissimus dorsi*, permitiu, de acordo com o fenótipo observado para cada animal, a formação dos tratamentos experimentais. Os animais foram distribuídos em três classes fenotípicas: EGS-1 (< 4,0 mm), EGS-2 (≥ 4 ≤ 5 mm) e EGS-3 (> 5 mm). Verificaram-se diferenças (P<0,001) no teor de lipídeos totais (LT) da carne. Existe uma igualdade (P > 0,05) entre as médias de força de cisalhamento, área de olho de lombo e índice de fragmentação miofibrilar dos animais correspondentes as três classes fenotípicas de EGS. Sob condições de idade, manejo e sistemas de produção semelhantes, as variações de crescimento e deposição do tecido adiposo na carcaça de bovinos machos da raça Nelore, levam a diferenças na deposição de lipídeos intramusculares.

Palavras chave: gado de corte, característica de carcaça, maciez da carne

Title: Effects of backfat variation on the meat quality traits of Nelore cattle (*Bos indicus*) males selected for meat production

ABSTRACT: Data from 1104 Nellore cattle, bulls, aged 20 to 24 months, produced in ten farms in Brazil and feedlot period around 90 to 100 days. The backfat thickness (BF) measured in the *Longissimus dorsi* muscle allowed, according to the phenotype observed for each animal, the formation of experimental treatments. The animals were divided into three phenotypic classes: BF-1 (<4.0 mm), BF-2 (≥ 4 ≤ 5 mm) and BF-3 (> 5 mm). There were differences (P < 0.001) in intramuscular fat in meat of animals. No difference was observed (P > 0.05) to average of shear force, rib eye area and myofibrillar fragmentation index of animals corresponding three BF classes. Under system production, age and management similar, the variations of growth and deposition of adipose tissue in carcass steers Nellore, leads only to differences in the deposition of intramuscular lipids.

Keywords: Beef cattle, carcass characteristics, meat tenderness

1. Introdução

O aumento ou diminuição do consumo de produtos cárneos está diretamente associado à qualidade da carne comercializada (PAZ E LUCHIARI FILHO, 2000). Segundo os mesmos autores, dentre os aspectos qualitativos, a maciez é a característica central para a maioria dos consumidores, uma vez que a demanda por produtos de qualidade é uma realidade notável.

A influência da alimentação na maciez da carne está associada principalmente com o grau de acabamento (espessura de gordura subcutânea) e com o teor de gordura intramuscular na carcaça, ou seja, as carcaças de animais bem acabados, com cobertura de gordura adequada e com bom grau de marmorização, tendem a apresentar carne mais macia quando avaliadas por técnicas laboratoriais ou painéis de degustação (KILLINGER *et al*., 2004 e ALVES & MANCIO, 2007). Desta forma é possível dizer que a espessura de gordura subcutânea, medida no músculo *Longissimus dorsi*, pode ser considerada como um indicador de acabamento da carcaça, sendo uma característica altamente influenciada pelo manejo nutricional (OWENS, 1993).

Essa característica é de grande importância para a indústria da carne durante o processamento das carcaças. O aumento da deposição de gordura subcutânea garante a proteção da carcaça (isolamento térmico) na estocagem em câmaras frias, reduzindo o impacto proporcionado pelo resfriamento rápido, com o intuito de evitar o encurtamento das fibras que prejudica a maciez da carne (TAIT *et al*., 2005)

Observações demonstram que, para a classificação das carnes quanto à maior possibilidade de serem macias, o consumidor utiliza-se da observação de características fenotípicas importantes como a coloração da carne, tamanho dos cortes e principalmente a quantidade de gordura intramuscular - a marmorização - e a subcutânea (CHARDULO, 2000, SILVEIRA *et al*., 2010). Em diversos estudos com bovinos de corte verificam-se diferenças físicas e químicas na carne, seja por fatores ambientais e/ou por influência de grupos genéticos (WARNER *et al*., 2010).

Além das diferenças observadas entre raças, experimentos (HADLICH, 2006, MORALES *et al*., 2006) evidenciaram grandes variações na composição da carcaça e na qualidade da carne entre indivíduos da raça Nelore (*Bos indicus*), indicando a existência de variabilidade genética dentro das raças e, conseqüentemente, a possibilidade de seleção após a identificação de animais de genótipo favorável.

Nesse contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a influência das variações na espessura de gordura subcutânea da carcaça nas características de qualidade de

carne, mais especificamente a maciez, de bovinos Nelores machos selecionados para a produção de carne.

2. Material e Métodos

2.1. Animais, colheita de amostras e tratamentos experimentais

Foram utilizados dados de 1104 bovinos da raça Nelore, machos inteiros, idade entre 20 a 24 meses, produzidos em dez fazendas do Brasil e alimentados em confinamento por período aproximado de 90 a 100 dias. As informações de desempenho e genealogia dos animais foram disponibilizadas pelos programas de melhoramento animal *Conexão Delta G®*, *Paint®* e *Nelore Qualitas®*. Os animais foram selecionados para o abate em vários grupos de contemporâneos, onde a formação destes foi baseada principalmente nas informações de ano de nascimento, manejo animal ao nascer, desmama e sobreano.

O abate dos animais ocorreu nos anos de 2010, 2011 e 2012 em frigoríficos colaboradores dos programas de produção de carne, todos de acordo com as normas estipuladas para o abate humanitário de bovinos (BRASIL, 2000). As carcaças foram então lavadas e resfriadas por 24 horas em câmara de resfriamento a 1ºC para estabelecimento do *rigor mortis*. Após o resfriamento foram colhidas quatro (04) amostras do músculo *Longissimus dorsi* (*L. dorsi*) com osso e espessura aproximada de 2,5 cm a partir da 13ª costela em direção cranial de meia-carcaça esquerda de cada animal. As amostras foram embaladas a vácuo, mantidas sob resfriamento até completarem 120 horas pós-abate, quando então foram congeladas a -20ºC até a realização dos ensaios experimentais de qualidade da carne. Uma das características de qualidade observadas foi a espessura de gordura subcutânea (EGS) medida na amostra de *L. dorsi*, o que permitiu, de acordo com o fenótipo observado para cada animal, a formação dos tratamentos experimentais.

Os animais foram então distribuídos em três classes fenotípicas de acordo com a EGS: EGS-1 (espessura menor que 4,0 mm), EGS-2 (espessura entre 4,0 - 5,0 mm) e EGS-3 (espessura maior que 5,0 mm).

2.2. Espessura de gordura subcutânea e área de olho de lombo

A espessura de gordura subcutânea (EGS) foi determinada nas amostras de *L. dorsi* colhidas na região da 13ª costela em milímetros (mm) e a área de olho de lombo

(AOL), na mesma amostra, em cm^2. Ambos os procedimentos seguiram os protocolos descritos pelo *United States Standards for Grades of Feeder Cattle - USDA Beef Quality and Yield Grade* (2000). A EGS foi medida com paquímetro analítico e a AOL determinada pelo método do quadrante de pontos.

2.3. Força de cisalhamento

Para a determinação da força de cisalhamento (FC) foi adotado o procedimento padronizado e proposto por WHEELER *et al*. (1995), onde as amostras foram assadas em forno pré-aquecido a 170 ºC até atingirem temperatura interna de 71ºC. Para a determinação da força de cisalhamento foi utilizado um equipamento SALTER *Warner-Bratzler Shear Force* mecânico com capacidade de 25 kg e velocidade de seccionamento de 20 cm/minuto. O *shearing* foi realizado em cilindros de ½ polegada, retirados da região central da amostra resfriada por 12 horas em câmara a 1ºC, em sentido longitudinal as fibras musculares. Foram feitas oito medidas por amostra a fim de se obter maior precisão nos resultados obtidos, que foram expressos em quilogramas (kg).

2.4. Análises químicas

Foram feitas também análises químicas da carne dos animais como teor de lipídeos totais (LT) por análise gravimétrica com extração a frio (BLIGH e DYER, 1959) onde foram utilizadas amostras de carne crua e moída, provenientes do músculo *L. dorsi*, com pesos aproximados a 3,0 g, utilizando-se de clorofórmio e etanol como elementos extratores. Foi realizada ainda a determinação do índice de fragmentação miofibrilar (MFI) conforme os procedimentos descritos por Culler et al. (1978), utilizando-se de 3,0 g de tecido muscular livre de gordura e de tecido conjuntivo, onde as amostras foram homogeneizadas em tampão à 2ºC (100 m*M* KCl, 20m*M* de fosfato de potássio pH 7, 1m*M* EDTA, 1m*M* MgCl2 e 1m*M* NaN3, em pH 7,0), centrifugadas e o índice determinado por espectrofotometria em comprimento de onda de 540 nm.

Devido a pouca quantidade de gordura presente no tecido muscular dos animais Nelore optou-se por utilizar a medida de quantificação dos lipídeos totais presentes na porção comestível, uma vez que a avaliação subjetiva dos índices de marmorização resultou em uma variação muito grande dos valores obtidos. Segundo a escala de graduação visual dos índices de marmorização utilizada pelo *United States Standards for Grades of Feeder Cattle – USDA Beef Quality and Yield Grade* (2000) os

valores encontrados para os animais Nelore do presente ensaio caracterizaram a carne nos padrões de marmorização *Standard* a *Slight,* variação esta difícil de estabelecer por análise visual subjetiva.

2.5. Análise estatística

A consistência e distribuição dos dados das características de qualidade de carne foram analisadas utilizando o programa SAS (SAS, 2011). O modelo para análise estatística utilizou as características FC, AOL, MFI e LT como variáveis dependentes e incluíram fazenda de criação, ano de abate e classes de EGS como efeitos fixos. As três classes de EGS foram montadas com base nas medidas de EGS: EGS-1, EGS-2 e EGS-3, menores de 4,0 mm, entre 4 e 5 mm e maiores que 5 mm, respectivamente. As análises foram realizadas com o procedimento GLM (SAS, 2011). Os valores médios ajustados das características de qualidade de carne analisadas, obtidos com base nos modelos de maior coeficiente de determinação, foram comparados pelo Teste de Tukey-Kramer (SAS, 2011), considerando nível de significância de 5%. Correlações fenotípicas entre as características de qualidade de carne foram realizadas com o procedimento CORR (SAS, 2011).

3. Resultados e Discussão

3.1 Grupos de espessura de gordura subcutânea da carne (EGS)

O modelo empregado permitiu verificar diferenças (P<0,001) no teor de lipídeos totais (LT) da carne dos animais, dentro das classes fenotípicas avaliadas de acordo com a espessura de gordura subcutânea: EGS-1 (< 4,0 mm), EGS-2 (≥ 4 ≤ 5 mm) e EGS-3 (> 5 mm). Os resultados das análises físico-químicas do músculo *L. dorsi* como FC, EGS, AOL, MFI e LT estão descritos na Tabela 1**.**

Observou-se uma pequena diferença numérica, mas não estatística (P>0,05), entre as médias de FC dos animais correspondentes as três classes fenotípicas de EGS. Os bovinos Nelores foram, em média, semelhantes para a maciez da carne.

Tabela 1**.** Número de animais e médias da espessura de gordura subcutânea (EGS), força de cisalhamento (FC), área de olho de lombo (AOL), índice de fragmentação miofibrilar (MFI) e teor de lipídeos totais (LT) dos grupos de bovinos da raça Nelore distribuídos nas diferentes classes fenotípicas de espessura de gordura subcutânea EGS-1 (< 4,0 mm), EGS-2 (≥ 4,0 ≤ 5,0 mm) e EGS-3 (> 5,0 mm).

Variáveis	Classes			CV (%)[1]
	EGS-1	EGS-2	EGS-3	
Número de animais	359	373	344	.
EGS (mm)	2,35 ± 0,05[a]	4,23 ± 0,07[b]	6,80 ± 0,08[c]	20,52
FC (kg)	5,45 ± 0,07[NS]	5,47 ± 0,08[NS]	5,42 ± 0,09[NS]	20,80
AOL (cm^2)	65,57 ± 0,48[NS]	66,49 ± 0,54[NS]	66,29 ± 0,62[NS]	11,06
MFI	34,48 ± 0,98[NS]	35,21 ± 1,04[NS]	35,42 ± 1,20[NS]	36,76
LT (%)	0,60 ± 0,03[a]	0,68 ± 0,03[b]	0,74 ± 0,03[c]	37,89

[a,b,c] = Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste Tukey-Kramer (P<0,05)
[NS] = não significativo
[1] = Coeficiente de Variação

Constatou-se também uma igualdade (P>0,05) entre os resultados das classes EGS-1, EGS-2 e EGS-3 para a característica de produção de carne (AOL), sendo os valores médios observados de 65,57 ± 0,48, 66,49 ± 0,54 e 66,29 ± 0,62 cm², respectivamente.

Os resultados médios de FC, EGS e AOL dos 1104 bovinos da raça Nelore, produzidos nas dez fazendas do estudo encontram-se representados na Figura 1. A inexistência de diferenças para maciez da carne fica explícita pelos resultados observados, pois as variações médias de EGS dos animais das diferentes fazendas não diminuíram significativamente (P>0,05) as médias de FC da carne dos mesmos. O mesmo ocorreu para a musculosidade e rendimento dos cortes cárneos, medidos pela AOL, pois maiores deposições de EGS não diminuíram significativamente as médias de AOL observadas.

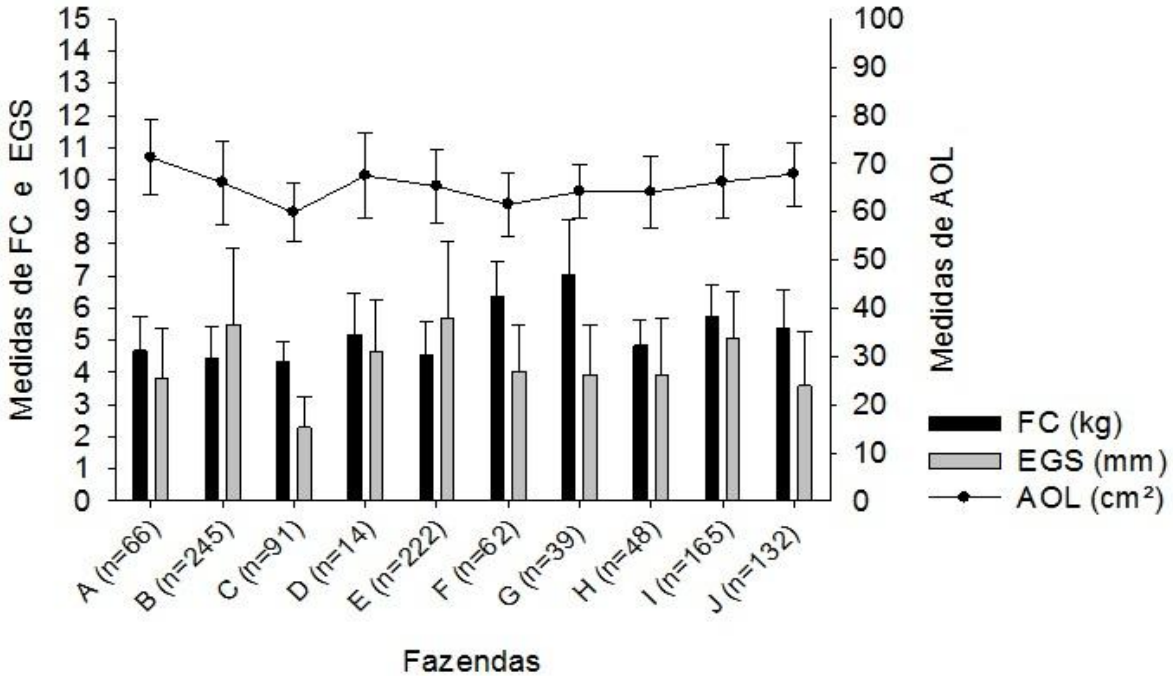

Figura 1. Médias de força de cisalhamento (FC), espessura de gordura subcutânea (EGS) e área de olho de lombo (AOL) de bovinos da raça Nelore produzidos nas dez fazendas (representadas pelas letras A até J) do estudo.

Nota-se na Figura 1 a variação da média de EGS dos animais por fazenda, nas quais foram verificados valores de 2,5 mm (fazenda C) até 6,0 mm (fazenda E). No entanto, tomando como exemplo essas duas fazendas (C e E), ao comparar a maciez da carne dos animais não foram observadas diferenças significativas (P > 0,05), pois os valores médios de FC encontravam-se entre 4,5 e 5,0 kg, respectivamente. Essa constatação denota mais uma vez que os bovinos Nelore foram, em média, semelhantes para a maciez da carne, independentemente da quantidade de EGS presente na carcaça. A mesma situação pode ser verificada para a AOL média, com valores entre 60,00 cm² (fazenda C) e 72,00 cm² (fazenda A). Contudo, para a presente investigação, os efeitos de fazenda e ano de abate dos animais foram significativos (P < 0,05) para a deposição de gordura da carcaça. Esses efeitos já eram esperados, pois a EGS é uma característica altamente influenciada por efeitos ambientais, principalmente ao manejo nutricional.

3.2 Maciez da carne e proteólise post mortem

Os valores da FC dos animais que compõe as classes EGS-1 (5,45 ± 0,07 kg), EGS-2 (5,47 ± 0,08 kg) e EGS-3 (5,42 ± 0,09 kg) foram, em média, semelhantes aos de 5,8 ± 0,3 e 6,0 ± 0,29 kg reportados por Pflanzer & Felício (2009) que trabalharam

com novilhos da raça Nelore divididos em três grupos e duas classes, de acordo com a maturidade fisiológica (20-24; 30-36 e 42-48 meses de idade) e o escore de gordura na carcaça (2 = pouco; 3 = médio). Em contrapartida ao presente estudo, esses mesmos autores encontraram diferenças (P<0,05) ao comparar a maciez da carne desses animais, atribuindo-as aos escores visuais 2 e 3 de gordura de cobertura da carcaça. Na presente investigação, não foram observadas diferenças na maciez da carne dos animais avaliados. Os resultados médios da FC denotam que a EGS da carcaça não influenciou o grau de maciez da carne dos bovinos Nelore utilizados.

Contudo, apesar da constatação acima, as carcaças de animais bem acabados, com cobertura de gordura adequada e com bom grau de marmorização, tendem a apresentar carne mais macia quando avaliadas por técnicas laboratoriais ou painéis de degustação (ALVEZ & MANCIO, 2007). Porém, destaca-se ainda que os bovinos Nelore, distribuídos nas três classes de EGS, produziram em média uma carne com FC acima do limite de 4,5 kg descrito na literatura (Shackelford et al., 1991; Belew et al., 2003) para que a carne seja considerada dura.

Ressalta-se que a variação da maciez da carne não depende apenas de fatores genéticos, quando o estudo é realizado em diferentes raças ou grupos raciais. Tal variação depende ainda do músculo em questão e, para o músculo *L. dorsi,* ocorre principalmente devido a proteólise de proteínas miofibrilares, e em menor escala ao comprimento do sarcômero e a quantidade de tecido conectivo (KOOHMARAIE et al., 2002; OLSON et al., 1976).

Constatou-se que o MFI médio não diferiu significativamente (P>0,05) entre as classes de EGS dos animais avaliados, conforme os valores de 34,48 ± 0,98 (EGS-1), 35,21 ± 1,04 (EGS-2) e 35,42 ± 1,20 (EGS-3) descritos anteriormente na Tabela 1. Nessa lógica, a EGS da carcaça de bovinos Nelore abaixo de 4, entre 4 e 5 ou acima de 5 mm (EGS-1, EGS-2 e EGS-3, respectivamente) não alterou a intensidade da proteólise das miofibrilas e, consequentemente, não contribuiu para possíveis diferenças no grau de maciez da carne dos animais avaliados. Apesar da inexistência de efeitos significativos tanto para a maciez da carne como para a intensidade da proteólise miofibrilar, dentro das classes fenotípicas avaliadas, observa-se na Figura 2 a relação inversa entre essas duas características mensuradas pela FC e o MFI, respectivamente.

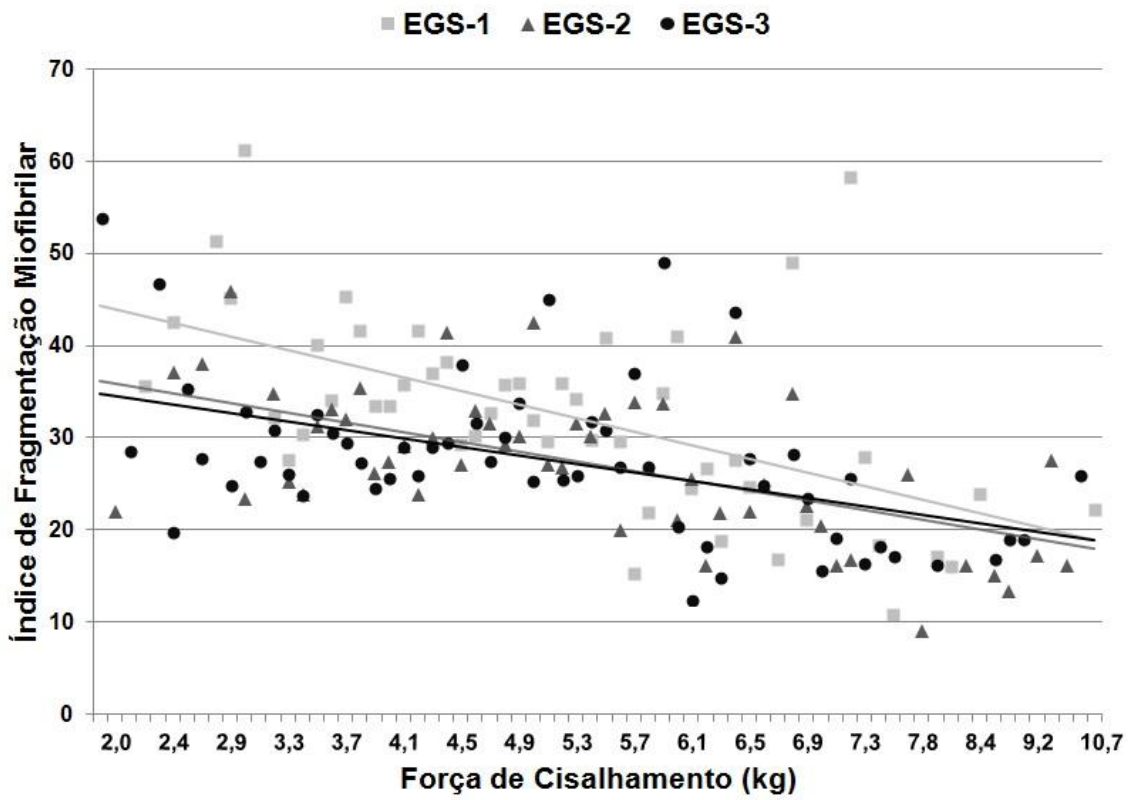

Figura 2. Relação entre o Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) e a Força de Cisalhamento (FC) de bovinos Nelore nas três classes fenotípicas de espessura de gordura subcutânea: EGS-1 (< 4,0 mm), EGS-2 (≥ 4,0 ≤ 5,0 mm) e EGS-3 (> 5,0 mm).

O MFI é um indicativo da proteólise das fibras musculares, aumentando seu valor quando a FC é menor (Girard et al., 2012). Entretanto, destaca-se que o MFI é usado para explicar mais de 50% da variação da maciez da carne maturada (KOOHMARAIE et al., 2002), condição esta não utilizada no presente estudo, no qual as amostras foram colhidas com 24h de resfriamento a 1° C, logo após o abate.

Apesar de que os resultados obtidos no presente estudo demonstram não haver variações numéricas significativas entre os animais dos grupos experimentais, observa-se ainda (Figura 2) que as amostras com EGS menor que 4,0 mm (EGS-1) apresentaram valores mais dispersos de força de cisalhamento em relação ao aumento dos valores do MFI. Assim, o estabelecimento desta relação (FC x MFI) pode ser utilizado como uma boa ferramenta de detecção de problemas de maciez na carne ocasionados pelo processamento pelo frio na indústria frigorífica, no pós-abate (KOOHMARAIE et al., 1987).

Em contrapartida, Hadlich (2007) não observou diferenças significativas (P>0,05) na maciez da carne maturada por sete dias de bovinos Nelore em um estudo de padrões de crescimento do tecido muscular. O autor descreve um MFI de 72 e uma FC de 2,7 ± 0,66 kg, analisada 48h *post mortem*, assim como um MFI de 98 e uma FC de 2,3 ± 0,48 kg com sete dias de maturação.

3.3 Produção de carne e crescimento muscular

A AOL pode ser usada como característica indicadora da composição da carcaça, já que esta associada à musculosidade do animal e ao rendimento dos cortes de alto valor comercial, tendo correlação positiva com a porção comestível da carcaça. Outras características importantes de crescimento corporal, mensuradas durante as fases iniciais de desenvolvimento são importantes para determinar a eficiência econômica de qualquer sistema de produção de bovinos de corte (ZUIN et al., 2012).

Os valores reportados para AOL na literatura variam consideravelmente, mesmo dentro de grupos de contemporâneos com pesos e idades semelhantes. Os valores médios de AOL encontrados no presente estudo (65,57 ± 0,48, 66,49 ± 0,54 e 66,29 ± 0,62 cm², nas classes fenotípicas EGS-1, EGS-2 e EGS-3, respectivamente) foram próximos aos relatados por Zuin et al. (2012) que encontraram valores médios de 52,93 ± 0,48 cm², com extremos entre 21,86 a 114,10 cm^2 de AOL em bovinos Nelore produzidos nos anos de 1998 e 2008 que integram o programa de melhoramento genético da ANCP (Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores).

Apesar da relação inversa comumente existente entre EGS e a AOL do músculo *L. dorsi*, no presente estudo não foram encontradas diferenças significativas entre a AOL média das 3 classes de EGS. Certamente, os animais do presente estudo foram semelhantes para a área de porção comestível da carcaça devido à alta correlação do músculo *L. dorsi* com o rendimento e composição dos cortes cárneos. Atrelado a isso, a inexistência de diferenças significativas para AOL média, juntamente com a igualdade dos resultados observados anteriormente para a FC média, denota que a EGS da carcaça dos bovinos Nelore avaliados não influenciou características de qualidade da carne como musculosidade e maciez.

Entretanto, normalmente espera-se que a intensificação da velocidade do crescimento muscular, aliada a rápida terminação da carcaça seja uma maneira mais factível e eficiente de se obter um produto de melhor qualidade e competitividade no atual mercado consumidor de carne.

3.4 Lipídeos intramusculares e marmorização

As três classes de EGS expressaram diferença significativa (P<0,05) entre os teores médios de LT, conforme os valores de 0,60 ± 0,03% (EGS-1), 0,68 ± 0,03% (EGS-2) e 0,74 ± 0,03% (EGS-3) descritos anteriormente na Tabela 1**.** Nesta ótica,

animais com acabamento de gordura na carcaça acima de 5 mm (EGS-3) tendem a depositar mais lipídeos intramusculares quando comparados com aqueles com EGS abaixo de 4 mm (EGS-1) e entre 4 e 5 mm (EGS-2), pois os valores médios de espessura de gordura subcutânea dessas classes também foram diferentes (P<0,05), sendo de 2,35 ± 0,05 (EGS-1), 4,23 ± 0,07 (EGS-2) e 6,80 ± 0,08 mm para EGS-1, EGS-2 e EGS-3, respectivamente.

De forma semelhante, Pflanzer & Felício (2011) trabalharam com novilhos Nelore divididos em três grupos e duas classes, de acordo com a maturidade fisiológica (grupos 2; 4 e 6 dentes incisivos permanentes) e o escore de gordura na carcaça (classe 2 = pouco; classe 3 = médio), verificaram diferenças significativas (P<0,05) no teor de LT entre bovinos do grupo 6 (LT = 5,7%) e bovinos do grupo 2 (LT = 4,2%), ambos das classes 2 e 3 de escore de gordura na carcaça. Os valores mais altos de LT no estudo de Pflanzer & Felício (2011) ocorrem devido à utilização da porção cranial do músculo *Longissimus thoracis,* na qual geralmente os teores de lipídeos intramusculares são mais elevados.

Os teores de LT da carne dos bovinos Nelore representantes das três classes fenotípicas de EGS podem ser observados na Figura 3. Nota-se que a maioria dos bovinos da EGS-1 (< 4,0 mm) expressa teores de LT na carne que variam entre 0,12 e 0,98%. Os animais da EGS-2 expressaram teores de LT na carne no intervalo de 0,21 a 1,28%. Já aqueles animais pertencentes à EGS-3 expressaram teores de LT mais dispersos, com valores entre 0,42% a 1,70%, com uma EGS de aproximadamente 6 e 9 mm, respectivamente.

O conteúdo total de lipídeos no músculo (frequentemente denominado de marmorização) exerce um papel fundamental na suculência e sabor da carne cozida, embora essa correlação varie consideravelmente entre os estudos, pois alguns demonstram uma importante função na marmorização e outros mostram apenas uma fraca relação com as características sensoriais (WOOD et al., 2008).

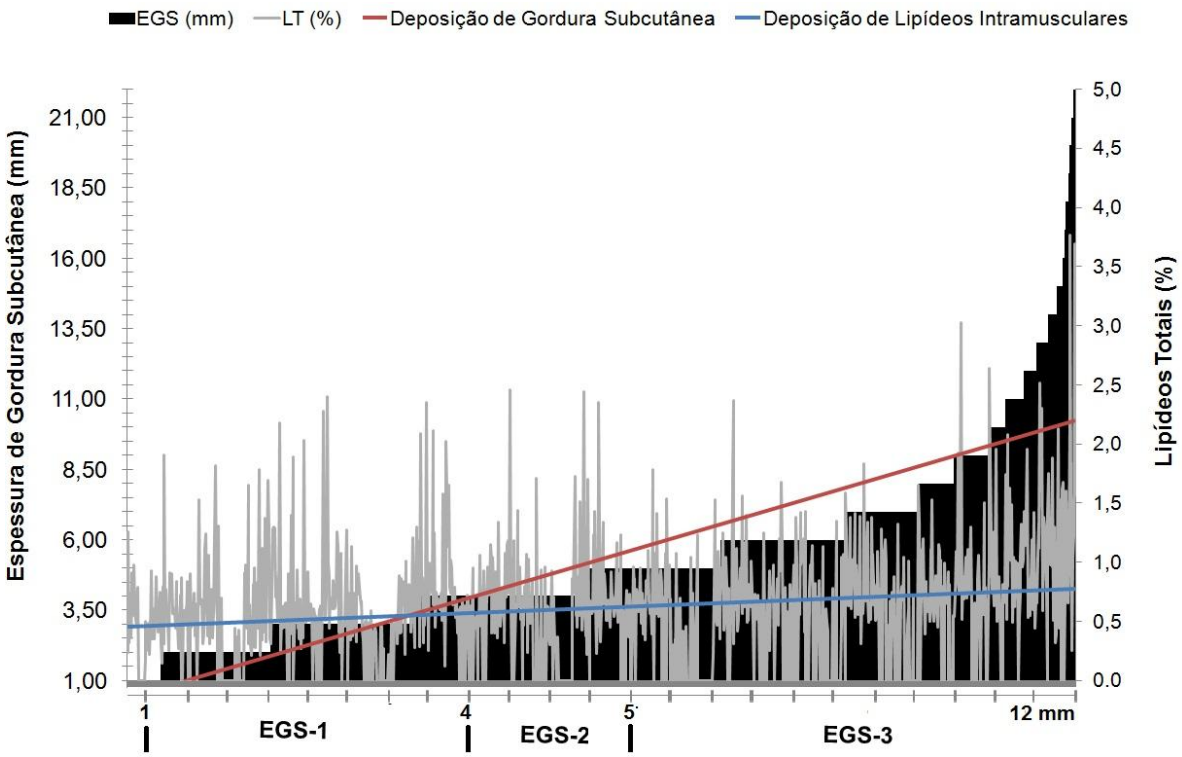

Figura 3. Distribuição da espessura de gordura subcutânea (EGS) e do teor de lipídeos totais (LT) de bovinos Nelore distribuídos nas três classes fenotípicas de espessura de gordura subcutânea: EGS-1 (< 4,0 mm), EGS-2 (≥ 4,0 ≤ 5,0 mm) e EGS-3 (> 5,0 mm).

No presente trabalho, o conteúdo de lipídeos intramusculares foi diretamente associado à quantidade de gordura de acabamento medida pela EGS em milímetros. Esta situação pode ser evidenciada na Figura 3, na qual é possível verificar uma tendência linear de deposição de lipídeos intramusculares na porção comestível da carne, de acordo com os aumentos da EGS dos animais avaliados. Existe um sinergismo entre a deposição gordura subcutânea e o conteúdo total de lipídeos no músculo *L. dorsi.* Em animais terminados em confinamento, os aumentos na gordura de cobertura da carcaça (a cada 5%) podem levar a maiores deposições de lipídeos intramusculares e, consequentemente na marmorização dessa carne, correspondendo a elevações do LT de até 1% (HOCQUETE et al., 2010).

Hadlich (2007) observou grandes variações nas características químicas da carne entre bovinos da raça Nelore de diferentes idades (15 e 24 meses). Entretanto, quando da avaliação do LT não foram detectadas diferenças (P>0,05) significativas. Apesar da maior quantidade (P<0,01) de EGS nos animais de 24 meses (6,4 mm) em comparação aos de 15 meses de idade (3,1 mm), os grupos apresentaram valores de LT muito semelhantes (1,2 e 0,9%, respectivamente para 24 e 15 meses de idade).

3.5 Correlações

As correlações fenotípicas das características de qualidade de carne foram estimadas para o conjunto total de dados, independentemente dos grupos de animais (EGS-1, EGS-2 e EGS-3). Verifica-se na Tabela 2 que, contrariamente ao modelo que utilizou classes de EGS, a FC foi negativamente associada com a AOL (r = -0,058; P<0,05). Mesmo com essa pequena correlação, o crescimento muscular e o rendimento de carcaça, medidos pela AOL, tem estreita relação inversa com a maciez da carne, pois reduziu levemente os valores de FC observados.

Tabela 2. Coeficientes de correlações fenotípicas estimadas (r) entre as características força de cisalhamento (FC), área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS), índice de fragmentação miofibrilar (MFI) e teor de lipídeos totais (LT) de 1104 bovinos da raça Nelore.

Características	AOL	EGS	MFI	LT
FC	-0,058*	-0,122**	-0,22**	-0,12*
AOL		-0,002	0,009	-0,028*
EGS			-0,12*	0,25**
MFI				0,17**

Significância: *(P<0,05) **(P<0,0001)

Ao avaliar os dados dos animais sem considerar as classes de EGS, foi possível observar também que a FC demonstra pequena correlação fenotípica negativa com a EGS (r = -0,122), porém altamente significativa (P<0,0001). Nesta situação, a EGS parece contribuir para a diminuição dos valores médios da FC, muito provavelmente ajudando na proteção durante o resfriamento nas câmaras frigoríficas e na prevenção do encurtamento excessivo das miofibrilas.

Apesar da baixa magnitude, observa-se que a maciez da carne também está negativamente associada ao MFI e ao LT. Como esperado, existe uma associação inversa altamente significativa entre a FC e MFI (r = -0,22; P<0,0001), situação já evidenciada anteriormente na Figura 1. No presente estudo os valores de LT expressaram pequena correlação inversa com a FC (r = -0,12; P<0,05). Pflanzer & Felício (2011) verificaram correlações significativas entre a idade (42-48 meses) e o escore de gordura sobre o teor de LT na carne (5,7%), situação semelhante ao presente estudo, no qual a EGS foi positivamente associada ao LT (r = 0,25; P<0,0001). Em outro estudo sobre maturidade fisiológica e gordura de cobertura da

carcaça, Pflanzer & Felício (2009) verificaram associações entre a suculência da carne (medida por painel de degustação treinado) e a FC (r = -0,29; P<0,05).

As características AOL e EGS, juntamente com AOL e MFI, não demonstraram correlações fenotípicas estimadas (P>0,05). Na literatura, as correlações fenotípicas negativas e próximas de zero observadas entre AOL e EGS, podem ser explicadas pelo fato de que animais com grande AOL tendem a apresentar, principalmente em idades mais jovens, menores deposições de gordura subcutânea (REZENDE et al., 2009). Encontrou-se uma baixa associação inversa entre AOL e LT (r = -0,028; P<0,05) e entre o MFI e EGS (r = -0,12; P<0,05). Finalmente as medidas LT e MFI foram positivamente correlacionadas, mas também uma associação de baixa magnitude (r = 0,17; P<0,0001).

4. Conclusão

A inexistência de diferença na maciez da carne dos grupos de espessura de gordura subcutânea denota que a melhor forma de se obter um produto cárneo de qualidade é a intensificação da velocidade do crescimento muscular, aliada a terminação adequada da carcaça com um mínimo de espessura de gordura subcutânea (EGS). As carcaças com EGS entre 4 e 6 mm são semelhantes principalmente para maciez final e intensidade de proteólise miofibrilar pós-abate.

A partir da inexistência de diferenças para a força de cisalhamento e demais características físico-químicas, entre as classes de EGS, pode-se afirmar que, sob condições de idade, manejo e sistemas de produção semelhantes, as variações estão mais ligadas ao crescimento e a deposição do tecido adiposo na carcaça de bovinos machos da raça Nelore, pois as principais diferenças nessa situação são causadas pela deposição de lipídeos intramusculares.

5. Agradecimentos

Os autores agradem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo 2011/14850-0) e a Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo suporte financeiro.

6. Referências

ALVES, D. D., MANCIO, A. B. (2007) Maciez da carne bovina - Uma Revisão. *Revista FZVA*, Uruguaiana **14**, 193-216.

BELEW, J. B., BROOKS, J. C., MCKENNA, D. R., SAVELL, J. W. (2003) Warner-Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. *Meat Science*, Texas **64**, 507-512.

BLIGH, E. G., e DYER, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry Physiology* **37**, 911.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa no. 3 de 07 de janeiro de 2000. Regulamento técnico de métodos de insensibilização para o a bate humanitário de animais de açougue. S.D.A./M.A.A. Diário Oficial da União, Brasília, p.14-16, 24 de janeiro de 2000, Seção I. Disponível em < www.agricultura.gov.br/das/dipoa/Anexo%20Abate.html> Acesso em 15/06/2013

CHARDULO, L. A. L. Desempenho, níveis plasmáticos de hormônios, expressão e quantificação de proteínas musculares, características de carcaça e qualidade de carne de bovinos inteiros jovens de cinco diferentes grupos genéticos submetidos a confinamento. 2000. 101p. **Tese** (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.

CULLER, R. D., PARRISH, F. C., SMITH, G. C., CROSS, H. R. (1978). Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine Longissimus muscle. *Journal of Food Science* **43**, 1177-1180.

GIRARD, I., BRUCE, H. L., BASARAB, J. A., LARSEN, I. L., AALHUS, J. L. (2012). Contribution of myofibrillar and connective tissue components to the Warner–Bratzler shear force of cooked beef. *Meat Science* **92**, 775-782.

HADLICH, J. C., MORALES, D. C., SILVEIRA, A. C., OLIVEIRA, H. N., CHARDULO, L. A. L. (2006). Efeito do colágeno na maciez da carne de bovinos de distintos grupos genéticos. *Acta Scientiarum Animal Science*, Maringá **28**, 57-64.

HADLICH, J. C. Características do crescimento animal, do tecido muscular esquelético e da maciez da carne de bovinos Nelore e mestiços no modelo biológico superprecoce. 2007. 90 f. **Tese** (Doutorado/ Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

HOCQUETE, J. F., GONDRET, F., BAÉZA, E., MÉDALE, F., JURIE, C., PETHICK, D. W. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers (2010). *The International Journal of Animal Biosciences* **4***,* 303-319.

KILLINGER, K. M., CALKINS, C. R., UMBERGER, W. J., FEUZ, D. M., ESKRIDGE, K. M. (2004). Consumer visual preference and value for beef steaks differing in marbling level and color. *Jornal Animal Science* **82**, 3288-3293.

KOOHMARAIE, M., SEIDEMAN, S. C., SCHOLLMEYER, J. E., DUTSON, T. R., CROUSE, J. D. (1987). Effect of post-mortem storage on Ca^{++}-dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. *Meat Science* **19**, 187-196.

KOOHMARAIE, M., KENT, M. P., SHACKELFORD, S. D., VEISETH, E., WHEELER, T. L. (2002). Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship?. *Meat Science* **62**, 345-352.

MORALES, M. M. Avaliação dos resíduos sólidos e líquidos num sistema de abate de bovinos. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

OLSON, D. G., PARRISH, F. C. JR., STROMER, M. H. (1976). Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage. *Journal of Food Science* **41**, 1036 -1041.

OWENS, F. N., DUBESKI, P., HANSON, C. F. (1993). Factors that alter the growth and development of ruminants. *Journal of Animal Science* **71**, 3138-3150.

PAZ, C. C. P. de, LUCHIARI FILHO, A. (2000). Melhoramento genético e diferenças de raças com relação à qualidade da carne bovina. *Pecuária de Corte* **101**, 58-63.

PFLANZER, S. B., FELÍCIO, P. E. (2009). Effects of teeth maturity and fatness of Nellore (*Bos indicus*) steer carcasses on instrumental and sensory tenderness. *Meat Science* **83**, 697-701.

PFLANZER, S. B.; FELÍCIO, P. E. (2011). Moisture and fat content, marbling level and color of boneless rib cut from Nellore steers varying in maturity and fatness. *Meat Science* **87**, p. 7-11.

REZENDE, P. L. P., RESTLE, J., FERNANDES, J. J. R., NETO, M. D. F., PRADO, C. S., PEREIRA, M. L. R. (2012). Características de carcaça e da carne de novilhos mestiços submetidos a diferentes estratégias nutricionais na recria e na terminação. *Ciência Rural* **42**, 875-881.

SAS – **Statistical Analysis System**. User's guide. Version 9.0. Cary: Statistical Analysis System Institute Inc., 2011.

SHACKELFORD, S. D., KOOHMARAIE, M., MILLER, M. F., CROUSE, J. D., REAGAN, J. O. (1991). An evaluation of tenderness of the Longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. *Journal of Animal Science*, Champaing **69**, 171-177.

SILVEIRA, A.C., ARRIGONI, M. D. B., MARTINS, C. L., CHARDULO, L. A. L. Produção de Bovinos Superprecoces no Brasil In: Bovinocultura de Corte ed.Piracicaba - SP : Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz - FEALQ, 2010, v.68, p. 1347-1364.

TAIT, J. R., WILSON, D. E., ROUSE, G. H. (2005). Prediction of retail product and trimmable fat yields from the four primal cuts in beef cattle using ultrasound or carcass data. *Journal of Animal Science* **83**, 1353-1360.

WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M., SHACKELFORD, S. D. (1995). Standardized Warner-Bratzler Shear Force procedures for meat tenderness measurement. **Roman L.** *Hruska U. S. MARC. USDA*, Clay Center, NE.

WARNER, R. D., GREENWOOD, P. I., PETHICK, D. W., FERGUSON, D. M. (2010). Genetic and environmental effects on meat quality. *Meat Science* **86,** 171-183.

WOOD, J. D., ENSER, M., FISHER, A. V., NUTE, G. R., SHEARD, P. R., RICHARDSON, R. I., HUGHES, S. I. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science* **78**, 343–358.

ZUIN, R. G. (2012). Genetic analysis on growth and carcass traits in Nelore cattle. *Meat Science,* Kidlington **91**, 352-357.

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

IMPLICAÇÕES

A competitividade de carne bovina, que possa agradar diversos perfis de consumidores, gerou um interesse renovado em pesquisas de qualidade de carne. Nesse meio, a proteômica exerce papel fundamental, pois utiliza ferramentas como a 2D-PAGE combinadas com a MS para gerar resultados que ganham cada vez mais força, tais como os que discorrem sobre alterações de enzimas metabólicas, proteólise no *post mortem,* e mudanças induzidas pelo ambiente e condições de processamento das carcaças.

A utilização de animais zebuínos (e seus mestiços) nesses estudos é de extrema relevância, pois são estes os que formam a base do rebanho brasileiro, uma vez que o país se caracteriza como principal exportador de carne bovina. A melhoria da qualidade da carne produzida é uma realidade notável, e existe uma crescente demanda por produtos cárneos diferenciados que possam agregar valor.

O presente estudo utilizou animais zebuínos e buscou desvendar os mecanismos moleculares que promovem as diferenças fenotípicas entre grupos contrastantes para a maciez da carne. Atrelado a isso, foram feitas avaliações sobre a influência das variações na EGS da carcaça nas características de qualidade de carne, mais especificamente a maciez.

. Nessa tentativa, com base na hipótese estabelecida, algumas implicações podem ser destacadas: (I) Dentro de uma mesma raça é possível identificar animais que, sob condições de idade, manejo e sistemas de produção semelhantes tem potencial genético para produzir carne com maior grau de maciez; (II) Existem proteínas ligadas ao metabolismo glicolítico, tal como a piruvato quinase que podem explicar parte das variações da maciez da carne de bovinos Nelore; (III) Essas informações são de extrema relevância para trabalhos futuros que buscam desenvolver e validar possíveis biomarcadores para predição desta característica e; (IV) A utilização de bovinos da raça Nelore para a obtenção de um produto cárneo de qualidade depende de alguns fatores como a deposição mínima (entre 4 e 6 mm) de gordura subcutânea (terminação adequada) aliada a uma taxa de desempenho e crescimento muscular acelerada para que os animais sejam abatidos mais precocemente.