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

Diferença em proteólise *postmortem* entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*
pode estar associada à capacidade máxima respiratória mitocondrial

Patricia Maloso Ramos

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

Piracicaba
2017

Patricia Maloso Ramos
Zootecnista

Diferença em proteólise *postmortem* entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* pode
estar associada à capacidade máxima respiratória mitocondrial
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2017

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

Ramos, Patricia Maloso

Diferença em proteólise *postmortem* entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* pode estar associada à capacidade máxima respiratória mitocondrial / Patricia Maloso Ramos. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

77 p.

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

1. Acidificação 2. Bovino 3. Carne 4. Calpaína 5. Maciez 6. Metabolismo
7. Músculo 8. Oxidativo 9. Respiração I. Título

DEDICO este trabalho a TUDO que me inspira a continuar nesta jornada,
especialmente ao meu pequeno Enzo, que a cada dia cresce em beleza e
sabedoria, me dando razões para acreditar em um mundo melhor!

AGRADECIMENTOS

Primeiro, a toda minha família: meu filho Enzo, meus pais Pedro e Maria Lucia, meu irmão mais velho Pedro H. e sua esposa, Juliana, e meu irmão mais novo, Rafael. Essa família é um Time e eu me orgulho muito de fazer parte dele! Também às minhas tias, tios e primos, porque a presença deles aqui em Piracicaba e acompanhando meu processo fizeram ser mais fácil e divertido. Minha avó (*in memoriam*) que sempre me ajudou simplesmente se preocupando, perguntando e fazendo com que eu me sentisse importante. Ela não pôde ver este passo final, mas também me ensinou a deixar a vida com significado. Amo todos vocês!!!

Ao meu amigo e também orientador Eduardo F. Delgado. É difícil descrever o quão importante ele se tornou pra mim. Às vezes eu sinto como se sempre ele estivesse presente para ajudar, apoiar, conversar... mesmo quando ele não podia estar. Muito obrigada!

A minha nova família Gator e amigos Tracy e Jason Scheffler. A ajuda deles foi principalmente no final do doutorado, mas com uma importância fundamental. Sem eles, provavelmente eu estaria me sentindo menos importante do que me sinto agora e com certeza menos feliz também! Sou grata a toda família 'Gator Meat Science', especialmente Charlotte e Shelby. Quanto aprendizado, quanto acolhimento e cuidado! Obrigada! Agradeço também a Dra. Stephanie Wohlgemuth, por todo o ensinamento durante o período que estivemos juntas.

Aos meus colegas de laboratório no Brasil, Marcelo A. da Silva Coutinho, Daiane A. Fausto, Giuliana M. de Oliveira e Giancarlo Souza (pós-graduação) e Deborah, Lucas (graduação) por tudo, desde ajuda com a louça (como é difícil!) até as grandes tomadas de decisão. Vocês todos me ajudaram com meu trabalho, mas principalmente com meu crescimento. Eu aprendi com vocês a ser melhor em todos os sentidos que é possível crescer, amadurecer. Só agradeço!

Ao pessoal que trabalha no prédio, especialmente José Luiz e a Rose, porque eles também estavam sempre lá para conversar e para somar. Além disso, é ótimo chegar no trabalho e receber um bom dia, um sorriso, um conforto. Vocês são especiais e raros pra mim, obrigada.

Agradeço ao CNPq e a CAPES, por todo o aporte financeiro que permitiu que tudo se realizasse com a qualidade que exige o Program de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens da Esalq/USP e permitiu que minhas necessidades de sobrevivência (e pesquisa!) fossem sanadas/compradas. Agradeço também a Universidade da Flórida pelo investimento feito nesta pesquisa.

BIOGRAFIA

Eu nasci em 1984 em Piracicaba onde vivi até completar dezoito anos quando me mudei para iniciar o estudo superior na Universidade Estadual de Maringá. Após três anos no curso de Zootecnia e já com meu recém-nascido Enzo, decidi me mudar de volta para São Paulo para estar mais perto da família. Me formei em Zootecnia pela Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo – Pirassununga, SP – em 22 de dezembro de 2008. Quatro dias depois, assumi um cargo de ‘encarregada da rastreabilidade’ em uma fazenda de gado de corte na cidade de Horqueta, Concepcion, Paraguai. Permaneci no cargo por dois anos e uma das minhas responsabilidades era formular os relatórios de abate de bovinos cruzados Nelore x Simental para acompanhar os pagamentos feitos pelo frigorífico. Esse acompanhamento próximo com os frigoríficos e as dificuldades inerentes ao processo de acabamento das carcaças, manejo interno da fazenda, embarque, transporte, exigências dos mercados compradores etc., me impulsionaram a questionar. Em 2010, quando retornei a Piracicaba, os questionamentos me levaram a procurar respostas. Uma pergunta que me fazia era: será que a ciência resolve tais dilemas? Iniciei meu mestrado em Julho de 2011, terminei em Julho de 2013. Três dias depois, iniciei o doutorado. Eu ainda estou buscando respostas... mas agora eu sinto que estou começando a fazer as perguntas certas, ou pelo menos, as importantes! Vou continuar perguntando...

“Com certeza, existem muitas coisas desconhecidas, e muitas partes da ciência são especulativas, mas não há nada para se envergonhar ou desconsiderar. Certamente, toda ciência é provisória, e nós não estamos de forma alguma nem próximos do ponto de conhecer tudo. Mas quando as observações da natureza contradizem a teoria – não importa o quanto esta for referenciada, antiga ou popular – a teoria será sem nenhuma cerimônia abandonada, e a busca por uma nova e mais acurada teoria se intensificará. De fato, isso descreve o ponto no qual nós entendemos que nossos conhecimentos sobre mitocôndria estão: muitas teorias foram propostas, desafiadas, testadas, e ou elas se fortaleceram ou foram abandonadas. Isso é ciência: uma constante mudança de base de conhecimento.”

Lee Know, ND (Life: the epic story of our mitochondria), médico naturopata licenciado e premiado diversas vezes. Conhecido por seus pares por ser um empreendedor estratégico e de pensamento a frente de sua época, ele ocupou cargos como consultor médico, avaliador científico e diretor de pesquisa e desenvolvimento para importantes organizações médicas.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. QUALIDADE E MACIEZ DA CARNE DE ANIMAIS <i>BOS TAURUS TAURUS</i> E <i>BOS TAURUS INDICUS</i>	16
2.2. METABOLISMO ENERGÉTICO DO MÚSCULO <i>POSTMORTEM</i>	17
2.2.1. LACTATO DESIDROGENASE	18
2.2.2. CITRATO SINTASE	18
2.3. MITOCÔNDRIA, METABOLISMO ENERGÉTICO MUSCULAR E QUALIDADE DA CARNE	19
2.4. SISTEMA PROTEOLÍTICO E pH.....	22
2.5. DEGRADAÇÃO PROTEICA	24
2.5.1. TITINA E NEBULINA	24
2.5.2. ALFA-II-ESPECTRINA	27
2.5.3. DESMINA	25
2.5.4. TROPONINA-T.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. ANIMAIS E AMOSTRAGEM	27
3.2. PARÂMETROS DE CARCAÇA PARA RENDIMENTO E QUALIDADE	28
3.3. FORÇA DE CISALHAMENTO	28
3.4. ATIVIDADES DAS ENZIMAS LACTATO DESIDROGENASE E CITRATO SINTASE	29
3.5. EFICIÊNCIA MITOCONDRIAL POR RESPIRÔMETRO DE ALTA RESOLUÇÃO EM FIBRAS PERMEABILIZADAS.....	30
3.6. ANÁLISES DE ELETROFORESE.....	33
3.6.1. DEGRADAÇÃO DE TITINA E NEBULINA EM GEL DE AGAROSE	33
3.6.2. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA IMUNODETECÇÃO.....	34
3.6.2.1. AUTÓLISE DE μ -CALPAÍNA E DEGRADAÇÃO PROTEICA	35
3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
4. RESULTADOS	39
4.1. CARACTERÍSTICAS DOS TIPOS BIOLÓGICOS	39
4.2. ATIVIDADES DAS ENZIMAS GLICOLÍTICAS E DECLÍNIO DE pH DAS CARCAÇAS	40

4.3. RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL EM CÉLULAS MUSCULARES PERMEABILIZADAS	41
4.3.1. RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL BASE	41
4.3.2. RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL PELO COMPLEXO I	41
4.3.3. RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL PELOS COMPLEXOS I E II	43
4.3.4. VAZAMENTO DE PRÓTONS NA RESPIRAÇÃO DESACOPLADA	43
4.3.5. SISTEMA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS MITOCONDRIAL	44
4.3.6. RAZÃO DE CONTROLE DE ACOPLAMENTO	46
4.4. AUTÓLISE DE μ -CALPAÍNA	48
4.5. DEGRADAÇÃO DA TITINA E NEBULINA	49
4.6. DEGRADAÇÃO DA ALFA-II-ESPECTRINA	51
4.7. DEGRADAÇÃO DA DESMINA	52
4.8. DEGRADAÇÃO DA TROPONINA-T	53
5. DISCUSSÃO	57
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
7. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	71

RESUMO

Diferença em proteólise *postmortem* entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* pode estar associada a capacidade máxima respiratória mitocondrial

O tipo biológico influenciado pela genética *Bos taurus indicus* garante maior adaptação aos animais em regiões com altas temperaturas, no entanto exibe alguns atributos de carcaça e associados à palatabilidade da carne inferiores quando comparados ao tipo biológico predominantemente *Bos taurus taurus*. Existe a hipótese de que tais diferenças estejam associadas ao conteúdo mitocondrial na musculatura destes animais. Objetivou-se avaliar as diferenças no metabolismo oxidativo, pela medida de respiração mitocondrial em fibras permeabilizadas submetidas a duas temperaturas (38,5 e 40 °C) utilizando respirômetro de alta resolução (Oroboros Instruments), do *Longissimus lumborum* imediatamente após abate, entre os tipos biológicos Brahman e Angus com taxa e extensão da proteólise distintas ao longo de 14 dias de maturação. Foram investigadas as atividades enzimáticas de lactato desidrogenase e citrato sintase, pH, bem como autólise de μ -calpaína e degradação de proteínas miofibrilares de 18 animais das raças Brahman (6), Brangus (6) e Angus (6). A taxa de acidificação das carcaças foi diferente entre os tipos biológicos ($P = 0,049$) e entre os tempos *postmortem* ($P < 0,001$), sendo que as carcaças dos animais Brahman às 6h *postmortem* apresentaram pH tão alto quanto as carcaças de Brangus e Angus às 3h *postmortem*. A atividade de citrato sintase 1h *postmortem* também foi diferente ($P = 0,086$) entre os tipos biológicos, sendo que maior atividade ($P = 0,075$) foi identificada em Brahman comparado a Brangus. O fluxo de consumo de oxigênio mitocondrial no estado 4 (ST4_O), apresentou interação ($P = 0,050$) entre os tipos biológicos e temperatura, assim como a respiração mitocondrial do sistema de transporte de elétrons desacoplado da produção de ATP ($P = 0,047$), ambos superiores para Brahman a 38,5 °C na comparação entre tipos biológicos. Todavia, ocorreu uma queda da ST4_O, apenas para os animais Brahman, quando a temperatura foi aumentada. A maior resistência a acidificação e maior respiração mitocondrial imediatamente após o abate para o tipo biológico Brahman, foram acompanhadas pela redução ($P = 0,058$) da autólise completa de μ -calpaína às 24h *postmortem*. A degradação da titina após 7d de maturação foi reduzida ($P = 0,056$) e se manteve menor ($P = 0,003$) aos 14d para Brahman comparado aos outros tipos biológicos. O aparecimento da banda 150 kDa da alfa-II-espectrina às 24h *postmortem* também é menor ($P = 0,011$) para Brahman, assim como a degradação da desmina ($P = 0,019$) e troponina-T ($P = 0,001$). As duas últimas proteínas tiveram sua degradação reduzida ao longo dos 14d *postmortem* para este tipo biológico. Portanto, o tipo biológico Brahman tem um mecanismo muscular adaptativo que envolve maior conteúdo mitocondrial, com maior vazamento de prótons pelo sistema de transporte de elétrons e que pode estar relacionado a redução da taxa de ativação da μ -calpaína, redução da degradação proteica e, consequentemente, a redução da taxa e da extensão do amaciamento da carne destes animais.

Palavras-chave: Acidificação; Bovino; Carne; Calpaína; Maciez; Metabolismo; Músculo; Oxidativo; Respiração

ABSTRACT

Difference in *postmortem* proteolysis between *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* can be associated to mitochondrial respiratory maximum capacity

Biological type influenced by *Bos taurus indicus* ensures higher animals adaptation to warm environment, however exhibit less desirable carcass and palatability traits when compared to predominant *Bos taurus taurus* biological types. There is a hypothesis that muscle mitochondrial content is associated with those differences. It was aimed to evaluate the oxidative metabolism, measuring mitochondrial respiration in permeabilized fibers submitted to two temperatures (38.5 and 40 °C) using high resolution respirometry (Oroboros Instruments), in *Longissimus lumborum* immediately after slaughter between biological types Brahman and Angus with different proteolysis rate and extension during 14d aging. Were investigated lactate dehydrogenase and citrate synthase activities, pH, as well as μ -calpain autolysis and protein degradation between 18 animals from breeds Brahman (6), Brangus (6) and Angus (6). The carcass pH decline is different between biological types ($P = 0.049$) and between time *postmortem* ($P < 0.001$), with Brahman carcasses showing pH at 6h *postmortem* as high as Brangus and Angus pH at 3h *postmortem*. Citrate synthase activity 1h *postmortem* is different ($P = 0.086$) between biological types, with Brahman showing higher ($P = 0.075$) values than Brangus animals. The mitochondrial oxygen flux consumption at state 4 (ST4_O) showed interaction ($P = 0.050$) between biological types and temperature, as well as respiration for electron transport system uncoupled from ATP production ($P = 0.047$), both higher for Brahman at 38.5 °C in biological types comparison. However, decreased ST4_O was observed only for Brahman animals when temperature was increased. Higher resistance to pH decline and higher mitochondrial respiration after slaughter to Brahman cattle were followed by reduced ($P = 0.058$) complete μ -calpain autolysis at 24h *postmortem*. Titin degradation after 7d aging was reduced ($P = 0.056$) and kept lower ($P = 0.031$) after 14d to Brahman when compared to other biological types. The 150 kDa band from alpha-II spectrin degradation at 24h *postmortem* is lower ($P = 0.011$) to Brahman, as well as desmin degradation ($P = 0.019$) and troponin-T ($P = 0.001$). Desmin and troponin-T had its degradation reduced extended until 14d aging for this biological type. Therefore, Brahman biological type has an adaptive muscular mechanism that involves higher mitochondrial content, with higher proton leak in electron transport system and that can be related with reduced rate for μ -calpain activation, reduced protein degradation and, consequently, reduced rate and extension to beef tenderization for these animals.

Keywords: Acidification; Bovine; Calpain; Meat; Metabolism; Muscle; Oxidative; Proteolysis; Respiration

1. INTRODUÇÃO

A Ciência Animal ou Zootecnia é relativamente recente em termos de cursos de graduação oferecidos no Brasil, sendo que em 2016 foi comemorado os 50 anos da criação do primeiro curso, no Rio Grande do Sul. No entanto, a arte de domesticar e criar animais é tão antiga que foi registrada pelos homens antes mesmo da escrita, em desenhos, os quais retratam a convivência entre homens e animais seja como predador e presa, e, posteriormente, como companheiros, condição provavelmente impulsionada pela necessidade mútua de sobrevivência. Domesticar animais permitiu aos homens se estabelecerem em um mesmo local por mais tempo e marca uma importante transição entre o modo de vida humano, de caçadores/coletores e nômades para a formação de civilizações autônomas, organizadas, que passam a produzir seu próprio alimento, alimentar seus animais e os criar tanto para auxiliar no trabalho, como para servir de alimento ou companhia. Portanto, a história da criação de animais, descrição de suas características, exigências nutricionais e ambientais, relacionais, sempre com intuito de mantê-los sadios e produtivos, é uma ciência que encontra-se registrada pela humanidade em muitas épocas.

Os registros científicos sobre os animais começam a ser relevantes para a ciência animal atual com a escola Liceu de Aristóteles, na Macedônia. Por meio destes registros é possível compreender o impacto que Aristóteles (384 a 322 a.C.) tem na edificação da história das ciências naturais, que pode ser evidenciado nas pesquisas atuais. Na época destes escritos, o convívio humano com os animais experimenta uma fase investigativa, na qual conhecer os animais torna-se fundamental. A descrição de sua anatomia inspira teorias sobre a ‘dinâmica’ da vida na Terra, mas sempre contextualizada pelos conceitos de essencialismo, fixismo e finalismo, princípios aristotélicos. A relação entre forma-função de um órgão, por exemplo, é estabelecida nesta época. Essa visão passará por uma transição após a interferência da Igreja, através de Alberto Magno (1193 – 1280) e posteriormente Thomas de Aquino (1225 – 1274), mas sobrevive por muito tempo no campo das ciências naturais. Na Universidade de Pádua, uma das mais antigas do mundo (estabelecida em 1222), Galileu Galilei (1564 – 1642) prestou uma importante contribuição no direcionamento desta ciência, influenciando a formação de William Harvey (1578 – 1657), John Ray (1627 – 1705), William Paley (1743 – 1805) e Jean-Baptiste Lamarck (1744 – 1829) que são referências importantes para os estudos de Charles Darwin (1809 – 1882). O estudo sobre a transição entre o teleologismo aristotélico¹ e a ciência natural como entendemos atualmente, no contexto evolutivo de Darwin, fornece importante base científica para o avanço da ciência animal.

¹Por teleologismo aristotélico, entende-se que faz referência a ideia ‘a finalidade explica a existência’.

Enquanto para Aristóteles a natureza é sábia e perfeita, nada faz em vão (*Natura nihil frustra facit*) e o estudo das ‘monstruosidades’ é considerado perda de tempo (Solinas, 2015), é nas ‘monstruosidades’ aristotélicas que Darwin encontrará subsídios para construir a teoria da evolução. A luz da domesticação dos animais como um acelerador à seleção natural, os princípios genéticos começam a ser traçados por Darwin, com relatos de ‘ganho em vigor constitucional’ no acasalamento de indivíduos ‘da mesma variedade’ que, para algumas espécies, supera os problemas relacionados ao aparecimento de anomalias. Para raças bovinas, a observação do aparecimento de anomalias é muito mais lenta quando comparadas a raças de pombos, por exemplo. Um dos casos mais interessantes do ‘ganho em vigor constitucional’, foi observado na raça Shorthorn:

“... o famoso touro Favorito (que era filho de meio-irmão e irmã de Foljambe) foi acasalado com sua própria filha, neta, bisneta; então o produto da última união, ou a tataraneta, tinha 93,75% de sangue do Favorito. Foi acasalada com um touro chamado Wellington que tinha 62,5% de sangue do Favorito e produziu Clarissa. Clarissa por sua vez foi acasalada com outro touro Lancaster, com 68,75% do mesmo sangue e produziu prole valiosa. Mesmo assim, Collings, quem criou estes animais, cruzou seu estoque com um Galloway e as vacas fruto desse cruzamento alcançaram os preços mais altos.” (Fonte: Darwin, pág. 118)

O ganho genético aditivo de cruzamentos entre subespécies é atualmente foco da atenção de muitos zootecnistas. Adicionalmente vale destacar que, com o avanço das técnicas de melhoramento genético e identificação da hereditariedade das características fenotípicas de interesse, a seleção de indivíduos superiores exerce papel central na determinação do fenótipo da progênie. Para a indústria de carne bovina movimenta importante volume de recursos, determina produtividade e qualidade de produto final. Darwin conhecia esta realidade e a registrou:

“Como Mr. Spooner me escreveu: cruzamentos entre raças distintas certamente melhoram o gado para o açougueiro.”
(Fonte: Darwin, pág. 118)

O interesse econômico de ser criador de determinada raça, na época de Darwin, provocava um certo mal estar entre os criadores ao inserir sangue de outra subespécie e/ou família, no entanto, eles sabiam desta necessidade. Apesar da falta de valor de animais cruzados para criadores de raça, relatos de cruzamentos de animais enviados ao abate na Inglaterra, com reconhecimento pela quantidade de cobertura de gordura desse tipo biológico foram feitos por

Darwin. A redução da fertilidade de animais puros, ou silvestres confinados em um mesmo ambiente por anos, também era uma preocupação.

É evidente que as ‘anomalias’ relatadas por Darwin se restringiam à inabilidade reprodutiva dos animais ou em grandes alterações morfológicas, que eram facilmente percebidas pelos criadores e, portanto, excluídas do rebanho. No entanto, ele conhecia que existia um grupo de alterações acumuladas que, segundo ele ‘são de difícil detecção e acumulam lentamente’, e que hoje preocupam os cientistas. Na área de qualidade da carne, o mecanismo fisiológico de transformação de músculo em carne entre subespécies, como no caso da raça Angus e da raça Brahman, determina diferenças importantes no amaciamento e, potencialmente se relacionam com estas ‘pequenas alterações de difícil percepção’, mencionadas por Darwin. Apesar de avanços importantes na área, ainda é patente a atribuição da maior ocorrência de carne menos macia aos animais da raça Brahman, quando comparados a raça Angus, assim como a carne de seu cruzamento é valorizada (Brangus).

Como o ambiente evolutivo entre essas subespécies apresenta inúmeras diferenças, destacando-se ambientais (temperatura) e nutricionais (quantidade de energia da dieta quando em pastagens nativas), é possível que mecanismos adaptativos possam ter evoluído e, potencialmente, se relacionam ao metabolismo muscular *postmortem*. O processo de transformação de músculo em carne envolve o mecanismo de resposta celular ao estresse. Dessa forma, apesar de produtivos e adaptados, a raça Brahman pode ser composta por um número maior de indivíduos adaptados a eventos estressantes de tal forma, que provoca impacto negativo no amaciamento da carne.

A principal estrutura celular que se relaciona com tantos diferentes aspectos biológicos nos bovinos, em termos de uso de energia e resposta ao estresse, é a mitocôndria. A plasticidade mitocondrial garante o uso de energia eficiente e adequação ao meio no qual se insere. Um importante exemplo disso são as diferenças fenotípicas entre mitocôndrias de fibras musculares oxidativas e glicolíticas, sendo que para as últimas a necessidade de adaptação aos altos níveis intracelulares de cálcio e, conseqüentemente, maior tempo de retenção de cálcio na matriz mitocondrial, com retardamento na abertura dos poros de permeabilidade, moldou sua disposição espacial (Picard, Hepple e Burelle, 2012). Essa adaptação tecido ou célula-dependente mostra claramente que a plasticidade mitocondrial pode ser avaliada em diversos aspectos.

Outra importante evidência sobre a plasticidade mitocondrial pode ser verificada em um estudo interessante sobre a morfologia mitocondrial do tecido adiposo marrom de bezerros de diferentes raças. O uso de energia para produção de calor é diferente entre os bezerros, sendo que a desorganização das cristas mitocondriais está relacionada à baixa eficiência na produção de calor. As alterações na morfologia mitocondrial são perceptíveis:

Figura 1. Mitocôndria do tecido adiposo marrom de bezerros Angus (esquerda) e Brahman (direita) exibindo cristas mais finas e menos extensas. (Fonte: Martin et al., 1999)

Neste contexto, os cientistas da carne estão atentos às potenciais diferenças entre respostas celulares ao estresse inerente ao abate que potencialmente se relacionam com prejuízos à maciez e/ou coloração, principalmente aqueles relacionados à acidificação deficiente pela redução na formação de lactato e liberação de íons H^+ (pH final elevado), retenção de água e aspectos sanitários, uma vez que estas características determinam a aceitação do produto final pelos consumidores. Em trabalho recente realizado nos Estados Unidos, uma grande quantidade (320) de carcaças bovinas de diferentes raças foi classificada de acordo com a ocorrência de problema de coloração e relacionada a quantidade e eficiência mitocondrial. Os resultados apontam que as carcaças classificadas como ‘severamente escuras’ têm maior abundância mitocondrial do que aquelas classificadas como ‘menos escuras’ ou o controle (não escuras). O trabalho também mostrou que a coloração escura está associada a maior concentração de mioglobina, menor eficiência mitocondrial medida pela maior produção de peróxido de hidrogênio, e que, tais condições estão combinadas com a depleção de glicogênio, potencializando o escurecimento dos bifes (McKeith et al., 2016). A relação entre a ocorrência de carne escura e maciez foi alvo de intenso estudo, porém a descrição dos metabolismos celulares que levam a formação dos problemas, não. Assim como também são poucos os estudos que relatam associação entre eficiência mitocondrial, taxa e extensão do amaciamento da carne, e impactos na proteólise miofibrilar.

Dessa forma, o presente trabalho procura investigar a existência de associação entre a respiração mitocondrial *postmortem* do *Longissimus lumborum* e o processo de ativação e autólise da μ -calpaína na determinação do amaciamento da carne maturada por 7 e 14 dias proveniente de animais de diferentes tipos biológicos (Brahman, Brangus e Angus).

A hipótese estabelecida é a de que animais Brahman apresentam alteração no metabolismo mitocondrial associada a maior resistência de acidificação e a proteólise *postmortem* tardia quando comparada aos tipos biológicos Brangus e Angus.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Maciez é um dos atributos mais importantes para definir qualidade da carne e garantir aceitação pelos consumidores. Esse é o motivo pelo qual se mantém no foco dos cientistas por tantos anos, sendo que algumas importantes questões relacionadas às diferenças de maciez entre subespécies já foram estabelecidas. Destaca-se a contribuição da maior atividade inibitória de calpastatina sobre as calpaínas, com consequente redução do amaciamento, com impacto maior para animais *Bos taurus indicus* (Wheeler et al., 1990a; Whipple et al., 1990a; Shackelford et al., 1991; Pringle et al., 1997; 1999). Todavia, muitos processos interrelacionados e importantes na determinação do amaciamento, com impacto decisivo na taxa e extensão da proteólise, ainda são objeto de estudos. Recentemente, a contribuição mitocondrial para o amaciamento da carne bovina passou a ganhar atenção dos cientistas, principalmente pela sua função de produção de energia suficiente que será utilizada pela célula muscular no processo de conversão de músculo em carne, assim como na regulação dos níveis intracelulares de cálcio durante desintegração, iniciando mecanismos apoptóticos e potencialmente contribuindo para oxidação proteica. Durante esse processo, a energia disponível é determinante para definir a taxa de queda de pH, que por sua vez também se relaciona a outro aspecto definidor de compra, que é a coloração. Mitocôndrias pouco eficientes (com maior produção de peróxido de hidrogênio) foram relacionadas a bifes com pH alto às 36 horas *postmortem* e coloração escura (McKeith et al., 2016).

O processo de conversão de músculo em carne é resultado de transformações fisiológicas musculares que pode ser afetado por diversos fatores, como a dieta dos animais (Rowe et al., 2004a), o estresse imediatamente anterior ao abate (Ferguson e Warner, 2008), assim como a condição individual ou as diferenças de temperamento animal em situações estressantes (King et al., 2006). Outros fatores como ritmo de crescimento, idade e categoria animal (Purchas, Burnham e Morris, 2002), diferentes características metabólicas musculares (Stolowski et al., 2006) e a cobertura de gordura das carcaças associada ao processo de resfriamento nas câmaras (Savell, Mueller e Baird, 2005) são também potenciais definidores deste processo. Portanto, os fatores somados ou avaliados individualmente são potenciais interferências no amaciamento e, consequentemente, produzem carne de maciez variável, mesmo se o manejo dos animais e o abate forem sob as mesmas condições. Essa diversidade de fatores e a complexa relação entre eles, interferem na proteólise miofibrilar e no entendimento dos processos, tornando o tema desafiador. Não menos importante é a contribuição genética do animal, que pode ter impacto na definição da velocidade ou taxa dos mecanismos fisiológicos.

2.1. Qualidade e maciez da carne de animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*

A carne proveniente de animais taurinos é considerada de qualidade superior quando comparada a de animais zebuínos, pela avaliação do sistema de qualidade norte-americano (USDA Quality Grade), no qual há penalização principalmente pela ausência de gordura intramuscular nos bifes. Os cruzamentos com touros *Bos indicus* (Brahman e Sahiwal) resultaram nos menores valores de gordura intramuscular e piores classificações de qualidade para todos os pontos de terminação avaliados (Koch, Dikeman e Crouse, 1982). Vale ressaltar que, a maciez sensorial e instrumental da carne desses animais também é reduzida, mas não está intrinsecamente relacionada à marmorização. Esta constatação foi observada em estudo com avaliação de 1.667 animais de composições raciais diversas, bem como diferentes categorias animais, mas abatidos com idade semelhante, no qual a contribuição da marmorização na redução da maciez instrumental é pequena para todos os genótipos. Além disso, apenas 5% da variação da palatabilidade pode ser explicada pelo aumento da marmorização, com aumento da percepção geral de maciez por painel sensorial treinado para animais *Bos taurus*, sendo que para animais com alguma contribuição genética de *Bos indicus* o aumento não é suficiente para atingir o limite mínimo de aceitação da carne (Wheeler, Cundiff e Koch, 1994). Ou seja, a gordura intramuscular em animais com contribuição genética *Bos indicus* não resolve a percepção geral de carne menos macia para os padrões do mercado norte-americano.

Outro sistema de classificação de padrões de qualidade da carne, mas que envolve avaliação dos animais como diferentes tipos biológicos, é o sistema australiano (Meat Standard Australia - MSA). Neste sistema, o desconto de pontos é feito pela presença do cupim nos animais, considerando assim uma característica intrínseca ao tipo biológico. Na avaliação de 8 diferentes genótipos produzidos no cruzamento terminal entre diversos tipos biológicos com matrizes Brahman, os animais puros Brahman foram os únicos a não se enquadrar nos requisitos mínimos de qualidade propostos pelo MSA (Schutt et al., 2009).

No Brasil, a qualidade da carne ainda está muito atrelada a aspectos sanitários. Apesar de existir instrução normativa (009/04) que aprova o Sistema Brasileiro de Classificação de Carcaças Bovinas, a classificação de qualidade bem como a disponibilidade de marcas de carne que preconizam qualidade estão atreladas as raças bovinas e associações dos criadores destas raças. Portanto, existe demanda para carne de qualidade, no entanto, baixa oferta. Por outro lado, a grande produção de carne ainda está baseada em animais com grande contribuição genética da raça zebuína Nelore, que é responsável pela formação da base do rebanho nacional. Este tipo biológico foi escolhido pela alta adaptabilidade climática, bem como eficiência produtiva a pasto e resistência parasitária. No entanto, a carne proveniente de animais desta raça apresenta menor efetividade no processo de amaciamento exigindo longos períodos de maturação (21d) para atingir valores de

maciez considerados satisfatórios (O'Connor et al., 1997). Outra importante questão é a alta demanda de carne a custo baixo pelo mercado consumidor brasileiro, fato que dificulta a adoção, pela indústria frigorífica, de técnicas simples de amaciamento, como a maturação. Dessa forma, grande parte do produto que está à disposição dos consumidores, se não atrelado a marca de qualidade e custo maior, apresenta grande variação quanto a maciez, que é considerada insatisfatória. A qualidade da carne produzida nas condições brasileiras pode ser considerada como um ponto fraco para a indústria de carne nacional (Ferraz e Felício, 2010), sendo que existe percepção do mercado consumidor interno quanto às diferenças de maciez e há valorização de carnes macias (Delgado et al., 2006). Desvendar quais são as principais diferenças metabólicas entre as subespécies e determinantes dos cenários de amaciamento pode contribuir para busca de meios para disponibilização ao mercado consumidor do produto brasileiro de uma carne com atributos de qualidade em níveis consistentemente satisfatórios.

2.2. Metabolismo energético do músculo *postmortem*

No processo de conversão de músculo em carne, a acidificação natural que ocorre durante as primeiras 24 horas *postmortem* pode ter impacto decisivo na determinação da taxa e extensão da proteólise. O processo é dependente de concentrações musculares de glicogênio, bem como de atividades enzimáticas para sua utilização. Também depende da redução gradativa da perfusão de oxigênio, queda de temperatura e pH concomitante a crescente concentração intracelular de cálcio para ativação das calpaínas. O processo de anaerobiose que segue após a sangria dos animais, promove uma mudança entre metabolismo oxidativo a glicolítico exclusivo que pode ter impacto diferenciado entre as fibras musculares e, potencialmente, entre as subespécies.

O glicogênio no momento do abate, denominado inicial, é substrato para o processo de acidificação que ocorre durante o processo de *rigor mortis*, com sua conversão anaeróbia a lactato para produção de ATP, cuja quebra resulta na produção de íons H^+ . Essa acidificação pode ser avaliada pela medida de pH às 24 horas *postmortem* (também chamado pH final) que é utilizado em alguns frigoríficos como critério que determina a qualidade da carne e indica tomadas de decisão para processamentos futuros (Apaoblaza et al., 2015). O conteúdo de glicogênio muscular pode ser influenciado pela dieta do animal, sendo que o uso de concentrado em dietas pré-abate de bovinos pode ser capaz de reduzir a depleção do glicogênio e consequentemente a ocorrência de pH elevado (Immonen et al., 2000). Dessa forma, quando a reserva de glicogênio muscular pré-abate em bovinos está abaixo do limite mínimo de 45-55 mmol/kg, o pH final considerado adequado para carne (5,5-5,6) não será atingido (Howard, 1963; Tarrant, 1989). Para *Longissimus* de bovinos com cenários de acidificação diferenciados, a atividade da enzima glicogênio fosforilase

aumenta do tempo 0 para 24 horas *postmortem* apenas na condição onde observa-se pH final considerado normal, enquanto a atividade da enzima desramificadora do glicogênio aumenta no tempo tanto em pH ideal como anormal ($>5,9$; Apaoblaza et al., 2015). Portanto, o declínio deficiente do pH pode ter impacto direto na disponibilidade de glicose-1-fosfato e reduzir a taxa de glicólise imediatamente após o abate.

2.2.1. Lactato desidrogenase

Na ausência de oxigenação muscular após o abate, o aumento das concentrações de glicose-1-fosfato proveniente da glicogenólise estimula a glicólise citosólica até piruvato, que é então reduzido a lactato pela ação da lactato desidrogenase (Bender e Mayes, 2015). O acúmulo de lactato nas células musculares *postmortem*, bem como dos íons H^+ , reduzem o pH que terá impacto central na determinação das características sensoriais da carne, principalmente pela sua contribuição na determinação da capacidade de retenção de água. Por ser um mecanismo anaeróbio, é esperado que as musculaturas com maior contribuição de fibras rápidas e glicolíticas, apresentem maior atividade de lactato desidrogenase. De fato, a maior atividade de miosina ATPase, que promove contrações mais vigorosas e típicas de musculatura glicolítica, está relacionada a um aumento de atividade de lactato desidrogenase (Talmant e Monin, 1986). A atividade da lactato desidrogenase é um indicador importante da contribuição do metabolismo glicolítico à musculatura e está relacionada ao aumento da taxa de acidificação *postmortem*, bem como tem impacto na determinação do pH final. Em bovinos, no músculo *Longissimus thoracis*, que em média tem $27,9 \pm 8,9$ % de contribuição de miosina tipo I (oxidativa), o aumento da atividade de lactato desidrogenase é inversamente correlacionado ao valor de pH final medido às 24 horas *postmortem* (Serra et al., 2004). Portanto, quanto mais glicolítica é a musculatura, menores valores de pH final são esperados.

2.2.2. Citrato sintase

Porém, existe um período inicial no processo *postmortem* no qual ainda há a presença de oxigênio. Durante este período, a crescente disponibilidade de glicose-1-fosfato estimula a glicólise até a produção de piruvato, que será incorporado à matriz mitocondrial. O piruvato é submetido a descarboxilação oxidativa a acetil-CoA, que em presença de oxaloacetato e água, pela ação da citrato sintase, produzirá ácido cítrico e possibilitará a continuidade do ciclo até a produção de ATP (Bender e Mayes, 2015).

A atividade de citrato sintase difere de acordo com o metabolismo muscular, sendo que musculaturas com menores taxas de atividade da miosina ATPase ou mais oxidativas, estão relacionadas a um aumento de atividade de citrato sintase e uma maior resistência a variações de

pH (Talmant e Monin, 1986). Entre animais de mesma raça submetidos a diferentes tipos de sistemas alimentares, a composição das fibras musculares do *Longissimus dorsi* apontam para uma transição metabólica adaptada às exigências físicas e confirmadas pela maior atividade de citrato sintase para os animais em sistema extensivo comparados a bovinos confinados (Vestergaard, Oksbjerg e Henckel, 2000). Portanto, o metabolismo muscular está diretamente relacionado a atividade de citrato sintase, que é um indicador do conteúdo mitocondrial nas células musculares.

2.3. Mitocôndria, metabolismo energético muscular e qualidade da carne

Apesar de existirem poucas evidências atualmente a respeito da contribuição mitocondrial na definição do cenário de acidificação inicial *postmortem* e consequentemente com impacto no processo de conversão muscular à carne, para algumas espécies o crescente número de pesquisas na área apontam para uma contribuição determinante. Para bovinos, a investigação é necessária.

Em um sistema *in vitro* que representa o metabolismo *postmortem*, o conteúdo mitocondrial influencia o declínio de pH e consequentemente o metabolismo (Scheffler et al., 2015). Além disso, com o advento de técnicas como a proteômica surgem evidências como a grande quantidade de proteínas das membranas interna e externa da mitocôndria relacionadas a maior ocorrência de bifes macios ou às melhores taxas de amaciamento que, além de demonstrarem que a degradação extensiva mitocondrial inicial potencialmente relaciona-se a apoptose, também indicam que potencialmente há uma contribuição desta organela para a definição de processos proteolíticos *postmortem* (Laville et al., 2009; Bernevic et al., 2011; Longo et al., 2015);

A mitocôndria é uma organela celular particularmente interessante conhecida como a ‘casa de força’, responsável pela produção aeróbia de ATP, tendo seu próprio DNA e alta plasticidade. Como um organismo independente pode ser isolada dos tecidos e se manterá funcional em meios com substrato, mas as relações que estabelece com as células nas quais se insere são de particular interesse, dentre as quais destaca-se aquela estabelecida no processo de biogênese mitocondrial induzido pela atividade contrátil das células musculares (Hood, 2001). Algumas das relações mitocôndria-miofibras podem ser preservadas pela técnica de permeabilização das miofibras, principalmente relacionadas a interação funcional entre mitocôndrias e retículo sarcoplasmático (Kuznetsov et al., 2008). Além disso, é possível através desta técnica avaliar os diferentes estágios da respiração pela adição sequencial de substratos e inibidores dos complexos mitocondriais. A produção de ATP pela via aeróbia das miofibras sustenta contrações musculares por longos períodos, típicas de musculaturas oxidativas *in vivo*.

O complexo mitocondrial I, ou a NADH desidrogenase, catalisa simultaneamente a transferência exergônica de um íon hidreto do NADH e um próton da matriz à ubiquinona (Q),

assim como a transferência endergônica de quatro prótons da matriz para o espaço intermembranas (Figura 2). A transferência do elétron do centro ferro-enzofre do complexo I para Q pode ser inibida pela adição de rotenona. O ubiquinol, forma reduzida da ubiquinona, difunde-se pela membrana interna da mitocôndria do complexo I ao III, onde é oxidado a Q com a concomitante movimentação de prótons da matriz. O complexo II, ou succinato desidrogenase (única enzima do ciclo de Krebs ligada à membrana interna mitocondrial), catalisa a oxidação de succinato à fumarato, sendo a Q o receptor final de elétrons (Nelson e Cox, 2006).

Figura 2. Modelo quimiosmótico proposto por Peter Mitchell. Nesta representação simplificada da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria, os elétrons do NADH e outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de transportadores arranjados assimetricamente na membrana interna. O fluxo de elétrons é acompanhado por uma transferência de prótons através da membrana produzindo um gradiente químico (ΔpH) e um gradiente elétrico ($\Delta\psi$). A membrana interna da mitocôndria é impermeável aos prótons e eles podem voltar à matriz somente através de canais específicos para prótons (F_0). A força próton-motriz que impulsiona os prótons de volta para a matriz propicia a energia para a síntese de ATP que é catalisada pelo complexo F_1 associado a F_0 (Fonte: capítulo 19, figura 19-17; Nelson e Cox, 2006).

O complexo III, ou ubiquinona:citocromo c oxidorreductase, acopla a transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo c, com transporte de prótons para o espaço intermembranas. O uso de antimicina A inibe o complexo III e impede o fluxo de elétrons, interrompendo a respiração e produção de ATP. Finalmente, o complexo IV, também conhecido como citocromo oxidase, transporta dois elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, reduzindo-o a água, sendo que há concomitante transferência de prótons ao espaço intermembranas. Neste processo, não é desejável a geração de intermediários não completamente reduzidos, tais como peróxido de hidrogênio ou radicais hidroxilas livres, que devem permanecer ligados ao complexo IV até serem convertidos a água (Nelson e Cox, 2006).

O acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas miofibras está relacionado a uma resposta ao estresse, como acontece no cenário *postmortem*. O acúmulo do peróxido de hidrogênio neste

processo também indica uma redução gradativa da funcionalidade mitocondrial. A recente observação de que bifes classificados como severamente escuros, com base em altos valores de pH às 36 horas *postmortem*, está associado a um aumento de população mitocondrial considerada menos eficiente pela medida de maior produção de peróxido de hidrogênio (McKeith et al., 2016), levanta importante questionamento sobre o impacto das mitocôndrias na determinação dos atributos de qualidade da carne nos primeiros momentos pós-abate.

De forma alinhada, algumas questões de eficiência mitocondrial diferenciada entre subespécies são levantadas. De fato, existem algumas evidências de que animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* diferem quanto a mobilização das reservas de lipídeos. Bezerros Angus e Brahman apresentaram diferentes morfologias mitocondriais no tecido adiposo marrom que foram apontadas como determinantes para reduzir a habilidade de produção de calor para os bezerros Brahman que, em contrapartida, apresentaram um maior número de receptores β -adrenérgicos (Martin et al., 1999). Tais receptores, determinam uma maior capacidade de mobilizar as reservas de lipídeos (Moystin et al., 1993; Godfrey et al., 1991). Portanto, bezerros Brahman contrariam com maior capacidade de mobilizar lipídeos e menor habilidade de produção de calor. Provavelmente isso se deve a uma incompleta oxidação dos ácidos graxos pela via β -oxidação. Se é verdadeiro para tecido adiposo, o questionamento que surge é sobre as diferenças potenciais entre mitocôndrias no tecido muscular estriado esquelético.

Neste sentido, um estudo interessante e ainda em fase de conclusão (comunicação pessoal em aula, Dr. David E. Gerrard), mostrou que com o desligamento do gene OGT (UDP-N-acetilglicosamina—peptídio N-acetilglicosaminiltransferase) em células estriadas esqueléticas de camundongos, a produção do sensor de nutriente (UDP-GlcNAc; Uridina difosfato N-acetilglucosamina) é interrompida, o que significa que as células musculares não eram capazes de perceber os nutrientes extracelulares, assemelhando-se à uma condição de subnutrição. Como resultado desta deficiência, estes camundongos apresentaram uma redução drástica de gordura corporal, maior habilidade de mobilizar lipídeos mas uma β -oxidação incompleta, apesar de um aumento do conteúdo mitocondrial no músculo. Além disso, apresentaram maiores temperaturas corporais e de produção de gás carbônico em estado de repouso. A possível explicação apontada pelos autores estaria relacionada ao aumento de expressão de uma proteína que regula a fissão mitocondrial (Drp1 – dynamin related protein 1). Na ausência da percepção dos nutrientes, a expressão da proteína Drp1 foi aumentada, e consequentemente a fissão mitocondrial, como uma tentativa de recuperar a homeostase energética muscular. Portanto, o maior conteúdo mitocondrial muscular pode estar relacionado a uma condição induzida pela ausência de nutrientes. Esta pode ser uma estratégia utilizada pelos animais *Bos taurus indicus* para garantir a preservação da espécie

em ambiente com altas temperaturas, baixa disponibilidade de nutrientes e maior necessidade de deslocamento.

2.4. Sistema proteolítico e pH

A maciez da carne é processo modulado por condições físico-químicas, como pH e resfriamento, fruto da ação de enzimas proteolíticas dentre as quais tem sido dada atenção para as calpaínas, caspases, ou peptidases de serina dentre outras, e é predita com maior acurácia pela quantidade e/ou atividade dos inibidores naturais destas enzimas (Sentandreu et al., 2002). Diferentes sistemas apontam para maior contribuição no amaciamento da carne do sistema dependente de cálcio para ativação, formado pelas calpaínas e seu inibidor, calpastatina (Delgado et al., 2001a; Koohmaraie, 1992; Koohmaraie e Geesink, 2006). Para uma adequada ação das calpaínas na proteólise *postmortem*, o regime de resfriamento das carcaças deve permitir uma acidificação gradual, com concomitante gradual liberação de cálcio ao sarcoplasma. Quando a temperatura muscular é reduzida a valores inferiores a 15 °C antes do estabelecimento do *rigor mortis*, o retículo sarcoplasmático não é capaz de funcionar adequadamente e os níveis de cálcio se elevam no sarcoplasma que ainda tem ATP, provocando a contração máxima (Savell, Muller e Baird, 2005). Ao mesmo tempo, as calpaínas são ativadas, mas a sobreposição dos filamentos pode ser tão intensa devido ao encurtamento excessivo dos sarcomêros pelo frio que provoca prejuízos irreversíveis para o amaciamento da carne (Fausto et al., 2017). Para bovinos, os melhores valores de maciez do bife maturado por 14 dias, proveniente do *Longissimus lumborum*, foi o resultado do declínio intermediário de pH, ou seja, pH com valor próximo a 6 após 90 minutos do abate ou a temperatura muscular de *rigor* em torno de 30 °C (Hwang e Thompson, 2001).

A proteólise miofibrilar como consequência da atuação das calpaínas pode ser evidenciada pelo índice de fragmentação miofibrilar, obtido pela fragilização das miofibrilas e mensuração por turbidimetria solução com concentração proteica conhecida, inversamente relacionada à força de cisalhamento (Ilian et al., 2004; Ilian et al., 2001; Wheeler e Koohmaraie, 1994) e que aumenta com a maturação (Olson et al., 1976). A expressão de calpaína, medida pela abundância de RNAm, e o índice de fragmentação miofibrilar de bifes maturados por 21 dias provenientes de animais *Bos taurus indicus*, apresentaram associação significativa, indicando o impacto da regulação da expressão de calpaína sobre o índice de fragmentação miofibrilar inversa, ou seja, a redução da expressão está associada ao aumento dos valores de fragmentação, indicando que nível máximo de expressão é alcançado neste tipo biológico para promover amaciamento (Rezende, 2011). Quando comparados animais *Bos taurus* e *Bos indicus*, os valores dessa fragmentação aumentam com a redução da contribuição genética de *Bos indicus* (Whipple et al., 1990a). Ou seja, carne de animais *Bos indicus*

fragmentam menos, consequentemente são mais resistentes ao corte. Além disso, a taxa e a extensão da proteólise são diferenciadas entre estes tipos biológicos e estão associadas à atividade inibitória da calpastatina. Em condições de pH ideal, a maior atividade inibitória da calpastatina às 24 horas *postmortem* de animais *Bos indicus* (Wulf et al., 1997) pode ser em parte explicada por modificações nas frequências alélicas para o gene CAST (Curi et al., 2010). A maior expressão do gene que codifica a calpastatina tipo II (CAT II) está relacionada ao aumento da força de cisalhamento (Rezende, 2011). Modificações alélicas favoráveis no gene CAST II reduz a expressão de RNA mensageiro diferencialmente entre animais Angus e Brahman, sendo que para animais Angus a presença de 2 alelos favoráveis reduz a expressão em 11% quando comparada a animais Brahman com os 2 alelos favoráveis (Nattrass et al., 2014). Maior expressão de calpastatina potencialmente está relacionada a maior atividade inibitória da proteólise. Maior atividade de calpastatina está relacionada à maior necessidade de força para romper a carne (Koohmaraie, 1994).

As calpaínas na musculatura estriada esquelética são dependentes de cálcio para ativação, sendo encontrados três diferentes tipos: μ -calpaína, m-calpaína e skm-calpaína (p94), com as duas primeiras suscetíveis a inibição pela calpastatina e todas com atividade ótima em pH neutro (Koohmaraie e Geesink, 2006). Enquanto a contribuição da skm-calpaína na proteólise *postmortem* é indefinida, é conhecido que este polipeptídeo de 94 kDa tem relação estrutural com a titina (Sorimachi et al., 1995). Porém, a contribuição das μ - e m-calpaínas foi explorada amplamente, principalmente por sofrerem inibição pela calpastatina. A contribuição da μ -calpaína para a proteólise *postmortem* é determinante para o amaciamento (Koohmaraie e Geesink, 2006). A μ -calpaína quando se torna ativa, promove autólise (Cruzen et al., 2014; Goll et al., 2003; Lomiwes et al., 2014). Sua autólise envolve uma sequência de passos sendo iniciado pela remoção de uma sequência de 14 aminoácidos na posição NH₂-terminal da unidade de 80 kDa, para formação do produto intermediário de 78 kDa, seguido pela remoção adicional de 12 aminoácidos produzindo o fragmento autolítico de 76 kDa (Goll et al., 2003). Em presença de calpastatina em substrato exógeno, apenas o processo de clivagem da subunidade 80 kDa a 78 kDa é observado (Koohmaraie, 1992). Todas as proteínas miofibrilares, titina, nebulina, desmina e troponina-T, que são substratos para a degradação da μ -calpaína serão afetadas pela reduzida ativação e autólise tardia (Huff-Lonergan, Parrish e Robson, 1995; Huff-Lonergan et al., 1996; Koohmaraie, 1992; Whipple et al., 1990a). A proteína alfa-II-espectrina potencialmente terá a proteólise reduzida relacionada a menor ativação da calpaína, afetando a formação das bandas de peso molecular de 150 e 145 kDa (McGinnis et al., 1999).

2.5. Degradação proteica

2.5.1. Titina e nebulina

Titina é a maior proteína encontrada na musculatura estriada esquelética, com peso molecular aproximado de 3.000 kDa. Tem duas importantes funções na musculatura *in vivo*, que são 1) atuar como um modelo para os filamentos grossos de miosina se organizarem no sarcômero e 2) atuar como um elemento elástico entre os filamentos grossos e a linha Z durante a contração muscular (Robson, 1995). Como é uma proteína citoesquelética, é esperado que sua degradação esteja relacionada ao amaciamento da carne, principalmente pela desestruturação que facilitará outras degradações proteicas. De fato, quando comparada a degradação da titina entre bifes segredados pela maciez, macios e duros, o primeiro grupo apresentou a formação de duas bandas (T1 - intacta e T2 - degradada) proteicas, sendo que após 7 dias de maturação predominava a banda T2 e após 14d apenas pequenos peptídeos foram observados, enquanto para o segundo grupo a degradação foi observada somente após 14d de maturação (Anderson e Parrish Jr., 1989). Também é esperado que a titina seja degradada de forma diferente de acordo com a categoria animal e idade, com maior degradação para novilhos castrados quando comparados com touros, assim como quando comparados a vacas (Huff-Lonergan, Parrish Jr. e Robson, 1995).

Nebulina também é uma proteína miofibrilar, tem peso molecular aproximado de 800 kDa e constitui um conjunto de filamento inextensível com os filamentos finos de actina. Inicialmente, sua função foi apenas relacionada a servir como um molde para o posicionamento dos filamentos de actina, porém foram acrescidas evidências de sua atuação na transdução de sinal, regulação da contração, e geração de força na miofibrila (McElhinny et al., 2003). Assim como a titina, uma de suas extremidades está ancorada à linha Z (Robson, 1995). A degradação da nebulina quando comparada a da titina parece ser mais rápida, com completa degradação aos 7 d *postmortem* independente de idade dos animais ou categoria (Huff-Lonergan, Parrish e Robson, 1995) e o preparo das amostras (Taylor et al., 1995). A taxa de queda de pH é determinante para a degradação de proteínas de alto peso molecular, sendo que em pH final intermediário (5,86 a 6,19) o aumento da força de cisalhamento está diretamente relacionado a redução da degradação destas proteínas (Wu et al., 2014).

2.5.2. Alfa-II-espectrina

A isoforma alfa-II é a mais abundante forma de espectrina nos tecidos, que caracteriza-se como uma proteína citoesquelética composta por subunidades α (alfa) e β (beta) em uma conformação tetramérica, importante na manutenção da integridade estrutural da célula, garantindo

a adesão muscular e a resiliência dos sarcômeros e dos retículos sarcoplasmáticos durante o estresse da contração (Bennett et al., 2004). A espectrina está envolvida no controle da organização da membrana, sua estabilidade e conformação, liga a membrana aos motores de transportes, assim como aos sistemas de filamentos maiores (De Matteis e Morrow, 2000). Alfa-II- espectrina é substrato de degradação de caspase e de calpaína (McGinnis et al., 1999) e forma padrões de bandas com diferentes pesos moleculares identificados por imunodetecção, que permitem a distinção de degradação por um ou outro sistema proteolítico (Warren et al., 2005). No entanto, como a procaspase-3 é também substrato da μ -calpaína (McGinnis et al., 1999), pode ser difícil estabelecer o impacto direto de cada sistema na degradação da alfa-II-espectrina.

A degradação de alfa-II-espectrina *postmortem* em suínos, pela observação da banda com peso molecular de 120 kDa (degradação por caspase) está inversamente correlacionada a força de cisalhamento, apontando para a possível contribuição deste sistema proteolítico nos primeiros estágios *postmortem* (Kemp, Bardsley e Parr, 2006). Para bovinos, foi encontrada diferença relacionada a formação da banda de 145 kDa (degradação por calpaína) entre músculos com diferentes metabolismos, sendo que o glicolítico (*Longissimus lumborum*) apresenta uma quantidade muito superior desse fragmento quando comparado ao oxidativo imediatamente após o abate (*Infrapinatus*) e nenhuma diferença na formação das bandas de 150 kDa (produto de degradação de ambos sistemas proteolíticos) ou 120 kDa (Sàcca et al., 2016). Segundo os mesmos autores, na musculatura glicolítica a degradação da alfa-II-espectrina é bem mais acelerada do que na musculatura oxidativa, e principalmente determinada pela ação das calpaínas.

2.5.3. Desmina

A desmina é o maior filamento intermediário específico de musculatura responsável por fazer ligações longitudinais e sucessivas entre as linhas Z, com função essencial na manutenção da arquitetura muscular, conectando todo o aparato contrátil ao sarcolema, bem como ao núcleo e outras organelas, como as mitocôndrias (Paulin e Li, 2004). Em conjunto com a titina, a degradação da desmina exerce grande influência na determinação da taxa de amaciamento (Koohmaraie e Geesink, 2006). Além de ser substrato da μ -calpaína, sua degradação está relacionada às perdas por gotejamento do músculo após abate (Huff-Lonergan e Lonergan, 2005). Existem algumas evidências de estudos *in vitro*, que mostram que a desmina também é substrato da caspase-6 e tem participação importante na determinação do início da apoptose (Chen et al., 2003). Em bovinos, musculatura induzida a maior nível de oxidação por irradiação sofre prejuízo na degradação da desmina (Huff-Lonergan e Lonergan, 2005). A degradação de desmina de bifes proveniente de *Bos taurus* é maior e está relacionada aos maiores valores de índice de fragmentação miofibrilar durante

o período de maturação quando comparada a de *Bos indicus*, que após 14d ainda não apresentava maciez satisfatória (Whipple et al., 1990b).

2.5.4. Troponina-T

A troponina-T é uma proteína formada por única cadeia de polipeptídeos com peso molecular aproximado de 31 a 36 kDa e cerca de 250 a 300 aminoácidos, sendo que sua função principal está relacionada ao processo de contração muscular, durante o qual forma, em conjunto com as outras troponinas, um sistema inibidor (tropomiosina-actomiosina) sensível a cálcio (Perry, 1998). Em condições *postmortem*, a troponina-T é substrato da μ -calpaína e o produto de sua degradação foi identificado como uma sequência de polipeptídeos de aproximadamente 30 kDa e em menor quantidade, 28 kDa, após longo período de maturação (Ho, Stromer e Robson, 1994). O aparecimento daqueles polipeptídeos foi considerado ótimo indicador do processo de amaciamento da carne bovina durante a maturação (Penny e Dransfield, 1979). Em cenários com acidificação muscular deficiente, ou pH final em faixa intermediária, a degradação de troponina-T é atrasada (Pulford et al., 2009), processo que pode estar relacionado a uma maior suscetibilidade desta proteína a oxidação (Rowe et al., 2004a). Entre carne de animais *Bos taurus* e *Bos indicus*, o aparecimento de banda de proteína com peso molecular de aproximadamente 30 kDa (degradação de troponina-T) é mais evidente no período de 1 ao 14d *postmortem* para o primeiro grupo, sendo que para o segundo grupo foi constatada a maior susceptibilidade das proteínas à degradação com o aumento da força iônica (Wheeler et al., 1990b).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os animais utilizados neste experimento fazem parte de um estudo de avaliação genética de longo-termo envolvendo Angus (A), Brahman (B) e cruzados Angus-Brahman, pertencentes ao rebanho da Universidade da Flórida. Foram escolhidos três tipos biológicos e utilizados seis novilhos de cada um dos grupos ($n = 18$): Brahman (1.0 a 0.8 B e 0.0 a 0.2 A); Angus (1.0 a 0.8 A e 0.0 a 0.2 B) e Brangus (0.625 A e 0.375 B; Elzo et al., 2012). Os procedimentos de manejo e uso dos animais foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade da Flórida (IACUC, número 201003744).

3.1. Animais e amostragem

Os animais nasceram e foram criados no campus da Universidade da Flórida, onde permaneceram até serem encaminhados ao confinamento, momento que foram vendidos e transferidos a propriedade privada. Receberam dieta de alta energia e foram alimentados a vontade até o ponto de abate, momento no qual foram comprados novamente pela Universidade, quando tinham idade média de 18 meses. Os abates aconteceram em Maio, Junho e Agosto de 2016. A seleção dos animais para o abate considerou a percepção visual da cobertura de gordura subcutânea mínima de 1,27 cm. No dia anterior ao abate, durante a manhã, os animais foram transportados por aproximadamente 55 km em via asfaltada até Gainesville, Flórida Central, e permaneceram no curral de espera por 24 horas. Os abates foram realizado no Centro de Processamento de Carnes da Universidade da Flórida (Gainesville, FL, EUA) que funciona sob inspeção do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA-FSIS).

Amostras do músculo *Longissimus lumborum* foram coletadas nos tempos 1, 3, 6 e 24 h *postmortem* e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. O pH das carcaças foi medido utilizando equipamento portátil Hanna modelo HI99163 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI) nos tempos 1, 3, 6, 9 e 24 h *postmortem*. Após 48 h do abate foram coletados 2 bifes de 2,54 cm de espessura entre as 12^a e 13^a costelas, embalados à vácuo (B2570; Cryovac, Duncan, SC), selados (Multivac C500) e destinados à maturação por 7 e 14 dias, para realização das análises de força de cisalhamento. Após o período de maturação, os bifes foram congelados (- 40°C) até o momento das análises. A coleta de amostras para análises bioquímicas foi feita em bifes adicionais (menos espessos), também submetidos à maturação. Todas as amostras para análises bioquímicas foram mantidas em freezer -80 °C até sua realização.

3.2. Parâmetros de carcaça para rendimento e qualidade

O rendimento das carcaças foi calculado como o percentual de peso da carcaça relativo ao peso vivo do animal antes do abate, segundo a fórmula:

$$\text{Rendimento de carcaça (\%)} = (\text{Peso da carcaça quente} / \text{Peso Vivo}) \times 100$$

Os parâmetros de avaliação das carcaças foram obtidos por profissionais da Universidade da Flórida habilitados (Dra. Tracy Scheffler, Dr. Jason Scheffler e Dr. Chad Carr) e realizado na câmara fria às 48 horas *postmortem*, nas carcaças com o *Longissimus* exposto, cortado na altura entre as 12ª e 13ª costelas. A cobertura de gordura foi determinada com uma régua obtendo a medida na posição lateral da área de secção à $\frac{3}{4}$ do comprimento total da superfície dorsal sobre o músculo *Longissimus*, bem como a observação visual da distribuição da gordura de corbatura que foi utilizada para o cálculo preliminar ajustado do grau de rendimento de carcaça (Ajust. – RCP). Além dessa avaliação subjetiva, foram também considerados o peso de carcaça quente (PCC, libras), a área de olho de lombo (AOL, cm²), e a gordura visceral (pélvica, renal e cardíaca; GV, %), para o cálculo do rendimento das carcaças segundo os padrões norte-americanos na composição do USDA Yield Grade (USDA, 2016):

$$\text{USDA Yield Grade} = \text{Adj.} - \text{RCP} + (((\text{PCC} - 600) \times 0,012) + 11) - \text{AOL} \times 0,3 + ((\text{GV} - 3,5) \times 0,2)$$

Para propósitos de determinação da qualidade das carcaças, segundo os padrões norte-americanos (USDA Quality Grade), a presença de gordura intramuscular foi avaliada através do escore correspondente à escala de quantidade perceptível visualmente, no qual: 100 a 199 = praticamente ausente; 200 a 299 = traços; 300 a 399 = ligeira quantidade; 400 a 499 = pequena quantidade; 500 a 599 = modesta quantidade; 600 a 699 = moderada quantidade; 700 a 799 = ligeiramente abundante; 800 a 899 = moderadamente abundante; e 900 a 999 = abundante.

A cor da carne foi obtida utilizando um espectrofotômetro portátil MiniScan[®]XE Plus (Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, VA) com ângulo de observação de 10 graus, iluminante D65 e após 30 minutos de oxigenação. As coordenadas CIE L* a* b* foram determinadas em 2 diferentes posições anatômicas nos bifes, sendo que a média entre essas medidas representa a cor do bife para cada parâmetro.

3.3. Força de cisalhamento

No dia anterior a análise, os bifes foram descongelados em câmara fria (2 a 5 °C) e preparados de acordo com o Protocolo da Associação Norte-Americana de Ciência da Carne (American Meat Science Association Guidelines-AMSA; Belk et al., 2015). A temperatura interna foi monitorada com um termômetro (Omega Engineering Inc., Stamford, CT) colocado no centro geométrico de cada bife, que foram cozidos em grelhas abertas (Hamilton Beach Brand,

Washington, NC). Quando atingiram temperatura interna de 35 °C, foram virados e cozidos até atingir a temperatura interna de 71 °C. Após o cozimento e resfriamento inicial, foram embalados e colocados sob refrigeração (2 a 5 °C) durante 24 horas. Os bifes foram cortados em uma extremidade para exposição do alinhamento das fibras musculares e, paralelamente à disposição das fibras, seis cilindros com 1,27 cm de diâmetro foram removidos de cada bife. Os cilindros foram utilizados para que seu centro fosse cisalhado perpendicularmente por equipamento Instron Universal Testing Machine (Instron Corporation, Canton, MA) com a lâmina Warner-Bratzler (velocidade do corte de 200 mm/min) acoplada a uma célula de 490 N. A força de cisalhamento (FC) de cada bife é a média aritmética dos seis cilindros e o resultado está expresso em Newtons (N).

3.4. Atividades das enzimas citrato sintase e lactato desidrogenase

Amostras coletadas 1h *postmortem* foram utilizadas para determinação das atividades enzimáticas de citrato sintase (CS) e lactato desidrogenase (LDH). Após a pulverização utilizando nitrogênio líquido, o músculo foi diluído 1:20 (peso/volume) em tampão (0,25 M sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl, pH 7,4), homogenizado uma vez a 5.000 rpm por 10 segundos em equipamento Precellys 24 (Bertin Instruments, Hialeah, FL), seguido de quebra mecânica por ultrassom. Os homogenatos foram diluídos 1:4 e 1:200 para determinação de CS e LDH, respectivamente. As atividades foram determinadas utilizando placas de 96 poços e leitor de microplacas (Sinergy HT, Biotek Instruments, Winooski, VT). Para a determinação da atividade de CS, a reação foi iniciada em meio específico (83 mM Tris, 118 µM DTNB e 0,6 mM oxaloacetato) pela adição de 3 mM de acetil-CoA e a taxa de reação do CoA-SH livre com o composto DTNB (ácido 5'5-ditiolbis-2-nitrobenzoico) a 37 °C, foi medida a cada 20 segundos por 7 minutos, pela absorbância a 412 nm de comprimento de onda. Para a determinação da atividade de LDH, a reação foi iniciada em meio específico (90 mM fosfato de sódio, 4,5 mM EDTA, pH 7,5 e 0,6 mM NADH) pela adição de 8,4 mM de piruvato de sódio, sendo as medidas de desaparecimento do NADH realizadas pela absorbância a 340 nm, a 37 °C e a cada 20 segundos por 7 minutos. O conteúdo de proteína total das mesmas amostras utilizadas na quantificação das atividades enzimáticas foi determinado imediatamente após as leituras das atividades específicas, utilizando um kit com base de ácido bicinônico (BCA; BioRad Laboratories, Hercules, CA) e albumina como proteína padrão. As atividades foram calculadas usando a diferença entre as leituras de absorbância em um intervalo de tempo específico e os respectivos valores de proteína total na equação de Beer-Lambert. As atividades foram reportadas em nmol/min/mg de proteína para CS e µmol/min/mg de proteína para LDH.

3.5. Eficiência mitocondrial por respirômetro de alta resolução em fibras permeabilizadas

Amostras do *Longissimus lumbarum* foram retiradas das carcaças dos animais Angus (6) e Brahman (6) aproximadamente 1h *postmortem*, imediatamente limpas de gordura, armazenadas em microtubo com tampão frio de preservação (BIOPS; 2,77 mM CaK₂EGTA, 7,23 mM K₂EGTA, 5,77 mM Na₂ATP, 6,56 mM MgCl₂·6H₂O, 20 mM taurina, 15 mM Na₂ Fosfocreatina, 20 mM Imidazol, 0,5 mM DTT e 50 mM MES, com pH ajustado a 7,1) e transportadas em caixa com gelo para o laboratório de fisiologia animal, do departamento de Ciência Animal da Universidade da Flórida, onde permaneceram acondicionadas em refrigerador até o início do preparo da permeabilização. A análise foi realizada sob responsabilidade da Professora Dra. Stephanie Wohlgemuth e está descrita de acordo com protocolo utilizado naquele laboratório (Li et al., 2016).

No início do preparo de permeabilização, delicado processo de limpeza de gordura e tecido conjuntivo foi realizado antes da separação manual das miofibras utilizando dois pares de pinças. O conjunto de miofibras foi transferido novamente para o tampão BIOPS acrescido de 50 µg/ml de saponina e as membranas celulares permeabilizadas durante 30 minutos sob refrigeração (4 °C). A saponina é um agente formador de complexo com o colesterol, portanto interage com as moléculas de colesterol presentes na membrana sarcoplasmática, induzindo a permeabilização seletiva (formação de poros) e permitindo com que a barreira entre o meio e o espaço intracelular desapareça, preservando as membranas mitocondriais e do retículo sarcoplasmático e permitindo sua investigação funcional (Kuznetsov et al., 2008; Figura 3).

Após a permeabilização, as miofibras foram lavadas no meio de respiração mitocondrial frio (MiR05; 110 mM sacarose, 60 mM de lactobionato de potássio, 0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂·6H₂O, 20 mM taurina, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, e 1g/L BSA, pH 7,1) por 10 minutos sob refrigeração (4 °C). Imediatamente após a lavagem, as miofibras permeabilizadas (aproximadamente 3 a 4 mg de peso úmido) foram transferidas para a câmara do respirômetro de alta resolução.

A respiração mitocondrial (fluxo de O₂) foi determinada em duplicata, sendo cada amostra submetida a medidas nas duas câmaras do respirômetro Oroboros O2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria), ajustadas a duas temperaturas 38,5 °C e 40 °C e mantidas sob condições de hiperoxigenação (220 – 450 µM O₂). Dessa forma, a eficiência mitocondrial do *Longissimus lumbarum* dos animais dos tipos biológicos Angus e Brahman foram testadas sob diferentes condições: normal ou fisiológica (38,5 °C) e sob estresse por calor (40 °C). O tecido foi colocado nas câmaras e ao meio de respiração MiR05 foi adicionado 20 mM de creatina para saturar a creatina quinase mitocondrial, facilitando o transporte de ADP. De acordo com o protocolo de titulação (Li et al.,

2016; Figura 4), as medidas foram realizadas nos momentos nos quais o consumo de oxigênio estacionário se estabeleceu após a adição dos substratos e inibidores, conforme a sequência a seguir:

- 1) Inicialmente, o fluxo dos elétrons através do complexo I (CI) do sistema de transporte de elétrons (STE) foi suportado pelos substratos ligados ao NADH, o glutamato (10 mM) e o malato (2 mM). Essa medida representa a respiração base (RB);
- 2) Sequencialmente foi adicionado ao sistema adenosina difosfato (ADP, 2,5 mM) para estimular a respiração e o fluxo do consumo de oxigênio se refere apenas ao complexo I (Oxidação fosforilativa, OXFOS-CI, F_{CI});
- 3) Após a adição de succinato (10 mM), o fluxo de elétrons convergentes através do complexo I e II (CII) do STE é garantido e o fluxo de oxigênio consumido se refere a ambos complexos (OXFOS-CI e CII, F_{CI+II});
- 4) ADP adicional (1,25 mM) e succinato (5 mM) foram então titulados para avaliar se a capacidade de OXFOS poderia ser aumentada mais. O aumento não foi observado, indicando que a capacidade de OXFOS foi medida numa concentração de ADP saturante;
- 5) A adição subsequente de citocromo c (cito c, 10 μ M) testou a integridade da membrana externa mitocondrial. Somente amostras com resposta a citocromo c abaixo de 15% de aumento na respiração foram incluídas na análise (apenas 1 amostra de Brahman foi retirada da análise);
- 6) A síntese de ATP é então interrompida pela adição de oligomicina, garantindo que o estado não-fosforilativo ou o estado intrínscio de desacoplamento se estabeleça. Neste momento foi determinado o fluxo do consumo de oxigênio pelo vazamento de prótons no estado desacoplado ou estado IV da respiração mitocondrial;
- 7) A titulação do desacoplador carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenilidrazina (FCCP, 0,5 μ L de uma solução de reserva 0,1 mM, até uma concentração final entre 1,5 - 2,0 μ M) é feita e a medida do fluxo do consumo de oxigênio representa a respiração máxima não acoplada (capacidade STE);
- 8) As razões de controle de acoplamento foram calculadas sendo a primeira entre o fluxo de oxigênio consumido pela respiração base e pelos complexos I e II (RB/F_{CI+II}) e depois entre os complexos I e II e o STE (F_{CI+II}/E).

3.6. Análises de eletroforese

3.6.1. Degradação da Titina e Nebulina via gel de agarose

Para a análise de degradação da titina e da nebulina, amostras congeladas nos diferentes tempos (1, 3, 6, 24h, 7 e 14d *postmortem*), foram pulverizadas com nitrogênio líquido e dissolvidas em tampão de extração na relação 1:10 amostra:tampão (Warren, Krzesinski e Greaser, 2003). O tampão de extração utilizado (0,05 M Tris-Cl, pH 6,8, 8 M Ureia, 2 M Tiourea, 3% SDS e 75 mM ditioneitol – DTT), foi adicionado ao tubo congelado contendo o tecido pulverizado e os ‘beads’ para auxílio da quebra mecânica, colocados no equipamento Precellys 24 Homogenizer (Bertin Instruments, Hialeah, FL). A homogeneização consistiu de três ciclos de 10 segundos a 5.000 rpm, com centrifugação intercalada de 5.000 x g por 10 minutos, sendo a última com 13.000 x g por 12 minutos. O conteúdo foi transferido a um novo microtubo para a determinação proteica utilizando um kit compatível aos reagentes do tampão (RC DC protein assay; BioRad Laboratories, Hercules, CA) e albumina como proteína padrão. Após a determinação da proteína, as amostras foram preparadas para conterem mesma concentração proteica de 0,5 mg/ml, utilizando o tampão de extração acrescido de 0,03% de bromofenol azul. As amostras foram aquecidas por 10 minutos a 60 °C e armazenadas em freezer -20 °C até as análises serem conduzidas. Foram carregados 5 µg de proteína em cada poço dos géis e para cada gel foi utilizada uma amostra referência para controle de qualidade entre as corridas.

A separação das frações proteicas, foram realizadas em géis de agarose 1% (20 cm de largura x 16 cm de altura x 1,5 mm de espessura) foram empacotados e corridos utilizando a unidade de eletroforese Protean II xi (BioRad Laboratories, Hercules, CA) e a corrida realizada em câmara fria (2 – 5 °C) a 30 V (2 géis) durante aproximadamente 5 horas. Tampão de corrida com volume final 4 litros (50 mM Tris-base, 0,384 M Glicina e 0,1% SDS) foi adicionado à câmara inferior, e mesmo tampão acrescido de 10 mM de 2-mercaptoetanol na câmara de carregamento, ou superior (300 ml). Após a corrida, os géis foram transferidos a um recipiente plástico contendo água duplamente destilada e lavados brevemente (2 minutos) antes de serem corados, utilizando solução corante Imperial™ Protein Stain (Thermo Scientific, Rockford, IL) por 1 hora e agitação. Foram então descorados utilizando água duplamente destilada durante 1 hora, sob agitação, sendo realizadas duas trocas de água e 30 minutos adicionais com 4 trocas de água, antes da aquisição das imagens em escaneador Odyssey CLx (LI-COR, Lincoln, NE). As bandas proteicas referente à titina e nebulina foram identificadas e quantificadas com auxílio do programa Image Studio, versão 5.2.

A degradação da titina foi calculada para cada tempo, como sendo a relação entre o sinal emitido pelas bandas na mesma coluna (referentes ao mesmo tempo). Foram identificadas duas bandas como sendo titina (T1 e T2) sendo a de maior peso molecular considerada como a proteína intacta (T1) e a de menor peso molecular como sendo o produto de degradação (T2). A soma do sinal emitido por ambas as bandas foi utilizada para o cálculo de degradação da banda intacta, conforme a fórmula:

$$\text{Degradação de titina} = \text{sinal da banda intacta (T1)} / \text{soma do sinal das bandas (T1 + T2)}$$

Apenas uma banda foi identificada como sendo referente a nebulina. Além da quantificação desta banda para comparações entre os tipos biológicos e tempo *postmortem*, também foi avaliada a relação desta banda com a miosina no mesmo tempo *postmortem*, conforme a fórmula:

$$\text{Degradação da nebulina} = \text{sinal da banda referente a nebulina} / \text{sinal da banda referente a miosina}$$

3.6.2. Preparo das amostras para imunodeteção

As amostras congeladas nos diferentes tempos (1, 3, 6, 24 h, 7 e 14 d) foram pulverizadas em nitrogênio líquido e diluídas em tampão fosfato (10 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, pH 7 e 10% SDS) respeitando a relação 1:10 amostra:tampão. Em seguida, as soluções foram homogenizadas numa repetição de três ciclos de 10 segundos a 5.000 rpm em homogenizador Precellys 24 (Bertin Instruments, Hialeah, FL) com ciclos intermediários de centrifugação a 5.000 x g por 5 minutos, sendo a última centrifugação a 13.000 x g por 12 minutos. A concentração proteica foi determinada através do método BCA (BioRad Laboratories, Hercules, CA) e albumina foi utilizada como proteína padrão. As amostras foram padronizadas para conter 1,5 mg/ml de proteína total, diluídas em tampão concentrado 5x Laemmli (0,5 M Tris-base com pH ajustado para 6,8, 0,5 M DTT, 10% SDS, 0,5% bromofenol azul e 50% glicerol), aquecidas a 95 °C por 5 minutos e permaneceram em freezer -20 °C até a realização das análises. Uma amostra referência foi elaborada para ser utilizada como controle de qualidade em cada gel. Géis de diferentes percentuais foram preparados nas dimensões 20 cm de largura x 8,5 cm de altura e 0,75 mm de espessura e a unidade utilizada para a corrida foi a MGV-202-20 (C.B.S. Scientific, San Diego, CA). Todas as corridas foram iniciadas a 60 V por 20 minutos em tampão de corrida gelado (25 mM Tris-base, 0,2 M Glicina e 0,1% SDS), para correto processo de empilhamento das proteínas no gel de acrilamida.

A transferência das frações proteicas do gel à membrana de nitrocelulose (Thermo Scientific, Rockford, IL) foram realizadas em câmara fria a 4 °C, com tampão de transferência gelado (50 mM Tris-base, 0,38 M Glicina, 10% SDS e 10% metanol) a 500 mA durante 1 hora, na unidade de transferência EBU-402 (C.B.S. Scientific, San Diego, CA). Após a transferência, as

membranas foram secas até o momento do início da incubação, quando então foram umidecidas com tampão 1x TBS-tween, pH 7,6, por 2 minutos e bloqueadas com solução de bloqueio StartBlocking™(PBS) Blocking Buffer (Thermo Scientific, Rockford, IL) por 1 hora. Imediatamente após o bloqueio, a incubação com anticorpo primário específico para cada proteína foi realizada, seguindo-se a lavagem das membranas por quatro vezes com solução 1x PBS-0,1% Tween 20 por 5 minutos cada. Novamente as membranas foram incubadas, mas dessa vez com anticorpo secundário, específico para leitura de sinal por fluorescência (tecnologia LI-COR). O anticorpo secundário utilizado é comum a todas as revelações (Goat anti-mouse, IRDye 800 CW, LI-COR, Lincoln, NE) e a solução de diluição para todos os anticorpos foi 1x PBS-0,2% Tween 20. Após a incubação com anticorpo secundário, novo ciclo de lavagens foi realizado e uma lavagem adicional utilizando tampão 1x PBS, pH 7,6 foi realizada para remoção do Tween 20. As membranas foram então escaneadas utilizando o equipamento Odyssey CLx (LI-COR, Lincoln, NE) e o sinal emitido por fluorescência de cada banda foi quantificado com o auxílio do programa Image Studio versão 5.2.

3.6.2.1. Autólise de μ -calpaína e degradação proteica

Alfa-II-espectrina. Gel de acrilamida 7% (30% acrilamida/0,8% bisacrilamida) foi utilizado para a separação das frações proteicas, com carregamento de 25 μ g de proteína por poço e corrida adicional à corrida de empilhamento (descrito no item anterior) por 2 horas e 40 minutos a 125 V. Anti-alfa-II-espectrina (SC-48382, Santa Cruz, Dallas, TE) foi utilizado como anticorpo primário e diluído na proporção 1:250, sendo a incubação realizada em temperatura ambiente, com agitação, por 2 horas. O anticorpo secundário foi diluído na proporção 1:10.000. Três bandas com diferentes pesos moleculares foram identificadas como sendo fragmentos da alfa-II-espectrina, sendo a primeira e maior considerada como a proteína intacta (> 250 kDa) e duas frações com pesos moleculares menores, como produtos de degradação ou proteólise (150 e 145 kDa). Foram investigados o desaparecimento da banda de proteína intacta, bem como o aparecimento das bandas de 145 e 150 kDa, em relação ao conteúdo total da proteína pela soma do sinal emitido por todas as bandas e de acordo com a fórmula:

$$\text{Alfa-II-espectrina peso específico (250, 150 ou 145 kDa)} = \frac{\text{sinal da banda peso específico (250, 150 ou 145 kDa)}}{\text{soma do sinal de todas as bandas}}$$

Autólise de μ -calpaína. Gel de acrilamida de 7% (30% acrilamida/0,8% bisacrilamida) foi utilizado para separação das frações proteicas, com carregamento de 15 μ g de proteína por poço e corrida adicional à corrida de empilhamento (descrito no item anterior) por 1 hora e 30 minutos a 125 V. Anti- μ -calpaína (MA3-940, Thermo Scientific, Rockford, IL) foi utilizado como anticorpo

primário e diluído na proporção 1:10.000, sendo a incubação realizada em temperatura ambiente, com agitação, por 2 horas. O anticorpo secundário foi diluído na proporção 1:10.000. Foram identificadas três bandas com diferentes pesos moleculares (80, 78 e 76 kDa) como sendo frações de μ -calpaína e a autólise incompleta determinada pela relação entre as bandas de 78 e 76 kDa à soma do sinal de todas as bandas, bem como a autólise completa pela relação entre a banda de 76 kDa à soma do sinal de todas as bandas, de acordo com as fórmulas:

$$\text{Autólise incompleta de } \mu\text{-calpaína} = \text{bandas 78 e 76 kDa} (78+76) / (80+78+76)$$

$$\text{Autólise de } \mu\text{-calpaína} = \text{banda de 76 kDa} / (80 + 78 + 76)$$

Degradação de desmina e troponina-T. Gel de acrilamida de 10% (30% acrilamida/0,8% bisacrilamida) foi utilizado para separação das frações proteicas, com carregamento de 10 e 5 μ g de proteína para quantificação de desmina e troponina-T, respectivamente. Corrida adicional à corrida de empilhamento (descrito no item anterior) por 1 hora e 40 minutos a 125 V foi feita. Anti-desmina (D1033, Sigma, St. Louis, MO) e anti-troponina-T (T6277, Sigma, St. Louis, MO) foram os anticorpos primários usados, diluídos 1:10.000 e 1:20.000 para determinação de desmina e troponina-T, respectivamente. A incubação para desmina foi feita em temperatura ambiente por 2 horas, enquanto para troponina-T em ambiente refrigerado (2 – 5 °C) por 12 horas. A diluição do anticorpo secundário para revelação da desmina foi 1:10.000, enquanto para troponina-T foi 1:15.000.

Foram identificadas bandas de peso molecular de aproximadamente 54 kDa e 35 kDa como sendo referentes as frações de proteína intacta de desmina e troponina-T, respectivamente. Todas as bandas com pesos moleculares inferiores foram consideradas produto de degradação e quantificadas para o cálculo de degradação, conforme a fórmula:

$$\text{Degradação de desmina ou troponina-T} = \text{sinal da banda intacta (54 ou 35 kDa)} / \text{soma do sinal de todas as bandas}$$

3.7. Análises Estatísticas

O delineamento estatístico utilizado foi em blocos casualizados, com as datas dos abates consideradas como o fator bloco (24 de maio, 28 de junho e 2 de agosto) e considerado como efeito fixo, enquanto os tipos biológicos representados por animais de diferentes composições raciais (Angus, Brangus e Brahman), considerados como efeito aleatório. Os pontos de coleta das amostras e maturação da carne foram considerados como medidas repetidas no tempo, sendo que as estruturas das matrizes de co-variância foram testadas para cada parâmetro e a correlação entre as medidas repetidas no tempo considerada, assim como foi verificada para cada estrutura testada a distribuição residual. Os efeitos dos pontos de coleta (1, 3, 6, 9 e 24 horas) e maturação (7 e 14 dias), bem como do tipo biológico foram testados, assim como a interação entre eles. A

comparação entre médias múltiplas foi feita utilizando o teste Tukey e estão apresentadas nas tabelas e figuras, seguidas do desvio padrão. Todas as variáveis foram testadas quanto a normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias, sendo que transformação de dados foi aplicada para satisfazer a premissa estatística de análise de variância quando necessário. As variáveis que sofreram transformação foram: atividade de lactato desidrogenase, fluxo de respiração pelo vazamento de prótons no estado desacoplado (estado 4) ajustado pela atividade de citrato sintase calculada com base no peso do tecido, autólise incompleta da μ -calpaína, bem como a degradação da nebulina sem normalização pela banda de miosina.

A análise de respiração mitocondrial foi realizada apenas para dois tipos biológicos (Angus e Brahman) submetidos as diferentes condições de temperatura. O efeito dos tipos biológicos, da temperatura e sua interação também foram testados sendo a comparação de médias feita pelo teste Tukey.

Todos os valores de significância para os efeitos testados estão descritos no texto.

Análise de correlação de Pearson entre algumas variáveis resposta foi realizada como forma complementar no entendimento de processos fisiológicos musculares *postmortem*.

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS edição gratuita para universitários (SAS University Edition, SAS Institute, Inc., Cary, NC) e o procedimento MIXED, com o comando LSMEANS e DIFF ajustado pelo Tukey foi utilizado para comparar as médias, além do procedimento MEANS para obtenção das médias e respectivos desvios padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Características dos tipos biológicos

Os grupos de animais pertencentes aos três tipos biológicos tiveram a mesma idade ao abate, mesmo rendimento de carcaça e mesmo grau de rendimento pelo sistema USDA, que as classifica com índice 3 (Tabela 1). Os novilhos Brahman tiveram peso vivo e peso de carcaça quente inferiores aos observados em novilhos Angus e Brangus (Tabela 1). O escore de marmorização foi diferente ($P = 0.006$) entre os tipos biológicos, com os bifes de animais Brahman apresentando menores valores ($P = 0.011$), quando comparado aos bifes de animais Angus e Brangus, que tiveram mesmo escore ($P = 1.000$).

Tabela 1. Características dos animais, carcaças e bifes do *Longissimus lumborum* às 48 horas *postmortem* de novilhos pertencentes a três tipos biológicos

		Tipo biológico			
	Unidade	Angus (n=6)	Brangus (n=6)	Brahman (n=6)	P ³
Idade	meses	18,2 ± 0,98 ²	18,0 ± 2,09	17,0 ± 1,41	0,103
Peso Vivo	kg	603,67 ± 31,72 a	592,71 ± 30,16 a	498,20 ± 47,34 b	0,008
Peso de carcaça quente	kg	375,81 ± 25,12 a	380,42 ± 19,64 a	317,22 ± 33,64 b	0,027
Rendimento de Carcaça	%	62,18 ± 1,51	64,21 ± 2,09	63,57 ± 2,06	0,244
Grau de rendimento USDA	índice	3,23 ± 0,56	3,76 ± 0,70	3,35 ± 0,86	0,467
Marmorização	escala	473,33 ± 85,01 a	473,33 ± 34,45 a	341,67 ± 54,92 b	0,006
FC-WB ¹ 7d	N	42,86 ± 8,92	50,80 ± 12,45	55,51 ± 9,12	0,092
FC-WB 14d		44,91 ± 8,83	44,62 ± 9,81	50,01 ± 11,08	0,292
Parâmetros de cor do bife					
Angus	L*	a*	b*	Saturação	Tonalidade
Média	36,83	26,73	24,46	36,26	42,32
Desvio Padrão	3,50	2,62	3,61	4,24	2,29
Mínimo	32,68	24,37	19,25	31,06	38,31
Máximo	41,09	31,82	29,81	43,60	44,88
Brangus					
Média	36,60	25,93	23,37	34,93	41,77
Desvio Padrão	2,83	3,50	4,84	5,78	2,47
Mínimo	33,13	22,51	18,97	29,81	38,31
Máximo	40,56	30,41	29,58	42,35	44,47
Brahman					
Média	34,89	25,64	23,69	34,91	42,65
Desvio Padrão	3,68	4,67	4,85	6,70	1,07
Mínimo	30,69	19,01	17,70	25,97	40,92
Máximo	39,00	31,45	29,85	43,36	43,94

¹Força de Cisalhamento Warner-Bratzler aos 7 dias (7d) e aos 14 dias (14d) de maturação a vácuo em condição refrigerada;

²Média ± desvio padrão;

³Valor de significância entre os tipos biológicos.

Pela observação dos valores de desvio padrão para o escore de marmorização, os bifes de Brangus foram mais consistentes nessa característica (Tabela 1). A classificação das carcaças pelo sistema de qualidade do USDA comprova este resultado, sendo que cinco das seis carcaças Brahman foram classificadas como ‘Padrão’ (Standard) e apenas uma carcaça como ‘Superior’

(Choice). Para as carcaças Brangus, todas foram classificadas como ‘Superior’, enquanto Angus teve cinco classificadas como ‘Superior’ e apenas uma como ‘Padrão’.

A força de cisalhamento avaliada aos 7d é diferente ($P = 0,080$) entre os bifes de Angus e Brahman, porém os bifes de Angus e Brangus têm mesma ($P = 0,329$) resistência ao corte, assim como os bifes de Brangus e Brahman ($P = 0,654$). Aos 14d de maturação não houve diferença entre os tipos biológicos quanto a força de cisalhamento (Tabela 1).

A cor dos bifes proveniente do tipo biológico predominantemente *Bos taurus indicus* teve maiores desvios padrão para todos os parâmetros de cor avaliados, exceto para tonalidade (Tabela 1). Estes valores associados com obtenção de medidas de L^* , a^* , b^* e saturação muito reduzidos, mostram inconsistência e possibilidade de carne escurecida.

4.2. Atividades das enzimas glicolíticas e declínio de pH das carcaças

A atividade de lactato desidrogenase do músculo *Longissimus lumborum* foi a mesma entre os tipos biológicos ($P = 0,477$; Figura 5).

A atividade de citrato sintase do músculo *Longissimus lumborum* diferiu ($P = 0,086$) entre os animais de diferentes tipos biológicos, sendo que os animais Brangus apresentam menor ($P = 0,075$) atividade quando comparada a dos animais Brahman (Figura 5).

Figura 5. Atividade de lactato desidrogenase e citrato sintase do músculo *Longissimus lumborum* 1h *postmortem* de três tipos biológicos. Atividade de lactato desidrogenase é a mesma entre os tipos biológicos ($P = 0,477$), enquanto a atividade de citrato sintase de animais Brangus é menor ($P = 0,075$) quando comparada a dos animais Brahman, que por sua vez não difere ($P = 0,660$) dos animais Angus. Animais Brangus e Angus tem mesma ($P = 0,309$) atividade de citrato sintase.

O pH medido nas carcaças durante o resfriamento, revelou que há diferenças entre as taxas de acidificação entre os tipos biológicos. Os músculos de animais Brangus, acidificaram rapidamente quando comparados àqueles das carcaças Brahman, sendo que a curva de acidificação para as carcaças Angus é intermediária entre estes grupos (Tabela 2). As carcaças Brahman foram mais resistentes ao declínio do pH, sendo que os valores médios às 3h *postmortem* para esse grupo foram tão altos quanto aqueles observados nas carcaças de Angus e Brangus 1h *postmortem*. Da mesma forma, os valores de pH para o grupo Brahman às 6h *postmortem* ainda são comparáveis aos valores para os outros grupos às 3h *postmortem* (Tabela 2). As carcaças Brangus às 6h *postmortem* atingiram valores de pH considerados iguais aqueles observados às 24h, ou pH final (Tabela 2).

Tabela 2. Declínio do pH no músculo *Longissimus lumborum* de novilhos de diferentes tipos biológicos¹

Tempo (T)	Tipo Biológico (Tb)			Efeito tipo III		
	Angus	Brangus	Brahman	Tb	T	Tb x T
1h	6,7 ± 0,20 a	6,7 ± 0,15 a	6,8 ± 0,15 a	0,049	< 0,001	0,107
3h	6,3 ± 0,36 b	6,1 ± 0,20 bc	6,6 ± 0,10 ab			
6h	5,9 ± 0,29 cde	5,6 ± 0,24 def	5,9 ± 0,25 bcd			
9h	5,7 ± 0,22 def	5,5 ± 0,15 def	5,8 ± 0,16 cdef			
24h	5,5 ± 0,07 f	5,5 ± 0,07 ef	5,5 ± 0,09 ef			

¹Médias ± desvio padrão. Médias que não compartilham mesma letra diferem entre si (P < 0,05).

4.3. Respiração mitocondrial em célula muscular permeabilizada

4.3.1. Respiração mitocondrial base

O fluxo de oxigênio consumido durante a respiração base ou de rotina não foi diferente entre os tipos biológicos ou entre as temperaturas testadas, tanto o fluxo calculado com base na massa específica (Figura 6A), quanto com o fluxo de respiração ajustado pela atividade de citrato sintase com base na proteína total do tecido (Figura 6B) ou ainda com base no peso de amostra utilizado (Figura 6C).

4.3.2. Respiração mitocondrial pelo complexo mitocondrial I

O fluxo de oxigênio consumido pelo complexo mitocondrial I, após adição de ADP, não diferiu entre os tipos biológicos ou entre os diferentes cenários de temperatura, tanto o fluxo calculado com base na massa específica (Figura 6D), quanto o fluxo de respiração ajustado pela atividade de citrato sintase com base na proteína total (Figura 6E) ou ainda com base no peso de amostra utilizado (Figura 6F).

Figura 6. A-C Fluxo de oxigênio consumido pela respiração base mitocondrial sem adição de ADP, mas em presença de glutamato e malato. A) Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,719$), temperatura ($P = 0,928$) ou a interação entre eles ($P = 0,276$); B) Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,992$), temperatura ($P = 0,876$) ou a interação entre eles ($P = 0,319$); C) Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,665$), temperatura ($P = 0,986$) ou a interação entre eles ($P = 0,399$). D-F Fluxo de oxigênio consumido pelo complexo mitocondrial I após adição de ADP. D) Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,213$), temperatura ($P = 0,423$) ou a interação entre eles ($P = 0,212$); E) Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,587$), temperatura ($P = 0,409$) ou a interação entre eles ($P = 0,215$); F) Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,324$), temperatura ($P = 0,527$) ou a interação entre eles ($P = 0,315$). G-I Fluxo de oxigênio consumido pelos complexos mitocondriais I e II após adição de succinato. G) Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,115$), temperatura ($P = 0,198$) ou a interação entre eles ($P = 0,118$); H) Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,496$), temperatura ($P = 0,229$) ou a interação entre eles ($P = 0,145$); I) Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,214$), temperatura ($P = 0,356$) ou a interação entre eles ($P = 0,249$). A, D e G) Valores calculados com base na massa específica; B, E e H) após correção por atividade de citrato sintase calculada com base no conteúdo de proteína total; C, F e I) após correção por atividade de citrato sintase calculada com base no peso do músculo *Longissimus lumborum* de novilhos de tipos biológicos distintos.

4.3.3. Respiração mitocondrial pelos complexos I e II

Assim como no fluxo de oxigênio consumido pela respiração base e o fluxo de consumo pelo complexo I, aquele consumido pelos complexos mitocondriais I e II após adição de ADP e succinato, não diferiu em nenhum dos cenários avaliados, seja com base na massa específica (Figura 6G), corrigido pela atividade de citrato sintase com base na proteína total (Figura 6H) ou corrigido pela atividade de citrato sintase com base no peso bruto do tecido (Figura 6I).

4.3.4. Vazamento de prótons na respiração desacoplada

A adição da oligomicina inibe a síntese de ATP pela ATP sintase, mas a respiração mitocondrial continua e o fluxo de oxigênio consumido é indicativo do vazamento de prótons do sistema desacoplado (estado 4). Houve interação ($P = 0,050$) entre os tipos biológicos e as temperaturas para o fluxo de oxigênio consumido medido com base na massa específica (Figura 7). Após a correção pela atividade de citrato sintase calculada com base na proteína total, a diferença ($P = 0,061$) se mantém (Figura 8), mas desaparece ($P = 0,511$) após a correção pela atividade de citrato sintase calculada com base no peso do tecido (Figura 9).

Figura 7. Fluxo de oxigênio consumido no estado IV da respiração mitocondrial desacoplada calculado com base na massa específica do músculo *Longissimus lumborum* de novilhos de tipos biológicos distintos. Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,138$), temperatura ($P = 0,152$) ou a interação entre eles ($P = 0,050$). *Na temperatura de 38,5 °C há diferença ($P = 0,022$) entre os tipos biológicos; ^{a,b}Para Brahman, há diferença ($P = 0,023$) entre as temperaturas avaliadas.

Figura 8. Fluxo de oxigênio consumido no estado IV da respiração mitocondrial desacoplada corrigido pela atividade de citrato sintase calculada com base na proteína total do músculo *Longissimus lumbarum* de novilhos de tipos biológicos distintos. Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,444$), temperatura ($P = 0,162$) ou a interação entre eles ($P = 0,061$). *Na temperatura de 38,5 °C há diferença ($P = 0,071$) entre os tipos biológicos; ^{a,b}Para Brahman, há diferença ($P = 0,029$) entre as temperaturas avaliadas.

Figura 9. Fluxo de oxigênio consumido no estado IV da respiração mitocondrial desacoplada corrigido pela atividade de citrato sintase calculada com base no peso do músculo *Longissimus lumbarum* de novilhos de tipos biológicos distintos. Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,115$), temperatura ($P = 0,190$) ou a interação entre eles ($P = 0,511$).

4.3.5. Sistema de transporte de elétrons mitocondrial

Após adição de desacoplador, o fluxo total de oxigênio consumido pelo sistema de transporte de elétrons avaliado é considerado como a capacidade máxima. No entanto, os valores médios obtidos apontam para uma redução na capacidade máxima deste sistema. Os resultados obtidos pela observação do fluxo de oxigênio consumido após o desacoplamento, calculado

considerando-se a massa específica do tecido, mostram que há interação ($P = 0,047$) entre os tipos biológicos e as diferentes temperaturas (Figura 10). Portanto, o sistema de transporte de elétrons mitocondriais do músculo *Longissimus lumborum* dos diferentes tipos biológicos *postmortem*, apresentaram alterações distintas na capacidade respiratória sob diferentes condições de temperatura: próximas aquelas consideradas fisiológicas ($38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) ou sob estresse por temperatura ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Seguindo o mesmo padrão observado para o vazamento de elétrons, para os animais Brahman, há uma inibição da capacidade do sistema de transporte de elétrons com o aumento da temperatura, enquanto para Angus a inibição não ocorre. Após a correção do fluxo de oxigênio consumido pelo sistema de transporte de elétrons pela atividade de citrato sintase, calculada com base na proteína total do tecido (Figura 11) as alterações ainda se mantêm ($P = 0,078$), mas quando corrigido pela atividade de citrato sintase calculada com base no peso de amostra utilizado (Figura 12) a diferença identificada anteriormente não foi observada ($P = 0,129$).

Figura 10. Fluxo de oxigênio consumido pelo sistema de transporte de elétrons mitocondrial desacoplado da oxidação fosforilativa após adição de desacoplador FCCP e calculado com base na massa específica do músculo *Longissimus lumborum* de novilhos de tipos biológicos distintos. Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,266$), temperatura ($P = 0,226$) e a interação entre eles ($P = 0,047$). *Na temperatura de $38,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ há diferença ($P = 0,037$) entre os tipos biológicos; ^{a,b}Para Brahman, há diferença ($P = 0,032$) entre as temperaturas avaliadas.

Figura 11. Fluxo de oxigênio consumido pelo sistema de transporte de elétrons mitocondrial desacoplado da fosforilação oxidativa após adição de desacoplador FCCP e corrigido pela atividade de citrato sintase calculada com base no conteúdo de proteína total do músculo *Longissimus lumborum* de novilhos de tipos biológicos distintos. Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,860$), temperatura ($P = 0,260$) ou a interação entre eles ($P = 0,078$). ^{a,b}Para Brahman, há diferença ($P = 0,051$) entre as temperaturas avaliadas.

Figura 12. Fluxo de oxigênio consumido pelo sistema de transporte de elétrons mitocondrial desacoplado da fosforilação oxidativa após adição de desacoplador FCCP e corrigido pela atividade de citrato sintase calculada com base no conteúdo no peso do músculo *Longissimus lumborum* de novilhos de tipos biológicos distintos. Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,363$), temperatura ($P = 0,356$) ou a interação entre eles ($P = 0,129$).

4.3.6. Razão de controle de acoplamento

O fluxo de oxigênio nos diferentes estágios da cadeia respiratória mitocondrial foi utilizado para calcular o controle de acoplamento entre respiração e oxidação-fosforilativa. A relação entre o fluxo de oxigênio consumido pela respiração base e aquele consumido pelos complexos I e II (RB/F_{CI+II}) no sistema acoplado mostra valores médios entre 0,09 a 0,10. Tais valores demonstram que quando substratos e ADP são limitantes, o sistema opera com uma

capacidade que é cerca de 10% daquela na qual ADP e substratos não são mais limitantes. Ou seja, há um acoplamento justo mesmo na condição do músculo *postmortem*. Porém, não há diferenças entre os tipos biológicos ou entre as temperaturas, assim como não há interação entre estes fatores (Figura 13).

Para entender a extensão com a qual a oxidação-fosforilativa explora a capacidade máxima do sistema de transporte de elétrons, a razão de controle de acoplamento da fosforilação (F_{CI+II}/E) foi calculada como a razão de capacidade OXFOS (F_{CI+II}) à capacidade STE. Não foram encontradas diferenças entre o controle de acoplamento para os tipos biológicos, sob diferentes temperaturas ou interação entre estes fatores (Figura 14). No entanto os valores médios obtidos para esta razão (1,4 a 1,5) superiores a 1, demonstram que há uma redução na capacidade total do sistema de transporte de elétrons.

Figura 13. Razão de controle de acoplamento mitocondrial do músculo *Longissimus lumbarum* de novilhos de tipos biológicos distintos calculada entre o fluxo de oxigênio consumido pela respiração base (RB) e a OXFOS (RB/F_{CI+II}). Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,906$), temperatura ($P = 0,578$) ou a interação entre eles ($P = 0,744$).

Figura 14. Razão de controle de acoplamento mitocondrial do músculo *Longissimus lumbarum* de novilhos de tipos biológicos distintos calculada entre o fluxo consumido pelos complexos I e II em relação ao sistema de transporte de elétrons (F_{CI+II}/E). Valores de significância para tipo biológico ($P = 0,280$), temperatura ($P = 0,859$) ou a interação entre eles ($P = 0,170$).

4.4. Autólise de μ -calpaína

A autólise incompleta da μ -calpaína não apresentou interação ($P = 0,174$) entre tipos biológicos e tempo *postmortem*. No entanto, foi diferente ($P = 0,007$) entre tipos biológicos e tempos *postmortem* ($P < 0,001$). Para os animais Angus, houve diferença entre a autólise incompleta nos tempos iniciais *postmortem* (1 e 3h) quando comparada à autólise incompleta às 24 horas. Para os animais Brangus, além destes tempos, às 6h também diferiu das 24h. Já para os animais Brahman, não foi possível detectar diferenças na autólise incompleta da μ -calpaína entre os tempos iniciais e às 24h *postmortem*, mostrando que houve um retardamento neste processo para este tipo biológico. Não obstante, não foi possível detectar diferenças de autólise incompleta da μ -calpaína entre os tipos biológicos às 24h *postmortem* (Tabela 3).

Por sua vez, a autólise completa da μ -calpaína apresentou interação ($P = 0,058$) entre os tipos biológicos e o tempo *postmortem*. Enquanto não foram identificadas diferenças nos períodos iniciais *postmortem* (1, 3 e 6h), houve diferença ($P = 0,008$) entre os tipos biológicos às 24 horas *postmortem*, com os animais Brangus mostrando os maiores valores de autólise completa, seguido pelos animais Angus e os animais Brahman com a menor taxa (Tabela 3). Foi possível verificar que houve diferença dentro dos tipos biológicos quanto ao padrão de ativação e autólise completa. O tipo biológico Brahman diferenciou-se dos outros dois, pois os valores às 24h se assemelham aos valores iniciais (Tabela 3, comparação nas colunas). Adicionalmente, a observação do padrão de formação da banda autolítica (76 kDa) foi diferente entre os tipos biológicos, sendo possível verificar que às 24h *postmortem* o tipo biológico Brangus apresentou a formação dessa banda com maior emissão de sinal quando comparado aos outros tipos biológicos no mesmo tempo (Figura 15).

Figura 15. Identificação de μ -calpaína por imunodetecção em homogenato total do músculo *Longissimus lumborum* em três diferentes tipos biológicos de bovinos e de acordo com tempo *postmortem*.

Tabela 3. Autólise incompleta e completa de μ -calpaína em *Longissimus lumborum* em três diferentes tipos biológicos de bovinos e diferentes tempos *postmortem*¹

	Tipo biológico (Tb)			Efeito tipo III		
	Angus	Brangus	Brahman	Tb	T	Tb x T
Tempo (T)	μ -calpaína autólise incompleta ²			0,007	< 0,001	0,174
1h	0,18 $\pm$ 0,077 a	0,19 $\pm$ 0,091 a	0,18 $\pm$ 0,067 a			
3h	0,22 $\pm$ 0,067 a	0,23 $\pm$ 0,039 a	0,20 $\pm$ 0,064 a			
6h	0,35 $\pm$ 0,200 ab	0,41 $\pm$ 0,133 ab	0,31 $\pm$ 0,148 ab			
24h	0,61 $\pm$ 0,223 bc	0,75 $\pm$ 0,161 c	0,38 $\pm$ 0,130 abc			
7d	0,98 $\pm$ 0,011 d	0,98 $\pm$ 0,012 d	0,96 $\pm$ 0,020 d			
14d	0,99 $\pm$ 0,007 d	0,99 $\pm$ 0,009 d	0,98 $\pm$ 0,010 d			
	μ -calpaína autólise completa ³			0,003	< 0,001	0,058
1h	0,05 $\pm$ 0,034 a	0,06 $\pm$ 0,037 a	0,06 $\pm$ 0,042 a			
3h	0,08 $\pm$ 0,053 ab	0,07 $\pm$ 0,039 a	0,07 $\pm$ 0,051 a			
6h	0,14 $\pm$ 0,066 ab	0,20 $\pm$ 0,107 b	0,11 $\pm$ 0,060 a			
24h	0,33 $\pm$ 0,222 bAB	0,50 $\pm$ 0,141 cA	0,16 $\pm$ 0,103 aB			
7d	0,91 $\pm$ 0,060 c	0,86 $\pm$ 0,065 d	0,81 $\pm$ 0,055 b			
14d	0,95 $\pm$ 0,028 c	0,94 $\pm$ 0,044 d	0,93 $\pm$ 0,031 b			

¹Médias $\pm$ desvio padrão. Médias seguidas de letras diferentes, diferem entre si ($P < 0,05$);

²Autólise incompleta da μ -calpaína = bandas 76 + 78 kDa / total (80 + 78 + 76);

³Autólise completa da μ -calpaína = banda 76 kDa / total (80 + 78 + 76). Efeito parcial para 24h ($P = 0,008$);

a-d comparação dentro das colunas;

A-B comparação dentro da linha.

As medidas referentes aos 7 e 14 dias de maturação não demonstraram diferenças em autólise incompleta ou completa da μ -calpaína entre os tipos biológicos ou tempo *postmortem* (Tabela 3).

4.5. Degradação de titina e nebulina

Houve interação ($P = 0,001$) entre tipo biológico e tempo *postmortem* na degradação da titina. Aos 7 e 14d *postmortem*, a degradação da titina foi diferente ($P = 0,056$) entre os tipos biológicos e permaneceu diferente ($P = 0,003$) após 14 dias de maturação (Tabela 4). Aos 14 dias *postmortem*, a degradação da titina foi maior para os animais Angus comparada a degradação para os animais Brahman ($P = 0,058$) e não diferiu ($P = 0,075$) daquela para os animais Brangus. Dentro dos tipos biológicos, o padrão de degradação da titina é diferenciado para o tipo biológico Angus, que apresenta valores às 24h *postmortem* diferentes daqueles iniciais, comportamento que não foi observado dentro dos outros tipos biológicos (Tabela 4). A formação da banda de degradação (T2) para os animais Angus e Brangus iniciou às 24 horas *postmortem*, enquanto aos 14d para o tipo biológico Brahman ainda foi possível detectar banda intacta de titina (T1; Figura 16).

Quando avaliada independente da relação com a miosina, a degradação da nebulina mostra que houve interação ($P = 0,091$) entre os tipos biológicos e tempo *postmortem*, com diferenças ($P = 0,086$) na degradação observadas às 24h entre os animais Angus e os animais Brahman. Em contrapartida, aos 7d a diferença ($P = 0,072$) passou a ser observada entre os animais Angus ou Brahman comparados aos animais Brangus. Após 14d da maturação, as diferenças relacionadas à degradação da nebulina não foram mais observadas entre os animais dos diferentes tipos biológicos (Tabela 4). Mesmo comportamento para degradação da nebulina foi observado dentro dos tipos biológicos (Tabela 4).

Quando comparada a degradação da nebulina de acordo com o conteúdo de miosina, não houve interação ($P = 0,984$) entre o tipo biológico e o tempo *postmortem*, no entanto com o avanço do tempo houve um aumento ($P < 0,001$) gradativo da degradação, principalmente entre 7 e 14d quando comparados a 1, 3, 6 e 24h que permaneceram inalterados.

Figura 16. (A) Titina intacta (T1) e o produto de sua degradação (T2) e (B) nebulina provenientes do músculo *Longissimus lumborum* de bovinos de acordo com tipos biológicos e o tempo *postmortem*.

Tabela 4. Degradação de titina e nebulina em *Longissimus lumborum* em três diferentes tipos biológicos de bovinos em diferentes tempos *postmortem*¹

Tempo (T)	Tipo biológico (Tb)			Efeito tipo III		
	Angus	Brangus	Brahman	Tb	T	Tb x T
	<i>Titina</i> ²			0,237	< 0,001	0,001
1h	0,96 ± 0,026 a	0,93 ± 0,032 a	0,91 ± 0,064 a			
3h	0,91 ± 0,058 a	0,92 ± 0,048 a	0,87 ± 0,109 a			
6h	0,86 ± 0,102 ab	0,83 ± 0,072 a	0,86 ± 0,074 a			
24h	0,60 ± 0,261 b	0,63 ± 0,160 a	0,74 ± 0,220 a			
7d	0,10 ± 0,043 c	0,19 ± 0,228 b	0,32 ± 0,188 b			
14d	0,03 ± 0,026 cB	0,04 ± 0,032 bB	0,11 ± 0,074 bA			
	<i>Nebulina</i> ³			0,969	< 0,001	0,091
1h	128,87 ± 45,74 a	108,60 ± 29,87 a	117,25 ± 43,19 a			
3h	126,18 ± 40,05 a	114,90 ± 32,98 a	115,82 ± 33,20 a			
6h	113,18 ± 33,63 a	100,34 ± 30,17 a	122,88 ± 30,60 a			
24h	87,67 ± 49,67 a	96,61 ± 24,71 a	116,25 ± 35,03 a			
7d	19,69 ± 14,17 b	35,50 ± 28,15 b	19,84 ± 25,13 b			
14d	19,04 ± 17,11 b	19,97 ± 11,25 b	12,16 ± 16,60 b			

¹Médias ± desvio padrão. Médias que não compartilham mesma letra diferem entre si (P < 0,05);

²Degradação da titina = banda intacta (T1) / soma das bandas (T1+T2). Efeitos parciais aos 7d P = 0,056 e 14d P = 0,003;

³Degradação da nebulina = desaparecimento da banda. Efeitos parciais às 24h P = 0,086 e 7d P = 0,072;

a-d comparação dentro da coluna;

A-B comparação dentro da linha.

4.6. Degradação da alfa-II-espectrina

Não foram detectadas interações entre os tipos biológicos e os tempos *postmortem* no desaparecimento da banda intacta de 250 kDa da alfa-II-espectrina (P = 0,181), assim como na formação da banda de peso molecular 145 kDa (P = 0,776). No entanto foi detectada interação (P = 0,097) entre tipos biológicos e tempo *postmortem* para a formação da banda de peso molecular 150 kDa referente a produto de degradação da alfa-II-espectrina em *Longissimus lumborum*. Portanto, a degradação foi acelerada às 24 horas *postmortem* para os animais Brangus quando comparado aos outros tipos biológicos (Tabela 5). Além disso, dentro de cada tipo biológico foi observado um padrão de formação dessa banda que é diferenciado. Para Angus e Brahman, às 24h os valores são semelhantes aos iniciais, mas para Brangus o comportamento é outro, sendo que às 24h os valores não se assemelham aos iniciais e também diferem dos finais, 7 e 14d *postmortem* (Tabela 5).

Alta correlação entre a formação desta banda e autólise completa da μ -calpaína foi encontrada (coeficiente de Pearson = 0,834 e P < 0,0001; Figura 20A). Adicionalmente, o padrão do aparecimento da banda com peso molecular de 145 kDa para Brahman difere daquele dos

outros tipos biológicos (Figura 17). Não foi possível identificar a formação de bandas de degradação com valores inferiores a 145 kDa.

Figura 17. Alfa-II-espectrina (250 kDa) e produtos de sua degradação (150 e 145 kDa) identificados por imunodeteção em homogenato total do músculo *Longissimus lumborum* em três diferentes tipos biológicos de bovinos e de acordo com tempo *postmortem*.

Tabela 5. Degradação da alfa-II-espectrina pela formação da banda de 150 kDa em *Longissimus lumborum* em três diferentes tipos biológicos de bovinos em diferentes tempos *postmortem*¹

	Tipo biológico (Tb)			Efeito tipo III		
	Angus	Brangus	Brahman	Tb	T	Tb x T
Tempo (T)	Alfa-II-espectrina ²			0,241	< 0,001	0,097
1h	0,08 ± 0,008 a	0,09 ± 0,018 a	0,07 ± 0,027 a			
3h	0,09 ± 0,010 a	0,09 ± 0,015 a	0,07 ± 0,024 a			
6h	0,10 ± 0,042 a	0,14 ± 0,048 b	0,10 ± 0,041 a			
24h	0,19 ± 0,081 a	0,25 ± 0,087 c	0,12 ± 0,048 a			
7d	0,54 ± 0,097 b	0,57 ± 0,091 d	0,48 ± 0,104 b			
14d	0,55 ± 0,097 b	0,60 ± 0,101 d	0,57 ± 0,072 b			

¹Médias ± desvio padrão. Médias que não compartilham mesma letra diferem entre si (P < 0,05);
²Degradação de alfa-II-espectrina pela formação da banda de 150 kDa = banda de 150 kDa / soma das bandas (250 + 150 + 145). Efeito parcial às 24h P = 0,011;
a-d comparação dentro da coluna.

4.7. Degradação da desmina

A interação entre os tipos biológicos e o tempo *postmortem* (P < 0,001) da degradação da desmina não está relacionada aos tempos iniciais *postmortem*, enquanto às 24h *postmortem* a degradação foi diferente (P = 0,019) entre os tipos biológicos e se estendeu até o final do período avaliado (Tabela 6). Os animais Angus e Brangus apresentaram maiores valores de degradação de desmina, do que os animais Brahman, tanto aos 7 como aos 14d de maturação. Enquanto para os tipos biológicos Angus e Brangus o padrão de degradação mostrou diferenças entre os tempos iniciais (1 e 3h) e aquele observado às 24h *postmortem*, para o tipo biológico Brahman o padrão foi outro, com semelhanças entre os valores iniciais e às 24h (Tabela 6). A formação da banda de peso molecular aproximado de 37 kDa, produto da degradação de desmina, para os animais Brahman foi evidente apenas após 14 d de maturação, porém não com a mesma intensidade (Figura 18).

Figura 18. Desmina (54 kDa) e produtos de sua degradação (bandas inferiores até menor banda, 37 kDa), identificadas por imunodeteção, em homogenato total do músculo *Longissimus lumborum* em três diferentes tipos biológicos de bovinos e de acordo com tempo *postmortem*.

Tabela 6. Degradação da desmina em *Longissimus lumborum* em três diferentes tipos biológicos de bovinos em diferentes tempos *postmortem*¹

	Tipo biológico (Tb)			Efeito tipo III		
	Angus	Brangus	Brahman	Tb	T	Tb x T
Tempo (T)	<i>Desmina</i> ²			0,011	< 0,001	< 0,001
1h	0,99 ± 0,004 a	0,98 ± 0,010 a	0,99 ± 0,004 a			
3h	0,98 ± 0,005 a	0,98 ± 0,009 a	0,98 ± 0,010 a			
6h	0,97 ± 0,026 ab	0,97 ± 0,014 a	0,98 ± 0,013 a			
24h	0,91 ± 0,084 b	0,85 ± 0,065 b	0,97 ± 0,013 ab			
7d	0,57 ± 0,087 cB	0,59 ± 0,076 cB	0,85 ± 0,056 bA			
14d	0,52 ± 0,097 cB	0,50 ± 0,075 cB	0,67 ± 0,096 cA			

¹Médias ± desvio padrão. Médias que não compartilham mesma letra diferem entre si (P < 0,05);

²Degradação da desmina = banda intacta / soma de todas as bandas (intacta + produtos). Efeitos parciais às 24h P = 0,019, aos 7d P < 0,001 e aos 14d P < 0,001;

a-c comparação dentro da coluna;

A-B comparação dentro da linha.

4.8. Degradação da troponina-T

Assim como a degradação de desmina, a interação entre os tipos biológicos e o tempo *postmortem* (P = 0,001) não teve efeito para os tempos iniciais, mas após 24h determinou diferenças que se estenderam por todo o período avaliado. O sinal da banda intacta de troponina-T às 24h *postmortem* para os animais Angus não diferiu (P = 0,987) dos animais Brangus, que por sua vez foi menor (P = 0,020) do que para os animais Brahman (Tabela 7). Após 7d de maturação, os animais Angus alcançaram maiores (P = 0,001) valores de degradação da troponina-T quando comparados aos animais Brahman, mas não diferiram dos animais Brangus (P = 0,808), exatamente como os valores de força de cisalhamento neste ponto. Além disso, após 14d de maturação, os animais Angus e Brangus mostraram uma degradação maior quando comparado aos animais Brahman (Tabela 7). Quando observados os padrões de degradação dentro de cada tipo biológico, foi possível observar que enquanto Angus e Brangus mostram um padrão semelhante de degradação, Brahman tem um padrão diferenciado (Tabela 7). Da mesma forma, pela observação das bandas

dos produtos de degradação da troponina-T o padrão diferenciado e atrasado para os animais Brahman quando comparado aos animais Angus e Brangus é evidente às 24h *postmortem* e se estende até os 14d (Figura 19). A degradação da troponina-T e da desmina avaliadas às 24 h *postmortem* apresentaram alta correlação (Coeficiente de Pearson = 0,883, $P < 0,0001$; Figura 20B).

Figura 19. Troponina-T (37 kDa) e produtos de sua degradação (bandas inferiores até menor banda, 28 kDa) identificados por imunodeteção, em homogenato total do músculo *Longissimus lumborum* em três diferentes tipos biológicos de bovinos e de acordo com tempo *postmortem*.

Tabela 7. Degradação de troponina-T em *Longissimus lumborum* em três diferentes tipos biológicos de bovinos em diferentes tempos *postmortem*¹

	Tipo biológico (Tb)			Efeito tipo III		
	Angus	Brangus	Brahman	Tb	T	Tb x T
Tempo (T)	Troponina-T ²			0,037	< 0,001	0,001
1h	0,86 ± 0,042 a	0,913±0,049 a	0,851±0,059 a			
3h	0,852±0,037 a	0,881±0,062 a	0,835±0,053 a			
6h	0,808±0,084 ab	0,827±0,073 a	0,799±0,093 a			
24h	0,677±0,133 bAB	0,610±0,168 bB	0,788±0,049 aA			
7d	0,293±0,094 cB	0,387±0,118 cAB	0,515±0,065 bA			
14d	0,222±0,075 cB	0,225±0,084 dB	0,390±0,089 bA			

¹Médias ± desvio padrão. Médias que não compartilham mesma letra diferem entre si ($P < 0,05$);

²Degradação de troponina-T = banda intacta / soma de todas as bandas (intacta + produtos). Efeitos parciais às 24h $P = 0,001$, aos 7d $P < 0,001$ e aos 14d $P < 0,001$;

a-d comparação dentro da coluna;

A-B comparação dentro da linha.

Figura 20. Correlação de Pearson entre A) autólise completa da μ -calpaína e a formação da banda de 150 kDa da proteína alfa-II-espectrina e B) degradação de desmina e troponina-T obtidas por análise de imunodeteção às 24h *postmortem*.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos tipos biológicos

Os animais dos três tipos biológicos estudados diferiram quanto ao desempenho em confinamento, principalmente no que se refere a deposição de gordura subcutânea, sendo que os animais Brahman atingiram mesmo ponto de abate (1,27 cm de espessura) com peso vivo e de carcaça inferiores. Os mesmos resultados foram encontrados em comparações entre cruzamentos destes mesmos tipos biológicos, mostrando que os animais cruzados Brahman levaram menor tempo para atingir mesma espessura de gordura, com menor peso de carcaça (Koch, Dikeman e Crouse, 1982). Por outro lado, os resultados observados entre grupos contemporâneos de animais $\frac{3}{4}$ Brahman e puros Angus mostram que, para atingirem mesma espessura de gordura, o primeiro grupo era mais pesado na entrada do confinamento e foram abatidos com maior peso vivo, no entanto, mesmo rendimento de carcaça (Huffman et al., 1990).

Na determinação do grau de rendimento de carcaça pelo sistema norte-americano (USDA Yield Grade), todos os tipos biológicos resultaram em média que classifica suas carcaças a um valor de grau de rendimento 3. Para sua composição, o índice considera a contribuição da gordura subcutânea mas também da gordura visceral, sendo que maiores valores do índice são considerados inferiores quanto ao rendimento. A classificação de grau de rendimento 3, representa uma carcaça completamente coberta por gordura com a parte magra visível apenas na parte do pescoço e nas partes inferiores externas do traseiro, além de geralmente ter uma cobertura de gordura ligeiramente espessa na região lombar, das costelas e interna do traseiro e moderadamente espessa sobre a garupa, anca e paleta (USDA, 2016). Estes resultados não corroboram com grau de rendimento menores e, portanto, melhores, valores de grau de rendimento para Angus quando comparado a animais com $\frac{1}{4}$ ou mais de contribuição genética Brahman (Huffman et al., 1990). Estes autores apontam a área de olho de lombo como a principal responsável pela diferença observada, dadas as maiores áreas por 100 kg de carcaça de animais Angus.

A classificação diferenciada para marmorização dos bifes, com mesmos escores para Angus e Brangus e menor escore médio para Brahman, contribuiu para a classificação de qualidade das carcaças segundo o padrão norte-americano (USDA Quality Grade). A maior deposição de gordura intramuscular é responsável pelo escore de marmorização mais elevado e, portanto, melhor classificação de qualidade geral para carcaças Angus e Brangus. Tais evidências corroboram com resultados mostrando que para atingir mesmo grau de marmorização, os animais cruzados Brahman precisarão ser mais pesados do que outros tipos biológicos (Koch, Dikeman e Crouse, 1982). Considerando-se ponto de abate com similares valores de gordura subcutânea, o conteúdo

de gordura intramuscular no músculo *Longissimus* é menor em animais $\frac{1}{2}$ e $\frac{3}{4}$ Brahman quando comparados a $\frac{3}{4}$ ou puros Angus (Johnson et al., 1990). Com ponto de abate estabelecido a valores próximos a 1,27 cm de gordura subcutânea, há diferenças na classificação de marmorização para bifes Brahman como ‘ligeira presença de gordura’, enquanto os bifes de Angus alcançaram ‘pequena presença de gordura’ (Elzo et al., 2012). No entanto, a força de cisalhamento parece reduzir ligeiramente com o aumento da marmorização, de ‘traços’ para ‘pequena’, para ambos tipos biológicos *Bos taurus* e *Bos indicus*, sendo que por explicar apenas 5% da variação em palatabilidade requer avaliação adicional ao USDA Quality Grade para segregar carcaças com palatabilidade distintas (Wheeler, Cundiff e Koch, 1994).

Os valores de força de cisalhamento aos 7d de maturação mostram que há diferença entre os tipos biológicos quanto a taxa de amaciamento, sendo que os bifes de Brahman sofrem tanto redução na taxa como na extensão do amaciamento. Apenas a média de bifes de Angus após o período de maturação de 7d alcançou valor suficiente (menor que 43 N) para atingir patamares aceitáveis para o Programa de Maciez do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2011). Apesar de menos intensa, a taxa de amaciamento dos bifes de Brangus foi responsável por atingir média de força de cisalhamento próxima aos patamares de aceitação após 14d de maturação, enquanto para Brahman o cenário se modifica, com a média dos bifes ainda em condição não ideal para serem considerados macios, pela maciez instrumental. Esse comprometimento no amaciamento com o aumento da contribuição genética Brahman corrobora com observações de que após período de maturação de 5 dias, bifes proveniente de animais $\frac{3}{4}$ Brahman ainda têm valores de força de cisalhamento superiores ao limite de maciez (65 N), quando comparados a bifes proveniente de animais $\frac{1}{2}$ Brahman (51 N), ou animais $\frac{3}{4}$ e puros Angus (48 N; Johnson et al., 1990).

As medidas de cor dos bifes às 48 horas *postmortem* revelam que há uma variação maior entre os parâmetros relacionados aos bifes de Brahman. A instabilidade da cor dos bifes é um problema potencial para a indústria de carne, uma vez que tem impacto direto na aceitabilidade do produto pelo mercado consumidor. Em recente pesquisa envolvendo 26 países com mais de 1238 respondentes, a variação dos parâmetros L^* e b^* foram percebidas pelos consumidores e consideradas como potenciais candidatos para o estabelecimento de limites de percepção visual determinantes da aceitabilidade (Holman et al., 2016). Neste sentido, os valores de L^* explicam 21%, enquanto os valores de b^* explicam 23%, da variação dos índices gerais de palatabilidade por painel sensorial (Wulf e Page, 2000). Valores de L^* mais baixos, indicando bife com menor luminosidade, combinado com valores de b^* mais baixos, indicando bifes com menor contribuição de amarelo do prisma de cor ($CIE L^* a^* b^*$) estão relacionados a maior capacidade de retenção de

água e potencialmente ao quadro de DFD (da sigla em inglês Dark, Firm and Dry), principalmente em cenário com maior incidência de pH final alto.

5.2. Atividades das enzimas glicolíticas e declínio do pH

A atividade de lactato desidrogenase foi utilizada como indicador do metabolismo glicolítico no músculo *Longissimus lumborum* e não diferiu entre os tipos biológicos. Estes resultados não corroboram com aumento observado na contribuição da fibra tipo IIx, de metabolismo glicolítico, na área de secção transversal nesta musculatura, associado ao aumento da contribuição genética de Brahman na composição de tipos biológicos (Wright et al., 2016). Por outro lado, a relação direta entre atividade de lactato desidrogenase e proporção de fibras glicolíticas tipo IIx no perfil de fibras musculares no *Longissimus thoracis* pode não ocorrer, sendo observada a redução de atividade de lactato desidrogenase, assim como aumento de atividade de citrato sintase, porém sem efeito no declínio de pH *postmortem* em animais Angus selecionados para aumento de musculossidade com maior contribuição das fibras glicolíticas (McGilchrist et al., 2016).

A maior atividade de citrato sintase do músculo *Longissimus lumborum* dos animais Brahman comparada àquela para Brangus aponta para alterações do metabolismo oxidativo *postmortem* entre estes tipos biológicos que está diretamente relacionada ao aumento do conteúdo mitocondrial desta musculatura. A atividade de citrato sintase foi utilizada como indicador do metabolismo oxidativo, que potencialmente difere entre os grupos. As alterações no perfil de fibras, com aumento da contribuição da fibra tipo IIx parecem estar relacionadas ao aumento da atividade da enzima mitocondrial em musculaturas glicolíticas (Wright et al., 2016). Da mesma forma, foi observado aumento da atividade de citrato sintase após estímulo da proteína quinase ativada por AMP na porção branca (glicolítica) e não vermelha (oxidativa) do músculo *Quadriceps* de camundongos (Winder et al., 2000), fato que aponta para uma resposta adaptativa da musculatura à indução do exercício. Por outro lado, touros jovens, de mesmo tipo biológico (Charolês) divergentemente selecionados para baixa e alta capacidade de crescimento muscular, têm mesma atividade de citrato sintase no *Longissimus thoracis* (Bernard et al., 2009). Enquanto a maior atividade de citrato sintase é esperada em músculos mais oxidativos, entre músculos com metabolismos distintos, a maior atividade de citrato sintase está relacionada a maior resistência de declínio de pH em músculos com menor atividade de miosina ATPase (Talmant e Monin, 1986).

Os valores de declínio de pH são diferenciados entre os tipos biológicos, sendo que há uma relação entre o maior conteúdo mitocondrial para a musculatura dos animais Brahman e a maior resistência ao declínio do pH após a sangria. O atraso na queda do pH pode ser um indicativo de que a integridade mitocondrial é preservada por um tempo maior, potencialmente atrasando os

eventos apoptóticos que derivam de sua desestruturação, o que pode influenciar a ativação das proteases, sequencialmente a degradação proteica e, finalmente, a taxa e extensão do amaciamento. De fato, além da resistência à acidificação, os bifes de animais Brahman mostraram redução na taxa de amaciamento. Resultados similares foram encontrados anteriormente, com taxa rápida de declínio de pH medido no *Longissimus lumborum* promovendo melhora na avaliação sensorial de maciez aos bifes maturados por 2 e 7d, além de menores valores de força de cisalhamento aos 2, 7 e 14d (O'Halloran, Troy e Buckley, 1997). Adicionalmente, a relação curvilínea entre o declínio do pH e a força de cisalhamento mostram que há uma taxa ideal na qual a glicólise está relacionada a menores valores de força de cisalhamento, principalmente após 14 dias de maturação (Hwang e Thompson, 2001).

5.3. Respiração mitocondrial

O fluxo de oxigênio consumido tanto pela respiração base mitocondrial como pelos complexos I e II, assim como a relação entre essas medidas apresentam valores próximos daqueles reportados na literatura. Para músculo *Gluteus medius* de cavalos Quarto de Milha jovens, a relação entre a respiração base e aquela observada pelos complexos mitocondriais I e II está em torno de 0,08 (Li et al., 2016). A ausência de interação entre os tipos biológicos e temperaturas, bem como dos fatores isolados, mostra que o sistema de transporte de elétrons acoplado a produção de ATP tem mesmo comportamento para os tipos biológicos em ambos os cenários de temperatura avaliados.

Por outro lado, o fluxo de oxigênio consumido pelo vazamento de prótons após adição de oligomicina (estado 4) difere tanto na comparação entre os tipos biológicos em temperatura de 38,5 °C como para os animais Brahman nas diferentes temperaturas. Quanto maior o consumo de oxigênio, maior o vazamento de prótons que ocorre nesta etapa, sendo que após a correção pela atividade de citrato sintase calculada com base no peso do tecido, a interação desaparece e não há diferença entre tipos biológicos ou temperatura isolados. Dessa forma é possível verificar que o resultado foi reflexo do maior conteúdo mitocondrial no músculo dos animais Brahman e potencialmente de alterações metabólicas adaptativas da musculatura desses tipos biológicos, como pela maior presença de desacopladores. Aumento no estado 4 da respiração mitocondrial está relacionado ao aumento do conteúdo de UCP3 nas mitocôndrias intermiofibrilares do músculo *Tibialis anterior* de ratos (Ljubcic, Adhietty e Hood, 2004).

A diferença estabelecida no estado 4 entre os tipos biológicos a 38,5 °C determina a respiração associada ao sistema de transporte de elétrons após adição de desacoplador. O valor médio encontrado em torno de 25 pmol/s/mg de tecido para este estudo seria próximo daquele

esperado para a espécie bovina. A relação entre este valor e a respiração máxima no músculo *Gluteus medius* de cavalos Quarto de Milha jovens, com valor médio de 80 pmol/s/mg de tecido (Li et al., 2016), situou-se em 3,2. Equinos apresentaram capacidade respiratória máxima 2,6 vezes superior a de bovinos (Weibel et al., 1991).

Por sua vez, quando comparados os fluxos de oxigênio consumido pelo STE desacoplado para o tipo biológico Brahman nas diferentes temperaturas, a inibição do vazamento de prótons quando avaliados a 40 °C, aponta para um mecanismo adaptativo que é alterado para este tipo biológico e potencialmente está relacionado a desacopladores. A maior expressão da proteína desacopladora UCP3 em musculatura de ratos, em condição de subalimentação, parece estar relacionada a um papel que os desacopladores passam a exercer na termorregulação naquele estado fisiológico (Gong et al., 1997).

A relação entre o fluxo de oxigênio consumido pelos complexos I e II e aquele consumido pelo STE desacoplado está acima de 1, indicando prejuízos ao STE que potencialmente foram provocados pela condição de anoxia na coleta das amostras.

5.4. Autólise de μ -calpaína

A autólise incompleta da μ -calpaína revela que há um atraso relacionado ao tipo biológico Brahman quando comparado aos outros tipos biológicos. A taxa de amaciamento para este tipo biológico é mais lenta do que para os outros grupos. No entanto, não é possível verificar diferenças na autólise incompleta às 24h *postmortem*, demonstrando que a contribuição da banda de 78 kDa determina similaridades entre os tipos biológicos. Previamente, resultados utilizando mesmo rebanho, mostrou que o conteúdo de calpastatina é diferente entre estes tipos biológicos, com autólise completa da μ -calpaína diminuindo com o aumento do conteúdo de calpastatina avaliados às 24 h *postmortem* ($r^2 = -0,33$; Wright et al., 2016). O conteúdo de calpastatina e sua atividade têm maior importância para animais zebuínos (Whipple et al., 1990a; Pringle et al., 1997) e existem evidências de que enquanto o passo inicial da autólise ocorre (formação da banda de 78 kDa), sua progressão pode ser reduzida pela calpastatina (Koohmaraie, 1992). A calpastatina é cálcio dependente e quando submetida a concentrações baixas deste íon e alto valores de pH, é possível que sua ativação seja mais rápida para os animais Brahman em comparação aos outros grupos. Em touros com pH às 48 h *postmortem* na faixa entre 5,81 e 6,2, a redução da degradação proteica é resultado da alta atividade de calpastatina (Lomiwes et al., 2013). Portanto, a ativação e maior atividade inibitória atinge maiores taxas *postmortem* na musculatura de animais Brahman que mostram maior resistência ao declínio do pH e exibem redução na autólise incompleta de μ -calpaína.

Alinhado aos resultados de resistência ao declínio de pH também estão os resultados de autólise completa de μ -calpaína, com animais Brahman alcançando menores valores de autólise às 24 h *postmortem*. É possível que as mitocôndrias do *Longissimus lumborum* dos animais Brahman permaneçam íntegras por mais tempo do que aquelas dos animais Brangus, influenciando o resultado. Às 24 h *postmortem*, a maioria das diferenças relacionadas ao extravazamento de prótons e cálcio ao sarcoplasma já foram estabelecidas entre os tipos biológicos, permitindo a diferenciação da taxa de autólise completa entre eles, principalmente pela ação da calpastatina. O atraso na ativação da cascata apoptótica está potencialmente relacionado ao atraso na autólise completa e incompleta de μ -calpaína. Este cenário comprometeria a degradação proteica e o amaciamento da carne.

5.5. Degradação proteica

A degradação da titina corrobora com os resultados de força de cisalhamento para os diferentes tipos biológicos, sendo que a lenta degradação está associada à maior resistência ao corte dos bifes. A formação da banda de degradação da titina (T2) a partir das 24h *postmortem* para os grupos Angus e Brangus está relacionada a maior ocorrência de bifes macios. A degradação de titina em *Longissimus dorsi* com a formação da banda T2 está relacionada a menores valores de força de cisalhamento em cenários de pH final alto (Wu et al., 2014) ou para novilhos comparados a touros ou vacas (Huff-Lonergan, Parrish e Robson, 1995). Bifes selecionados como macios ou muito macios após maturação por 14d podem não apresentar mais a banda de degradação T2, indicando maior proteólise (Anderson e Parrish Jr., 1989). Pela contribuição importante que a titina tem no músculo, tanto pela função como pela maior participação percentual dado seu tamanho, sua degradação *postmortem* determina avanços importantes na proteólise de outras proteínas miofibrilares.

A degradação da nebulina avaliada pelo desaparecimento da banda sem relação com a miosina é reduzida às 24 h *postmortem* para Brahman, corroborando com o atraso na degradação proteica para este tipo biológico. No entanto, após 7d de maturação essa redução na degradação está associada ao tipo biológico Brangus, corroborando com os valores de força de cisalhamento ainda altos para este tipo biológico neste ponto da maturação. Assim também foram os resultados da reduzida degradação de nebulina associada a bifes classificados como menos macios, além de ser dependente também da categoria animal (novilhos *vs.* touros *vs.* vacas) e idade (Anderson e Parrish Jr. 1989; Huff-Lonergan, Parrish e Robson, 1995). No entanto, no presente estudo os bifes classificados como macios aos 7d de maturação, que pertencem ao tipo biológico Angus, exibiram valores da emissão de sinal pela nebulina muito semelhantes aos do grupo Brahman.

Pela dificuldade na quantificação do sinal emitido por essa proteína em gel de agarose, dado a grande variação nas medidas, foi feita a comparação entre os tipos e tempos *postmortem* em relação à miosina, mas não foi encontrada interação entre os tipos biológicos e o tempo *postmortem*, sendo que apenas o tempo apresentou efeito, como esperado.

Após a degradação da alfa-II-espectrina, a formação da banda de 150 kDa como produto é diferenciada entre os tipos biológicos às 24h *postmortem*, sendo que para o *Longissimus lumborum* dos animais Brangus essa formação é antecipada em relação aos outros grupos. O mesmo grupo apresenta a mais rápida taxa de declínio de pH, relação que remete a ideia de que há um impacto direto dessa acidificação na ativação das proteases, potencialmente envolvendo diferentes sistemas proteolíticos, uma vez que a banda 150 kDa pode também ser produto da degradação de caspases. Além disso, diferenças potenciais entre os tipos biológicos e a ativação da skm-calpaína são passíveis de contribuição para a formação desse quadro.

A banda de peso molecular 145 kDa aparentemente se forma antecipadamente no músculo dos animais Brahman (visualização do padrão de formação pela imagem de imunodeteção) e seria referente a proteólise por ação da calpaína, porém não há diferença quanto sua formação, assim como o desaparecimento da banda intacta é o mesmo entre os tipos biológicos. No presente estudo, não foi possível encontrar bandas com peso molecular inferiores a 145 kDa, que seriam referentes aos produtos de degradação exclusivamente pela ação da caspase-3, quando apoptose está presente (McGinnis et al., 1999). No entanto, a ausência não indica outro processo para a conversão de músculo em carne que não seja apoptótico. Resultados da degradação de alfa-II-espectrina em tecido cerebral danificado de camundongos mostram que os padrões de degradação são tecido-dependentes, sendo que a banda de 120 kDa foi identificada em hipocampo e não no córtex, mas ambos tecidos apresentaram aumento na formação da banda de 150 kDa (Warren et al., 2005). O processo de morte celular neuronal é apoptótico e envolve caspase e calpaína (Wang, 2000). Portanto, a interação entre as calpaínas e caspase-3 em cenários com distinto conteúdo de calpastatina na determinação da degradação da alfa-II-espectrina deve ser melhor elucidado.

A degradação de desmina às 24h *postmortem* diferenciada entre os tipos biológicos e o atraso na formação da banda de menor peso molecular para bifes dos animais Brahman, após 14 d de maturação, evidenciam novamente relação com a resistência ao declínio do pH e, consequentemente, a redução no amaciamento para este tipo biológico. Adicionalmente, os animais Brangus apresentam taxa de degradação de desmina acelerada inicialmente quando comparada aos animais Angus, mas que aos 7d de maturação já são similares e permanecem até os 14d. A preservação da estrutura muscular é evidenciada pela menor degradação da desmina e está

relacionada a preservação da condição intacta da mitocôndria, também evidenciada pela maior atividade de citrato sintase. A proteólise da desmina está associada a maior promoção da morte celular por apoptose (Chen et al., 2003) e o mecanismo explanatório, apontado pelos autores, é a relação entre a deficiência de desmina e a morfologia anormal das mitocôndrias, com matriz inchada e desintegração (Milner et al., 2000). A organização muscular *in vivo* depende da desmina, fixando sarcolema e mitocôndrias, portanto em cenário *postmortem* sua degradação tem impacto determinante na taxa de amaciamento, principalmente quando consideradas diferenças oxidativas. Após exposição a irradiação durante o período inicial *postmortem*, a proteólise da desmina é dificultada, assim como é observada menor habilidade da μ -calpaína de degradar desmina em presença de peróxido de hidrogênio (Huff-Lonergan e Lonergan, 2005).

A degradação de troponina-T concilia todas as observações discutidas anteriormente. Às 24h *postmortem*, o maior impacto para promover o aumento da degradação está associado a maior taxa de declínio de pH, portanto os animais Brangus inicialmente tem maior degradação desta proteína, assim como mais rápido declínio de pH imediatamente após o abate. No entanto, após 7d de maturação a degradação passa a ser maior para o grupo Angus, que apresenta os menores valores de força de cisalhamento neste tempo e taxa de acidificação intermediária, entre os tipos biológicos. Após 14 d, ambos grupos Brangus e Angus são iguais em termos de degradação de troponina-T, assim como tem menores valores de força de cisalhamento quando comparado aos animais Brahman, que acidificou lentamente. Os resultados corroboram com a observação de que cruzamentos entre tipos biológicos promovem melhorias na maciez em tempos reduzidos de maturação, com consequente redução de custos ao processo (Marino et al., 2003). Por outro lado, quando comparadas as taxas de proteólise da troponina-T entre animais Angus e Brangus, o segundo grupo apresenta menor taxa mas mesma extensão, assim como acontece entre bifes de baixo e alto valores de força de cisalhamento entre touros e novinhos Brangus, com proteólise completa aos 7d para bifes de baixa força e 14d para bifes de alta força (Lonergan et al., 2001). Além dos níveis de calpastatina e atividade diferenciada entre os tipos biológicos (Pringle et al., 1997), outros processos fisiológicos podem também estar associados a redução da taxa proteolítica na carne. Para touros Angus e Angus x Limosin, que são mais propensos a maior ocorrência de pH final elevado, o atraso na degradação da troponina-T está associado com a faixa intermediária de pH determinado às 22 h *postmortem* (Pulford et al., 2009). Além disso, a maior resistência ao declínio de pH é potencialmente relacionada a maior oxidação proteica, provavelmente decorrente da maior produção de espécies reativas ao oxigênio durante a produção aeróbica de ATP. A oxidação das proteínas miofibrilares reduz a susceptibilidade à proteólise (Morzel et al., 2006) e pode ser prevenida pela adição de antioxidantes. Níveis baixos de oxidação em bifes com altos

níveis endógenos de vitamina E está relacionado ao aumento da proteólise de troponina-T (Rowe et al., 2004a). O aumento da oxidação proteica imediatamente pós abate está associado com o aumento da força de cisalhamento em tempos de maturação prolongados (Rowe et al., 2004b).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O amaciamento da carne entre os diferentes tipos biológicos estudados é diferente tanto quanto sua taxa como em relação a extensão da proteólise. Enquanto a taxa é acelerada para o tipo biológico Angus em comparação aos outros tipos, Brangus e Brahman, a extensão do amaciamento, isto é, a mudança que ocorre em termos de maciez no período avaliado, é maior para Angus, seguida pelo Brangus, os quais tiveram bifes considerados macios após 14d de maturação, e reduzida para Brahman, que não teve os bifes considerados macios no período. No entanto, a maciez dos bifes após 14d de maturação era esperada ser maior para todos os tipos biológicos.

A taxa e extensão reduzidas no amaciamento estão relacionadas a resistência a acidificação das carcaças imediatamente após o abate, para o tipo biológico Brahman. As carcaças Brahman pelo pH medido no *Longissimus lumborum* permaneceram com valores médios às 6h comparáveis aos valores dos outros tipos biológicos às 3h *postmortem*. Essa resistência a acidificação não parece estar associada ao metabolismo glicolítico entre os tipos biológicos, uma vez que apresentam similares valores de atividade de lactato desidrogenase, porém potencialmente há uma diferença entre os metabolismos oxidativos desta musculatura, pela maior atividade da citrato sintase. Essa diferença aponta para uma contribuição determinante das mitocôndrias entre os tipos biológicos, com maior consumo de oxigênio pelo vazamento de prótons e entre o sistema transportador de elétrons ambos desacoplados da produção de ATP, para o tipo biológico Brahman quando comparado a Angus. O maior conteúdo mitocondrial do *Longissimus lumborum* para os animais Brahman também está relacionado a redução da respiração no sistema desacoplado submetido a temperaturas elevada, potencialmente indicando um mecanismo adaptativo para este tipo biológico controlado por desacopladores.

A maior resistência à acidificação do músculo *Longissimus lumborum* dos animais Brahman, também está relacionada ao retardamento da ativação do principal sistema proteolítico relacionado ao amaciamento da carne, com redução da autólise incompleta e completa da μ -calpaína para este tipo biológico. Tal redução também é observada pela menor degradação proteica das diferentes proteínas miofibrilares: titina, nebulina, alfa-II-espectrina, desmina e troponina-T. Finalmente, o mecanismo adaptativo que potencialmente garantiu a sobrevivência e produtividade dos animais Brahman ao calor do ambiente, está também associado a redução da taxa e da extensão do amaciamento da carne deste tipo biológico quando comparado ao tipo biológico influenciado pela genética Angus.

7. CONCLUSÃO

O tipo biológico com grande contribuição genética da subespecie *Bos taurus indicus* apresentou maior conteúdo mitocondrial no músculo *Longissimus lumborum* que está associado à maior resistência à acidificação das carcaças e que definiu redução na taxa do amaciamento e extensão da proteólise da carne maturada por período estendido por até 14d e na comparação ao tipo biológico com maior contribuição genética da subespecie *Bos taurus taurus*. A degradação da alfa-II-espectrina apresentou alta correlação com a ativação da μ -calpaína e sugere-se que este sistema proteolítico seja responsável pela definição de sua degradação para os diferentes tipos biológicos, dado o padrão de formação das bandas de degradação observado.

REFERÊNCIAS

- AMSA Meat Color Measurement Guidelines (2012) **American Meat Science Association**, disponível em: <http://www.meatscience.org>, Champaign, Illinois, EUA
- Anderson TJ, Parrish Jr. FC (1989). A research note – Postmortem degradation of Titin and Nebulin of beef steaks varying in tenderness. **Journal of Food Science**, 54(3):748-749
- Apablaza A, Galaz A, Strobel P, Ramírez-Reveco A, Jeréz-Timaure N, Gallo C (2015) Glycolytic potential and activity of adenosine monophosphate kinase (AMPK), glycogen phosphorylase (GP) and glycogen debranching enzyme (GDE) in steer carcasses with normal (b5.8) or high (N5.9) 24 h pH determined in M. longissimus dorsi. **Meat Science**, 101:83-89
- Belk KE, Dikeman ME, Calkins CR, King AD, Shackelford SD, Hale D, Laird H (2015) Research Guidelines for Cookery, Sensory Evaluation, and Instrumental Tenderness Measurements of Meat. **American Meat Science Association**, Champaign, IL, USA.
- Bender DA, Mayes PA (2015) Glycolysis and the oxidation of pyruvate. In: **Harper's Illustrated Biochemistry**, 30ed, capítulo 17, The McGraw-Hill Education, New York, EUA
- Bennett PM, Baines AJ, Lecomte MC, Maggs AM, Pinder JC (2004) Not just a plasma membrane protein: in cardiac muscle cells alpha-II spectrin also shows a close association with myofibrils. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, 25:119-126
- Bernard C, Cassar-Malek I, Renand G, Hocquette JF (2009) Changes in muscle gene expression related to metabolism according to growth potential in young bulls. **Meat Science**, 82:205-212.
- Bernevic B, Petre BA, Galetskiy D, Werner C, Wicke M, Schellander K, Przybylski M (2011) Degradation and oxidation postmortem of myofibrillar proteins in porcine skeleton muscle revealed by high resolution mass spectrometric proteome analysis. **International Journal of Mass Spectrometry**, 305:217-227
- Chen F, Chang R, Trivedi M, Capetanaki Y, Cryns V L (2003) Caspase Proteolysis of Desmin Produces a Dominant-negative Inhibitor of Intermediate Filaments and Promotes Apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, 278(9):6848-6853
- Cruzen SM, Paulino PVR, Lonergan SM, Huff-Lonergan, E (2014) Postmortem proteolysis in three muscles from growing and mature beef cattle. **Meat Science**, 96:854-861
- Curi RA, Chardelo LA, Giusti J, Silveira AC, Martins CI, Oliveira HN (2010) Assessment of GH1, CAPN1 and CAST polymorphisms as markers of carcass and meat traits in Bos indicus and Bos taurus-Bos indicus cross beef cattle. **Meat Science**, 86: 915-920
- Darwin, Charles (1868) The variation of Animals and Plants under domestication. **London**, Cap. XVII – On the Good effects of crossing and the Evil effects of close interbreeding, London
- De Matteis MA, Morrow JS (2000) Commentary. Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. **Journal of Cell Science**, 113:2331-2343
- Delgado EF, Aguiar AP, Ortega EMM., Spoto MHF, Castillo CJC (2006) Brazilian consumers' perception of tenderness of beef steaks classified by shear force and taste. **Scientia Agrícola**, 63:232-239
- Delgado EF, Geesink GH, Marchello JA, Goll DE, Koohmaraie M (2001a) The calpain system in three muscles of normal and callipyge sheep. **Journal of Animal Science**, 79:398-412
- Delgado EF, Geesink GH, Marchello JA, Goll DE, Koohmaraie M (2001b) Properties of myofibril-bound calpain activity in longissimus muscle of callipyge and normal sheep. **Journal of Animal Science**, 79:2097-2107

- Elzo MA, Johnson DD, Wasdin JG, Driver JD (2012) Carcass and meat palatability breed differences and heterosis effects in an Angus–Brahman multibreed population. **Meat Science**, 90:87-92
- Fausto DA, Lima MA, Ramos PM, Pertile SFN, Susin I, Delgado EF (2017) Cold shortening decreases the tenderization of Biceps femoris muscle from lambs, **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**_no prelo
- Ferguson DM, Warner RD (2008) Review: Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? **Meat Science**, 80:12-19
- Ferraz JBS, Felício PE (2010) Production system – An example from Brazil. **Meat Science**, 84: 238-243
- Godfrey RW, Smith SD, Guthrie MJ, Stanko R.L, Neuendorff DA, Randel RD (1991) Physiological responses of newborn Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus calves after exposure to cold. **Journal of Animal Science**, 69:258-263
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The Calpain System. **Physiological Review**, 83:731-801
- Gong, DW, He Y, Karas M, Reitman M (1997) Uncoupling Protein-3 Is a Mediator of Thermogenesis Regulated by Thyroid Hormone, β 3-Adrenergic Agonists, and Leptin. **The Journal of Biological Chemistry**, 272(39):24129-24132
- Ho CY, Stromer MH, Robson RM (1994) Identification of the 30 kDa polypeptide in postmortem skeletal muscle as degradation product of troponin-T. **Biochimie**, 76:369-375
- Holman YM, Coombs CEO, van de Ven RJ, Hopkins DL (2016) Relationship between colorimetric (instrumental) evaluation and consumer-defined beef colour acceptability. **Meat Science**, 121:104-106
- Hood, David A (2001) Invited Review: Contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, 90:1137-1157
- Howard A (1963) The relation between physiological stress and meat quality. In D.E. Tribe (Ed.) **Carcass composition and appraisal of meat animals**, 11–21p, Melbourne, Australia: CSIRO
- Huff-Loneragan E, Lonergan SM (2005) Review. Mechanisms of water-holding capacity of meat: the role of postmortem biochemical and structural changes. **Meat Science**, 71:194-204
- Huff-Loneragan E, Mitsuhashi T, Beekman DD, Parrish FC, Olson DG, Robson RM (1996) Proteolysis of Specific Muscle Structural Proteins by μ -calpain at Low pH and Temperature Is Similar to Degradation in Postmortem Bovine Muscle. **Journal of Animal Science**, 74:993-1008
- Huff-Loneragan E, Parrish FC, Robson RM (1995) Effects of postmortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, 73:1064-1073
- Huffman RD, Williams SE, Hargrove DD, Johnson DD, Marshall TT (1990) Effects of percentage Brahman and Angus breeding, age-season of feeding and slaughter end point on feedlot performance and carcass characteristics. **Journal of Animal Science**, 68(8):2243-2252
- Hwang IH, Thompson JM (2001) The interaction between pH and temperature decline early postmortem on the calpain system and objective tenderness in electrically stimulated beef longissimus dorsi muscle. **Meat Science**, 58:167-174
- Ilian MA, Bekhit AEI-DinA., Stevenson B, Morton JD, Isherwood P, Bickerstaffe R (2004) Up- and down-regulation of longissimus tenderness parallels changes in the myofibril-bound calpain 3 protein. **Meat Science**, 67:433-445
- Ilian MA, Morton JD, Kent MP, Le Couteur CE, Hickford J, Cowley R, Bickerstaffe R (2001) Intermuscular variation in tenderness: Association with the ubiquitous and muscle-specific calpains. **Journal of Animal Science**, 79:122-132

- Immonen K, Ruusunen M, Hissa K, Puolanne E (2000) Bovine muscle glycogen concentration in relation to finishing diet, slaughter and ultimate pH. **Meat Science** 55:25-31
- Johnson DD, Huffman RD, Williams SE, Hargrov DD (1990) Effects of percentage Brahman and angus breeding, age-season of feeding and slaughter end point on meat palatability and muscle characteristics. **Journal of Animal Science**, 68(7):1980-1986
- Kemp CM, Bardsley RG, Parr T (2006) Changes in caspase activity during the postmortem conditioning period and its relationship to shear force in porcine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, 84:2841-2846
- King DA, Schuehle PCE, Randel RD, Welsh Jr TH, Oliphint RA, Baird BE, Curley Jr KO, Vann RC, Hale DS, Savell JW (2006) Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. **Meat science**, 74:546-556
- Koch RM, Dikeman ME, Crouse JD (1982) Characterization of biological types of cattle (cycle III): III. Cracass composition, quality and palatability. **Journal of Animal Science**, 54(1):35-45
- Koohmaraie M, Geesink GH (2006) Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Science**, 74:34-43
- Koohmaraie, Mohamed (1992) Effect of pH, Temperature, and Inhibitors on Autolysis and Catalytic Activity of Bovine Skeletal Muscle μ -Calpain. **Journal of Animal Science**, 70:3071-3080
- Koohmaraie, Mohammad (1994) Muscle Proteinases and Meat Aging. **Meat Science**, 36:93-104
- Kuznetsov AV, Veksler V, Gellerich FN, Saks V, Margreiter R, Kunz WS (2008) Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells-protocol. **Nature Protocols**, 3(6):965-976
- Laville E, Sayd T, Morzel M, Blinet S, Chambon C, Lepetit J, Renand G, Hocquette JF (2009) Proteome changes during meat aging in tough and tender beef suggest the importance of apoptosis and protein solubility for beef aging and tenderization. **J. Agric. Food Chem.**, 57(22):10755-10764
- Li C, White SH, Warren LK, Wohlgemuth SE (2016) Effects of aging on mitochondrial function in skeletal muscle of American Quarter Horses. **Journal of Applied Physiology**, 121:299-311
- Ljubcic V, Adhietty PJ, Hood DA (2004) Role of UCP3 in state 4 respiration during contractile activity-induced mitochondrial biogenesis. **Journal of Applied Physiology**, 97:976-983
- Lomiwes D, Farouk MM, Frost DA, Dobbie PM, Young OA (2013) Small heat shock proteins and toughness in intermediate pHu beef. **Meat Science**, 95:472-479
- Lomiwes D, Farouk MM, Wu G, Young OA (2014) The development of meat tenderness is likely to be compartmentalised by ultimate pH. **Meat Science**, 96:646-651
- Lonergan SM, Huff-Lonergan E, Wiegand BR, Kriese-Anderson LA (2001) Postmortem proteolysis and tenderization of top loin steaks from Brangus cattle. **Journal of Muscle Foods**, 12:121-136
- Marino R, Albenzio M, Malva A della, Santillo A, Loizzo P, Sevi A (2013) Proteolytic pattern of myofibrillar protein and meat tenderness as affected by breed and aging time. **Meat Science**, 95:281-287
- Martin GS, Carstens GE, King MD, Eli AG, Mersmann HJ, Smith SB (1999) Metabolism and Morphology of Brown Adipose Tissue from Brahman and Angus Newborn Calves. **Journal of Animal Science**, 77:388-399
- McElhinny AS, Kazmierski ST, Labeit S, Gregorio CC (2003) Nebulin: The Nebulous, Multifunctional Giant of Striated Muscle. **Trends Cardiovasc Med**, 13:195-201
- McGilchrist P, Greenwood PL, Pethick DW, Gardner GE (2016) Selection for increased muscling in Angus cattle did not increase the glycolytic potential or negatively impact pH decline, retail colour stability or mineral content. **Meat Science**, 114:8-17

- McGinnis KM, Gnegy ME, Park YH, Mukerjee N, Wang KKW (1999) Procaspase-3 and Poly(ADP)ribose Polymerase (PARP) are calpain substrates. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 263:94-99
- McKeith RO, King AD, Grayson AL, Shackelford SD, Gehring KB, Savell JW, Wheeler TL (2016) Mitochondrial abundance and efficiency contribute to lean color of dark cutting beef. **Meat Science**, 116:165-173
- Milner DJ, Mavroidis M, Weisleder N, Capetanaki Y (2000) Desmin Cytoskeleton Linked to Muscle Mitochondrial Distribution and Respiratory Function. **The Journal of Cell Biology**, 150(6):1283-1297
- Morzel M, Gatellier P, Sayd T, Renerre M, Laville E (2006) Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins. **Meat Science**, 73:536-543
- Mostyn PC, Carstens GE, Lammoglia MA, Vann RC, Holloway JW, Randel RD (1993) Nonshivering thermogenesis in *Bos taurus* and *Bos indicus* newborn calves. **Beef Cattle Research in Texas**, PR-5054:15-17
- Natrag SS, Cafe LM, McIntyre BL, Gardner GE, McGilchrist P, Robinson DL, Wang YH, Pethick DW, Greenwood PL (2014) A post-transcriptional mechanism regulates calpastatin expression in bovine skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, 92:443-455
- Nelson DL, Cox MM (2006) Fosforilação oxidativa e fotofosforilação. In: **Lehninger: princípios de bioquímica**, 4ed, capítulo 19, Sarvier, São Paulo
- O'Connor SF, Tatum JD, Wulf DM, Green RD, Smith GC (1997) Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, 75:1822-1830
- O'Halloran GR, Troy DJ, Buckley DJ (1997) The Relationship between Early Post-mortem pH and the Tenderisation of Beef Muscles. **Meat Science**, 45(2):239-251
- Olson DG, Parrish Jr FC, Stromer MH (1976) Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage. **Journal of Food Science**, 41:1036-1041
- Paulin D, Li Z (2004) Review. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. **Experimental Cell Research**, 301:1-7
- Penny IF, Dransfield E (1979) Relationship between toughness and topnin-t in conditioned beef. **Meat Science**, 3:135-141
- Perry SV (1998) Review. Troponin T: genetics, properties and function. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, 19:575-602
- Picard M, Hepple RT, Burelle Y (2012) Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, 302:C629-C641
- Pringle TD, Harrelson JM, West RL, Williams SE, Johnson DD (1999) Calcium-Activated Tenderization of Strip Loin, Top Sirloin, and Top Round Steaks in Diverse Genotypes of Cattle. **Journal of Animal Science**, 77:3230-3237
- Pringle TD, Williams SE, Lamb BS, Johnson DD, West RL (1997) Carcass Characteristics, the Calpain Proteinase System, and Aged Tenderness of Angus and Brahman Crossbred Steers. **Journal of Animal Science**, 75:2955-2961
- Pulford DJ, Dobbie P, Vazquez SF, Fraser-Smith E, Frost DA, Morris CA (2009). Variation in bull beef quality due to ultimate muscle pH is correlated to endopeptidase and small heat shock protein levels. **Meat Science**, 83:1-9
- Purchas RW, Burnham DL, Morris S T (2002) Effects of growth potential and growth path on tenderness of beef longissimus muscle from bulls and steers. **Journal of Animal Science**, 80:3211-3221

- Rezende, LR (2011) 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. **Dissertação de Mestrado**, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, Brasil
- Robson R (1995) Myofibrillar and cytoskeletal structures and proteins in mature skeletal muscle cells. In **Expression of Tissue Proteinases and Regulation of Protein Degradation as Related to Meat Quality**. Ed. A. Ouali, D. I. Demeyer e F. J. M. Smulders, 267p, ECCEAMST, Utrecht, The Netherlands
- Rowe LJ, Maddock KR, Lonergan SM, Huff-Lonergan E (2004a) Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of μ -calpain. **Journal of Animal Science**, 82:3254-3266
- Rowe LJ, Maddock KR, Lonergan SM, Huff-Lonergan E (2004b) Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. **Journal of Animal Science**, 82:785-793
- Saccà E, Pizzutti N, Corazzin M, Lippe G, Piasentier E (2016) Rapid communication. Assessment of calpain and caspase systems activities during ageing of two bovine muscles by degradation patterns of α II spectrin and PARP-1. **Animal Science Journal**, 87:462-466
- Savell JW, Mueller SL, Baird BE (2005) Review: The chilling of carcasses. **Meat Science**, 70:449-459
- Scheffler TL, Matarneh SK, England EM, Gerrard DE (2015). Mitochondria influence postmortem metabolism and pH in an in vitro model. **Meat Science**, 110:118-125
- Schutt KM, Burrow HM, Thompson JM, Bindon BM (2009) Brahman and Brahman crossbred cattle grown on pasture and in feedlots in subtropical and temperate Australia. 2. Meat quality and palatability. **Animal Production Science**, 49:439-451
- Sentandreu MA, Coulis G, Ouali A (2002) Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. **Trends in Food Science & Technology**, 13:400-421
- Serra X, Gil M, Gispert M, Guerrero L, Oliver MA, Sañudo C, Campo MM, Panea B, Olleta JL, Quintanilla R, Piedrafita J (2004) Characterisation of young bulls of the Bruna dels Pirineus cattle breed (selected from old Brown Swiss) in relation to carcass, meat quality and biochemical traits. **Meat Science**, 66:425-436
- Shackelford SD, Koohmaraie M, Miller MF, Crouse JD, Reagan JO (1991) An evaluation of tenderness of the Longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, 69:171-177
- Solinas, Marcos (2015) From Aristotle's Teleology to Darwin's Genealogy: the stamp of inutility. University of Florence, Italy. **Ed Palgrave Macmillan**, translated from the Italian by James Douglas, 182p
- Sorimachi H, Kinbara K, Kimura S, Takahashi M, Ishiura S, Sasagawa N, Sorimachi N, Shimada H, Tagawa K, Maruyama K, Suzuki K (1995) Muscle-specific Calpain, p94, Responsible for Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2A, Associates with Connectin through IS2, a p94-specific Sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, 270(52):31158-31162
- Stolowski GD, Baird BE, Miller RK, Savell JW, Sams AR, Taylor JF, Sanders JO, Smith SB (2006) Factors influencing the variation in tenderness of seven major beef muscles from three Angus and Brahman breed crosses. **Meat Science**, 73:475-483
- Talmant A, Monin G (1986) Activities of metabolic and contractile enzymes in 18 bovine muscles. **Meat Science**, 18:23-40
- Tarrant PV (1989) Animal behavior and environment in the dark-cutting condition in beef – a review. **Irish Journal of Food Science and Technology**, 13:1-21

- Taylor RG, Geesink GH, Thompson VF, Koohmaraie M, Goll DE (1995) Is Z-Disk Degradation Responsible for Postmortem Tenderization? **Journal of Animal Science**, 73:1351-1367
- USDA (2011). Standard Specification for Tenderness Marketing Claims Associated with Meat Cuts Derived from Beef. Disponível em: <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/F2925-11> **Standard Specification for Tenderness.pdf**.
- USDA (2016). United States Standards for Grades of Carcass Beef. Disponível em: <https://www.ams.usda.gov/grades-standards/carcass-beef-grades-and-standards> **Standard Specification for Yield Grade.pdf**
- Vestergaard M, Oksbjerg N, Henckel P (2000) Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on muscle fibre characteristics and meat colour of semitendinosus, longissimus dorsi and supraspinatus muscles of young bulls. **Meat Science**, 54:177-185
- Wang, Kevin KW (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? Review **Trends in Neuroscience**, 23:20-26
- Warren CM, Krzesinski PR, Grease ML (2003) Vertical agarose gel electrophoresis and eletroblotting of high-molecular-weight proteins. **Electrophoresis**, 24:1695-1702
- Warren MW, Kobeissy FH, Liu MC, Hayes RL, Gold MS, Wang KKW (2005) Concurrent calpain and caspase-3 mediated proteolysis of α II-spectrin and tau in rat brain after methamphetamine exposure: A similar profile to traumatic brain injury. **Life Sciences**, 78:301-309
- Weibel ER, Taylor CR, Hoppeler H (1991) The concept of symmorphosis: a testable hypothesis of structure-function relationship. **Proc Natl Acad Sci**, 88:10357-10361
- Wheeler TL, Cundiff LV, Koch RM (1994) Effect of Marbling Degree on Beef Palatability in Bos taurus and Bos indicus Cattle. **Journal of Animal Science**, 72:3145-3151
- Wheeler TL, Koohmaraie M (1994) Prerigor and postrigor changes in tenderness of ovine longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, 72:1232-1238
- Wheeler TL, Savell JW, Cross HR, Lunt DK, Smith SB (1990a) Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, 68:4206-4220
- Wheeler TL, Savell JW, Cross HR, Lunt DK, Smith SB (1990b) Effect of postmortem treatments on the tenderness of meat from Hereford, Brahman and Brahman-cross beef cattle. **Journal of Animal Science**, 68:3677-3686
- Whipple G, Koohmaraie M, Dikeman ME, Crouse JD (1990a) Predicting beef-longissimus tenderness from various biochemical and histological muscle traits. **Journal of Animal Science**, 68(12):4193-4199
- Whipple G, Koohmaraie M, Dikeman ME, Crouse JD, Hunt MC, Klemm RD (1990b) Evaluation of attributes that affect Longissimus muscle tenderness in Bos taurus and Bos indicus cattle. **Journal of Animal Science**, 68:2716-2728
- Winder WW, Holmes BF, Rubink DS, Jensen EB, Chen M, Holloszy JO (2000) Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, 88:2219-2226
- Wright AS, Johnson DD, Scheffler JM, Elzo M, Scheffler T (2016) Relating muscle fiber morphometrics and protein degradation to meat quality in a multibreed herd. In: **Reciprocal Meat Conference 2016**, ID 104, American Meat Science Association, San Angelo, Texas, EUA
- Wu G, Farouk MM, Clerens S, Rosenvold K (2014) Effect of beef ultimate pH and large structural protein changes with aging on meat tenderness. **Meat Science**, 98:637-645

- Wulf DM, O'Connor SF, Tatum JD, Smith GC (1997) Using objective measures of muscle color to predict beef longissimus tenderness. **Journal of Animal Science**, 75(3):684-692
- Wulf DM, Page JK (2000) Using measurements of muscle color, pH, and electrical impedance to augment the current USDA beef quality grading standards and improve the accuracy and precision of sorting carcasses into palatability groups. **Journal of Animal Science**, 78:2595-2607