**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Temperamento divergente em bovinos está associado à alteração
no amaciamento de carne e atividade inibitória de calpastatina**

Marcelo Aranda da Silva Coutinho

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal
e Pastagens

**Piracicaba
2016**

Marcelo Aranda da Silva Coutinho
Médico Veterinário

**Temperamento divergente em bovinos está associado à alteração no
amaciamento de carne e atividade inibitória de calpastatina**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **EDUARDO FRANCISQUINE DELGADO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal
e Pastagens

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Coutinho, Marcelo Aranda da Silva

Temperamento divergente em bovinos está associado à alteração no amaciamento de carne e atividade inibitória de calpastatina / Marcelo Aranda da Silva Coutinho. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.
96 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Componentes principais 2. Força de cisalhamento 3. Habituação 4. Nelore 5. Maciez
6. Reatividade 7. Termografia infravermelha 8. Expressão gênica I. Título

CDD 636.291
C871t

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

*À minha querida e adorável esposa, Tatiele, à minha princesinha, Ísis,
aos meus pais, Frande e Ana, e aos meus irmãos e amigos*

Com carinho,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Dr. Eduardo Francisquine Delgado**, pela oportunidade, ensinamentos, apoio e incentivo, e estima.

Ao **Professor Dr. Saulo Luz e Silva**, pelo acolhimento na FZEA/USP, pela oportunidade, pela atenção e colaboração no projeto. Agradeço pelos mesmos motivos a **Professora Dra. Luciane Martello** e a **Professora Dra. Angélica Simone Cravo Pereira**.

Ao **Professor Dr. Luiz Lehmann Coutinho**, pela atenção e acolhimento no Laboratório de Biotecnologia Animal.

Aos demais Professores que fizeram parte da minha formação no doutorado, dos quais tenho orgulho de ter sido aluno e ter convivido: **Camen Contreras Castillo, Carla Maris Machado Bittar, Flavio Augusto Portela Santos, Gerson Barreto Mourão, Ivanete Susin, José Eurico Possebon Cyrino, José Fernando Machado Menten, Luiz Gustavo Nussio, Luiz Lehmann Coutinho, Raul Machado Neto, Roberto Sartori Filho, Saulo Luz e Silva, Sila Carneiro da Silva e Valdomiro Shigueru Miyada**

Agradecimento especial aos meus colegas do LAFA pelo convívio, amizade e colaboração: **Patricia Maloso Ramos, Giuliana Micai de Oliveira e Giancarlo de Souza Moura, Daiane Fausto, Robson Sfaciotti Barduci e Lucas Maniero**.

Agradeço toda a equipe do LNCA/ESALQ pela amizade e cooperação, muito obrigado **Daniel Messias Ribeiro, Welder Baldassini, Antonio Carlos Ramos, Maria Antonia Ladalardo Etchegaray, Tiago Zanett Albertini, Veridiana Lourenço de Souza e Bruna Alves**. Ao Professor Dr. **Dante Pazzanese Lanna** pelas diversas oportunidades de trabalho junto a equipe do LNCA.

Agradecimento especial à **Nirlei Aparecida Silva** pela atenção e ajuda nas análises realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal, também agradeço a **Marcela Paduan** e a **Pilar D. Mariani**. Agradeço a **Fabiane Costa, Anderson Cabral e Verônica Pacheco** pela ajuda e compartilhamento do projeto.

Agradeço a minha família pelo amparo, incentivo, compreensão e afeto. Especialmente a minha esposa, **Tatiele Martinez Garcia**, sempre ao meu lado,

apoiando e auxiliando em todos os momentos. Agradeço à minha mais nova e importante razão de viver, a minha pequena princesa **Ísis Garcia Coutinho**. À minha mãe **Maria Ana Aranda**, ao meu pai, **Frande da Silva Coutinho** por todos ensinamentos e amor. Às minhas irmãs **Adriane Coutinho**, **Cristiane Coutinho**, e **Isabel Coutinho** pelo carinho e apoio, e aos meus irmãos **Emersom Carlos Loubet** e **Cezar Augusto Cáceres** pela compreensão e apoio. Agradeço à **Josiely Garcia** pela ajuda com a minha princesinha durante a redação da tese. Agradeço a minha querida sogra **Teodora Martinez**. Agradeço aos meus amigos de longa data **Tiago Jesus Santos** (*in memoriam*), **Vinícius Basso dos Santos**, **Marcel Senna** e **Tamires Basso dos Santos**.

Agradeço aos amigos pela convivência, pela amizade e pelos conselhos. Estarão sempre na minha memória como referências de virtudes especiais e pelo apoio incondicional durante o projeto: **Patrícia Maloso Ramos** (amizade, companheirismo e convívio), **Tiago Zanett Alberti** (conselhos, amizade e parceria), **Antonio Carlos Ramos** (intensas reflexões científicas, formulações de hipóteses, boas conversas e amizade). Também não poderia faltar mais agradecimentos ao **Welder Baldassini**, à **Giuliana Micaí de Oliveira** e ao **Giancarlo Moura** pela amizade, parceria e companheirismo.

Também merecem meus agradecimentos pelo apoio, convívio e amizade durante a minha estadia em Piracicaba: **Violene M. Nordi**, **Thaline Pachelli**, **Debora B. Moretti**, **José Luiz**, **Rosângela da Silva (Rosi)**, **Diógenes Coriguazi**, **Marcell P. Alonso**, **Tatiane Beloni**, **Susana Barizon**, **Flávia Delgado**, **Pedro Ramos** e **Maria Lúcia M. Ramos**.

À **ESALQ/USP** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens**, pela oportunidade de realização do Doutorado. À **CAPES** e ao **CNPq** pelas bolsas de doutorado. À **FAPESP** pelo auxílio financeiro ao projeto.

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
Não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito".

Chico Xavier

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS.....	19
1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 Maciez da carne bovina.....	25
2.1.1 Principais fatores na definição da maciez na carne bovina	25
2.1.1.1 Comprimento de sarcômero	26
2.1.1.2 pH.....	28
2.1.1.3 Gordura intramuscular.....	30
2.1.1.4 Tecido conjuntivo intramuscular	31
2.1.1.5 Proteólise <i>post mortem</i>	34
2.2 Temperamento	40
2.3 Temperamento e maciez.....	42
2.4 Temperatura corporal e Temperamento.....	43
2.4.1 Termorregulação e estresse.....	43
2.4.2 Termografia infravermelho	45
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 Instalações, Animais e Período Experimental	47
3.2 Manejos, Termografia e Temperatura Retal.....	47
3.3 Avaliações do Temperamento Animal	49
3.4 Abate	49
3.5 Coleta de amostras	49
3.6 Análises da Carne	50
3.7 Análise de Expressão Gênica	51
3.8 Análise estatística	54
4 RESULTADOS	57
4.1 Estatística descritiva dos grupos de cisalhamento.....	57
4.2 Força de Cisalhamento e Amaciamento.....	57
4.3 Comprimento de Sarcômero, pH e Calpastatina	59

4.4 Expressão gênica de calpaína e calpastatina.....	59
4.5 Velocidade de Fuga, Escore de Tronco, ITM e Temperatura Retal.....	61
4.6 Análise de Componentes Principais	62
4.7 Correlações entre Variáveis de Temperamento e da Carne.....	65
4.8 Correlações entre temperamento ou FC com Temperatura do animal	66
5 DISCUSSÃO.....	69
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
REFERÊNCIAS	79
ANEXOS.....	93

RESUMO

Temperamento divergente em bovinos está associado à alteração no amaciamento de carne e atividade inibitória de calpastatina

Embora muitos avanços tenham ocorrido no entendimento dos fatores que afetam a maciez, a incidência de carne dura ainda é significativa. Animais mais reativos apresentam carnes mais duras, porém o mecanismo que determina este efeito ainda não foi estabelecido. Presume-se que o maior estresse nos animais reativos aumente a atividade de calpastatina afetando o amaciamento *post mortem*. Com objetivo de testar esta hipótese, foram avaliadas correlações da força de cisalhamento (FC), temperamento e temperatura corporal obtida de noventa e seis novilhos Nelore castrados, com cerca de 20 meses de idade. O temperamento foi baseado nas variáveis velocidade de fuga (VF) e escore de tronco (ET) avaliadas 3 - 4 semanas antes do abate (Manejo 1) e 2 dias pré-abate (Manejo 2). A análise de componentes principais com as variáveis de temperamento obtidas em ambos os manejos resultou em dois índices: índice de temperamento (IT) e índice de habituação (IH). Estes índices apresentaram maior correlação com a FC do que a VF. O IH apresentou correlação negativa e positiva com FC e pH ($P < 0,05$), respectivamente. A temperatura retal foi positivamente correlacionada com IT e negativamente com FC. A termografia infravermelho de várias regiões corporais apresentou correlações baixas com IT ou FC. Dois grupos divergentes quanto à FC (extremos da população para FC), cada qual com 6 novilhos, foram comparados para variáveis de temperamento, expressão dos genes CAPN1, CAST, CAST1 e CAST2, e características de carne. O grupo de alta FC (AFC) apresentou maior ($P < 0,05$) VF, ET, IT e índice de temperamento com base na média da VF e ET (ITM). Os grupos de AFC e baixa FC (BFC) não diferiram ($P > 0,05$) para comprimento de sarcômero e pH final, mas tiveram diferenças no amaciamento *post mortem*, com diferenças em maciez que persistiram em todos os tempos de maturação (2, 16 e 30 dias *post mortem*; $P < 0,05$). O grupo AFC apresentou maior atividade inibitória de calpastatina total 48 h *post mortem* medida no *M. triceps brachii* ($P < 0,05$), embora diferenças não tenham sido observadas no *M. longissimus lumborum* ($P > 0,05$). No entanto, o grupo AFC teve no *M. longissimus* maior expressão de CAST do que o grupo de BFC ($P < 0,05$). Em conclusão, temperamentos divergentes têm impacto na atividade de calpastatina que influencia o amaciamento *post mortem*.

Palavras-chave: Componentes principais; Força de cisalhamento; Habituação; Nelore; Maciez; Reatividade; Termografia infravermelho; Expressão gênica

ABSTRACT

Divergent temperament in cattle is associated with the change in meat tenderization and calpastatin inhibitory activity

Despite significant advancements in the knowledge of factors affecting beef tenderness, incidence of tough beef continues to be elevated. Animals more excitable have tougher meat, but the mechanism that determines this effect has not been established. It is presumed that more stress in excitable animals increases calpastatin activity with effects on tenderization *post mortem*. With the aim of test this hypothesis, correlations were measured for shear force (SF), temperament and body surface temperature obtained from ninety-six Nellore with about 20 months of age. Temperament was based on the exit velocity variables (EV) and crush score (CS) measured 3-4 weeks (handling 1) and two days (handling 2) before slaughter. The principal component analysis with the temperament variables obtained in both handlings resulted in two index: temperament index (TI) and habituation index (HI). These indexes had higher correlation with the SF than the VF. The HI had negative and positive correlation with SF and pH ($P < 0.05$), respectively. Rectal temperature was positively correlated with TI and negatively with SF. Infrared thermography of different body sites had low correlations with TI or SF. Two divergent groups to SF (extremes of the population to FC), each with 6 steers, were compared to temperament variables, expression of genes CAPN1, CAST, CAST1 and CAST2, and meat traits. The high SF group (HSF) had higher EV, CS, TI and temperament index based on the average of EV and CS (ATI) ($P < 0.05$). The HSF groups and low SF (LSF) did not differ for sarcomere length and final pH ($P < 0.05$), but it had differences in *post mortem* tenderization, with differences in tenderness that persisted in all aging times (2, 16 and 30 days *post mortem*; $P < 0.05$). The HSF group had higher calpastatin inhibitory activity 48 h *post mortem* measured in *M. triceps brachii* ($P < 0.05$), although no differences were observed in the *M. longissimus lumborum* ($P > 0.05$). However, the HSF group had in the *M. longissimus* greater CAST expression than the LSF group ($P < 0.05$). In conclusion, divergent temperaments affect the calpastatin activity that influence the tenderization *post mortem*.

Keywords: Excitable; Gene expression; Habituation; Infrared thermography; Nellore; Principal components; Shear force; Tenderness

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Médias e desvio padrão para força de cisalhamento em diferentes tempos de maturação para os grupos de baixa e alta força de cisalhamento no músculo <i>M. longissimus lumborum</i>	58
Figura 2 – Expressão gênica relativa em qPCR do <i>M. longissimus lumborum</i> para os grupos de baixa (n = 6) e alta força (n = 6) de cisalhamento (FC).....	60
Figura 3 – Expressão gênica relativa em qPCR do <i>M. longissimus lumborum</i> para os grupos de baixo e alto índice de temperamento (IT) com baixa ou alta força de cisalhamento (FC).....	61
Figura 4 – Representação da população estudada e dos grupos de força de cisalhamento para os dois primeiros componentes principais, CP1 e CP2.....	63
Figure 5 – Representação da população estudada e dos grupos de força de cisalhamento para o primeiro e terceiro componentes principais, CP1 e CP3.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Temperatura e umidade relativa no momento inicial e final do manejo, e temperatura mínima e máxima do dia anterior ao manejo.....	48
Tabela 2 – <i>Primers</i> utilizados para quantificação das expressões gênicas.....	53
Tabela 3 – Estatística descritiva dos grupos de baixa (B) e alta (A) força de cisalhamento do <i>M. longissimus lumborum</i> aos 16 dias <i>post mortem</i>	57
Tabela 4 – Médias para comprimento de sarcômero, pH final e calpastatina total avaliados nos músculos <i>M. longissimus lumborum</i> (LL) e <i>triceps brachii</i> (TB) dos grupos de baixa e alta força de cisalhamento do <i>M. longissimus lumborum</i> aos 16 dias <i>post mortem</i>	59
Tabela 5 – Média dos quadrados mínimos para velocidade de fuga (VF) e índice de temperamento médio (ITM), mediana do escore de tronco (ET) e temperatura retal (TR) avaliados em dois manejos diferentes para os grupos de baixa e alta força de cisalhamento (FC).....	62
Tabela 6 – Autovalores, porcentagem acumulada da variação explicada por cada componente principal e autovetores.....	62
Tabela 7 – Médias do índice de temperamento (IT), componentes principais 2 (PC2) e 4 (PC4), índice de habituação (IH) para os grupos de baixa e alta força de cisalhamento (FC).....	65
Tabela 8 – Correlação residual de Pearson para variáveis de força de cisalhamento, pH e comprimento de sarcômero do músculo <i>M. longissimus lumborum</i> com variáveis de temperamento de toda a população (n = 96).....	66
Tabela 9 – Correlação residual de Pearson para variáveis de força de cisalhamento aos 16 dias <i>post mortem</i> (FC) do músculo <i>M. longissimus lumborum</i> e índice de temperamento (IT) com termografia infravermelho de diferentes regiões corporais e com temperatura retal de toda a população (n = 96).....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AFC	alta força de cisalhamento
AIT	alto índice de temperamento
BFC	baixa força de cisalhamento
BIT	baixo índice de temperamento
CAPN1	calpaína isoforma I, μ -calpaína
CAST	calpastatina isoforma total
CAST 1	calpastatina isoforma I
CAST 2	calpastatina isoforma II
EA ₂₋₁₆	extensão de amaciamento do dia 2 ao 16 <i>post mortem</i>
EA ₂₋₃₀	extensão de amaciamento do dia 2 ao 30 <i>post mortem</i>
EA ₁₆₋₃₀	extensão de amaciamento do dia 16 ao 30 <i>post mortem</i>
ET	escore de tronco
ET1	escore de tronco do manejo 1
ET2	escore de tronco do manejo 2
FC	força de cisalhamento
FC2	força de cisalhamento do dia 2 <i>post mortem</i>
FC16	força de cisalhamento do dia 16 <i>post mortem</i>
FC30	força de cisalhamento do dia 30 <i>post mortem</i>
IH	índice de habituação
IT	índice de temperamento
ITH	índice de temperamento-habituação
ITM	índice de temperamento médio
ITM1	índice de temperamento médio do manejo 1
ITM2	índice de temperamento médio do manejo 2
LL	músculo <i>M. longissimus lumborum</i>
TB	músculo <i>M. triceps brachii</i>
TIV	termografia infravermelho
VF	velocidade de fuga
VF1	velocidade de fuga do manejo 1
VF2	velocidade de fuga do manejo 2

1 INTRODUÇÃO

A carne bovina possui características sensoriais únicas. Contudo, os atributos sensoriais apresentam uma grande variabilidade, resultado da associação de fatores genéticos e ambientais. Dos atributos da carne, o sabor característico talvez seja o fator mais apreciado pelos consumidores. Por outro lado, a maciez da carne tem sido apontada como definidora da aceitação do consumidor no mercado norte-americano (SHACKELFORD et al., 2001), ao ponto da identificação da disposição para pagamento de um prêmio pela garantia de satisfação de um padrão mínimo (BOLEMAN et al., 1997; MILLER et al., 2001; SHACKELFORD et al., 2001).

Dentro do mercado brasileiro, parece existir uma valorização do quesito maciez, e carnes diferenciadas para este atributo são distinguidas pelos consumidores (DELGADO et al., 2006). Portanto, em cenário de constante debate sobre os efeitos da carne sobre a saúde e aumento da competitividade de fontes alternativas de proteína, pode ser estratégica a redução de experiências negativas com a maciez da carne bovina produzida de forma sustentável. Neste contexto, as buscas de entendimento dos fatores determinantes de maciez são essenciais para manter e ampliar o mercado da carne produzida no Brasil.

A maciez da carne é influenciada pelo processo enzimático em condições normais de refrigeração (KOOHMARAIE, 1996). A relação entre altos níveis de calpastatina e a baixa maciez da carne são observações consistentes, dando conta da importância do sistema calpaína (O'CONNOR et al., 1997; WHIPPLE et al., 1990; WULF et al., 1997). Apesar das calpaínas realizarem a proteólise miofibrilar, é o seu inibidor que apresenta maior correlação com a maciez e exibe diferenças significativas entre tratamentos que possuem diferenças na textura (IBRAHIM et al., 2008; SHACKELFORD et al., 1991; WHIPPLE et al., 1990).

Algumas evidências sinalizam para um aumento da atividade de calpastatina em decorrência do estímulo diferenciado aos receptores agonistas adrenérgicos, com isso, afetando a maciez da carne (GRUBER et al., 2010; SENSKY et al., 1996; STRYDOM et al., 2009, 2011). Este mecanismo pode ser a causa da menor maciez na carne de animais reativos (BEHRENDTS et al., 2009; KING et al., 2006; WULF et al., 1997), os quais são mais suscetíveis ao estresse pré-abate que animais com bom temperamento (CAFE et al., 2011a; CURLEY et al., 2008). Animais reativos, ou seja, mais estressados apresentam maiores

concentrações plasmáticas de epinefrina (GRUBER et al., 2010), as quais agem sobre os receptores adrenérgicos.

O estabelecimento da relação entre maciez e temperamento apresenta o desafio da identificação de animais com responsividade diferenciada ao estresse, pois os animais podem expressar a sua condição emocional de formas diferentes (PETHERICK et al., 2002; SANT'ANNA; PARANHOS DA COSTA, 2013). Para o sistema produtivo, um bom identificador deve apresentar boa correlação com as variáveis de interesse. Deste modo, a velocidade de fuga, o escore de tronco e o escore de curral têm em alguns casos apresentado resultados satisfatórios quanto à relação com força de cisalhamento (BEHRENDTS et al., 2009; KING et al., 2006; WULF et al., 1997), embora sem o mesmo êxito em outras oportunidades (FRANCISCO et al., 2015; SILVEIRA et al., 2012).

Com a finalidade de obter variáveis com melhor capacidade preditiva do temperamento, a utilização de índices é uma alternativa que pode ser explorada (FRANCISCO et al., 2015; KING et al., 2006; SANT'ANNA; PARANHOS DA COSTA, 2013). Isto pode ser feito com análise de componentes principais, que realiza associação dos indicadores em uma variável, denominado como índice nesta condição (MANLY, 2008; SANT'ANNA; PARANHOS DA COSTA, 2013). O uso deste recurso é fortalecido pelas características intrínsecas dos métodos de avaliação que abordam diferentes aspectos do comportamento dos animais (KILGOUR; MELVILLE; GREENWOOD, 2006; PETHERICK et al., 2009; SANT'ANNA; PARANHOS DA COSTA, 2013). Se bem-sucedido, o índice pode aperfeiçoar a identificação de animais com maior reatividade pré-abate, e consequentemente, com maior propensão para comprometimento do amaciamento da carne.

A reatividade animal resultante do estímulo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e aumento do tônus simpático apresenta efeitos sobre a temperatura central, estimada pela temperatura retal (GRUBER et al., 2010; TERLOUW; SHOUTEN; LADEWIG, 1997). Entretanto, não se sabe do impacto destes processos fisiológicos sobre a temperatura em diferentes regiões corporais, pois ao mesmo tempo em que há estimulação do metabolismo, aumento da frequência cardíaca e maior aporte sanguíneo para a musculatura (processos que aumentam temperatura corporal), pode ocorrer vasoconstrição dos vasos da pele em resposta a liberação de norepinefrina ou vasodilatação após realização de exercício em decorrência do estresse (CHARKOUDIAN, 2010; CUNNINGHAM; KLEIN, 2007;

GREGORY; GRANDIN, 1998; TERLOUW; SHOUTEN; LADEWIG, 1997). Estes eventos podem se contrapor ou agir sinergicamente para aumento da temperatura das diversas regiões corporais. Deste modo, as avaliações de temperatura podem ser potenciais marcadores para temperamento e atributos da carne.

Presume-se que o maior estresse nos animais reativos aumente a atividade de calpastatina afetando o amaciamento *post mortem*. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo abordar os principais determinantes intrínsecos da maciez da carne bovina. Avaliar a relação da força de cisalhamento com calpastatina e temperamento, bem como avaliar a aplicação de análise multivariada como ferramenta para identificação de animais com diferentes temperamentos ao manejo. Além disto, procurou-se determinar a utilidade da temperatura em diferentes regiões corporais como marcadores para temperamento e maciez.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Maciez da carne bovina

A carne bovina tem a preferência dos consumidores brasileiros, podendo atingir patamares altos como primeira escolha entre as carnes (DELGADO et al., 2006), e representando cerca de 39% do consumo médio de carne (BRASIL, 2016), situando-se entre os maiores mercados de carne do mundo. A maciez é o fator mais importante influenciando a satisfação do consumidor (LAWRIE; LEDWARD, 2006; PURCHAS, 2004). A experiência negativa com a maciez pode limitar a possibilidade de uma nova compra (BOLEMAN et al., 1997), bem como a garantia de maciez pode render o pagamento de um prêmio pelos consumidores (BOLEMAN et al., 1997; MILLER et al., 2001; SHACKELFORD et al., 2001). Estas observações são reforçadas pela relação entre o preço do corte cárneo e sua relação com a expectativa de maciez (SHACKELFORD; WHEELER; KOOHMARAIE, 1995). Esta situação também é observada no Brasil (DELGADO, 2001).

A maciez da carne é determinada por testes sensoriais, bem como por uma medida instrumental objetiva pelo uso de um texturômetro. A maior parte dos estudos utiliza este método objetivo denominado *Warner-Bratzler Shear Force*, que mede a força necessária para o cisalhamento de um cilindro de carne no sentido transversal (HONIKEL, 1998; PURCHAS, 2004). Nesta técnica a maior força de cisalhamento (FC) indica redução na aceitabilidade da carne pela menor maciez (HOPKINS; HUFF-LONERGAN, 2004). A FC e a maciez sensorial medida pelos consumidores apresentam correlação negativa moderada-alta ($r = -0,72$, DESTEFANIS et al., 2008), ao ponto de os consumidores no teste sensorial serem capazes de identificar faixas de valores de FC (BOLEMAN et al., 1997; DELGADO et al., 2006; MILLER et al., 2001; SHACKELFORD et al., 2001).

2.1.1 Principais fatores na definição da maciez na carne bovina

A maciez da carne é afetada por fatores *ante* e *post mortem*. Os fatores *ante mortem* são inerentes ao sistema de produção e representam interações entre o genótipo animal e o ambiente, enquanto que os fatores *post mortem* são extrínsecos, se confundem com os procedimentos técnicos utilizados após o abate até o consumidor final (FELÍCIO, 1997). Os fatores envolvidos nestes dois

momentos são inúmeros, e frequentemente, interagem, afetando características estruturais e metabólicas na carne. Estas são denominadas de determinantes intrínsecos (e.g., pH e teor de colágeno).

Os determinantes intrínsecos afetam a maciez em diferentes intensidades (PURCHAS, 2014). Contudo, o processo enzimático envolvido no amaciamento durante a maturação da carne pode responder por quase a totalidade da variabilidade na maciez (KOOHMARAIE, 1992a). Esta constatação é corroborada pelas altas correlações existentes entre FC e índice de fragmentação miofibrilar (CULLER et al., 1978; MARINO et al., 2013; SHACKELFORD et al., 1991). Contudo, esta constatação é plausível para carnes que permitem preparação rápida com calor seco (e.g., *M. longissimus*), enquanto em cortes usualmente empregados em preparações lentas e com calor úmido adiciona-se o conteúdo e solubilidade do colágeno (FELÍCIO, 1997). Não obstante, os estudos a respeito da maciez da carne bovina são concentrados em carnes de preparação rápida, que utilizam elevadas temperaturas, cujos cortes cárneos são valorizados e apresentam alta proporção na carcaça bovina (SHACKELFORD et al., 1995). A maciez destes cortes sofre influência de diversos determinantes intrínsecos, tais como: comprimento de sarcômero, pH, gordura intramuscular, tecido conjuntivo intramuscular e proteólise *post mortem* (PURCHAS, 2014).

2.1.1.1 Comprimento de sarcômero

Sarcômero é a unidade básica do músculo esquelético, e o seu comprimento é definido pela distância entre dois discos Z adjacentes. A avaliação do comprimento sarcômero tem importância em condições que predisõem o encurtamento pelo calor (*heat shortening*) ou pelo frio (*cold shortening*). O último tem maior importância em bovinos devido à ocorrência associada ao abate e resfriamento imediato das carcaças. O encurtamento pelo frio ocorre quando baixas temperaturas no *pre rigor* induzem a contração muscular mais intensa (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010; PURCHAS, 2014). Considera-se que pode ocorrer encurtamento pelo frio quando o pH muscular está maior que 6,0 e a temperatura está menor que 10 °C (HONIKEL; RONCALÉS; HAMM, 1982; HONIKEL, 2014a). A baixa taxa de acidificação e alta proporção de fibras vermelhas

na musculatura de bovinos, o torna susceptível ao encurtamento pelo frio (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010; LAWRIE; LEDWARD, 2006).

Em condições normais, o comprimento de sarcômero *post rigor* tem entre 1,8 a 2,0 μm no músculo *M. longissimus*. Abaixo destes valores, caracteriza-se o encurtamento causado pela contração muscular. Dependendo das condições de resfriamento, pode ser alcançado 50% de redução no comprimento do sarcômero (HONIKEL, 2014b). Quanto menor o comprimento do sarcômero, mais dura carne se torna. No entanto, esta relação não é linear. O encurtamento excessivo, acima de 40%, pode causar dano estrutural no sarcômero e resultar em melhora da maciez (MARSH; LEET; DICKSON, 1974; SMULDERS et al., 1990; PURCHAS, 2014).

O comprimento de sarcômero tem forte impacto na maciez. O encurtamento de 30% no sarcômero do *M. longissimus dorsi* de bovinos pode aumentar em duas vezes a FC medida na carne com 14 dias de maturação (HONIKEL, 2014a). Impacto maior na maciez deste músculo foram observados em carnes que foram tratadas com resfriamento rápido. Este efeito provocou aumento na FC em três vezes quando comparada ao resfriamento adequado (DAVEY; GILBERT; CARSE, 1975). Esta diferença caiu para a metade após 14 dias de maturação. O impacto do encurtamento de sarcômero também é verificado no painel sensorial treinado. A redução de 0,20 μm no comprimento de sarcômero no *M. longissimus* (de 1,80 para 1,60 μm) acarretou em decréscimo de quase 3 pontos (1 – 9) no escore de maciez (SMULDERS et al., 1990).

A alta correlação entre comprimento de sarcômero e FC é observável em tratamentos que provocam variação significativa do comprimento de sarcômero (DEVINE; WAHLGREN; TORNBERG, 1999). Para minimizar estes efeitos, é preconizado o abate de animais com espessura de gordura subcutânea no lombo no mínimo mediana, ou seja, maior que 3 mm (BRASIL, 2004). Esta estratégia reduz a susceptibilidade ao encurtamento pelo frio e previne maiores danos a maciez (PFLANZER; FELÍCIO, 2009; SAVELL; MUELLER; BAIRD, 2005).

A percepção do impacto do comprimento de sarcômero sobre a maciez tem estimulado o desenvolvimento de técnicas que minimizem o encurtamento, ou até mesmo que provoque o alongamento dos músculos. Uma alternativa à suspensão da carcaça pelo tendão de Aquiles, a suspensão pélvica (*tenderstretch*),

tem sido pontuada positivamente pelo *Meat Standards Australia*¹ para palatabilidade devido seu impacto positivo na maciez. A suspensão pélvica tem redução em torno de 20% na FC dos músculos traseiros (média ponderada pelo peso dos músculos) (HOPKINS, 2014a).

Portanto, é de suma importância o monitoramento das condições de resfriamento e a espessura de gordura. O encurtamento pelo frio pode ser evitado ao assegurar temperaturas entre 10 a 15 °C até o estabelecimento do *rigor mortis* ou pH menor que 6, e gordura subcutânea com espessura acima da mínima preconizada (> 3mm). Além disso, estimulação elétrica também tem sido um importante aliado contra o encurtamento do sarcômero por acelerar o *rigor mortis* (LAWRIE; LEDWARD, 2006; HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010). Ao atender estas recomendações de resfriamento e espessura de gordura subcutânea, poucas variações são observadas no músculo para o comprimento de sarcômero (STOLOWSKI et al., 2006).

2.1.1.2 pH

A avaliação do pH na carne tem como base mensurar a concentração de íons hidrogênio (H^+). Pequenas alterações na concentração dos H^+ podem afetar fortemente as estruturas e as funções das moléculas do meio. A concentração do H^+ na musculatura é mantida relativamente constante por meio da manutenção da homeostase no animal em vida, mantendo o pH em torno de 6,9-7,0 (HONIKEL, 2014b).

Na morte do animal, o fluxo sanguíneo e o aporte de oxigênio são interrompidos. Com isso, há alteração do metabolismo energético no tecido muscular, provocando o declínio do pH pela acumulação de íons hidrogênio. Na condição anóxica, as principais fontes de energia para as células musculares são a fosfocreatina e o glicogênio. Os ATPs oriundo destas fontes são aproveitados pelas células, e após sucessivas reações químicas acumulam H^+ , gerando redução do pH no músculo (FERGUNSON, GERRARD, 2014). O estabelecimento do *rigor mortis* tem sido atribuído a falta de substrato ou a inativação de enzimas glicolíticas (LAWRIE; LEDWARD, 2006). Em determinadas condições, o pH final parece ser

¹Sistema australiano de classificação da qualidade da carne bovina, o qual acompanha ao longo do sistema de produção os fatores que afetam a palatabilidade da carne, site: <http://www.mla.com.au>

estabelecido pela inativação da enzima fosfofrutoquinase, a qual é pH-dependente, mas a atividade da AMP deaminase, fluxo glicolítico e a capacidade tamponante são importantes determinantes do metabolismo *post mortem* (WICKS et al., 2015). O mecanismo exato do estabelecimento do pH final ainda é desconhecido (FERGUSON; GERRARD, 2014).

A taxa de declínio do pH muscular é um dos fatores mais importantes para a maciez relativo a este determinante intrínseco, devido à sua contribuição no encurtamento excessivo pelo frio e calor, como abordado previamente. Além disso, outra importância relevante do pH para maciez, é sua influência na proteólise *post mortem*. O pH final da carne categorizados em baixo ($\text{pH} < 5,8$), intermediário ($5,8 < \text{pH} < 6,2$) e alto ($\text{pH} > 6,2$) apresentam diferenças na maciez, com o pH intermediário exibindo carnes mais duras (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; PURCHAS, 2014) e menor taxa de amaciamento (WATANABE; DALY; DEVINE, 1996). Provavelmente, como resultado da menor degradação das proteínas miofibrilares (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016). Corroborando com estes resultados, análises de regressão estimaram que com a redução no pH final da carne ocorre redução na atividade de calpastatina e maior ação das calpaínas (HWANG; THOMPSON, 2001).

Estudos recentes têm indicado que o pH intermediário pode aumentar a atividade protetiva das pequenas proteínas de choque térmico (sHSP) sobre a degradação das proteínas miofibrilares (BALAN; KIM; BLIJENBURG, 2014; PULFORD et al., 2008). Os níveis destas proteínas apresentam comportamento diferente para cada faixa de pH durante a maturação, contudo não aparentam uma relação direta com a degradação das proteínas miofibrilares e maciez (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016).

Assim como o pH final, a taxa de declínio do pH também está relacionada com o amaciamento *post mortem*. Maiores taxas de declínio do pH favorecem nos primeiros dias de maturação a clivagem de proteínas miofibrilares pelas calpaínas (HWANG; THOMPSON, 2001; KOOHMARAIE, 1992b; O'HALLORAN; TROY; BUCKLEYB, 1997). O mecanismo deste processo não é conhecido, mas supõe-se que o rápido declínio do pH desestabilizaria a estrutura da μ -calpaína, e permitiria uma mudança de conformação que favoreceria a proteólise dos substratos com subsequente autólise (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010). Este mecanismo parece estar associado com outro proposto, o

qual considera a ligação entre calpaína e calpastatina, que é extremamente sensível ao pH, e obedece uma relação sigmoide, sendo observado diminuição na inibição com a redução do pH (DRANSFIELD, 1993). Também foi sugerido que a rápida queda do pH alteraria conformações dos substratos favorecendo a proteólise (HUFF-LONERGAN, 2014). Estas proteases parecem ter maior ação em proteínas desnaturadas (GOLL et al., 2003), que podem estar em maior concentração no tecido como taxa declínio do pH elevada. Pelas evidências existentes, a importância do pH para a maciez se deve principalmente pelo seu efeito sobre o amaciamento *post mortem*, envolvendo o sistema calpaína.

2.1.1.3 Gordura intramuscular

A gordura depositada dentro dos músculos é denominada de gordura intramuscular, comumente chamada de marmorização. A gordura intramuscular apresenta significativa contribuição para palatabilidade geral da carne, mas o impacto sobre a maciez é questionável (MILLER, 2014; SAVELL; CROSS, 1988). A correlação entre gordura intramuscular e maciez é baixa para carnes com níveis de gordura muscular entre 3 a 10%, tanto em avaliação por FC como em painel treinado (WULF et al., 1997). Além disso, existe uma larga variação na maciez dentro de cada escore de marmorização, indicando que pode haver carne dura e macia em um mesmo escore (TATUM et al., 1980; WHEELER; CUNDIFF; KOCH, 1994).

Não obstante, alguns mecanismos são apontados como responsáveis pela melhoria na maciez com o incremento da gordura intramuscular. De acordo com Miller (2014), existem quatro características associadas ao efeito da marmorização sobre a maciez. A primeira, diz respeito à densidade da gordura, que é baixa, e por isso carnes com maior concentração de gordura seriam mais macias. A segunda, trata da maior lubrificação das fibras musculares com aumento da gordura na carne, isto reduziria a resistência da carne durante a mastigação. A terceira teoria, considera que carnes mais marmorizadas protegeriam as proteínas de uma desnaturação rápida durante o cozimento. Isto reduziria a perda de água na cocção, evitando concentração das fibras com impacto prejudicial na maciez. A última teoria é chamada da “teoria da deformação”. Nesta teoria, o aumento da gordura intramuscular causaria enfraquecimento do tecido conjuntivo do perimísio, causando

deformação neste tecido, e consequentemente, reduzindo o seu efeito de endurecimento da carne.

Embora seja difícil a separação dos possíveis mecanismos, a “teoria da deformação” foi visitada (NISHIMURA; HATTORI; TAKAHASHI, 1999). Neste estudo, foram utilizados novilhos Wagyu Japanese Black, reconhecidos pela alta capacidade de deposição de gordura. A FC e o teor gordura na carne foram mensurados até aos 32 meses de idade. A correlação entre FC e teor de gordura no *M. longissimus* foi baixa e positiva ($r = 0,18$; com os animais de 9 até 32 meses de idade). Entretanto, a correlação foi alta e inversa ($r = -0,76$) para animais com mais de 20 meses de idade. A partir desta idade, foi observado rápido aumento na taxa de deposição da gordura, de 5% aos 20 meses para 20% de gordura intramuscular aos 32 meses. Esta alteração na composição provocou redução no teor de colágeno e aumento na solubilidade do colágeno, redução na FC do tecido conjuntivo, e como consequência, redução na FC da carne. Portanto, o efeito do grau deposição da gordura intramuscular sobre maciez é factível, devido ao enfraquecimento do tecido conjuntivo. Entretanto, os autores salientaram que o efeito é aplicável quando a gordura intramuscular ultrapassa 8% da composição total do bife.

O nível de gordura intramuscular exigido para alteração estrutural é muito elevado, sendo difícil alcançar tal deposição de forma eficiente e sustentável, mesmo para animais de raças como Angus e Hereford, com aptidão para deposição de gordura intramuscular (SHACKELFORD et al., 1994). Em Nelore, principal raça utilizada na composição do gado de corte no Brasil, a gordura intramuscular varia entre 2 a 3% em touros jovens e adultos (DUARTE et al., 2011; FRANCISCO et al., 2015), com relatos de até 5% em castrados adultos (PFLANZER; FELÍCIO, 2011). Portanto, parece razoável as indicações que a gordura intramuscular pode explicar apenas de 5 a 15% na variação da maciez da carne bovina (PURCHAS, 2014; TATUM et al., 1980; WHEELER; CUNDIFF; KOCH, 1994).

2.1.1.4 Tecido conjuntivo intramuscular

A carne consiste de quantidade variáveis de tecido muscular, tecido adiposo, tecido conjuntivo, sangue, vasos sanguíneos, tecido linfático, tecido nervoso, tendões e cartilagem. Dentre estes componentes, o tecido conjuntivo é um dos com maiores participações relativa no músculo, pois contribui com 2 a 19% da

proteína total do músculo esquelético (KEETON et al., 2014), e representa 1,5 a 15% do peso do músculo em base de matéria seca (ASTRUC, 2014b). Este tecido apresenta disposição altamente organizada e serve de suporte e sustentação para as fibras musculares (ASTRUC, 2014a).

O tecido conjuntivo consiste primariamente de colágeno, mas também possui quantidades significativas de elastina e substância fundamental amorfa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O maior teor de colágeno na carne afeta negativamente a maciez, mas isso depende do método de cozimento, bem como da característica do colágeno (ASTRUC, 2014b; TAYLOR, 2004). A maior quantidade de ligações cruzadas entre cadeias de peptídeos dentro das moléculas de colágeno, a tornam mais insolúvel, e nestas condições a carne é menos macia (CHRISTENSEN; PURSLOW; LARSEN, 2000; HILL, 1966). O teor e a qualidade do tecido conjuntivo juntamente com proteólise *post mortem* são considerados os fatores mais importantes para a maciez, em condições de ausência do encurtamento excessivo do músculo durante o estabelecimento do *rigor mortis* (DE SMET, 2014).

O teor de colágeno afeta significativamente a maciez em comparações entre músculos (LAWRIE; LEDWARD, 2006; PURCHAS, 2014). Músculos usados para locomoção são menos macios, pois apresentam maior quantidade de tecido conjuntivo do que os músculos de postura (MILLER, 2014; TAYLOR, 2004). Deste modo, as diferenças dentre os músculos *M. psoas* e *longissimus* que apresentam baixo teor de colágeno e carne macia, e os *M. biceps* e *pectoriais* que se caracterizam pelo alto teor de colágeno e carne mais dura são explicadas em parte pelo colágeno presente (TAYLOR, 2004).

O teor de colágeno também é importante em avaliações que aplicam cozimento de baixa temperatura (PURCHAS, 2014). Nesta condição, as ligações intermoleculares e intramoleculares no colágeno apresentam quebras reduzidas, mantendo a integridade das unidades de polipeptídios de tripla-hélice, consequentemente, evitando a condição gelatinosa verificada em cozimentos com alta temperatura (LAWRIE; LEDWARD, 2006; LEWIS; PURSLOW; RICE, 1991; KEETON; ELLERBECK; NÚÑEZ DE GONZÁLEZ, 2014). De modo geral, à medida que aumenta a temperatura de cozimento reduz a contribuição do teor de tecido conjuntivo para variação da maciez (BOUTON; HARRIS; RATCLIFF, 1981; CHRISTENSEN; PURSLOW; LARSEN, 2000; TAYLOR, 2004).

O teor de colágeno parece não aumentar com a idade do animal, sugerindo que a qualidade e não quantidade de colágeno são relevantes para a maciez da carne quando há diferenças na idade (PURSLOW, 2005; TAYLOR, 2004; ASTRUC, 2014b). A menor solubilidade do colágeno resulta em aumento da dureza da carne de animais mais velhos (DUARTE et al., 2011; GOLL; HOEKSTRA; BRAY, 1964), atuando como o principal fator de contribuição do tecido conjuntivo para a maciez. Acima de 60 °C, as moléculas de colágeno são desnaturadas e perdem sua estrutura altamente organizada e torna-se gelatinosa (CHRISTENSEN; PURSLOW; LARSEN, 2000; PALKA, 1999), porém, no gado adulto as fibras de colágeno são muito mais termo estáveis devido o maior número de ligações cruzadas, fator que a torna mais insolúveis (HILL, 1966; LAWRIE; LEDWARD, 2006). Nesta condição, o tecido conjuntivo tem menor gelatinização no cozimento, interferindo negativamente na maciez (MILLER, 2014).

Além da idade, a solubilidade do colágeno pode ser afetada por aumento das ligações cruzadas devido a fatores como raça, sexo, nutrição e ritmo de crescimento (ASTRUC, 2014b; PURSLOW, 2005). A solubilidade do colágeno tem mais importância para métodos de cozimento de preparo rápido, visto que maiores tempos de cozimentos causam solubilização do colágeno em maior extensão dirimindo diferenças na solubilidade (CHRISTENSEN; PURSLOW; LARSEN, 2000; PURCHAS, 2014).

A maturação aparenta ter pouco ou nenhum efeito sobre o teor e a solubilidade do colágeno (KOOHMARAIE et al., 1987). Contudo, o tecido conjuntivo parece ser o responsável por uma dureza basal na carne, limitando o alcance de maiores níveis de maciez em sistemas com o sistema proteolítico eficiente (DEVINE, 2014; PURSLOW, 2005; TAYLOR, 2004). Segundo Taylor (2004), a contribuição do tecido conjuntivo para a variação na maciez demonstra ser em torno de 12%, e junto com a marmorização responderiam no máximo por 20% daquela variação. Esta constatação parece concordar com Koohmaraie (1992a), que atribuiu cerca de 15% da variabilidade na maciez da carne bovina às diferenças em colágeno e marmorização. Ambos os autores, apontaram o sistema proteolítico como o fator mais importante para a maciez na carne bovina.

2.1.1.5 Proteólise *post mortem*

O processo de amaciamento *post mortem* ocorre durante o período denominado de maturação, de maneira que estes termos são usados praticamente como sinônimos. Os mecanismos associados à maturação nas células musculares tornam-se ativados logo após o estabelecimento do *rigor mortis* (KOOHMARAIE et al., 1987; TAYLOR et al., 1995), com alguma maturação iniciando brevemente devido ao rápido alcance do *rigor mortis* em algumas fibras (DEVINE, 2014). Enzimas proteolíticas musculares endógenas, responsáveis pelo processo de renovação proteica no músculo dos animais, agem na transformação do músculo *post mortem* que resultam em amaciamento da carne. Após a morte, as proteases causam hidrólise de proteínas miofibrilares, que correspondem aproximadamente 80% do volume da célula (HOPKINS; HUFF-LONERGAN, 2004), provocando enfraquecimento da arquitetura e da integridade das células musculares (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010; TAYLOR et al., 1995). O nível de comprometimento desta estrutura tem grande influência na variação da maciez da carne (KEMP et al., 2010; KOOHMARAIE, 1992a; TAYLOR et al., 1995).

Apenas determinadas proteínas miofibrilares, do citoesqueleto miofibrilar e os costâmeros, tais como titina, desmina e vinculina são susceptíveis a degradação enzimática (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006; TAYLOR et al., 1995). As catepsinas, proteasomas, caspases e o sistema calpaína são potencialmente envolvidas na proteólise *post mortem* (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010; KEMP et al., 2010; KEMP; PARR, 2012). Os três primeiros sistemas têm tido sua importância no amaciamento da carne questionada (OUALI et al., 2006; HUFF-LONERGAN; 2014; KEMP et al., 2010; KOOHMARAIE, 1994). Contudo, alguns aspectos dão margem para especulações do envolvimento destes sistemas, pois as proteases são endógenas ao músculo esquelético, possuem acesso as miofibrilas no tecido, e os estudos *in vitro* repetem algumas alterações observadas nas miofibrilas no *post mortem* (KEMP; PARR, 2008; KEMP et al., 2010; KOOHMARAIE, GEESINK, 2006).

Algumas características específicas de cada sistema proteolítico ligam-nas a eventos *post mortem*. Por exemplo, as catepsinas são ativas em pH ácido (pH 5-6), e no animal em vida representam um dos principais sítios de degradação de proteínas (HUFF-LONERGAN, 2014). Enquanto que as proteasomas mantem

razoável atividade em pH baixo e persiste com atividade em longas maturações (HOUBAK; ERTBJERG; THERKILDTSEN, 2008; LAMARE et al., 2002). As caspases são envolvidas na morte programada das células musculares (apoptose), e já foram identificados mais de 1.000 substratos para esta enzima, incluindo as proteínas miofibrilares (HUFF-LONERGAN, 2014; KEMP; PARR, 2008). Porém, a maior evidência sobre a contribuição das caspases na proteólise *post mortem* está relacionada com a possibilidade de degradar o inibidor da calpaína, a calpastatina (HUFF-LONERGAN, 2014; KEMP et al., 2009). Este fato recoloca o sistema calpaína como central para a eficiência do sistema proteolítico.

O sistema calpaína tem sido apontado como o principal agente na proteólise das proteínas musculares (GEESINK et al., 2006; KOOHMARAIE, 1992a; KOOHMARAIE, 1994; KOOHMARAIE; GEESINK, 2006), sua contribuição no sistema proteolítico segundo estimativas pode ultrapassar 90% (GOLL, 1991 apud DELGADO et al., 1998).

Embora as evidências apontem para o envolvimento de outros sistemas proteolíticos atuantes no amaciamento *post mortem*, fortes argumentos colocam o sistema calpaína como central para o processo proteolítico (GOLL, 1991 apud TAYLOR et al., 1995). Estes autores compilaram cinco argumentos para justificarem o protagonismo do sistema calpaína no sistema proteolítico: 1) há mínima degradação da actina e miosina nas primeiras 72 horas *post mortem*, no entanto, a maior parte do amaciamento ocorre neste período, e sabe-se que as calpaínas são as únicas enzimas proteolíticas que não degradam actina e miosina. 2) nas primeiras 72 horas de maturação há pouca degradação da α -actinina, e sabe-se que as calpaínas são as únicas enzimas que degradam a estrutura da linha Z e liberam a α -actinina sem degradá-la em pequenos fragmentos. 3) durante a maturação o sarcômero permanece relativamente intacto, possibilitando isolar actomiosina e α -actinina, e além disso não se verifica aumento de aminoácidos livres durante o processo. Os demais sistemas proteolíticos causam extensa degradação de proteínas, em contraste com a calpaína que faz limitadas quebras. 4) aumento da concentração de cálcio no músculo resulta em aumento da maciez, entretanto, nenhuma das catepsinas nem as proteases multicatalíticas são ativadas por cálcio. 5) inúmeros estudos demonstraram que carnes macias apresentam extenso amaciamento *post mortem* em músculos com elevada atividade de calpaína ou baixa atividade de calpastatina.

Outros argumentos foram adicionados posteriormente por Koohmaraie e Geesink (2006): 6) incubação de miofibrilas com calpaína produz padrão proteolítico semelhante ao observado no *post mortem*. 7) a infusão de inibidores de calpaína no músculo inibe a proteólise e o amaciamento *post mortem*. 8) diferenças na proteólise e amaciamento *post mortem* entre espécies podem ser explicados pela variação na atividade da calpastatina. 9) o efeito de endurecimento provocado pela administração de agonista β -adrenérgico pode ser explicado pelo aumento na atividade de calpastatina. 10) a reduzida taxa e extensão da proteólise *post mortem* em ovinos callipyge² são atribuídos aos elevados níveis de calpastatina. 11) a superexpressão de calpastatina em camundongos resulta em uma grande redução na proteólise muscular *post mortem*. E por último, o resultado apresentado por Geesink et al. (2006): 12) camundongos *knockout* para μ -calpaína apresentam forte inibição da proteólise *post mortem*.

O sistema calpaína é composto por várias isoformas tecido-específico e pelo seu inibidor competitivo específico, calpastatina. As calpaínas são produzidas pelos músculos como pró-enzimas dependentes de cálcio para sua ativação, apresentando um resíduo de cisteína no seu sítio ativo (HUFF-LONERGAN, 2014). Muitas pesquisas têm sido realizadas abordando o sistema calpaína, porem sabe-se relativamente pouco sobre a sua regulação. Tem sido proposto o possível envolvimento dos diversos sistemas proteolíticos com a regulação do sistema calpaína (HUFF-LONERGAN, 2014; KEMP et al., 2012), resultados recentes indicam uma possível influência das caspases sobre a atividade de calpastatina (HUANG et al., 2014; KEMP et al., 2009).

As isoformas bem caracterizadas são as μ -calpaína e m-calpaína, que são referenciadas com os prefixos μ - e m- devido as suas exigências micromolar e milimolar de Ca^{2+} , 3-50 μM e 400-800 μM para metade da velocidade máxima, respectivamente (GOLL et al., 1998). As calpaínas ainda apresentam outras terminologias, calpaína I ou 1 para μ -calpaína, e calpaína II ou 2 para a m-calpaína. Estas calpaínas I e II são compostas de duas subunidades, uma subunidade catalítica de 80 kDa e uma subunidade regulatória de 28 kDa. A menor subunidade é idêntica na μ -calpaína e m-calpaína. A maior subunidade apresenta 55-65% de homologia entre as isoformas (GOLL et al., 2003; HUFF-LONERGAN, 2014). A

²O gene Callipyge tem um pronunciado efeito na musculatura, com hipertrofia dos principais músculos do quarto traseiro e lombo (MONIN; SANTÉ-LHOUELLIER, 2014).

subunidade de 80 kDa é composta de cinco domínios: o domínio âncora (domínio I; N-terminal), o domínio protease (domínios IIA e IIB; sítio ativos), domínio semelhante-calmodulina (domínio III; liga-se ao cálcio), e o domínio PEF (domínio IV; C-terminal)

As estruturas do domínio IV tem a função de ligar-se ao cálcio e formar heterodímeros com a subunidade 28 kDa das μ - e m-calpaína. Mais especificamente, o domínio IV liga-se ao domínio VI da subunidade de 28 kDa (CAMPBELL; DAVIES, 2012). O domínio I da subunidade maior, e o domínio V (ricoglicina) da subunidade menor da μ -calpaína e m-calpaína sofrem autólises progressiva quando a exigência de cálcio é atingida, reduzindo a massa da subunidade maior da μ -calpaína e m-calpaína de 80 kDa para 76 e 78 kDa, respectivamente. Também há redução para 18 kDa da subunidade 28 kDa na autólise, em ambas as proteases (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010; HUFF-LONERGAN, 2014).

As calpaínas autolizadas exigem em torno de 80-90% menos cálcio para serem ativadas, porém a extensão da autólise causa perda da atividade (EDMUNDS et al., 1991). A presença da μ -calpaína autolizada no tecido tem sido um indicativo da ativação da enzima (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010). Esta isoforma é considerada a principal, ou se não a única, responsável pela degradação das proteínas miofibrilares *post mortem* (GEESINK et al., 2006; KOOHMARAIE et al., 1987; KOOHMARAIE; GEESINK, 2006). Os níveis de cálcio inicialmente presentes nos músculos parecem não ser suficientes para ativar a m-calpaína (BOEHM et al., 1998), pois dentro das células a concentração varia de 0,2-0,8 μM de Ca^{2+} disponível (GOLL et al., 1992). Contudo, a concentração de Ca^{2+} é aumentada no *post mortem*, possivelmente pela incapacidade do retículo sarcoplasmático e da mitocôndria de reter Ca^{2+} durante o estabelecimento do *rigor mortis*, alcançando níveis entre 100 a 500 μM após a conversão do músculo em carne (DRANSFIELD, 1993).

A calpastatina é o inibidor natural das calpaínas e tem sido encontrado em todos os tecidos que contêm calpaínas (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010). A atividade inibitória desta proteína avaliada 24 horas pós-abate no músculo foi identificada como o indicador isolado que apresenta a maior correlação com maciez de carne bovina (HUFF-LONERGAN, 2014; SHACKELFORD et al., 1994; WHIPPLE et al., 1990). A calpastatina é composta de um polipeptídeo

com 70 kDa (CAMPBELL; DAVIES, 2012). A calpastatina contém quatro domínios inibitórios, cada qual pode inibir uma calpaína. Dentro destes domínios há três regiões A, B e C, que podem interagir com a calpaína após mudanças conformacionais ao ligar-se ao cálcio. Além destes quatro domínios, foram observados outros dois domínios (XL e L) em diferentes isoformas (GOLL et al., 2003). Em todos os casos existem uma isoforma inteira, isto é, traduzida normalmente e outras com deleções de exons na região denominada XL e do exon 3, que faz parte da ligação entre o domínio XL com outro domínio da proteína identificado como L (ambos não são domínios de ligação com as calpaínas), mostrando a existência de “slipicing” alternativo (GOLL et al., 2003). Em bovinos foram relatadas as quatro isoformas, com I, II e III presentes em todos os tecidos, e a IV apenas verificado em testículos (RAYNAUD et al., 2005).

A região XL da calpastatina, de acordo com Cong et al. (1998), possui sítios de fosforilação, e sua fosforilação bem como sua própria expressão são ambas dependentes de estímulo adrenérgico. Em ratos, a estimulação adrenérgica provocou redução na proteólise muscular com envolvimento da via do AMPc-dependente (NAVEGANTES et al., 2001). Esta via, resulta em fosforilação de diversas proteínas e pode ser a responsável por alterar afinidade da calpastatina pela μ -calpaína (PONTREMOLI et al., 1992). Portanto, isoformas com a região XL deletada talvez indique uma diferença na interação entre a calpastatina e as calpaínas. Já a região L é responsável pela regulação da ligação da calpaína no sítio inibitório da calpastatina (LEE et al., 1992), de modo que as moléculas com regiões desse domínio deletadas poderiam gerar isoformas da calpastatina com atividades inibitórias diferenciadas. A interação entre a calpaína e calpastatina tanto *in vivo* como o *post mortem* carecem de mais estudos (HUFF-LONERGAN, 2014; KEMP et al., 2010).

O nível da atividade inibitória da calpastatina decresce com os dias de maturação, devido a degradação no *post mortem* pelas calpaínas. O decréscimo na atividade de calpastatina alcança em torno de 30% nas primeiras 24 horas *post mortem* no *M. longissimus*, alcançando queda de 60% após 7 dias (BOEHM et al., 1988). A proteólise *post mortem* é mais intensa quando a atividade de calpastatina é baixa e a taxa de queda da atividade da calpaína é elevada (HUFF-LONERGAN, 2014). Carnes macias avaliadas entre 10 a 14 dias *post mortem* podem apresentar quase o dobro do índice de fragmentação miofibrilar de carnes duras (CULLER et

al., 1978). A maior taxa fragmentação miofibrilar ocorre nas primeiras 24 horas *post mortem*, alcançando cerca de 70% da fragmentação total em 72 horas (assumindo 100% de fragmentação no dia 14) (KOOHMARAIE et al., 1987).

Os diferentes grupos musculares em bovinos apresentam diferenças principalmente em calpastatina. No *pre rigor*, não foram observados diferenças entre os músculos *M. longissimus*, *semimembranosus* e *triceps brachii* de *Bos taurus taurus* (*Bos taurus*) para μ -calpaína, mas foram observadas diferenças para atividade de calpastatina total, calpastatina II e para a relação μ -calpaína:calpastatina (CRUZEN et al., 2014). As atividades dessas proteínas nos músculos podem ser afetadas por diferentes fatores, mas parecem estar fortemente relacionados ao desenvolvimento muscular.

No animal em vida, o crescimento resultante do acréscimo proteico que considera a renovação proteica muscular envolve o sistema calpaína, com a calpastatina participando ativamente destes processos (GOLL et al., 1992; GOLL et al., 2003; KOOHMARAIE et al., 2002). Os animais apresentam ondas de crescimento em diferentes etapas, implicando em diferenças na fisiologia muscular. Nas diferentes etapas de crescimento do animal, os grupos musculares alternam o ímpeto de crescimento. Isto pode estar associado a uma relação diferenciada entre calpaína e calpastatina nos músculos. Os músculos *M. triceps brachii* e o *longissimus* são exemplos de músculos com ímpeto de crescimento distintos quando avaliados em novilhos na fase de terminação (BERG; BUTTERFIELD, 1976).

Neste sentido, um mesmo músculo pode ter a relação calpaína e calpastatina alterada em diferentes fases da vida. Animais em crescimento apresentam maior relação μ -calpaína:calpastatina no *M. longissimus* do que animais adultos (CRUZEN et al., 2014). Tal fato, poderia justificar a maior maciez na carne de animais jovens. A importância da relação entre calpaína e calpastatina para o crescimento muscular e para maciez é nítido em ovinos callipyge. Estes animais apresentam maior desenvolvimento muscular e carnes mais duras nos músculos afetados pelo fenótipo, como o *M. biceps femoris* e o *longissimus*, que apresentam alta atividade de calpastatina. No entanto, não há diferenças para calpaína e calpastatina no músculo *M. infraspinatus* de animais callipyge e não afetados pelo fenótipo (DELGADO et al., 2001).

O tecido conjuntivo, comprimento de sarcômero e a proteólise são os fatores que afetam majoritariamente a maciez. Contudo, a relação de importância

destes fatores com a maciez é músculo dependente (KOOHMARAIE; GEESINK, 2006). Isto é, enquanto a proteólise é o principal determinante do *M. longissimus*, o comprimento de sarcômero é o principal fator para o músculo *psaos major*. Contudo, salvo algumas exceções, o sistema calpaína demonstra ser o principal determinante da maciez dos músculos (STOLOWSKI et al., 2006).

2.2 Temperamento

O temperamento animal apresenta diversas definições, sendo temperamento, personalidade e individualidade normalmente tratados como sinônimos (RÉALE et al., 2007). Também tem sido utilizado o termo “estilos de ajustes” (coping styles), mas este é comumente utilizado em estudos que tratam especificamente de mecanismos neurológicos e hormonais (RÉALE et al., 2007; KOOLHAAS et al., 1999). Contudo, os quatro termos compartilham da mesma base conceitual, pois tratam das respostas comportamentais individuais a situações de desafio, relativamente consistentes ao longo do tempo e/ou situações (RÉALE et al., 2007). Existe a recomendação para a utilização do termo temperamento, por ser menos antropomórfico (MACKAY; HASKELL, 2015). De modo geral, o temperamento em bovinos tem sido considerado como uma resposta do animal ao manejo pelos humanos (FORDYCE; GODDARD; SEIFERT, 1982).

De acordo com a resposta ao manejo os bovinos têm sido classificados em calmo/adequado, intermediário e reativos/excitável/temperamental (BURDICK et al., 2010; FRANCISCO et al., 2015; KING et al., 2006; SILVEIRA et al., 2012). Os animais com bom temperamento, ou seja, calmos, têm sido relacionados a melhor produtividade (CAFE et al., 2011b; TURNER et al., 2011), qualidade de carne e carcaça (FRANCISCO et al., 2015; KING et al., 2006) e aspectos fisiológicos (CAFE et al., 2011a; CURLEY et al., 2008; GRUBER et al., 2010) do que animais reativos.

A avaliação do temperamento tem sido realizada por indicadores comportamentais realizados durante o manejo dos animais. Os diferentes indicadores medem diferentes facetas do temperamento (PETHERICK et al., 2009). Os testes mais frequentemente utilizados nos estudos são o escore de tronco, escore de curral e velocidade de fuga (GRUBER et al., 2010; FRANCISCO et al., 2015; KING et al., 2006; SANT’ANNA; PARANHOS DA COSTA, 2013). Os dois primeiros testes são escores visuais de temperamento, e consistem na aplicação de

escores para um conjunto de reações dos bovinos durante uma determinada situação de manejo. Deste modo, o escore de tronco consiste na avaliação do grau de desconforto do animal quando contido no tronco. Neste teste, são considerados a intensidade e frequência de movimentação, o nível de respiração audível, a presença de coices e vocalizações durante os primeiros segundos do animal no tronco ou na balança (FORDYCE; GODDARD; SEIFERT, 1982).

O escore de curral, outro teste visual, consiste da avaliação da reação do animal (em grupos de 4 a 5 animais) à aproximação do avaliador dentro de um piquete. Nesta avaliação considera-se a velocidade e a distância de afastamento do animal, grau de excitação e aversão a humanos (KING et al., 2006).

Diferentemente dos escores visuais, na velocidade de fuga os animais são expostos a uma condição padronizada. A velocidade de fuga mensura o tempo dispendido para percorrer os primeiros metros (fixado em 1, 7 a 5 metros) após a saída do tronco de contenção ou da balança (BURROW; SEIFERT; CORBET, 1988).

O escore de tronco, escore de curral e a velocidade fuga avaliam alguns aspectos do temperamento do animal, como medo e ansiedade, estados emocionais indesejáveis pois resultam em estresse (PARANHOS DA COSTA et al., 2002; PETHERICK et al., 2009; SANT'ANNA; PARANHOS DA COSTA; 2013). Os animais com maiores valores para os indicadores de temperamento (escore ou velocidade), chamados reativos, apresentam de forma associada maiores níveis sanguíneos de cortisol (BURDICK et al., 2010; FRANCISCO et al., 2015; GRUBER et al., 2010; KING et al., 2006), haptoglobulina (FRANCISCO et al., 2015), lactato (CAFE et al., 2011a; GRUBER et al., 2010), creatina quinase (GRUBER et al., 2010), epinefrina (BURDICK et al., 2010; GRUBER et al., 2010), glicose (CAFE et al., 2011a), ácido graxo não-esterificado (CAFE et al., 2011a), bem como maior frequência cardíaca (GRUBER et al., 2010) e temperatura retal (BURDICK et al., 2010; GRUBER et al., 2010). Todas estas variáveis bioquímicas e as medidas fisiológicas são relacionadas ao estado de estresse.

Esta constatação de resultados confirma o envolvimento dos eixos simpato-adreno-medular e hipotálamo-pituitária-adrenal, especialmente devido aos níveis de epinefrina e cortisol, respectivamente (TERLOUW; SHOUTEN; LADEWIG, 1997). Portanto, pode ser afirmado que animais reativos são mais suscetíveis e apresentam respostas mais exacerbadas ao estresse, como havia sido verificado previamente em outros estudos (CURLEY et al., 2008; CAFE et al., 2011a).

2.3 Temperamento e maciez

O estresse pré-abate causa mudanças metabólicas que podem afetar negativamente a qualidade da carne. O manejo pré-abate é o principal ponto crítico sobre o rendimento e a qualidade da carne. Neste momento, os animais deparam-se com uma série de situações que geram medo e ansiedade, consequentemente, altos níveis de estresse podem estar presentes nestes animais (PARANHOS DA COSTA et al., 2002). Existe uma variabilidade da resposta dos animais ao ambiente, sendo alguns animais mais tolerantes e outros mais reativos (BEHRENDTS et al., 2009; KING et al., 2006; FRANCISCO et al., 2015). Estes últimos são mais propensos a terem maior incidência de contusões devido a sua ansiedade e agressividade, e também carnes mais duras (BEHRENDTS et al., 2009; VOISINET et al., 1997) e escuras (WULF et al., 1997), em parte, devido ao pH final elevado como resultado da depleção das reservas de glicogênio muscular. O pH intermediário (5,8 a 6,2) pode aumentar a atividade protetiva das pequenas proteínas de choque térmico (HSPs) e reduzir a degradação miofibrilar (BALAN; KIM; BLIJENBURG, 2014; PULFORD et al., 2008) reduzindo a maciez da carne. Entretanto, alguns trabalhos têm observado que o estresse antes do abate afeta a maciez mesmo sem alteração do pH (KING et al., 2006; WARNER et al., 2007). Deste modo, não se pode desconsiderar o processo proteolítico como importante atuante na determinação da maciez quando há diferenças no temperamento.

Um dos possíveis mecanismos do comprometimento da maciez em animais mais reativos é pelo estímulo diferenciado aos receptores agonista β -adrenérgicos (CONG et al., 1998; SENSKY et al., 1996). Estes receptores adrenérgicos são estimulados naturalmente pelas catecolaminas, substâncias secretadas pela adrenal e reguladas pelo sistema nervoso autônomo simpático (TERLOUW; SHOUTEN; LADEWIG, 1997). A intensidade de ativação deste mecanismo, ou seja, o grau de estimulação do tônus simpático, tem potencial de induzir resposta fisiológica diferenciada do animal a eventos estressantes (CAFE et al., 2011a; CURLEY et al., 2008), com a possibilidade de afetar a maciez da carne como resultado da alteração do processo proteolítico *post mortem* (GRUBER et al., 2010; KING et al., 2006; SENSKY et al., 1996).

Algumas evidências fortalecem esta hipótese. A simulação do estresse com administração de epinefrina para suínos antes do abate provocou a estimulação

agonista β -adrenérgica e aumentou consideravelmente a atividade da calpastatina (SENSKY et al., 1996). Com este resultado, os autores concluíram que o estresse pré-abate pode influenciar a maciez similarmente ao uso de agonista β -adrenérgico sintético utilizados em dietas. Na utilização de β -adrenérgicos, há redução na maciez da carne como resultado do aumento nos níveis de calpastatina (KOOHMARAIE et al., 1991; STRYDOM et al., 2009, 2011), e frequentemente sem afetar o pH final da carne.

Também foi verificado que animais com maiores níveis de lactato plasmático, portanto mais estressados, apresentaram carnes com atraso no amaciamento entre 3 e 7 dias, evidenciando o efeito do estresse sobre a proteólise *post mortem* (GRUBER et al., 2010). Neste trabalho, os autores enfatizaram a necessidade de estudos para elucidar o mecanismo de ação nesse processo e apontaram a menor taxa de amaciamento como parte deste mecanismo. Neste sentido, o pior temperamento pode criar condições que desfavorecem a proteólise *post mortem* (GRUBER et al., 2010; KING et al., 2006). Diferentes abordagens podem ser utilizadas para identificação dos animais responsivos ao estresse, nos casos acima, ambos foram eficientes e encontraram relação com a maciez da carne.

2.4 Temperatura corporal e temperamento

2.4.1 Termorregulação e estresse

A manutenção da normotermia nos animais homeotermos, como nos bovinos, é uma função essencial para evitar alterações metabólicas e enzimáticas (ROBERTSHAW, 2006). Os animais de produção necessitam que a temperatura interna fisiológica seja constante para manutenção da homeostase, e especialmente para produzir com o máximo de eficiência (TAKAHASHI; BILLER; TAKAHASHI, 2009). O sistema termorregulador em bovinos mantém a temperatura central próxima de 38,3 °C, com variações normais entre 36,7 a 39,1 °C (GREGORY; GRANDIN, 1998).

A termorregulação é controlada por um sistema de controle fisiológico que consiste em termorreceptores centrais e periféricos (ROBERTSHAW, 2006). No hipotálamo situa-se o sistema de controle central que regula a temperatura do corpo ao integrar os impulsos térmicos de quase todos os tecidos do organismo (CUNNINGHAM; KLEIN, 2007). Quando o impulso térmico integrado excede ou fica

abaixo da faixa limiar de temperatura, repostas fisiológicas termorreguladoras ajustam a temperatura corporal para níveis adequados (ROBERTSHAW, 2006).

Contudo, a temperatura corporal pode ser consideravelmente afetada por atividade muscular, fatores nervosos, hormonais (e.g., níveis dos hormônios tireoidianos) e pelas catecolaminas (CUNNINGHAM; KLEIN, 2007). Fisiologicamente, muitos desses fatores estão associados ao nível de estresse dos animais (MATTERI; CARROLL; DYER, 2000). Deste modo, importantes relações entre temperatura corporal e estresse animal podem ser mensuradas.

No estresse agudo, tanto o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal como o simpato-adreno-medular são ativados. Estas respostas liberam na corrente sanguínea epinefrina e norepinefrina, bem como glicocorticoides (MATTERI; CARROLL; DYER, 2000; TERLOUW; SHOUTEN; LADEWIG, 1997). As catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) estimulam a produção de calor pelo aumento do metabolismo de carboidratos e gorduras (TORTORA; DERRICKSON, 2011). Além disso, há aumento do fluxo sanguíneo muscular, aumento da força de contração e da frequência cardíaca que contribuem para a produção de calor (EILER, 2006). Catecolaminas também aumentam o metabolismo em todas as gorduras, mas particularmente na gordura marrom, ocorrendo distribuição de calor pela corrente sanguínea para todo o corpo (CUNNINGHAM; KLEIN, 2007).

O cortisol também contribui para elevação da temperatura corporal com estimulação da taxa metabólica, que ocorre pela redistribuição dos metabólitos energéticos e aumento da disponibilidade destes para o coração e para os músculos esqueléticos (EILER, 2006). Todos estes fatores contribuem para aumento da temperatura central. Contudo, as catecolaminas atuam sobre receptores α_1 e α_2 adrenérgicos, presentes nas arteríolas e veias de todos os órgãos, causando vasoconstrição com a função de aumentar a resistência periférica total e redirecionar o sangue para o coração e para os músculos (CUNNINGHAM; KLEIN, 2007; ERICKSON; DETWEILER, 2006). Portanto, pode haver vasoconstrição dos vasos sanguíneos cutâneos e periféricos. Isto pode gerar queda da temperatura nas extremidades corporais (e.g., membros, orelhas e barbeta) dependendo da temperatura ambiental (CUNNINGHAM; KLEIN, 2007; TERLOUW; SHOUTEN; LADEWIG, 1997; TAKAHASHI; BILLER; TAKAHASHI, 2009). A inervação simpática involuntária da circulação cutânea tem dois ramos: um simpático sistema noradrenérgico vasoconstritor, e um sistema ativo não-adrenérgico vasodilatador. Os

nervos noradrenérgicos vasoconstritor são tonicamente ativos em ambientes normotérmicos e aumentam sua atividade durante a exposição ao frio, liberando norepinefrina e cotransmissores para diminuir a fluxo sanguíneo na pele. O sistema vasodilatador apenas é ativado durante aumentos na temperatura corporal (CHARKOUDIAN, 2010).

Vacas expostas a choque elétrico, sustos e a gritarias apresentaram imediatamente após estes eventos queda na temperatura no olho medida por termografia infravermelho (TIV). A possibilidade do envolvimento do sistema simpático vasoconstritor foi confirmada com a observação do aumento da frequência cardíaca e das catecolaminas plasmáticas (STEWART et al., 2007). Estes resultados foram revistos após touros jovens sofrerem castração cirúrgica sem anestésico. Em contraste, nos animais recém castrados com dor visceral profunda (castração com anestésico local) apresentaram aumento da temperatura no olho, a qual foi associada a vasodilatação devido aos indicativos de aumento do tônus parassimpático, a dor visceral e pela redução na frequência cardíaca (STEWART et al., 2010).

A resposta de “lutar ou fugir” mediada pelo sistema nervoso simpático permite uma rápida resposta ao estressor e inclui elevação da frequência cardíaca e da pressão sanguínea, ao mesmo tempo mobiliza energia para produção de calor (DICKENS; DELEHANTY; ROMERO, 2010). O calor gerado é distribuído para o corpo pelos tecidos e pelo sangue, mas ao mesmo tempo a troca de calor com o ambiente pode ser reduzida pela possível vasoconstrição periférica. Com o tempo há elevação da temperatura corporal central e os mecanismos de perda de calor convergem para gerar vasodilatação periférica (CHARKOUDIAN, 2010). Portanto, os eventos podem se contrapor ou agir sinergicamente na alteração da temperatura corporal. As avaliações de temperatura de diferentes regiões corporais podem auxiliar no entendimento da termorregulação no estresse e podem ser potenciais marcadores para temperamento.

2.4.2 Termografia infravermelho

As relações fisiológicas existentes entre temperamento e a produção de calor, fundamentam o monitoramento da temperatura corporal para a identificação de fatores estressantes, bem como de animais responsivos ao estresse. A temperatura central do animal é normalmente estimada pela temperatura

retal. Esta temperatura é um pouco mais baixa que a temperatura central, mas fornece uma boa indicação da temperatura central (CUNNINGHAM; KLEIN, 2007). Esta medida nos animais domésticos é usualmente desempenhada por um termômetro comum. Para avaliação da temperatura superficial, em diferentes regiões corporais, faz-se necessária a utilização de uma câmera infravermelho.

A termografia infravermelho é um método de detecção de calor não-invasivo e sem-contato. A câmera da termografia infravermelho mede a radiação eletromagnética da parte infravermelho do espectro emitida por objetos (KUNC et al., 2007). Objetos mais quentes emitem comprimento de onda menor e frequência de onda maior que objetos frios (CUNNINGHAM; KLEIN, 2007). As informações obtidas pela câmera geram imagens (termogramas). Os termogramas são avaliados por um programa computacional específico que fornece os resultados em mapas de temperatura com análises detalhadas (KNÍZKOVÁ et al., 2007). A radiação emitida é uma função da temperatura de superfície do objeto e da emissividade. A radiação do objeto também sofre efeito da radiação do ambiente e da absorção pela atmosfera. Para medir com maior acurácia, a câmera automaticamente compensa os efeitos das diversas fontes de radiação. No entanto, alguns parâmetros devem ser fornecidos, como a emissividade do objeto, a temperatura refletida, a distância entre o objeto e a câmera, e a umidade relativa (KUNC et al., 2007).

A termografia infravermelho apresenta extensa aplicação, e são relatados usos em diversos ramos da indústria, mas também em humanos, na medicina veterinária e em pesquisas (CORTIZO; BARBOSA; SOUZA, 2008; VINKERS et al., 2013). Na produção animal, a TIV tem sido pouco empregada em estudos com organismos vivos (KNÍZKOVÁ et al., 2007). Contudo, a termografia infravermelho apresenta potencial de aplicação para monitoramento de aspectos fisiológicos que são relacionados com a temperatura corporal, como eficiência alimentar (MONTANHOLI et al., 2008; MARTELLO et al., 2015). Estudos explorando a relação da temperatura corporal, temperamento e aspectos produtivos não foram encontrados na literatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram revisados e aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (número de protocolo: 2014-35) e pela Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa (número de protocolo: 2014.5.2097.11.0) da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, SP, Brasil.

3.1 Instalações, Animais e Período Experimental

O estudo foi conduzido nas instalações da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP) em Pirassununga, SP, Brasil. Foram utilizados 96 bovinos Nelore castrados, com peso médio inicial de $352 \pm 37,2$ kg e idade média de 20 meses. Os animais foram alojados em dois confinamentos experimentais, sendo que um grupo de 48 animais foi distribuído em quatro baias (10 x 23 m) equipadas com Calan Broadbent feeding gates (American Calan, Inc., Northwood, NH, USA). Os 48 animais restantes foram alojados em baias individuais (5 x 8 m). As baias individuais e coletivas continham bebedouros automáticos e cochos cobertos. Os animais foram submetidos a um período de adaptação às dietas por 28 dias. O período experimental no confinamento foi de 70 dias.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente a quatro tratamentos (controle e dietas contendo diferentes fontes de óleo vegetal: girassol, soja e linhaça). A dieta controle apresentava maior nível de milho moído em substituição à energia proveniente do óleo. Os animais foram alimentados com dietas contendo 82% de concentrado e 18% de volumoso. A dieta controle apresentou 73% de NDT e 14% de PB, enquanto que os tratamentos apresentaram a mesma concentração energética (77% de NDT) e proteica (14% de PB), todas as dietas fornecidas *ad libitum*. Os animais foram abatidos com 23 meses e peso médio de $507 \pm 46,0$ kg de peso corporal.

3.2 Manejo, Termografia e Temperatura Retal

Durante o confinamento os animais foram conduzidos ao tronco de contenção para avaliações por ultrassom das características de carcaça e

monitoramento da espessura de gordura para definição do ponto de abate. Nasquelas oportunidades também foram realizadas coletas de sangue e testes de temperamento em dois manejos, que ocorreram entre 3 a 4 semanas antes do abate (manejo 1) e dois dias pré-abate (manejo 2). Os confinamentos (baia individual e coletiva) foram avaliados em dias diferentes com uma semana de intervalo. Os manejos iniciaram as 7:30 e seguiram até 12:00 horas. A temperatura e a umidade relativa dos manejos foram registradas (Tabela 1).

Tabela 1 – Temperatura e umidade relativa no momento inicial e final do manejo, e temperatura mínima e máxima do dia anterior ao manejo

	Manejo 1		Manejo 2	
	BI	BC	BI	BC
Temp. mín. dia anterior, °C	10,2	11,9	17,4	16,1
Temp. máx. dia anterior, °C	26,3	27,8	23,1	23,9
Temp. início manejo, °C	15,7	13,4	11,9	13,0
Temp. final manejo, °C	24,2	25,8	18,4	21,3
UR início manejo, %	77	90	92	91
UR final manejo, %	52	46	70	61

BI: baia individual; BC: baia coletiva; UR: umidade relativa

A termografia infravermelho foi realizada utilizando uma câmera de infravermelho (TI 20-9 Hz, Fluke; Fluke Corporation, Everett, WA, EUA). O valor de emissividade utilizado foi de 0,98, recomendado pelo fabricante da câmera para tecidos biológicos. Os animais foram trazidos de suas baias e foram alojados na sombra imediatamente antes da TIV, a avaliação ocorreu no tronco de contenção. As imagens da TIV foram tomadas nas seguintes localizações corporais: testa, face, flanco, costelas e olho. A distância da câmera para obtenção das imagens foi de aproximadamente 1 m de cada localização corporal. As imagens foram interpretadas utilizando o software Fluke InsideIR™ 4.0 (Fluke Corporation, EUA). A análise foi realizada com uma seleção específica (forma geométrica) para definir a sub-área de cada imagem, procedimento executado conforme especificado por Martello et al. (2015). A temperatura retal foi obtida manualmente com termômetro digital (VMDT01; Viomed®) simultaneamente com a TIV.

3.3 Avaliações do Temperamento Animal

As avaliações do temperamento ocorreram em dois momentos distintos (manejo 1 e 2) descritos acima. Foram utilizados dois métodos para avaliar o temperamento: escore de tronco e velocidade de fuga.

Escore de tronco (ET). Determinado logo na entrada do animal no tronco de contenção sem fazer a restrição física na cabeça e utilizando uma escala de quatro pontos, no qual: 1 = sem movimento, permanência com a cabeça, orelhas e rabo relaxados; 2 = algum movimento, com cabeça erguida e orelhas eretas; 3 = movimentos frequentes, mas não vigorosos, pode haver vocalização; 4 = movimentação constante, vocalização, oferece grande resistência com contínuos golpes (adaptado de Hearnshaw e Morris, 1984)

Velocidade de fuga (VF). Pares de células fotoelétricas foram instaladas a 5,5 m de distância e foram instaladas estrategicamente na saída do tronco de contenção para medir a velocidade com que o animal deixa o tronco de contenção, denominada velocidade de fuga e analisada em metros por segundo (m/s), adaptado de Burrow, Seifert e Corbet (1988).

3.4 Abate

Os abates dos animais da baia individual e coletiva ocorreram com intervalo de uma semana. Os animais foram transportados para abatedouro comercial a 190 km de distância do confinamento. O transporte ocorreu no dia anterior ao abate. No embarque e desembarque, cuidados foram tomados para minimizar o estresse dos animais como ausência de uso de choque e ao evitar mistura de animais de lotes diferentes e excesso de barulhos. O jejum alimentar para o abate foi aproximadamente 16 horas. A ordem de entrada para o abate foi aleatória, sendo os animais insensibilizados por concussão cerebral pelo uso de dardo cativo. A exsanguinação foi realizada por secção da artéria carótida e da veia jugular.

3.5 Coleta de amostras

Dentro dos primeiros 15 minutos após insensibilização e abate dos animais, amostras do *M. longissimus lumborum* (LL) foram coletadas, e

imediatamente congelas em nitrogênio líquido para posterior análise de expressão gênica. Após 48 horas do abate foram obtidas amostras dos músculos LL e *M. triceps brachii* (TB), as quais foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em temperaturas inferiores a -80 °C para análises de atividade total de calpastatina e comprimento de sarcômero (este apenas no LL). Neste momento, também foram coletadas três amostras de 2,5 cm de espessura do LL, embaladas à vácuo e estocadas em condição refrigerada (4 °C) para posterior determinação da FC, nos seguintes períodos de maturação: 2, 16 e 30 dias *post mortem*.

3.6 Análises da Carne

pH. O pH final foi medido nas amostras de LL as 48-h *post mortem* por meio de potenciômetro portátil HI99163 (Hanna instruments brasil Inc, São Paulo, Brazil).

Força de cisalhamento (FC). O procedimento foi executado de acordo com as recomendações da American Meat Science Association - AMSA (1995). As amostras com 2,5 cm de espessura foram cozidas em forno elétrico até atingir a temperatura interna de 40 °C, quando foram virados no forno e cozidas até alcançar a temperatura interna de 71 °C (monitoradas por termômetro). As amostras foram resfriadas em temperatura ambiente, e então armazenadas a ± 2 °C. Seis a oito cilindros com 1,25 cm de diâmetro (sub-amostras) foram removidas de cada amostra no sentido das fibras musculares. Então, as sub-amostras foram cisalhadas utilizando o equipamento Warner-Bratzler (G-R Manufacturing Co., Manhattan, KS, USA) para medir a força necessária para cortar as sub-amostras. Os resultados foram expressos em kg.

Comprimento de sarcômero. O comprimento de sarcômero foi determinado a partir de 5 sub-amostras do LL (armazenados em -80 °C) representando as porções lateral, medial, central, ventral e dorsal do LL. Cinco miofibrilas (com 10 a 20 sarcômeros) de cada sub-amostras tiveram o comprimento de sarcômero analisado, e então o valor médio das cinco sub-amostras foram reportadas como comprimento de sarcômero para o LL.

Aproximadamente 0,5 g de tecido muscular foram removidas de cada sub-amostra designada para determinação do comprimento de sarcômero. As amostras foram homogeneizadas a 5% glutaraldeído em tampão 0,1 M NaHPO₄ a

pH 7,2. Após quatro horas de incubação, o tampão foi substituído por solução de fixação (0,2 M sucrose em tampão 0,1 M NaHPO₄ a pH 7,2), seguindo método descrito por Cross, West e Dutson (1981). Gotas do homogenato foram depositados sobre lâminas de vidro e coberta com uma lamínula. As determinações foram realizadas com auxílio de microscópio de luz Nikon Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão), em ampliação de 100x. Os comprimentos foram medidos com o programa de computador Nikon Elements F.

Calpastatina Total. Calpastatina foi extraída de 25 g de amostra de dois diferentes músculos (LL e TB) que foram obtidos as 48 horas *post mortem* e armazenados em -80 °C. A extração e atividade da calpastatina foram determinadas conforme a metodologia descrita por Delgado et al. (2001), com adaptações. Os músculos foram homogeneizados a 4°C em 6 volumes (volume/peso) de 100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 10 mM EDTA; 10 mM 2-mercaptoetanol (MCE) e um coquetel de inibidores de proteases (6 mg leupeptina/L, 100 mg inibidor de tripsina/L, e 2 mM de PMSF). O homogenato foi centrifugado a 30.100 x g por 140 min a 4 °C.

O sobrenadante foi filtrado através de quatro camadas de Miracloth (Calbiochem) e carregadas sobre uma coluna 1,6 x 20 cm de DEAE-Sephacel (Bio Rad). Depois de carregadas, a coluna foi lavada (250 ml) com tampão de equilíbrio (50 mM Tris-HCl, pH 7,5 a 4°C; 0,5 mM EDTA e 10 mM MCE) para remover proteínas não adsorvidas. As proteínas ligadas foram eluídas com um formador de gradiente de 0 a 400 mM KCl. As atividades inibitórias foram determinadas utilizando caseína como substrato para calpaína. Uma unidade de atividade de calpastatina foi definida como a quantidade necessária para inibir uma unidade de m-calpaína de pulmão bovino.

3.7 Análise de Expressão Gênica

RNA total foram extraídas de amostras colhidas imediatamente após o abate do LL utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA) conforme o protocolo do fabricante, uma adaptação da metodologia de Chomczynski e Sacchi (1987). Os tecidos foram homogeneizados em 1 mL de trizol utilizando Ultra Turrax T10 (IKA, Staufen, Alemanha). Após cinco minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 200 µL de clorofórmio. Novamente fez-se a incubação por cinco minutos em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado a 12.000

x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo. Neste, foram adicionados 500 µL de isopropanol, permanecendo em temperatura ambiente por dez minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por dez minutos a 4°C e o pellet lavado com 1 mL de etanol 75%, sendo procedida nova centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos a 4 °C. O pellet foi desidratado a temperatura ambiente e ressuspendido em 20 µL de água-DEPC (0,01%). Posteriormente, este material teve a concentração e qualidade do RNA total determinado em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA).

A quantificação das amostras foi realizada utilizando comprimento de onda de 260 nm e sua qualidade estimada na razão 260/280 nm, sendo considerados adequados valores entre 1,8 a 2,0. Após a quantificação no NanoDrop 2000, as amostras foram diluídas para a concentração de 0,25 µg/µL e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para a verificação da integridade do RNA total e confirmação da concentração.

A síntese de cDNA foi realizada seguindo o protocolo do Kit ImProm-II Reverse Transcription System (Promega). Os cDNAs foram sintetizados a partir de 1 µg de RNA total das amostras de tecido. Foram utilizados 1 µL de primer oligo dT (0,5 g/µL); 3,5 µL de água livre de RNase/DNase. Posteriormente foram incubadas à 70 °C por 5 minutos, resfriando-a em gelo por 5 minutos. Depois de retiradas do gelo as amostras receberam 4 µL de ImProm-II 5X reaction buffer, 1,2 µL de MgCl₂ (25mM), 1,0 µL de dNTP mix (10 mM cada dNTP), 0,5 µL de RNasin, 1,0 µL da enzima RT, completando o volume com água livre de RNase/DNase (volume final de 20 µL). A transcrição reversa foi realizada a 25 °C por 5 minutos, 42 °C durante 1 hora, e à inativação da enzima deu-se a 70 °C durante 15 minutos.

Para as reações de RT-PCR quantitativo foram utilizados: 2,6 µL de água, 0,7 µL de primer direto e reverso (concentração inicial de 5 µM e concentração final de 0,4 µM) referentes aos genes alvos e referências (Tabela 2) e 5 µL do Kit Syber Green. As reações foram preparadas adicionando-se 9 µL do mix em cada poço da placa, seguidos de 1 µL de cDNA em cada reação. A placas foram centrifugadas à 800 x g por 30 segundos, e imediatamente conduzida ao LightCycler® 480 II (Roche). As condições de amplificação foram: 95 °C por 5 minutos para desnaturação do DNA no primeiro ciclo da PCR. Para os demais ciclos 95 °C por 10 segundos, 60 °C por 10 segundos para anelamento e 72 °C por 20

segundos para extensão. Os resultados da expressão gênica foram gerados e registrados como valores de Ct (Cycle Threshold).

A eficiência individual de cada amostra foi determinada utilizando-se o programa *LinRegPCR*. As curvas de regressão foram ajustadas individualmente para cada amostra, obtendo-se assim coeficiente de determinação e eficiência máxima para cada amostra. A eficiência individual foi ajustada para 2.0 utilizando (equação 1)

$$Ct_{ij} = \log_2 (E_gene_{ij}^{1/ct_gene(ij)}) \quad (1)$$

Em que:

Ct_{ij} é Ct da amostra ij corrigido para eficiência 2.0

$E_gene_{ij}^{1/ct_gene(ij)}$ é a eficiência real calculada pelo *LinRegPCR* elevado o Ct da amostra para o gene ij.

Tabela 2 - *Primers* utilizados para quantificação das expressões gênicas

Gene (GenBank ID)	Sequências (5'-3')
CAPN1 (281661)	F: CGCCTCCCTTACCCTCAA R: CATCCACCCACTCACCAAAC
CAST (281039)	F: ATGAGGAAACAGTCCCATCG R: GGGCTTGGGTTTTCTTCAG
CAST1 (001030318.2)	F: CACCCAGGAGCATGTCAGTA R: ACTGCTCCCAAGGCTTGTT
CAST2 (174003.2)	F: TGCAAGCTGGTGGTACAAGA R: GAGAGCTGACTGCTCCCAAG
EEF1A2 (515233)	F: GCAGCCATTGTGGAGATG R: ACTTGCCCGCCTTCTGTG
GAPDH (281181)	F: GCGTGAACCACGAGAAGTATAA R: CCCTCCACGATGCCAAAGT
RPL-19 (510615)	F: GAAATCGCCAATGCCAAC R: GAGCCTTGTCTGCCTTCA

CAPN1: Calpaína isoforma 1; CAST: calpastatina; CAST1: calpastatina isoforma 1; CAST2: calpastatina isoforma 2; EEF1A2: *Eukaryotic translation elongation factor-1-alpha-2*; GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; RPL-19: Proteína ribossomal L-19

A normalização dos dados foi realizada com o procedimento NormFinder com auxílio do software Genex (BioMMC, Freising, Alemanha). Seguindo a indicação do procedimento, utilizou-se exclusivamente o RPL19 em detrimento do GAPDH e EEF1A2 para normalização dos dados. Os resultados foram apresentados como alterações relativas em número de vezes em relação ao grupo baixa FC, e na outra abordagem em relação ao grupo baixa FC associada ao grupo

baixo índice de temperamento, utilizando o método descrito por Livak e Schmittgen (2001).

3.8 Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando o pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Análises preliminares dos dados não demonstraram efeitos das fontes de óleos sobre as variáveis alvos no estudo. Portanto, este fator não foi considerado na análise estatística.

As estatísticas descritivas de todas variáveis foram analisadas com o procedimento PROC MEANS. Os dados foram testados para normalidade dos resíduos utilizando o procedimento PROC UNIVARIATE com a normalidade da distribuição determinada por Shapiro-Wilk. A homogeneidade de variância foi avaliada pelo teste de Levene (PROC GLM).

Os dados de FC aos 16 dias *post mortem* (FC16) foi utilizada para segregar os animais em grupos. Os menores e maiores valores de FC obtidos deram origem aos grupos de baixa (BFC) e alta força de cisalhamento (AFC), respectivamente. Foram selecionados 12 animais igualmente divididos entre BFC e AFC, e tipo de confinamento (individual ou coletivo).

Os dados de qualidade de carne, temperamento e temperatura foram comparados entre os grupos de força de cisalhamento com o delineamento inteiramente casualizado utilizando o procedimento PROC MIXED. O modelo utilizado foi: $Y_i = \mu + \alpha_i + e$ onde, Y_i representa a observação realizada no n -ésimo animal, pertencente a i -ésima grupo de força de cisalhamento; μ é a média geral da característica; α_i é o efeito fixo do grupo de força de cisalhamento; e é o efeito residual, associado à observação realizada no n -ésimo animal. Quando pertinente foi utilizado o teste Tukey na comparação de médias (LSMEANS). O escore de tronco (variável categórica) foi comparado entre os grupos com estatística não-paramétrica utilizando-se o teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (PROC NPAR1WAY).

Para análise da expressão gênica de calpaína e calpastatina foram formados os grupos AFC ($n = 6$) e BFC ($n = 6$), seguindo os mesmos procedimentos da abordagem anterior, porém algumas amostras foram substituídas. Também foi explorada a relação entre a categoria de FC e de temperamento (com base no índice de temperamento-IT, mais detalhes a diante) para expressão gênica de calpaína e

calpastatina. Nesta abordagem, os grupos foram formados com base nas médias e no valor de um desvio padrão populacional das variáveis. Deste modo formou-se os seguintes grupos: BIT-BFC ($n = 4$), BIT-AFC ($n = 4$), AIT-BFC ($n = 4$) e AIT-AFC ($n = 4$), onde BIT é baixo índice de temperamento ($< -1,4$); AIT é alto índice de temperamento ($> 1,5$); BFC é baixa força de cisalhamento ($< 4,4$ kg); AFC é alta força de cisalhamento ($> 7,6$ kg). A análise estatística foi igual a previamente comentada, mas não foi considerado o tipo de confinamento.

A análise de componentes principais foi realizada utilizando dados dos 96 animais de velocidade de fuga e escore de troco dos manejos 1 e 2. O principal componente representou a maior proporção de variação dos dados, e com base nos resultados, foi definido como índice de temperamento (IT). O terceiro componente principal foi definido como índice de habituação (IH). Para análises de componentes principais foi utilizado PROC PRINCOMP. Também foi calculado o índice de temperamento médio (ITM) para cada manejo. Este foi determinado pela média dos resultados de velocidade de fuga e escore de tronco (média aritmética) semelhante a abordagem dada por King et al. (2006).

Correlação de Pearson (PROC CORR) foi estimada com os dados dos 96 animais para avaliar a correlação dos resíduos entre variáveis de temperamento com atributos da carne, e para analisar a correlação entre índice de temperamento-habitução ou força de cisalhamento com os dados de termografia por infravermelho. Os efeitos fornecidos no modelo foram dieta e ordem de avaliação (co-variável).

4 RESULTADOS

4.1 Estatística descritiva dos grupos de força de cisalhamento

A força de cisalhamento (FC) aos 16 dias *post mortem* entre os grupos de FC apresentaram valores bem distintos para a média (Tabela 3). O valor máximo do grupo de baixa força de cisalhamento (BFC) foi bem abaixo do valor mínimo do grupo de alta força de cisalhamento (AFC). O comprimento de sarcômero e pH tiveram médias e variações semelhantes entre os grupos de FC. A calpastatina total medida no LL e TB apresentam variações consideráveis em ambos os grupos de FC. A variação da calpastatina no LL foi relativamente maior que no TB. O temperamento medido pelo IT também apresentou variação expressiva nos grupos de FC.

Tabela 3 – Estatística descritiva dos grupos de baixa (B) e alta (A) força de cisalhamento do *M. longissimus lumborum* (LL) aos 16 dias *post mortem*

Variável	Grupo FC	n	Média	Mínimo	Máximo	DP
FC ^a , kg	B	6	4,02	3,50	4,80	0,51
	A	6	9,57	8,50	11,80	1,17
Sarcômero, μm	B	6	1,82	1,65	1,91	0,09
	A	6	1,77	1,66	1,95	0,09
pH final ^b	B	6	5,48	5,43	5,55	0,04
	A	6	5,53	5,43	5,59	0,05
Calpastatina LL ^c	B	6	3,80	2,53	4,57	0,84
	A	6	4,65	3,65	6,80	1,07
Calpastatina TB ^c	B	6	4,63	4,05	5,14	0,43
	A	6	6,08	4,53	7,07	0,92
IT ^d	B	6	-0,43	-1,77	1,96	1,20
	A	6	1,10	0,15	2,55	0,87

^aForça de cisalhamento do LL aos 16 dias *post mortem*

^bpH avaliado 48 horas *post mortem* no LL

^cCalpastatina total como unidade de atividade inibitória de m-calpaína por grama de tecido, avaliados no LL e *M. triceps brachii* (TB) 48 horas *post mortem*

^dÍndice de temperamento, $IT = (VF1 \times 0,59) + (VF2 \times 0,56) + (ET1 \times 0,39) + (ET2 \times 0,43)$, onde VF e ET correspondem a velocidade de fuga e escore de tronco, e 1 e 2 correspondem aos manejos 3-4 semanas antes do abate e pré-abate, respectivamente

4.2 Força de Cisalhamento e Amaciamento

Os grupos segregados aos 16 dias *post mortem* em baixa e alta força de cisalhamento no LL preservaram as diferenças em FC nos demais tempos de maturação analisados (Figura 1). A maior diferença de FC entre os grupos foi observada no dia 16 (diferença de 5,55 kg, $P < 0,01$), no dia 2 e 30 de maturação a diferença foi de 4,85 ($P < 0,01$) e 1,9 kg ($P = 0,03$), respectivamente.

Figura 1 – Médias e desvio padrão para força de cisalhamento em diferentes tempos de maturação para os grupos de baixa e alta força de cisalhamento no músculo *M. longissimus lumborum*. Letras diferentes para cada tempo *post mortem* entre grupos de baixa e alta FC diferem estatisticamente ($P < 0,05$)

No grupo AFC, houve redução similar da FC durante toda a maturação analisada. A redução na primeira (diferença do dia 2 e 16 *post mortem*) e na segunda quinzena (diferenças entre o dia 16 e 30 *post mortem*) de maturação foi semelhante para este grupo, 4,05±1,11 e 3,05±1,11 kg ($P > 0,05$), respectivamente. Por outro lado, no grupo BFC houve redução do FC até 16 dias de maturação. Esta

queda foi da ordem de 4,70 kg. Este valor foi semelhante à redução do grupo AFC no mesmo período ($P > 0,05$). A redução na FC considerando todo o período analisado foi diferente 4,13 e 7,08 kg ($P = 0,05$) para os grupos BFC e AFC, respectivamente. Os grupos de BFC e AFC apresentaram médias próximas dos observados no quartil inferior ($n = 24$) e superior ($n = 24$) da população estudada ($n = 96$), respectivamente.

4.3 Comprimento de Sarcômero, pH e Calpastatina

Variáveis consideradas importantes para definição da FC como o comprimento de sarcômero, pH e calpastatina total não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos no LL às 48 horas *post mortem* (Tabela 4). Por outro lado, o grupo AFC apresentou maior ($P < 0,01$) atividade de calpastatina total medida no TB.

Tabela 4 – Médias para comprimento de sarcômero, pH final e calpastatina total avaliados nos músculos *M. longissimus lumborum* (LL) e *triceps brachii* (TB) dos grupos de baixa e alta força de cisalhamento do *M. longissimus lumborum* aos 16 dias *post mortem*

Variáveis	Grupo de força de cisalhamento		Erro padrão	Valor P
	Baixa ($n = 6$)	Alta ($n = 6$)		
Sarcômero, μm	1,82	1,77	0,04	0,35
pH final ^a	5,48	5,53	0,02	0,11
Calpastatina ^b LL	3,80	4,65	0,43	0,20
Calpastatina ^b TB	4,63	6,08	0,32	<0,01

^apH avaliado 48 horas *post mortem*

^bCalpastatina total como unidade de atividade por grama de tecido

4.4 Expressão gênica de calpaína e calpastatina

Os grupos de FC formados para expressão gênica (com substituição de algumas amostras das análises anteriores, desconsiderando o tipo de baixa) apresentaram FC 16 dias *post mortem* (FC16) de 3,68 e 9,65 ($P < 0,01$) para os grupos BFC ($n = 6$) e AFC ($n = 6$), respectivamente. Não houve diferenças significativa ($P > 0,05$) para CAPN1 entre os grupos de FC (Figura 2), bem como

para CAST1 e CAST2. O grupo AFC teve maior expressão ($P = 0,05$) de CAST que o grupo de BFC.

Figura 2 – Expressão gênica relativa em qPCR do *M. longissimus lumborum* para os grupos de baixa ($n = 6$) e alta força ($n = 6$) de cisalhamento (FC)

Os grupos formados com base no valor de FC16 e no IT não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) na expressão gênica para CAPN1 e para as isoformas de calpastatinas (Figura 3). A média dos grupos para IT e FC16 foram: - 1,60 e 3,98 kg (BIT-BFC); -1,15 e 8,03 kg (BIT-AFC); 2,04 e 4,28 kg (AIT-BFC); 2,31 e 9,08 kg (AIT-AFC), respectivamente. Apenas o grupo BIT-AFC não atingiu uma condição pretendida no estudo, o valor de IT não foi inferior a -1,4 como determinado no desenho experimental. Isto ocorreu pela dificuldade em associar amostras com baixo índice de temperamento e alta FC. As amostras que interferiram na média deste grupo apresentaram valores de -0,75 e -0,66 para IT.

Figura 3 – Expressão gênica relativa em qPCR do *M. longissimus lumborum* para os grupos de baixo e alto índice de temperamento (IT) com baixa ou alta força de cisalhamento (FC)

4.5 Velocidade de Fuga, Escore de Tronco, ITM e Temperatura Retal

Os grupos de FC foram comparados para variáveis do temperamento animal em dois manejos distintos (Tabela 5). Na primeira avaliação de temperamento (Manejo 1), os animais do grupo AFC apresentaram maior VF ($P = 0,07$), embora diferenças para escore de tronco (ET) e para o índice de temperamento médio (ITM) não tenham ocorrido ($P > 0,05$). Todavia, no momento da segunda avaliação de temperamento (Manejo 2), os animais do grupo AFC apresentaram maior VF, ET e ITM ($P < 0,06$). Em nenhum dos manejos foi observado diferenças entre os grupos de BFC e AFC para temperatura retal.

Tabela 5 – Médias para velocidade de fuga (VF) e índice de temperamento médio (ITM), mediana do escore de tronco (ET) e temperatura retal (TR) avaliados em dois manejos diferentes para os grupos de baixa e alta força de cisalhamento (FC)

Variáveis	Manejo 1 ^a				Manejo 2 ^b			
	Grupo de FC		Erro padrão	Valor P	Grupo de FC		Erro padrão	Valor P
	Baixa	Alta			Baixa	Alta		
VF, m/s	1,61	2,51	0,31	0,07	1,70	2,60	0,25	0,03
ET ^c	2,00	2,00	-	0,29	1,00	3,50	-	0,06
ITM	1,88	2,31	0,33	0,38	1,66	2,71	0,25	0,01
TR, °C	39,1	38,5	0,36	0,27	39,1	38,9	0,19	0,55

^a3-4 semanas antes do abate

^bPré-abate

^cVariável não-paramétrica com análise estatística pelo teste Wilcoxon-Mann-Whitney.

4.6 Análise de Componentes Principais

Índice de Temperamento (PC1). A análise multivariada de componentes principais foi realizada neste estudo utilizando VF e ET dos dois manejos e com dados de todos os animais da população estudada ($n = 96$). A análise originou quatro componentes principais (Tabela 6). O primeiro componente principal (PC1) explicou 52% da variação dos dados. Neste componente principal, os coeficientes foram 0,59, 0,56, 0,43 e 0,39 para VF do manejo 1 (VF1), VF do manejo 2 (VF2), ET do manejo 2 (ET2) e ET do manejo 1 (ET1), respectivamente. Pela associação positiva dos componentes, o PC1 foi nomeado de índice de temperamento (IT). Esta nova variável variou de -2,93 (melhor temperamento) a 3,14 (pior temperamento), a média foi $0,05 \pm 1,48$ ($n = 80$).

Tabela 6 – Autovalores, porcentagem acumulada da variação explicada por cada componente principal e autovetores

Componentes	Autovalores	Autovalores % acumulada	Autovetores			
			VF1	VF2	ET1	ET2
CP1	2,09	52	0,59	0,56	0,39	0,43
CP2	0,90	75	-0,32	-0,48	0,68	0,46
CP3	0,70	93	0,06	0,10	0,62	-0,77
CP4	0,30	100	-0,73	0,67	0,07	0,08

VF1 = velocidade de fuga realizada 3-4 semanas antes do abate

VF2 = velocidade de fuga realizada pré-abate

ET1 = escore de temperamento realizada 3-4 semanas antes do abate

ET2 = escore de temperamento realizada pré-abate

PC2. O segundo componente principal (PC2) explicou 22% da variação dos dados, e retratou a diferença entre ET e VF (considerando o manejo 1 e 2).

Houve distribuição dos indivíduos nos quatro quadrantes do gráfico com o PC1 e PC2 (Figura 4). Os indivíduos do grupo AFC se concentraram mais nos quadrantes I e II, e do grupo BFC nos quadrantes III e IV.

Figura 4 – Representação da população estudada e dos grupos de força de cisalhamento para os dois primeiros componentes principais, CP1 e CP2 (baixa força de cisalhamento = •; não-categorizados = •; alta força de cisalhamento = •)

Índice de Habituação (PC3). O terceiro componente principal (PC3) explicou 18% da variação dos dados. Os coeficientes com valores importantes no PC3 foram referentes ao ET1 e ET2, os quais foram 0,62 e -0,77, respectivamente. Os coeficientes para VF apresentaram valores desprezíveis (0,06 e 0,10), portanto, não foram consideradas no cálculo do índice. Por esta associação de diferença entre os manejos para ET, este componente foi definido como índice de habituação (IH). Esta variável variou de -2,17 (pior habituação) a 1,99 (melhor habituação), a média foi $0,05 \pm 0,85$ ($n = 96$).

Gráficos dos Índices. A associação do índice de temperamento (PC1) e o índice de habituação (PC3) foram analisados graficamente quanto a distribuição dos indivíduos (Figura 5). Nesta distribuição houve maior separação dos indivíduos no eixo vertical em comparação com a PC2 da Figura 4. Observa-se que dois animais do grupo AFC estão entre os indivíduos com menores valores para o PC3, no entanto, aparecem também indivíduos deste grupo com altos valores para este

índice, todos nos quadrantes com maior índice de temperamento. A soma das variâncias do índice de habituação com a do índice de temperamento correspondeu a 70% da variação dos dados.

Figure 5 – Representação da população estudada e dos grupos de força de cisalhamento para o primeiro e terceiro componentes principais, CP1 e CP3 (baixa força de cisalhamento = •; não-categorizados = •; alta força de cisalhamento = •)

IT, PC2, IH e PC4. Os grupos de FC apresentaram diferença ($P < 0,05$) para IT (Tabela 7). Em contraste, o IH não diferiu entre os grupos de FC ($P > 0,05$). Os principais componentes não definidos como índices, PC2 e PC4, não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os grupos.

Tabela 7 – Médias do índice de temperamento (IT), componentes principais 2 (PC2) e 4 (PC4), índice de habituação (IH) para os grupos de baixa e alta força de cisalhamento (FC)

Variáveis	Grupo de FC		Erro padrão	Valor P
	Baixo (n = 6)	Alto (n = 6)		
IT	-0,43	1,10	0,47	0,04
PC2	0,37	0,12	0,47	0,72
IH	0,28	-0,55	0,45	0,22
PC4	0,04	0,14	0,24	0,76

4.7 Correlações entre Variáveis de Temperamento e da Carne

As variáveis de temperamento obtidas durante o experimento e as desenvolvidas por meio da análise multivariada dos componentes principais tiveram correlações baixas com as variáveis das características da carne (Tabela 8). Contudo, as variáveis desenvolvidas neste trabalho (IT e IH) apresentaram correlações mais elevadas que a VF e o ITM1. A VF1 e VF2 apresentaram comportamento semelhante nas correlações com as variáveis da carne. A única correlação significativa foi da VF1 com a FC de 2 dias *post mortem* (FC2), onde maiores VF foram relacionadas com maiores FC.

O ITM calculado com os dados do segundo manejo (ITM2) apresentou correlação significativa com cinco das oito variáveis analisadas na carne, enquanto que o ITM do manejo 1 (ITM1) não apresentou correlação com estas variáveis. A maior correlação da ITM2 foi verificada com a variável que representa a extensão do amaciamento em todo o período analisado (EA_{2-30d}, diferença de FC entre os dias 2 e 30 *post mortem*). Foi observada correlação positiva e significativa do ITM2 com a FC2 e FC16, e com a extensão de amaciamento na segunda quinzena analisada (EA_{16-30d}, diferença de FC entre os dias 16 e 30 *post mortem*). Este índice foi o único a apresentar correlação significativa com o comprimento de sarcômero, onde maiores ITM2 foram correlacionadas a menores sarcômeros.

O IT apresentou menor número de correlações significativas que o IH. As correlações do IT foram observadas para FC2 e para EA_{2-30d}. O IH apresentou correlação negativa significativa para FC2, FC16, EA_{16-30d} e EA_{2-30d}, e positiva significativa para pH.

Tabela 8 – Correlação residual de Pearson para variáveis de força de cisalhamento, pH e comprimento de sarcômero do músculo *M. longissimus lumborum* com variáveis de temperamento de toda a população ($n = 96$)

Variáveis	Variáveis de temperamento					
	VF 1	VF 2	ITM 1	ITM 2	IT	IH
FC, 2 d	0,20*	0,09	0,18	0,27**	0,24**	-0,25**
FC, 16 d	0,14	0,02	0,08	0,17*	0,13	-0,21**
FC, 30 d	0,06	-0,08	0,06	-0,05	-0,02	0,02
EA, 2-16 d	0,08	0,08	0,11	0,13	0,13	-0,07
EA, 16-30 d	0,10	0,10	0,04	0,24**	0,17	-0,24**
EA, 2-30 d	0,14	0,14	0,12	0,29***	0,23**	-0,23**
pH	-0,13	-0,12	0,03	-0,16	-0,12	0,28**
Sarcômero	0,05	-0,16	-0,10	-0,20*	-0,13	0,07

EA: Extensão de amaciamento, diferenças de FC entre os dias indicados; FC: Força de cisalhamento; VF: velocidade de fuga; ITM: índice de temperamento médio; IT: índice de temperamento; CP3: componente principal 3; 1: manejo 1; 2: manejo 2. * $P < 0,10$; ** $P < 0,05$; *** $P < 0,01$

4.8 Correlações entre temperamento ou FC com Temperatura animal

O IT apresentou correlação significativa com a TIV na testa (negativa), no olho (positiva), na face (positiva) e no flanco (negativa), contudo, apenas a TIV na no olho apresentou correlação significativa nos dois manejos (Tabela 9). A maior correlação verificada entre IT e TIV foi na região da testa realizada no manejo 3-4 semanas antes do abate. A temperatura retal apresentou correlações positivas significativas com o IT em ambos os manejos.

Tabela 9 – Correlação residual de Pearson para variáveis de força de cisalhamento aos 16 dias *post mortem* (FC) do músculo *M. longissimus lumborum* e índice de temperamento (IT) com termografia infravermelho de diferentes regiões corporais e com temperatura retal de toda a população ($n = 96$)

Manejo ^c		Termografia Infravermelho ^a					Temp. Retal ^b
		Testa	Olho	Face	Costela	Flanco	
1	IT	-0,29***	0,20*	0,01	-0,16	-0,24**	0,39***
2		-0,16	0,20*	0,19*	0,05	-0,15	0,33***
1	FC	-0,05	0,15	0,13	0,02	-0,07	-0,29***
2		-0,29***	0,01	-0,19*	-0,28***	-0,40***	-0,32***

^aAvaliação da temperatura superficial com auxílio de câmera infravermelho

^bAvaliação da temperatura retal com auxílio de termômetro comum

^cManejo: 1 = 3-4 semanas antes do abate; 2: pré-abate

* $P < 0,10$; ** $P < 0,05$; *** $P < 0,01$

Todas as correlações entre TIV e FC foram negativas. As correlações significativas foram observadas apenas nas medições pré-abate. A TIV no olho foi a única dentre as regiões corporais estudadas que não apresentou correlação significativa com FC. No flanco foi observada a maior correlação significativa entre TIV e FC. Esta correlação foi maior que a observada entre a temperatura retal e a FC, também negativas, contudo, significativas nos dois manejos.

5 DISCUSSÃO

Embora comparações com valores absolutos de FC obtidos por outros pesquisadores seja questionável, as diferenças dos grupos de FC permitem uma categorização das amostras AFC em patamar de FC condizente com carne dura (i.e., superior a 5,9 kg), e das amostras BFC no limiar de força que a carne pode ser considerada por consumidores como ligeiramente macia ou percebida como diferenciada quanto à maciez, em patamar próximo de 4 kg (BOLEMAN et al., 1997; DELGADO et al., 2006; MILLER et al., 2001;). A menor maciez na carne de *Bos taurus indicus* (*Bos indicus*) é um importante desafio comercial deste tipo biológico, constantemente apresentam carnes mais duras que *Bos taurus* (WHIPPLE et al., 1990; SHACKELFORD et al., 1994).

As diferenças de FC nos intervalos durante o período de amaciamento entre os grupos de maciez não foram constantes (Figura 1). Depois de 16 de maturação, o grupo AFC continuou o amaciamento, e a diferença de FC entre os grupos foi reduzida. Desta forma, a taxa de decréscimo de FC durante a maturação para o grupo AFC foi inicialmente inferior com compensação tardia. Este comportamento é típico de sistemas de produção que apresentam alguma deficiência proteolítica *post mortem*, normalmente associados a níveis de calpastatina, como verificado em estudos com utilização de agonistas β -adrenérgicos (KOOHMARAI et al., 1991; STRYDOM et al., 2009) e implantes anabólicos (SCHNEIDER et al., 2007), bem como em animais reativos (GRUBER et al., 2010; PEÑA et al., 2014). Nestas situações, podem ser verificados atrasos na resposta do amaciamento que alcançam até uma semana. No presente estudo, duas semanas a mais não foram suficientes ($P < 0,05$) para o grupo AFC alcançar o valor obtido pelo grupo BFC aos 16 dias *post mortem*. A comparação dos extremos da população experimental pode justificar a maior persistência da diferença.

Não houve diferença para comprimento de sarcômero e pH final para os grupos de FC (Tabela 4). A minimização do estresse pré-abate como transporte curto e em períodos fresco do dia, embarque e desembarque sem utilização de choques, e descanso dos animais em ambiente adequado reduzem a variação no pH. Cobertura de gordura subcutânea homogênea entre os animais e a resfriamento uniforme das carcaças na câmara fria são fatores que reduzem a variação no comprimento de sarcômero, impossibilitando o efeito deste sobre a FC.

Estes resultados (ausência de diferença para pH e comprimento de sarcômero) também são esperados principalmente em situações cujas diferenças de FC são atribuídas às alterações na taxa e extensão de amaciamento. Nestas condições, a contribuição do sistema proteolítico, em especial a atividade de calpastatina, aparece como principal fator sobre as diferenças de maciez (KOOHMARAIE, 1995; WHIPPLE et al., 1990).

Atividade inibitória de calpastatina foi superior no músculo TB para o grupo AFC, porém no LL não houve diferença significativa. No TB, a diferença entre as médias foi de 1,45 U/g, enquanto que no LL foi de 0,85 U/g. A obtenção das amostras 48-h *post mortem* pode justificar a falta de diferença no LL. Este músculo tem maior decréscimo na atividade de calpastatina *post mortem* que o TB, resultado que pode ser associado à maior relação μ -calpain:calpastatina no LL (CRUZEN et al., 2014). Embora a atividade inibitória de calpastatina 24-h *post mortem* seja o marcador bioquímico de maior relação com FC de carne maturada (WHIPPLE et al., 1990), apresentando uma correlação positiva com FC no músculo LL (O'CONNOR et al., 1997; WULF et al., 1997), às 72-h *post mortem* esta mesma relação não foi verificada (KING et al., 2006). Estes resultados sinalizam que avaliações após 24-h *post mortem* podem reduzir as perspectivas de detectar alterações na atividade de calpastatina no LL.

Os resultados obtidos na expressão gênica reforçam a existência de diferença entre os grupos de FC para atividade de calpastatina no LL, pois o grupo AFC apresentou maior expressão para CAST (Figura 2). Maior frequência gênica de CAST são associadas com maior atividade de calpastatina e com carnes maturadas com maior FC em *Bos indicus* (SMITH et al., 2009). Em conformidade com estes resultados, maior expressão relativa de CAST foi associada a animais Nelore com maior força de cisalhamento que Canchim (GIUSTI et al., 2013).

A CAST 1 não apresentou diferenças significativas entre os grupos de BFC e AFC. Em estudos anteriores, este gene não apresentou efeito sobre FC em três diferentes raças europeias (ALLAIS et al., 2011), e também não foi verificado efeito deste gene sobre a FC em carnes maturadas de animais Nelore (CARVALHO, 2012).

A CAST2 não diferiu entre os grupos de FC no presente estudo. Em contraste, em *Bos taurus* maior expressão deste gene foi associada a carnes mais duras. Este resultado também foi verificado em Charolês e Blonde d'Aquitaine,

porém não foi verificado efeito em Limousin (ALLAIS et al., 2011). Em Nelore, este gene não afetou a FC de carnes maturadas (CARVALHO, 2012), enquanto que novilhos da mesma raça demonstraram maior expressão do CAST2 em carnes mais macias nos dias 1, 7 e 21 *post mortem* (REZENDE, 2011). Portanto, existem resultados divergentes para este gene em relação seu efeito na maciez.

O CAPN1 não diferiu entre os grupos de FC. Embora este gene codifique a principal enzima da degradação muscular *post mortem* (μ -calpaína), diferenças na maciez da carne não estão condicionadas a diferenças na expressão deste gene ou na concentração da enzima traduzida no tecido, especialmente, se há diferenças na atividade de calpastatina. Na literatura, a maior expressão de CAPN1 em animais da raça Brahma foi associada a carnes mais macias 7 e 14 dias de maturação (SMITH et al., 2009). Nesta mesma raça, o maior número de alelos para CAPN1 também foi associado a carnes mais macias (CAFE et al., 2010b; ROBINSON et al., 2012). Em animais *Bos taurus* também foi observado efeito positivo do CAPN1 na maciez, porém neste mesmo estudo, não foi observado efeito deste gene na maciez da carne de *Bos indicus* (CASAS et al., 2006).

Os grupos com associação de FC e temperamento não diferiram para nenhum dos genes estudados. Era esperado pelo menos diferenças entre os grupos que contavam com FC divergentes, como entre BIT-BFC e AIT-AFC. As diferenças entre os grupos para expressão gênica talvez possam existir, mas não são suficientemente grandes para serem detectadas com o número amostral utilizado. É possível também que a regulação da atividade da calpastatina seja principalmente regulada por eventos pós-traducionais como fosforilação (CONG et al., 1998; PONTREMOLI et al., 1992; SALAMINO et al., 1994). Anteriormente, foi relatado ausência de relação entre número de alelos de CAST e CAPN1 com temperamento (CAFE et al., 2010a).

O grupo AFC apresentou pior temperamento de acordo com os dados de VF, ET e ITM (Tabelas 5), e com o IT (Tabelas 7). Este achado corrobora com a hipótese que animais reativos são propensos a apresentar maior atividade de calpastatina com impacto na maciez da carne. As diferenças para maciez entre novilhos e novilhas parece seguir o mesmo processo, visto que, novilhas são mais reativas, apresentam maior atividade de calpastatina e carne mais duras (GRUBER et al., 2010; O'CONNOR et al., 1997). Esta sequência de fatores também ocorre entre *Bos indicus* e *Bos taurus* (WULF et al., 1997). Estas evidências reforçam a

teoria que a estimulação do eixo simpato-adreno-medular provoca liberação de catecolaminas que agem sobre receptores adrenérgicos, implicando em alteração da atividade de calpastatina, provavelmente, por fosforilação desta molécula (PONTREMOLI et al., 1992; CONG et al., 1998). Além das evidências previamente mencionadas, serve de sustentação para esta hipótese os resultados que demonstram menor atividade proteolítica e maciez quando ocorre estimulação da via adrenérgica agonista (infusão de epinefrina em suínos, Sensky et al. (1996); administração de β -adrenérgico na dieta, Koohmaraie et al. (1991), Strydom et al. (2009); associação com estresse, King et al. (2006), Gruber et al. (2010). Este mecanismo seria a base para diferenças na maciez em população homogênea, como a do presente estudo.

O manejo pré-abate (manejo 2) apresentou resultados mais consistentes para diferenciação dos grupos de FC para questões de temperamento (Tabela 5). Estes resultados contrariam as suposições que os testes mais tardios são menos preditivos em razão da habituação ao confinamento (BEHRENDTS et al., 2009; KING et al., 2006). É comum a diminuição da reatividade em nível de média populacional com o tempo de confinamento (CAFE et al., 2011b; HALL et al., 2011; KING et al., 2006), contudo existem indivíduos que ficam mais reativos e outros mais calmos (BEHRENDTS et al., 2009).

No presente estudo, as variáveis VF e ET (oriundos do manejo 1 e 2) geraram quatro componentes principais. Dois deles interpretados como índices de interesse de estudo (PC1 = IT; PC3 = IH). No primeiro, maiores valores são associados com animais com pior temperamento, e no segundo, com maior habituação ao manejo medido pelo ET. Animais com AFC apresentaram maiores valores de IT ($P < 0,05$), mas não para IH. A utilização de índices tem como objetivo associar informações de diferentes características comportamentais em uma variável visando melhor capacidade preditiva. Índices de temperamento obtidos pela média aritmética da VF e escore de curral (KING et al., 2006), e da VF e ET (FRANCISCO et al., 2015) foram capazes de formar grupos de temperamento que distinguiram para padrões bioquímicos, desempenho animal e atributos de carne. Índice de temperamento mais elaborado pode ser desenvolvido utilizando análises multivariadas. Nesta abordagem, métodos estatísticos geram diversos componentes principais (índices), onde os coeficientes são definidos de acordo com a variabilidade da variável. Sant'Anna e Paranhos da Costa (2013) desenvolveram um índice de

temperamento (PC1) com base em medidas qualitativas do comportamento (12 variáveis) e observaram relações do índice desenvolvido com VF, ET, escore de curral, escore de movimento e ganho médio diário.

A utilização de variáveis colhidas em momentos distintos possibilitou a obtenção do IH entre os componentes principais. Este índice apresentou a terceira maior variância, e foi definido pela diferença entre os ET dos dois manejos. A ausência da VF no modelo pode ser devido a característica de maior repetibilidade desta variável (CURLEY et al., 2006; PETHERICK et al., 2009), restringindo a variação entre as medidas. A possibilidade de a habituação afetar características produtivas não tem sido muito estudada. Uma única abordagem demonstrou relação da habituação principalmente com peso corporal em diferentes fases de produção, e também com área de olho de lombo, USDA yield grade e FC (BEHRENDTS et al., 2009). Neste estudo foram utilizadas a variação da VF entre a fase de desmame e o confinamento.

A distribuição dos animais AFC e BFC nos quadrantes que representam animais com diferentes temperamentos e habituação foi razoavelmente uniforme (Figura 5). Pois observa-se indivíduos dos grupos de FC próximo do centro do gráfico e indivíduos não categorizados nos extremos dos índices. Contudo, a representação no gráfico confirma o potencial uso do temperamento como instrumento para obtenção de carnes de melhor maciez, e da habituação como informação auxiliar, a qual necessita de mais estudos.

O IH não apresentou diferença entre os grupos de FC, mas o estudo de correlação com toda a população estudada demonstrou correlação com a FC2 e FC16 (Tabela 8), onde maior habituação foi associado a menor FC. O IH apresentou correlações importantes também para as variáveis que mediram extensão do amaciamento (EA_{16-30d} e EA_{2-30d}), que são associadas a atividade proteolítica. A correlação significativa entre uma medida de habituação e FC foi relatada uma única outra vez, embora tenham observado maior FC em animais com maior habituação (BEHRENDTS et al., 2009).

O IH apresentou o maior número de correlações, bem como os maiores valores de correlação dentre as variáveis que avaliaram o temperamento. As maiores correlações dos índices desenvolvidos (IT e IH) foram com a FC2 seguido pela EA_{2-30d}. Importantes correlações também foram apresentadas pelo ITM2 (pré-abate), enquanto o ITM1 e as VF1 e VF2 não apresentaram correlações

significativas, exceto o VF1 com a FC2. Portanto, no presente estudo os índices desenvolvidos foram mais correlacionados com maciez que a VF. Em estudo com *Bos taurus*, foi demonstrado correlações entre FC21 e VF de três diferentes momentos. O ITM (pré-embarque) apresentou correlação menor que a VF, e o escore de curral e ET não apresentaram correlações com a FC (KING et al, 2006). Por outro lado, o uso somente da VF para estratificar em grupos de temperamento (calmo, intermediário e reativo), não obteve êxito em distinguir as categorias em FC para zebuínos e taurinos em outro estudo (SILVEIRA et al., 2012).

As correlações significativas entre as variáveis de temperamento e a EA, reforçam a hipótese que as diferenças na maciez entre animais calmos e reativos se deve ao sistema proteolítico. Contudo, a EA_{2-30d} pode causar uma falsa interpretação quando se observa que animais mais reativos apresentaram maior amaciamento *post mortem*. Porém, os resultados sugerem que atividade proteolítica nos animais com melhor temperamento foram intensas nos primeiros dois dias. Esta interpretação é sustentada pela diferença na FC presente aos 2 dias *post mortem* (Figura 1) entre os grupos de FC, que diferiram em temperamento (Tabelas 5 e 7). Além disso, há correlação positiva entre os índices de temperamento e a FC2 (Tabela 8). Os dados sugerem que as proteólises nos primeiros dois dias foram suficientes para determinar as diferenças nos demais tempos de maturação. Quase 60% da degradação da miofibrilas podem ocorrer nos primeiros dois dias de maturação (KOOHARAIE et al., 1987).

Outros estudos também reportaram evidências que o sistema proteolítico é afetado pelo temperamento (GRUBER et al., 2010; KING et al., 2006). Em contraste, Magolski et al. (2013) não encontraram correlação entre medidas de temperamento e degradação proteica *post mortem*, e sugeriram que mecanismos alternativos ao sistema das calpaínas estariam atuando na maciez. Contudo, este estudo não reportou se os testes de temperamento foram eficazes em prever a maciez ou a FC como realizado por outros estudos que apontaram atuação do sistema proteolítico (GRUBER et al., 2010; HALL et al., 2011; KING et al., 2006; VOISINET et al., 1997). Além disso, os efeitos negativos do temperamento (ou efetividade na predição) sobre características produtivas muitas vezes não estão presentes para maciez (FRANCISCO et al., 2015; SILVEIRA et al., 2012), tornando muitas vezes estudos de correlação inapropriados.

Foi observada correlação baixa-moderada entre IT e temperatura retal (Tabela 9), este resultado era esperado, pois o aumento da temperatura retal é associado ao maior estresse (BURDICK et al., 2010; GRUBER et al., 2010). Porém, obteve-se de forma inesperada correlação negativa entre FC e a temperatura retal verificada nos dois manejos realizados. Este resultado contrasta com resultados de Gruber et al. (2010) em *Bos taurus*, que observaram correlação positiva.

As maiores correlações entre TIV e IT foram observados no manejo 3-4 semanas antes do abate nas regiões da testa e flanco, onde menores temperaturas nestas regiões foram relacionadas com animais com maior IT. Também foram observadas correlações significativas ($P < 0,10$) entre IT e ITV no olho e na face, ambas correlações positivas. Embora as correlações tenham apresentado valores baixos, fornecem evidências que existe relação entre TIV de algumas regiões corporais e temperamento. A falta de repetibilidade dos resultados de correlação entre os manejos pode indicar interação da temperatura corporal superficial com a temperatura ambiental, visto que os manejos apresentaram temperaturas diferentes (Tabela 1). A troca de calor das diversas regiões corporais pode ser afetada pela temperatura ambiental em diferentes intensidades (CUNNINGHAM; KLEIN, 2007).

Correlação positiva significativa entre a TIV do olho e o IT foi observado nos dois manejos, apesar da baixa correlação, foi consistente pela repetição da observação. Provavelmente, a temperatura do olho sofre menor influência da temperatura ambiental por não ter a função de trocar calor com o ambiente como as demais regiões corporais estudadas. A maior temperatura do olho em animais com maior estresse contraria outros achados que observaram menor temperatura do olho com TIV em animais submetidos a eventos estressantes, este resultado foi justificado pelo possível envolvimento do sistema simpático vasoconstritor no olho (STEWART et al., 1997; STEWART et al., 2010).

A correlação entre TIV e FC apresentou a mesma direção das correlações entre TIV e IT na testa e no flanco (correlações negativas), ou seja, os animais que apresentaram menor temperatura nestas regiões tiveram maior IT e maior FC. Entretanto, diferentemente do observado para TIV e IT em que as correlações significativas foram observadas principalmente no manejo 3-4 semanas antes do abate, entre TIV e FC as correlações significativas foram observadas somente no manejo pré-abate. É conhecido que os manejos pré-abates são mais influenciáveis na qualidade da carne, principalmente sobre maciez. A avaliação da

temperatura do flanco pré-abate demonstrou-se como o principal indicador para a FC. Maiores temperaturas nestas regiões indicaram menores força de cisalhamento aos 16 dias *post mortem*. Considerando o mecanismo do estresse, é possível que estes animais tiveram menor liberação de adrenalina imediatamente a contenção no tronco para a TIV, e conseqüentemente, menor vasoconstrição periférica dos vasos do flanco ocorreu. Nas regiões que foi verificado maior FC com maior temperatura, provavelmente foram favorecidos com redirecionamento do aporte sanguíneo na condição de estresse.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atuação do sistema proteolítico *post mortem* é o principal determinante intrínseco que afeta a maciez, quase todo desempenhado pelo sistema calpaína. Este sistema é suscetível a diversos fatores. Os resultados indicam que o impacto do temperamento na maciez se deve pela alteração do sistema calpaína, especialmente sobre a calpastatina. As evidências indicam que o impacto do temperamento sobre atividade de calpastatina ocorre pela estimulação dos receptores β -adrenérgicos, no entanto, não é conclusivo se o efeito é direto sobre as proteínas (e.g., fosforilação) ou se há alteração da expressão das calpastatinas, ou se ambos os eventos ocorrem simultaneamente. Este mecanismo também pode estar contribuindo, ou ser o responsável pelas diferenças de maciez entre *Bos taurus* e *Bos indicus*, novilhos e novilhas, e entre animais suplementados com e sem β -adrenérgicos na dieta, ou seja, pode estar atuando nas diversas condições que exista estimulação diferenciada dos receptores β -adrenérgicos. Esta constatação pode fortalecer a importância da promoção do bem-estar animal, da seleção de animais com base na reatividade, e da consideração desta característica nos sistemas de classificação da qualidade da carne (e.g., *USDA Quality Grade* e *Meat Standards Australia*).

A análise multivariada utilizando componentes principais demonstrou-se uma ferramenta promissora para obtenção de indicadores com maior capacidade preditiva que as convencionais baseadas em apenas um indicador (e.g., VF e ET). Como os resultados são promissores, novos estudos considerando outros indicadores associadamente, como distância de fuga e escore de tronco, bem como medidas bioquímicas em diferentes fases do sistema de produção podem contribuir para melhor entendimento do temperamento. Além disso, pode-se gerar um índice simples viável para condições comerciais e um complexo com maior capacidade preditiva para utilização como referência para os indicadores existentes e outros que possam surgir. Novos estudos são necessários para compreender o mecanismo e o efeito da habituação sobre variáveis produtivas.

A termografia infravermelho apresenta correlação baixa com o IT e com a FC. Neste estudo, a TIV da testa e do franco apresentaram-se como melhores indicadores para IT e FC. No entanto, recomenda-se novos estudos considerando

outras regiões corporais e o impacto da temperatura ambiental sobre a TIV das diversas regiões corporais.

Em suma, as carnes com baixa e alta FC são oriundas de animais com temperamentos divergentes. Animais com pior temperamento alteram a atividade de calpastatina muscular. Análise de componentes principais mostrou-se uma importante ferramenta para análise de indicadores de temperamento, gerando índices com maior capacidade preditiva para maciez. A habituação no período final de confinamento mensurada pelo IH apresentou importantes correlações com a FC. A temperatura retal confirmou a efetividade do IT em identificar diferenças no temperamento. A termografia infravermelho demonstrou-se como uma técnica auxiliar para predição da FC e do temperamento.

REFERÊNCIAS

ALLAIS, S.; JOURNAUX, L.; LEVÉZIEL, H.; PAYET-DUPRAT, N.; RAYNAUD, P.; HOCQUETTE, J.F.; LEPETIT, J.; ROUSSET, S.; DENOYELLE, C.; BERNARD-CAPEL, C.; RENAND, G. Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 1, p. 1-11, 2011.

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. **Guidelines for uniform beef improvement programs**. 9th ed. Chicago: National Livestock and Meat Board, 1995. 182 p. Disponível em: <<http://www.beefimprovement.org/guidelines.html>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

ASTRUC, T. Carcass composition, muscle structure, and contraction. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 1, p. 148-166, 2014a.

_____. Connective tissue: structure, function, and influence on meat quality. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 1, p. 321-328, 2014b.

BALAN, P.; KIM, Y.H.B.; BLIJENBURG, R. Small heat shock protein degradation could be an indicator of the extent of myofibrillar protein degradation. **Meat Science**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 220-222, 2014.

BEHRENDTS, S.M.; MILLER, R.K.; ROUQUETTE, F.M.; RANDEL, R.D.; WARRINGTON, B.G.; FORBES, T.D.A.; HOLLOWAY, J.W. Relationship of temperament, growth, carcass characteristics and tenderness in beef steers. **Meat Science**, Oxford, v. 81, n. 3, p. 433-438, 2009.

BERG, R.T.; BUTTERFIELD, R.M. **New concepts of cattle growth**. Sydney: Sydney University Press, 1976. 240 p.

BOEHM, M.L.; KENDALL, T.L.; THOMPSON, V.F.; GOLL, D.E. Changes in the calpains and calpastatin during *postmortem* storage of bovine muscle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 9, p. 2415-2434, 1998.

BOLEMAN, S.J.; BOLEMAN, S.L.; MILLER, R.K.; TAYLOR, J.F.; CROSS, H.R.; WHEELER, T.L.; JOHNSON, D.D. Consumer evaluation of beef of known categories of tenderness. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, p.1521-1524, 1997.

BOUTON, P.E.; HARRIS, P.V.; RATCLIFF, D. Effect of cooking temperature and time on the shear properties of meat. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 46, n. 4, p. 1082-1087, 1981.

BRASIL. Leis, decretos, etc. **Instrução normativa nº 9, de 4 de maio de 2004**: dispõe sobre sistema brasileiro de classificação de carcaças de bovinos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/legislacao>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Mercado interno**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno>>. Acesso em: 14 jan. 2016.

BURDICK, N.C.; CARROLL, J.A.; HULBERT, L.E.; DAILEY, J.W.; WILLARD, S.T.; VANN, R.C.; WELSH JR., T.H.; RANDEL, R.D. Relationships between temperament and transportation with rectal temperature and serum concentrations of cortisol and epinephrine in bulls. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 166-172, 2010.

BURROW, H.M.; SEIFERT, G.W.; CORBET, N.J. A new technique for measuring temperament in cattle. **Proceedings of the Australian Society of Animal Production**, Brisbane, v. 17, p. 154-157, 1988.

CAFE, L.M.; MCINTYRE, B.L.; ROBINSON, D.L.; GEESINK, G.H.; BARENDSE, W.; GREENWOOD, P.L. Production and processing studies on calpain-system gene markers for tenderness in Brahman cattle: 1. Growth, efficiency, temperament, and carcass characteristics. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 9, p. 3047-3058, 2010a.

CAFE, L.M.; MCINTYRE, B.L.; ROBINSON, D.L.; GEESINK, G.H.; BARENDSE, W.; PETHICK, D.W.; THOMPSON, J.M.; GREENWOOD, P.L. Production and processing studies on calpain-system gene markers for tenderness in Brahman cattle: 2. Objective meat quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 9, p. 3059-3069, 2010b.

CAFE, L.M.; ROBINSON, D.L.; FERGUSON, D.M.; GEESINK, G.H.; GREENWOOD, P.L. Temperament and hypothalamic-pituitary-adrenal axis function are related and combine to affect growth, efficiency, carcass, and meat quality traits in Brahman steers. **Domestic animal endocrinology**, New York, v. 40, n. 4, p. 230-240, 2011a.

CAFE, L.M.; ROBINSON, D.L.; FERGUSON, D.M.; MCINTYRE, B.L.; GEESINK, G.H.; GREENWOOD, P.L. Cattle temperament: persistence of assessments and associations with productivity, efficiency, carcass and meat quality traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 5, p. 1452-1465, 2011b.

CAMPBELL, R.L.; DAVIES, P.L. Structure-function relationships in calpains. **Biochemical Journal**, London, v. 447, n. 3, p. 335, 2012.

CARVALHO, M.E. **Estudo de genes associados com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore**. 2012. 65 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CASAS, E.; WHITE, S.N.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; RILEY, D.G.; CHASE JR., C.C.; JOHNSON, D.D.; SMITH, T.P.L. Effects of and μ -markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 3, p. 520-525, 2006.

CHARKOUDIAN, N. Mechanisms and modifiers of reflex induced cutaneous vasodilation and vasoconstriction in humans. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 109, n. 4, p. 1221-1228, 2010.

CONG, M.; THOMPSON, V.F.; GOLL, D.E.; ANTIN, P.B. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 273, n. 1, p. 660-666, 1998.

CONTRERAS-CASTILLO, C.J.; LOMIWES, D.; WU, G.; FROST, D.; FAROUK, M.M. The effect of electrical stimulation on *post mortem* myofibrillar protein degradation and small heat shock protein kinetics in bull beef. **Meat Science**, Oxford, v. 113, p. 65-72, 2016.

CORTIZO, E.C.; BARBOSA, M.P.; SOUZA, L.A.C. Estado da arte da termografia. **Fórum Patrimônio: Ambiente Construído e Patrimônio Sustentável**, Belo Horizonte, v. 2, n. 2, p. 158-193, 2008.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 162, p. 156-159, 1987.

CHRISTENSEN, M.; PURSLOW, P.P.; LARSEN, L.M. The effect of cooking temperature on mechanical properties of whole meat, single muscle fibres and perimysial connective tissue. **Meat Science**, Oxford, v. 55, p. 301-307, 2000.

CROSS, H.R.; WEST, R.L.; DUTSON, T.R. Comparison of methods for measuring sarcomere length in beef semitendinosus muscle. **Meat Science**, Oxford, v. 5, p. 261-266, 1981.

CRUZEN, S.M.; PAULINO, P.V.; LONERGAN, S.M.; HUFF-LONERGAN, E. *Postmortem* proteolysis in three muscles from growing and mature beef cattle. **Meat Science**, Oxford, v. 96, n. 2, p. 854-861, 2014.

CULLER, R.D.; PARRISH JR., F.C.; SMITH, G.C.; CROSS, H.R. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 43, n. 4, p. 1177-1180, 1978.

CUNNINGHAM, J.G.; KLEIN, B.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Tradução de A. S. da Silva. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 720 p.

CURLEY, K.O.; NEUENDORFF, D.A.; LEWIS, A.W.; CLEERE, J.J.; WELSH, T.H.; RANDEL, R.D. Functional characteristics of the bovine hypothalamic–pituitary–adrenal axis vary with temperament. **Hormones and Behavior**, San Diego, v. 53, n. 1, p. 20-27, 2008.

DAVEY, C.L.; GILBERT, K.V.; CARSE, W.A. Carcass electrical stimulation to prevent cold shortening toughness in beef. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Abingdon, v. 19, n. 1, p. 13-18, 1976.

DRANSFIELD, E. Modelling post-mortem tenderization. IV: Role of calpains and calpastatin in conditioning. **Meat science**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 217-234, 1993.

DELGADO, E.F. **The calpain system and *postmortem* tenderization in ovine meat from callipyge and normal phenotypes**. 1998. 154 p. Thesis (Doctor of Philosophy in Animal Science) – University of Arizona, Tucson, 1998.

_____. Fatores bioquímicos que afetam a maciez da carne. CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 1., 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: ITAL, 2001. p. 143-159.

DELGADO, E.F.; GEESINK, G.H.; MARCHELLO, J.A.; GOLL, D.E.; KOOHMARAIE, M. The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 2, p. 398-412, 2001.

DELGADO, E.F.; AGUIAR, A.P.; ORTEGA, E.M.M.; SPOTO, M.H.F.; CASTILLO, C.J.C. Brazilian consumers' perception of tenderness of beef steaks classified by shear force and taste. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 3, p. 232-239, 2006.

DESTEFANIS, G.; BRUGIAPAGLIA, A.; BARGE, M.T.; DAL MOLIN, E. Relationship between beef consumer tenderness perception and Warner–Bratzler shear force. **Meat Science**, Oxford, v. 78, n. 3, p. 153-156, 2008.

DEVINE, C.E.; WAHLGREN, N.M.; TORNBERG, E. Effect of rigor temperature on muscle shortening and tenderisation of restrained and unrestrained beef *m. longissimus thoracicus et lumborum*. **Meat Science**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 61-72, 1999.

DEVINE, C.E. Conversion of muscle to meat: aging. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 1, p. 252-261, 2014.

DICKENS, M.J.; DELEHANTY, D.J.; ROMERO, L. Michael. Stress: an inevitable component of animal translocation. **Biological Conservation**, Oxford, v. 143, n. 6, p. 1329-1341, 2010.

DUARTE, M.S.; PAULINO, P.V.R.; FONSECA, M.A.; DINIZ, L.L.; CAVALI, J.; SERAO, N.V.L.; COX, R.B. Influence of dental carcass maturity on carcass traits and meat quality of Nellore bulls. **Meat Science**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 441-446, 2011.

EDMUNDS, T.; NAGAINIS, P.A.; SATHE, S.K.; THOMPSON, V.F.; GOLL, D.E. Comparison of the autolyzed and unautolyzed forms of μ - and m -calpain from bovine skeletal muscle. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1077, n. 2, p. 197-208, 1991.

EILER, H. Glândulas endócrinas. In: REECE, W. (Ed.). **Dukes, fisiologia dos animais domésticos**. Tradução de C. Figueiredo e I.R. Vanzelloti. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 37, p. 557-622.

ERICKSON, H.; DETWEILER, D. Mecanismo de controle do sistema circulatório. In: REECE, W. (Ed.). **Dukes, fisiologia dos animais domésticos**. Tradução de C. Figueiredo e I.R. Vanzelloti. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 17, p. 252-278.

FELICIO, P.E. de. Fatores que influenciam na qualidade da carne bovina. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. de. (Org.). **Produção de novilho de corte**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p. 79-97.

FERGUSON, D.M.; GERRARD, D.E. Regulation of post-mortem glycolysis in ruminant muscle. **Animal Production Science**, Wellington, v. 54, n. 4, p. 464-481, 2014.

FORDYCE, G.; GODDARD, M.E.; SEIFERT, G.W. The measurement of temperament in cattle and the effect of experience and genotype. **Animal Production in Australia**, Rock Hampton, v. 14, p. 329-332, 1982.

FRANCISCO, C.L.; RESENDE, F.D.; BENATTI, J.M.B.; CASTILHOS, A.M.; COOKE, R.F.; JORGE, A.M. Impacts of temperament on nellore cattle: physiological responses, feedlot performance, and carcass characteristics. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, n. 11, p. 5419-5429, 2015.

GEESINK, G.H.; KUCHAY, S.; CHISHTI, A.H.; KOOHMARAIE, M. μ -Calpain is essential for *postmortem* proteolysis of muscle proteins. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 10, p. 2834-2840, 2006.

GIUSTI, J.; CASTAN, E.; DAL PAI, M.; ARRIGONI, M.D.B.; BALDIN, S.R.; OLIVEIRA, H.N. de. Expression of genes related to quality of Longissimus dorsi muscle meat in nellore (*Bos indicus*) and canchim (5/8 *Bos taurus* x 3/8 *Bos indicus*) cattle. **Meat Science**, Oxford, v. 94, n. 2, p. 247-252, 2013.

GOLL, D.E. Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality. In: ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 44., 1991. Chicago. **Proceedings...** Chicago: National Livestock and Meat Board, 1991. p. 25-36.

GOLL, D.E.; HOEKSTRA, W.G.; BRAY, R.W. Age-associated changes in bovine muscle connective tissue. II. Exposure to increasing temperature. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 29, p. 615, 1964.

GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; TAYLOR, R.G.; CHRISTIANSEN, J.A. Role of the calpain system in muscle growth. **Biochimie**, Paris, v. 74, n. 3, p. 225-237, 1992.

GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; TAYLOR, R.G.; OUALI, A. The calpain system and skeletal muscle growth. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 78, n. 4, p. 503-512, 1998.

GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; LI, H.; WEI, W.; CONG, J. The calpain system. **Physiological reviews**, Bethesda, v. 83, n. 3, p. 731-801, 2003.

GREGORY, N.G.; GRANDIN, T. **Animal welfare and meat science**. Wallingford: CABI Publ., 1997. 298 p.

GRUBER, S.L.; TATUM, J.D.; ENGLE, T.E.; CHAPMAN, P.L.; BELK, K.E.; SMITH, G.C. Relationships of behavioral and physiological symptoms of preslaughter stress to beef longissimus muscle tenderness. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 3, p. 1148-1159, 2010.

HALL, N.L.; BUCHANAN, D.S.; ANDERSON, V.L.; ILSE, B.R.; CARLIN, K.R.; BERG, E.P. Working chute behavior of feedlot cattle can be an indication of cattle temperament and beef carcass composition and quality. **Meat Science**, Oxford, v. 89, n. 1, p. 52-57, 2011.

HEARNshaw, H.; MORRIS, C. A. Genetic and environmental effects on a temperament score in beef cattle. **Australian journal of agricultural research**, East Melbourne, v. 35, n. 5, p. 723-733, 1984.

HILL, F. The solubility of intramuscular collagen in meat animals of various ages. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 31, p. 161-166, 1966.

HONIKEL, K.O. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. **Meat Science**, Oxford, v. 49, n. 4, p. 447-457, 1998.

_____. Chemical and physical characteristics of meat: pH Measurement. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 1, p. 262-266, 2014a.

_____. Conversion of muscle to meat: *Rigor Mortis*, cold, and rigor shortening. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 1, p. 358-365, 2014b.

HONIKEL, K.O.; RONCALES, P.; HAMM, R. The influence of temperature on shortening and rigor onset in beef muscle. **Meat Science**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 221-241, 1983.

HOPKINS, D.L. Tenderizing mechanism: mechanical. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 3, p. 443-451, 2014.

HOPKINS, D.L.; HUFF-LONERGAN, E. Tenderizing mechanisms: chemical and enzymatic. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 1, p. 1363-1369, 2004.

HOUBAK, M.B.; ERTBJERG, P.; THERKILDSEN, M. In vitro study to evaluate the degradation of bovine muscle proteins post-mortem by proteasome and μ -calpain. **Meat Science**, Oxford, v. 79, n. 1, p. 77-85, 2008.

HUANG, F.; HUANG, M.; ZHANG, H.; GUO, B.; ZHANG, D.; ZHOU, G. Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during *postmortem* ageing of beef skeletal muscle. **Food Chemistry**, Oxford, v. 148, p. 1-6, 2014.

HUFF-LONERGAN, E. Tenderizing mechanisms: enzymatic. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 3, p. 438-442. 2014.

HUFF-LONERGAN, E.; ZHANG, W.; LONERGAN, S.M. Biochemistry of *postmortem* muscle: lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, Oxford, v. 86, n. 1, p. 184-195, 2010.

IBRAHIM, R.M.; GOLL, D.E.; MARCHELLO, J.A.; DUFF, G.C.; THOMPSON, V.F.; MARES, S.W.; AHMAD, H.A. Effect of two dietary concentrate levels on tenderness, calpain and calpastatin activities, and carcass merit in Waguli and Brahman steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 6, p. 1426-1433, 2008.

JUNQUEIRA, C.L.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 538 p.

KEETON, J.T.; ELLERBECK, S.M.; NÚÑEZ DE GONZÁLEZ; M.T. Chemical and physical characteristics of meat: chemical composition. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 1, p. 235-243, 2014.

KEMP, C.M.; PARR, T. The effect of recombinant caspase 3 on myofibrillar proteins in porcine skeletal muscle. **Animal**, Cambridge, v. 2, n. 8, p. 1254-1264, 2008.

_____. Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderization. **Meat Science**, Oxford, v. 92, n. 3, p. 252-259, 2012.

KEMP, C.M.; KING, D.A.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. The caspase proteolytic system in callipyge and normal lambs in longissimus, semimembranosus, and infraspinatus muscles during *postmortem* storage. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 9, p. 2943, 2009.

KEMP, C.M.; SENSKY, P.L.; BARDSLEY, R.G.; BUTTERY, P.J.; PARR, T. Tenderness: an enzymatic view. **Meat Science**, Champaign, v. 84, n. 2, p. 248-256, 2010.

KILGOUR, R.J.; MELVILLE, G.J.; GREENWOOD, P.L. Individual differences in the reaction of beef cattle to situations involving social isolation, close proximity of humans, restraint and novelty. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 99, n. 1, p. 21-40, 2006.

KING, D.A.; PFEIFFER, C.S.; RANDEL, R.D.; WELSH, T.H.; OLIPHINT, R.A.; BAIRD, B.E.; SAVELL, J.W. Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. **Meat Science**, Oxford, v. 74, n. 3, p. 546-556, 2006.

KNIZKOVA, I.; KUNC, P.; GÜRDIL, K.A.G.; PINAR, Y.; SELVI, Ç.K. Applications of infrared thermography in animal production. **Anadolu Journal of Agricultural Sciences**, Atakum, v. 22, n. 3, p. 329-336, 2007.

KOOHMARAIE, M. The role of endoproteases in meat tenderness. In: ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 41., 1988, Laramie. **Proceedings...** Laramie: National Livestock and Meat Board, 1988. p. 89-100.

_____. Effect of pH, temperature, and inhibitors on autolysis and catalytic activity of bovine skeletal muscle μ -calpain. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 10, p. 3071-3080, 1992a.

_____. Role of the neutral proteinases in *postmortem* muscle protein degradation and meat tenderness. In: ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 45., 1992, Kansas City. **Proceedings...** Kansas City: National Livestock and Meat Board, 1992b. p. 63-71.

_____. Muscle proteinases and meat aging. **Meat science**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 93-104, 1994.

_____. The biological basis of meat tenderness and potential genetic approaches for its control and prediction. In: ANNUAL RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 48., 1995, San Antonio. **Proceedings...** San Antonio: National Livestock and Meat Board, 1995. p. 69–75.

_____. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Science**, Oxford, v. 43, p. 193-201, 1996.

KOOHMARAIE, M.; GEESINK, G.H. Contribution of *postmortem* muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Science**, Oxford, v. 74, n. 1, p. 34-43, 2006.

KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S.D.; MUGGLI-COCKETT, N.E.; STONE, R.T. Effect of the beta-adrenergic agonist L644, 969 on muscle growth, endogenous proteinase activities, and *postmortem* proteolysis in wither lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 12, p. 4823-4835, 1991.

KOOHMARAIE, M.; KENT, M.P.; SHACKELFORD, S.D.; VEISETH, E.; WHEELER, T.L. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship?. **Meat science**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 345-352, 2002.

KOOHMARAIE, M.; SEIDEMANN, S.C.; SCHOLLMEYER, J.E.; DUTSON, T.R.; CROUSE, J.D. Effect of post-mortem storage on Ca⁺⁺-dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. **Meat Science**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 187-196, 1987.

KOOLHAAS, J.M.; KORTE, S.M.; DE BOER, S.F.; VAN DER VEGT, B.J.; VAN REENEN, C.G.; HOPSTER, H.; DE JONG, I.C.; RUIS, M.A.W.; BLOKHUIS, H.J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 925-935, 1999.

KUNC, P.; KNÍŽKOVÁ, I.; PŘIKRYL, M.; MALOUN, J. Infrared thermography as a tool to study the milking process: a review. **Agricultura Tropica et Subtropica**, Prague, v. 40, n. 1, p. 29-32, 2007.

LAMARE, M.; TAYLOR, R.G.; FAROUT, L.; BRIAND, Y.; BRIAND, M. Changes in proteasome activity during *postmortem* aging of bovine muscle. **Meat Science**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 199-204, 2002.

LAWRIE, R.A.; LEDWARD, D.A. **Lawrie's meat science**. 7th ed. Abington: Woodhead, 2006. 442 p.

LEE, W.J.; MA, H.O.N.G.; TAKANO, E.; YANG, H.Q.; HATANAKA, M.; MAKI, M. Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 267, n. 12, p. 8437-8442, 1992.

LEWIS, G.J.; PURSLOW, P.P.; RICE, A.E. The effect of conditioning on the strength of perimysial connective tissue dissected from cooked meat. **Meat Science**, Oxford, v. 30, p. 1-12, 1991.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MACKAY, J.R.; HASKELL, M.J. Consistent individual behavioral variation: the difference between temperament, personality and behavioral syndromes. **Animals**, Basel, v. 5, n. 3, p. 455-478, 2015.

MAGOLSKI, J.D.; BERG, E.P.; HALL, N.L.; ANDERSON, V.L.; KELLER, W.L.; JESKE, T.M.; CARLIN, K.M. Evaluation of feedlot cattle working chute behavior relative to temperament, tenderness, and *postmortem* proteolysis. **Meat science**, Oxford, v. 95, n. 1, p. 92-97, 2013.

MANLY, B.J.F. **Métodos estatísticos multivariados**: uma introdução. Tradução de S.I.C. Carmona. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008. 229 p.

MARINO, R.; ALBENZIO, M.; DELLA MALVA, A.; SANTILLO, A.; LOIZZO, P.; SEVI, A. Proteolytic pattern of myofibrillar protein and meat tenderness as affected by breed and aging time. **Meat Science**, Oxford, v. 95, n. 2, p. 281-287, 2013.

MARSH, B.B.; LEET, N.G.; DICKSON, M.R. The ultrastructure and tenderness of highly cold-shortened muscle. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 141-147, 1974.

MARTELLO, L.S.; SILVA, S.D.L.; GOMES, R. C.; CORTE, R.R.P.S.; LEME, P.R. Infrared thermography as a tool to evaluate body surface temperature and its relationship with feed efficiency in *Bos indicus* cattle in tropical conditions. **International Journal of Biometeorology**, New York, v. 60, n. 1, p. 173-181, 2016.

MATTERI, R.L.; CARROLL, J.A.; DYER, C.J. Neuroendocrine responses to stress. In: MOBERG, G.P.; MENCH, J.A. (Ed.). **The biology of animal stress**: basic principles and implications for animal welfare. Wallingford: CABI Publ., 2000. chap. 3, p. 43-76.

MILLER, M.F.; CARR, M.A.; RAMSEY, C.B.; CROCKETT, K.L.; HOOVER, L.C. Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, p. 3062-3068, 2001.

MILLER, R.K. Chemical and physical characteristics of meat: palatability. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 1, p. 252-261, 2014.

MONIN, G.; SANTE´-LHOUTELLIER, V. Conversion of muscle to meat: color and texture deviations. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 1, p. 339-345, 2014.

MONTANHOLI, Y.R.; ODONGO, N.E.; SWANSON, K.C.; SCHENKEL, F.S.; MCBRIDE, B.W.; MILLER, S.P. Application of infrared thermography as an indicator of heat and methane production and its use in the study of skin temperature in response to physiological events in dairy cattle (*Bos Taurus*). **Journal of Thermal Biology**, Kidlington, v. 33, n. 8, p. 468-475, 2008.

NAVEGANTES, L.C.C.; RESANO, N.M.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, Í.C. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 279, n. 3, p. E663-E668, 2001.

NISHIMURA, T.; HATTORI, A.; TAKAHASHI, K. Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese black cattle: effect of marbling on beef tenderization. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 1, p. 93-104, 1999.

O'CONNOR, S.F.; TATUM, J.D.; WULF, D.M.; GREEN, R.D.; SMITH, G.C. Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, n. 7, p. 1822-1830, 1997.

O'HALLORAN, G.R.; TROY, D.J.; BUCKLEY, D.J. The relationship between early post-mortem pH and the tenderisation of beef muscles. **Meat Science**, Oxford, v. 45, n. 2, p. 239-251, 1997.

OUALI, A.; HERRERA-MENDEZ, C.H.; COULIS, G.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; AUBRY, L.; SENTANDREU, M.A. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat Science**, Oxford, v. 74, n. 1, p. 44-58, 2006.

PALKA, K. Changes in intramuscular connective tissue and collagen solubility of bovine m. semitendinosus during retorting. **Meat Science**, Oxford, v. 55, p. 189-194, 1999.

PARANHOS DA COSTA, M.J.R.; COSTA E SILVA, E.V.; CHIQUITELLI NETO, M.; ROSA, M.S. Contribuição dos estudos de comportamento de bovinos para implementação de programas de qualidade de carne. In: ENCONTRO ANUAL DE ETOLOGIA, 20., 2002, Natal. **Anais...** Natal: Sociedade Brasileira de Etologia, 2002. p. 71-89.

PEÑA, F.; AVILÉS, C.; DOMENECH, V.; GONZÁLEZ, A.; MARTÍNEZ, A.; MOLINA, A. Effects of stress by unfamiliar sounds on carcass and meat traits in bulls from three continental beef cattle breeds at different ageing times. **Meat Science**, Oxford, v. 98, n. 4, p. 718-725, 2014.

PETHERICK, J.C.; HOLROYD, R.G.; DOOGAN, V.J.; VENUS, B.K. Productivity, carcass and meat quality of lot-fed *Bos indicus* cross steers grouped according to temperament. **Animal Production Science**, Wellington, v. 42, n. 4, p. 389-398, 2002.

PETHERICK, J.C.; DOOGAN, V.J.; HOLROYD, R.G.; OLSSON, P.; VENUS, B.K. Quality of handling and holding yard environment, and beef cattle temperament: 1. Relationships with flight speed and fear of humans. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 120, n. 1, p. 18-27, 2009.

PFLANZER, S.B.; DE FELICIO, P.E. Effects of teeth maturity and fatness of Nellore (*Bos indicus*) steer carcasses on instrumental and sensory tenderness. **Meat Science**, Oxford, v. 83, n. 4, p. 697-701, 2009.

PFLANZER, S.B.; DE FELÍCIO, P.E. Moisture and fat content, marbling level and color of boneless rib cut from nellore steers varying in maturity and fatness. **Meat Science**, Oxford, v. 87, n. 1, p. 7-11, 2011.

PONTREMOLI, S.; VIOTTI, P.L.; MICHETTI, M.; SALAMINO, F.; PARATORE, B.; MELLONI, E. Modulation of inhibitory efficiency of rat skeletal muscle calpastatin by phosphorylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 187, n. 2, p. 751-759, 1992.

PULFORD, D.J.; VAZQUEZ, S.F.; FROST, D.F.; FRASER-SMITH, E.; DOBBIE, P.; ROSENVOLD, K. The intracellular distribution of small heat shock proteins in post-mortem beef is determined by ultimate pH. **Meat Science**, Oxford, v. 79, n. 4, p. 623-630, 2008.

PURCHAS, R.W. Tenderness measurement. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 3, p. 1370-1377, 2004.

_____. Tenderness measurement. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 3, p. 452-459, 2014.

PURSLOW, P.P. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. **Meat Science**, Oxford, v. 70, p. 435-447, 2005.

RAYNAUD, P.; GILLARD, M.; PARR, T.; BARDSLEY, R.; AMARGER, V.; LEVÉZIEL, H. Correlation between bovine calpastatin mRNA transcripts and protein isoforms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 440, n. 1, p. 46-53, 2005.

RÉALE, D.; READER, S.M.; SOL, D.; MCDOUGALL, P.T.; DINGEMANSE, N.J. Integrating animal temperament within ecology and evolution. **Biological Reviews**, Hoboken, v. 82, n. 2, p. 291-318, 2007.

REZENDE, R.L. **Expressão de genes relacionados ao metabolismo de vitamina D3 mediante suplementação e estudo de associação com a maciez da carne em bovinos da raça Nelore**. 2011. 89 p. Tese (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

ROBERTSHAW, D. Regulação da temperatura e o ambiente térmico. In: REECE, W. (Ed.). **Dukes, fisiologia dos animais domésticos**. Tradução de C. Figueiredo e I.R. Vanzelloti. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 55, p. 898-908.

ROBINSON, D.L.; CAFE, L.M.; MCINTYRE, B.L.; GEESINK, G.H.; BARENDSE, W.; PETHICK, D.W.; THOMPSON, M.; POLKINGHORNE, R.; GREENWOOD, P.L. Production and processing studies on calpain-system gene markers for beef tenderness: consumer assessments of eating quality. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 8, p. 2850-2860, 2012.

SALAMINO, F.; DETULLIO, R.; MICHETTI, M.; MENGOTTI, P.; MELLONI, E.; PONTREMOLI, S. Modulation of calpastatin specificity in rat tissues by reversible phosphorylation and dephosphorylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 199, n. 3, p. 1326-1332, 1994.

SANT'ANNA, A.C.; PARANHOS DA COSTA, M.J.R. Validity and feasibility of qualitative behavior assessment for the evaluation of Nellore cattle temperament. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 157, n. 1, p. 254-262, 2013.

SAVELL, J.W.; CROSS, H.R. The role of fat in the palatability of beef, pork, and lamb. In: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Committee on Technological Options to Improve the Nutritional Attributes of Animal Products. (Ed.). **Designing foods: animal product options in the marketplace**. Washington: National Academy Press, 1988. p. 345-356.

SAVELL, J.W.; MUELLER, S.L.; BAIRD, B.E. The chilling of carcasses. **Meat Science**, Oxford, v. 70, n. 3, p. 449-459, 2005.

SENSKY, P.L.; PARR, T.; BARDSLEY, R.G.; BUTTERY, P.J. The relationship between plasma epinephrine concentration and the activity of the calpain enzyme system in porcine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 2, p. 380-387, 1996.

SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Relationship between shear force and trained sensory panel tenderness ratings of 10 major muscles from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 3333-3340, 1995.

SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L.V.; GREGORY, K.E.; ROHRER, G.A.; SAVELL, J.W. Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine *post rigor* calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 4, p. 857-863, 1994.

SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; MEADE, M.K.; REAGAN, J.O.; BYRNES, B.L.; KOOHMARAIE, M. Consumer impressions of tender select beef. **Journal of Animal Science**, Champaign v. 79, p. 2605-2614, 2001.

SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; WHIPPLE, G.; WHEELER, T.L.; MILLER, M.F.; CROUSE, J.D.; REAGAN, J.O. Predictors of beef tenderness: development and verification. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 56, n. 5, p. 1130-1135, 1991.

SILVEIRA, I.D.B.; FISCHER, V.; FARINATTI, L.H.E.; RESTLE, J.; ALVES FILHO, D.C.; MENEZES, L.F.G.D. Relationship between temperament with performance and meat quality of feedlot steers with predominantly Charolais or Nellore breed. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 6, p. 1468-1476, 2012.

SMITH, T.; THOMAS, M.G.; BIDNER, T.D.; PASCHAL, J.C.; FRANKE, D.E. Single nucleotide polymorphisms in Brahman steers and their association with carcass and tenderness traits. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 39-46, 2009.

SMULDERS, F.J.M.; MARSH, B.B.; SWARTZ, D.R.; RUSSELL, R.L.; HOENECKE, M.E. Beef tenderness and sarcomere length. **Meat Science**, Oxford, v. 28, n. 4, p. 349-363, 1990.

STEWART, M.; WEBSTER, J.R.; VERKERK, G.A.; SCHAEFER, A.L.; COLYN, J.J.; STAFFORD, K.J. Non-invasive measurement of stress in dairy cows using infrared thermography. **Physiology & Behavior**, Oxford, v. 92, n. 3, p. 520-525, 2007.

STEWART, M.; VERKERK, G.A.; STAFFORD, K.J.; SCHAEFER, A.L.; WEBSTER, J.R. Noninvasive assessment of autonomic activity for evaluation of pain in calves, using surgical castration as a model. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 93, n. 8, p. 3602-3609, 2010.

STOLOWSKI, G.D.; BAIRD, B.E.; MILLER, R.K.; SAVELL, J.W.; SAMS, A.R.; TAYLOR, J.F.; SMITH, S.B. Factors influencing the variation in tenderness of seven major beef muscles from three Angus and Brahman breed crosses. **Meat Science**, Oxford, v. 73, n. 3, p. 475-483, 2006.

STRYDOM, P.E.; FRYLINCK, L.; MONTGOMERY, J.L.; SMITH, M.F. The comparison of three β -agonists for growth performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot cattle. **Meat Science**, Oxford, v. 81, n. 3, p. 557-564, 2009.

STRYDOM, P.E.; HOPE-JONES, M.; FRYLINCK, L.; WEBB, E.C. The effects of a beta-agonist treatment, vitamin D 3 supplementation and electrical stimulation on meat quality of feedlot steers. **Meat science**, Oxford, v. 89, n. 4, p. 462-468, 2011.

TAKAHASHI, L.S.; BILLER, J.D.; TAKAHASHI, K.M. (Ed.). **Bioclimatologia zootécnica**. Jaboticabal: UNESP, 2009. 91 p.

TATUM, J.D.; SMITH, G.C.; BERY, B.W.; MURPHEY, C.E.; WILLIAMS, F.L.; CARPENTER, Z.L. Carcass characteristics, time on feed and cooked beef palatability attributes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 50, p. 833-840, 1980.

TAYLOR, R.G. connective tissue structure, function and influence on meat quality. **Encyclopedia of Meat Sciences**, Oxford, v. 1, p. 305-313, 2004.

TAYLOR, R.G.; GEESINK, G.H.; THOMPSON, V.F.; KOOHMARAIE, M.O.H.A.M.M.A.D.; GOLL, D.E. Is Z-disk degradation responsible for *postmortem* tenderization?. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 5, p. 1351-1367, 1995.

TERLOUW, E.M.C.; SCHOUTEN, W.G.P.; LADEWING, J. Physiology. In: APPLEBY, M.C.; HUGHES, B.O. **Animal welfare**. Wallingford: CABI Publ., 1997. chap. 10, p. 143-158.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B.H. **Principles of anatomy and physiology**. 12th ed. Danvers: Wiley, 2011. 1174 p.

TURNER, S.P.; NAVAJAS, E.A.; HYSLOP, J.J.; ROSS, D.W.; RICHARDSON, R.I.; PRIETO, N.; BELL, M.; JACK, M.C.; ROEHE, R. Associations between response to handling and growth and meat quality in frequently handled beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 12, p. 4239-4248, 2011.

VINKERS, C.H.; PENNING, R.; HELLHAMMER, J.; VERSTER, J.C.; KLAESSENS, J.H.; OLIVIER, B.; KALKMAN, C.J. The effect of stress on core and peripheral body temperature in humans. **Stress**, Abingdon, v. 16, n. 5, p. 520-530, 2013.

VOISINET, B.D.; GRANDIN, T.; O'CONNOR, S.F.; TATUM, J.D.; DEESING, M.J. *Bos indicus*-cross feedlot cattle with excitable temperaments have tougher meat and a higher incidence of borderline dark cutters. **Meat Science**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 367-377, 1997.

WARNER, R.D.; FERGUSON, D.M.; COTTRELL, J.J.; KNEE, B.W. Acute stress induced by the preslaughter use of electric prodders causes tougher beef meat. **Animal Production Science**, Clayton, v. 47, n. 7, p. 782-788, 2007.

WATANABE, A.; DALY, C.C.; DEVINE, C.E. The effects of the ultimate pH of meat on tenderness changes during ageing. **Meat Science**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 67-78, 1996.

WHEELER, T.L.; CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M. Effect of marbling degree on beef palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 12, p. 3145-3151, 1994.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M.E.; CROUSE, J.D.; HUNT, M.C.; KLEMM, R.D. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 68, n. 9, p. 2716-2728, 1990.

WICKS, J.C.; APAOBLAZA, A.; MATARNEH, S.K.; ENGLAND, E.M.; DUCKETT, S.; GERRARD, D.E. Understanding muscle growth and development and its effects on meat quality. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CIÊNCIA DA CARNE, 2., 2015, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: 5D Editora, 2015. p. 45-61.

WULF, D.M.; O'CONNOR, S.F.; TATUM, J.D.; SMITH, G.C. Using objective measures of muscle color to predict beef longissimus tenderness. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, n. 3, p. 684-692, 1997.

ANEXOS

Anexo A – Parecer da “Comissão de Ética no Uso de Animais”

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Fone: (19) 3429-4400
www4.esalq.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

PROTOCOLO N. 2014-35

PARECER

O projeto “A atividade relativa das isoformas de calpastatina determinam o processo de amaciamento da carne bovina proveniente de animais com grande participação *Bos indicus*” que tem como responsável o Prof. Eduardo Francisquine Delgado, foi examinado pela CEUA desta Escola em reunião de 23 de fevereiro de 2015.

Com base no protocolo experimental apresentado, a CEUA entende que os procedimentos serão realizados de forma a não ferir os princípios éticos na experimentação com animais.

Piracicaba, 23 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. José Fernando Machado Menten
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - ESALQ/USP

Anexo B – Parecer da “Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa”

COMISSÃO DE ÉTICA AMBIENTAL NA PESQUISA – ESALQ/USP

PARECER

Declaro que o Projeto Intitulado: “A atividade relativa das isoformas de calpastatina determinam o processo de amaciamento da carne bovina proveniente de animais com grande participação *Bos indicus*”, de responsabilidade do Prof. Eduardo Francisquine Delgado (LZT), está de acordo com os Princípios éticos Ambientais adotados das leis e decretos complementares (Lei 6.894/80, Lei 7.803/89, Lei 9.985/00, Lei 9.974/00, Decreto 99.556/90, Decreto 4.340/02, Instrução Normativa 169/2008, ABNT/NBR 10004:2004, Resolução ANVISA RDC 306/2004, Resolução 358/05) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas relativas aos assuntos ambientais pertinentes.

Piracicaba, 30 de janeiro de 2015.

Prof. Dr. Claudio Lima de Aguiar
Presidente – CEAP
ESALQ/USP

Este parecer exclui demais aspectos éticos que envolvam a utilização de animais de laboratório ou seres humanos, os quais são de competência das Comissões de Ética em Pesquisa com Animais e de Seres Humanos, respectivamente.