**FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS – FZEA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

MADELINE REZENDE MAZON

**Efeitos da imunocastração e de agonistas beta-adrenérgicos
sobre a qualidade da carne de bovinos**

Pirassununga – SP

2016

MADELINE REZENDE MAZON

**Efeitos da imunocastração e de agonistas beta-adrenérgicos
sobre a qualidade da carne de bovinos**

“Versão corrigida”

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Saulo da Luz e Silva

**Pirassununga - SP
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R475e Rezende Mazon, Madeline
Efeitos da imunocastração e de agonistas beta-
adrenérgicos sobre a qualidade da carne de bovinos
/ Madeline Rezende Mazon ; orientador Saulo da Luz
e Silva. -- Pirassununga, 2016.
145 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia
de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Bovinocultura de corte. 2. Carne. 3. calpaina.
4. fibras musculares. 5. maciez. I. Silva, Saulo da
Luz e, orient. II. Título.

MAZON, M.R. Efeitos da imunocastração e de agonistas beta-adrenérgicos sobre a qualidade da carne de bovinos. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu Pai, Odinaldo Mazon, pelo esforço, dedicação, confiança e amor

dispensados a mim.

A minha família, minha força e vontade de vencer.

Aos meus verdadeiros amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, que graças a ele tenho a oportunidade de vivenciar tudo isso com saúde e com as pessoas que amo do lado.

A todos os professores que me auxiliaram nesta caminhada, não só os da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos- FZEA, como também os da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais *campus* Poços de Caldas – PUC, que me ajudaram a ter base técnica e ética para chegar até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Saulo da Luz e Silva, que não mediu esforços para me ajudar no desenvolvimento deste projeto, análises, resumos, muitas vezes deixando suas obrigações de lado para se dedicar à resolução das minhas dúvidas.

Ao professor Dr. Domingos Marcelo Cenachi Pesce, da PUC Minas, que sempre acreditou no meu potencial desde a graduação, confiou nas minhas decisões e me incentivou no desenvolvimento deste projeto.

Ao professor Dr. Paulo Roberto Leme, da FZEA, que desde o começo esteve sempre disposto a me instruir, ajudar a resolver os problemas e tirar as dúvidas, muito atencioso.

Aos professores Dr. Miller e Dr. Jonhson da Texas Tech University, que me ajudaram a esclarecer várias dúvidas técnicas e me receberam de braços abertos para o doutorado sanduíche.

A CAPES, pela minha bolsa de doutorado, que proporcionou a realização e conclusão desta etapa e também pela bolsa PDSE para programa de doutorado sanduíche.

A FAPESP e a Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, pelo auxílio FIP para o desenvolvimento do projeto.

As empresas Elanco saúde animal, MSD saúde animal e Zoetis indústria de Produtos Veterinária, pelo fornecimento dos produtos e auxílio no projeto.

Aos meus companheiros de pesquisa Daniel Antonelo, Keni Nubiato e Delaila Juliana, que juntos fizemos o possível e impossível para que este projeto fosse desenvolvido da melhor maneira.

Aos meus amigos da pós-graduação Roberta Ferreira Carvalho, Rosana Ruegger Pereira da Silva Corte, Ana Paula Santos Silva, Raquel Ferrari Calviello, Juliana Balage, Henrique Bueno Silva, Juan Fernandes Morales, Anderson Cabral, Fabiane Costa, Katiéli Welter, Natália Petroli, Tiago Ronimar, Fábio Henrique, Henrique Hooper pelos momentos de descontração, conselhos e ajudas.

Pelos estagiários da PUC, Túlio Ricci e Nayara Terra, que me ajudaram muito nas análises laboratoriais, que sem eles não teria conseguido terminar a tempo.

Aos funcionários da USP, Ricardinho, João, Jone, Elso, Mario, Beloni, Seu Dito, Seu Dorival, Rose, Rosilda. Aos funcionários da pós-graduação, pelo suporte, ajuda e paciência.

Ao meu grande herói, companheiro, amigo e pai, Odinaldo Mazon, que por muitas vezes mesmo cansado não mediu esforços para me ver chegar até aqui. É o exemplo que quero seguir na minha vida tanto pessoal quanto profissional. Não tenho palavras para descrever a minha gratidão e meu amor.

Ao meu amigo e namorado, Henrique Bueno, que muitas vezes teve que abrir mão de vontades e obrigações próprias para me ajudar, tendo paciência nos meus dias de estresse, discutindo ideias técnicas e me ajudando a tomar decisões, me incentivando a fazer o doutorado sanduíche.

Aos meus amigos particulares Priscilla Ribeiro do Valle Segecs, Vanessa e Felipe Johansen, Thais Helena Franco de Souza, Leticia Silva Oliveira, amigos desde antes da graduação os quais direta ou indiretamente fizeram parte desta conquista.

Aos meus irmãos Cristina, Gustavo, Danielo e Dillard, que muitas vezes até sem saber foram as pessoas em que me inspirei e me deu ânimo em dias de fraqueza.

A todos que aqui mencionados, meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

Os agonistas beta-adrenérgicos (β AA) são conhecidos por aumentar a hipertrofia muscular e lipólise, neste caso uma maneira de se reduzir o efeito da lipólise seria a imunocastração. Dessa forma, o objetivo deste projeto foi avaliar o efeito dos β AA e da imunocastração sobre a qualidade da carne de bovinos Nelore. Foram utilizados noventa e seis bovinos Nelore, sendo que metade dos animais ($n=48$) receberam uma dose da vacina de imunocastração, e após 30 dias receberam a segunda dose. A outra metade dos animais ($n=48$) não recebeu nenhuma dose da vacina. Durante 70 dias os animais foram alimentados com uma dieta padrão composta de 24% volumoso e 76% de concentrado. Após 70 dias de confinamento os animais foram divididos em três grupos, dentro de bloco (peso inicial) e condição sexual e foram alimentados por 30 dias, com umas das seguintes dietas: CON – dieta padrão utilizada na fase anterior, sem a adição de β AA; ZIL – dieta padrão acrescida de 80 mg/dia Cloridrato de Zilpaterol; RAC – dieta padrão acrescida de 300 mg/dia Cloridrato de Ractopamina. Ao final desse período os animais foram abatidos e colhidas amostras do músculo *Longissimus dorsi* para as avaliações de qualidade de carne, lipídeos totais, perfil de ácidos graxos, análise sensorial do consumidor, perfil morfométrico muscular, expressão dos genes calpaína e calpastatina, comprimento de sarcômero. Para a maioria das características avaliadas não foram observadas interações entre os tratamentos. Ao avaliar o efeito da condição sexual, os animais imunocastrados apresentaram maiores intensidades de cor L, a e b, lipídios totais, ácidos oleico, palmítico e total de monoinsaturados e maior frequência para as fibras oxidativas (FO) e glicolíticas (FG) em relação aos não-castrados. Contudo, os

animais não-castrados tiveram uma tendência a apresentarem uma carne mais macia na análise sensorial e obtiveram maior frequência das fibras oxidativas-glicolíticas (FOG) em relação aos imunocastrados. Quanto ao efeito dos β AA, o grupo ZIL apresentaram uma carne menos macia na força de cisalhamento, maiores concentrações de ácidos heptadecanoico, linoleico, araquidônico ácido C20:3 n6C8C11C14, ômega 6, maior frequência para as FO e menor para FG em comparação ao grupo RAC e CON. No entanto, os animais do grupo CON e ZIL apresentaram maior área para as FO em comparação ao grupo RAC, enquanto que para as FOG, os animais do grupo CON tiveram maior área do que os animais do grupo RAC e ZIL. Na análise sensorial, os grupos RAC e ZIL receberam menores notas para os atributos textura e qualidade global em relação ao CON. Não foi observado efeito da condição sexual e dos β AA sobre a expressão dos genes e comprimento de sarcômero. Conclui-se que a condição sexual e a suplementação com os β AA podem alterar a qualidade da carne, perfil de ácidos graxos e morfométrico muscular, sem, contudo, alterar a expressão dos genes e do comprimento de sarcômero.

ABSTRACT

The Beta adrenergic agonist (β AA) are known for increase muscle hypertrophy and lipolysis, in this case on way for decrease the lipolysis effect is use the immunocastration. The objective of this research was evaluated the effect of β AA and immunocastration on meat quality of Nellore . Ninety-six Nellore were fed in this trial; half of the animals ($n = 48$) received one dose of immunocastration vaccine on d 0, and received another dose at d 30. The other half of animals ($n = 48$) received no vaccine. Animals were fed with a standard diet consisting of 24% forage and 76% concentrate for 70 d. After 70 d of the standard diet, animals were divided into three groups, and were fed 30 d with one of the following diets: CON - standard diet used in the previous phase, without the addition of β AA; ZIL - standard diet plus 80 mg/d Zilpaterol hydrochloride; RAC - standard diet plus 300 mg/d Ractopamine hydrochloride . After this period, animals were harvested and the Longissimus dorsi sample were colleted to evaluate meat quality, total lipid content, fatty acid profile, consumer sensory analysis, muscle morfometric profile, genes expression of calpain and calpastatin and sarcomere length. For almost of characteristics evaluated, were not observed interactions between treatments. The effect of sexual condition, imunocastrated animals showed higher intensity of color L, a and b, total lipidics, oleic, palmitic and total monounsaturated acids and more frequency for oxidative fibers (FO) and glycolytic fibers (FG) in relation at non-castrated. However, non-castrated animals had a tendency to show a meat tender in sensory analysis and more frequency of oxidative-glicolytics fibres (FOG) in relation to imunocastrated. The β AA effect, ZIL group showed a meat

less tender, higher concentrations of heptadecanoic, linoleic, araquidic acids, C20:3 N6C8C11C14, omega 6, higher frequency for FO and less for FG than RAC and CON group. Animals of CON and ZIL group showed more FO area than RAC group, while for the FOG, animals from COM group showed more area than animals from RAC and ZIL group. In the sensory analysis, RAC and ZIL group received lower grades for tenderness and global quality in relation to COM group. Was no observed effect of sexual condition and β AA for genes expressions and sarcomere length. As conclusion, sexual condition and β AA affected the meat quality, fatty acid profile, muscle fibers, but not affect genes expression and sarcomere lenght.

Lista de figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1: Interação das proteínas que mediam a mobilização lipídica nos adipócitos. 41

Figura 2: Mecanismo proposto da ativação pelos agonistas beta-adrenérgicos que reduz a deposição de tecido adiposo e aumenta o crescimento muscular..... 42

Figura 3: Mecanismo de ação do AMPc na expressão gênica 44

Índice de abreviaturas e siglas

AG	– Ácidos graxos
AGI	–Ácido graxo insaturado
AGM	– Ácido graxo monoinsaturado
AGP	– Ácido graxo poliinsaturado
AGS	– Ácido graxo saturado
AMPc	– 3,5 monofosfato de adenosina
AOL	–Área de olho de lombo
ATP	– Trifosfato de adenosina
βAA	– agonista beta-adrenérgico
CAPN1	– Calpaína 1 ou μ- calpaina
CAPN2	- Calpaína 2 ou m-calpaina
CAST	- Calpastatina
CLA	– Ácido linoleico conjugado
CON	- Controle
CRE	- Elemento de resposta ao AMPc
CREB	– Elemento de resposta ao AMPc ligada a proteína de ligação
CS	- Condição Sexual
DNA	– Ácido Desoxirribonucleico
EGS	– Espessura de gordura subcutânea
EPM	– Erro padrão da média
FG	- Fibra Glicolítica
FO	– Fibra oxidativa
FOG	– Fibra oxidativa-glicolítica
FSH	- Hormonio Foliculo estimulante
GnRH	– Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
GPCR	– Proteína G acoplada ao receptor
HSL	– Hormonio Sensitivo a Lipase
IGF-I	– Hormônio do crescimento
IM	– Imunocastrados

K⁺ - Potássio

LH – Hormônio Luteinizante

LM – *Longissimus dorsi*

NC – Não castrados

PKA – Proteína quinase A

PV 70- Peso vivo após 70 dias de confinamento

PV100- Peso vivo após 100 dias de confinamento

PVI – Peso vivo Inicial

RAC – Cloridrato de Ractopamina

RNA_m – Ácido Ribonucleico mensageiro

TAG – Triacilglicerol

TGF- β – Transformador do fator de crescimento

TM – Tempo de maturação

ZIL – Cloridrato de Zilpaterol

ω 3 – Ômega 3

ω 6 – Ômega 6

Sumário

Capítulo 1	18
Efeito dos agonistas beta-adrenérgicos e da imunocastração na qualidade da carne	18
1. <i>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</i>	19
2. <i>REVISÃO DE LITERATURA</i>	21
2.1. Características que afetam a qualidade da carne	23
2.1.1. Genética	23
2.1.2. Condição sexual	24
2.1.3. Manejo nutricional	25
2.1.4. Estrutura muscular	26
2.1.5. Sistema calpaína/calpastatina	27
2.1.6. Perfil morfométrico muscular	29
2.1.7. Sarcômero	32
2.1.8. Tecido Adiposo	33
2.2. Agonistas beta-adrenérgicos	37
2.3. Imunocastração	46
3. OBJETIVO GERAL	50
4. REFERÊNCIAS	51

Capítulo 1

Efeito dos agonistas beta-adrenérgicos e da imunocastração na
qualidade da carne

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

De acordo com dados da FAO (2011), em 2050 o crescimento da população mundial e o aumento de receita implicarão em um aumento no consumo de proteína de origem animal de aproximadamente 2/3 em relação ao que é consumido atualmente. Ainda de acordo com a mesma fonte, o aumento da produção de carne verificado nos últimos 40 anos, ocorreu, em grande parte, pelo aumento do número de animais produzidos. Porém, o aumento da produção para atender a demanda futura, com base nesse mesmo princípio seria praticamente impossível, indicando que essas metas só podem ser atingidas com ganhos em produtividade.

O Brasil possui a vantagem de ter grande espaço territorial e diversidade de clima, reunindo as condições necessárias para aumentar sua produção e suprir parte dessa demanda. Além disso, possui o segundo maior rebanho comercial bovino do mundo, com mais de 212.343 milhões de cabeças (IBGE, 2014) e é o maior exportador de carne, com mais de 1,8 milhões de toneladas em equivalente carcaça no ano de 2014 (USDA, 2015).

O crescimento da produção observado nos últimos anos tem sido resultado da aplicação crescente de tecnologias nas diferentes áreas da cadeia produtiva, que têm possibilitado ao setor da bovinocultura de corte, ganhos de volume e produtividade e, foram determinantes para colocar o Brasil em condição de destaque como um grande produtor de carne.

No entanto, novas tecnologias devem ser desenvolvidas e avaliadas constantemente, com o objetivo de aumentar a produção e atender a crescente demanda mundial por alimentos.

Nesse sentido, os aditivos melhoradores de desempenho têm sido utilizados como uma ferramenta para aumentar a produção, utilizando menos recursos e, conseqüentemente, tornando o sistema produtivo mais eficiente.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou em 2012 (Instrução Normativa 55/2011) a utilização comercial dos agonistas beta-adrenérgicos (β AA) como melhoradores de desempenho para animais em confinamento, no entanto, por razões políticas e de comércio exterior, o uso comercial dos β AA foi temporariamente suspenso no Brasil em novembro de 2013 (Instrução Normativa 25/2012).

De acordo com alguns estudos, o uso de β AA para bovinos em fase de terminação, além de aumentar a síntese e reduzir a degradação proteica, esses compostos apresentam uma ação lipolítica, causando redução na quantidade de gordura na carcaça (DUNSHEA 1993; KOOHMARAIE et al., 1991; EISEMANN et al., 1988), o que pode exercer efeitos negativos sobre a qualidade da carne, como por exemplo falhas nos resfriamentos das carcaças na câmara fria. Principalmente no Brasil, onde grande parte dos animais é confinada por curtos períodos e em sua maioria não são castrados, resultando em animais mais leves no abate, apresentando carcaças com gordura muitas vezes insuficiente para manutenção da qualidade da carne.

Uma alternativa para aumentar a deposição da gordura na carcaça é a castração dos animais, pois sabe-se que animais castrados apresentam maior deposição de gordura em comparação a animais não-castrados. Essa prática tem sido cada vez menos utilizada, principalmente em função do menor ganho de peso (15-18% menor) dos animais castrados, quando comparados com os não-castrados. Porém, com o recente surgimento da técnica de

imunocastração para bovinos, através de vacinas anti-GnRH, essa prática pode ser utilizada em associação com outras tecnologias, como os β AA, resultando em uma interação positiva, tanto para o desempenho animal (uso dos β AA) quanto para a qualidade da carne (imunocastração), em função da maior deposição de gordura na carcaça.

No Brasil, as informações sobre os efeitos na utilização dos β AA na qualidade de carne de animais zebuínos não-castrados e que normalmente são confinados por curtos períodos de tempo, são ainda pouco conhecidos.

Desta forma, a avaliação dos efeitos que a utilização dessas ferramentas isoladas ou em combinação, causarão sobre a qualidade da carcaça e da carne dos bovinos é de grande importância, visando fornecer informações importantes para todos os elos envolvidos na cadeia produtiva, de maneira que possam direcionar seus sistemas de produção de acordo com os resultados esperados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A pecuária de corte está entre as atividades de maior importância, em termos sócio-econômicos, para o Brasil. A atividade é desenvolvida na quase totalidade dos municípios brasileiros, com uma ampla variedade de raças, sistemas de produção, índices de produtividade, condições sanitárias e sistemas de comercialização, de acordo com as peculiaridades e exigências de cada região e do mercado a que se destina.

Por outro lado, a maioria absoluta do rebanho bovino brasileiro, cerca de 93% dos bovinos são terminados em pastagens, as quais normalmente apresentam uma grande variabilidade, em relação a quantidade e qualidade

dos nutrientes disponíveis, durante o ano (FERRAZ; FELÍCIO, 2010). De acordo com Lanna et al. (2004) cerca de 80% da produção de forragem ocorre no período das chuvas (outubro a maio), mas no período da seca é comum se observar grande déficit de alimentos para o gado no final da entressafra.

Esses fatores normalmente estão associados a baixos índices de produtividade, e consequentemente a um produto final (carne) de pior qualidade, uma vez que os animais necessitam permanecer por mais tempo no pasto para atingirem peso e acabamento adequados para o abate. Isso implica em animais abatidos com uma idade mais avançada e normalmente com uma menor quantidade de gordura de cobertura, insuficiente para proteção da carcaça durante o resfriamento, com prejuízos para a qualidade da carne.

O confinamento na fase de terminação é uma estratégia utilizada com o objetivo de reduzir esses problemas, pois além de proporcionar um ganho de peso maior, mais eficiente e em um menor período de tempo, também possibilita uma maior deposição de gordura, uma vez que um maior ganho de peso está associado a uma maior deposição de gordura (NRC, 1996).

Outra prática que tem sido bastante utilizada para o confinamento de animais é a utilização de dietas com altas proporções de concentrado. De acordo com Preston (1998) o fornecimento de dietas com elevadas proporções de concentrado, fornecidas *ad libitum*, é uma prática bastante comum na indústria de gado de corte norte-americana. No Brasil, essa prática também tem sido utilizada para confinamento de bovinos, onde a maior parte dos animais confinados não são castrados (69,5%) e permanecem por curtos períodos em confinamento (83,6 dias; MILLEN et al., 2009), pois proporcionam um maior ganho de peso e uma maior deposição de gordura nas carcaças.

Outra ferramenta que tem sido bastante estudada é a utilização dos aditivos melhoradores de desempenho, que tem por objetivo melhorar a eficiência dos animais e a lucratividade do sistema. Os promotores de crescimento, chamados também de aditivos, são substância, microrganismo ou produto formulado, intencionalmente adicionados a dieta do animal, que tenha ou não valor nutritivo e que melhore o desempenho dos animais sadios e atenda as necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano (BRASIL, 2004). Um exemplo desses promotores são os β AA que aumentam a deposição muscular no animal.

2.1. Características que afetam a qualidade da carne

De acordo com Miller et al. (2001), entre as características relacionadas a qualidade de carne, a maciez é a mais desejada pelo consumidor, depois do preço. Segundo os mesmos autores, os consumidores percebem as diferenças na maciez e afirmam estar dispostos a pagar mais por uma carne mais macia

A maciez é uma característica complexa, pois é afetada por uma série de fatores, tais como a genética dos animais, o sexo, o manejo nutricional, além de fatores pré e pós-abate, entre outros.

2.1.1. Genética

A raça dos animais é um fator que tem sido relacionado com a qualidade da carne. Alguns autores relataram um aumento da atividade da calpastatina em animais *Bos indicus* em comparação a animais *Bos taurus* e relacionaram

esse aumento a maior força de cisalhamento, ou seja, uma carne mais dura (IBRAHIM et al., 2008; GIUSTI, et al., 2013).

Giusti et al. (2013), afirmaram que com base nos resultados de expressão gênica, força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar, a carne de animais da raça Nelore foi menos macia quando comparadas a carne de animais da raça Canchim, porém os valores para maciez estavam dentro das médias observadas para uma carne macia.

2.1.2. Condição sexual

A maciez também está relacionada à condição sexual do animal, pois animais não-castrados possuem maior ação da testosterona, cuja função está relacionada a hipertrofia muscular, que por sua vez pode diminuir a maciez da carne em comparação ao animal castrado. A testosterona também tem efeito sobre a calpastatina, aumentando sua atividade sobre as calpaínas (ANDREO et al., 2013).

Segundo Andreo et al. (2013), a carne de bovinos imunocastrados foi mais macia que a de animais não-castrados, possivelmente justificada pela maior atividade das calpaínas em animais imunocastrados, confirmado pelo maior índice de fragmentação miofibrilar. Segundo Koohmaraie (1990) o índice de fragmentação miofibrilar é um indicador indireto da ação das calpaínas.

2.1.3. Manejo nutricional

A nutrição é um fator de grande importância para a qualidade da carne dos bovinos. A suplementação com promotores de crescimentos, como os β AA, tem sido relacionada a uma redução na maciez da carne (STRYDOM et al., 2009; HILTON et al., 2009; KELLERMEIER et al., 2009; RATHMANN et al., 2009; HOPE-JONES et al., 2010, HOWARD et al., 2014).

Hope-Jones et al. (2010), avaliaram bovinos Bonsmara, não-castrados, com 9 meses de idade e que foram confinados por 120 dias, suplementados com zilpaterol e observaram maiores valores de força de cisalhamento para os animais que receberam β AA em comparação ao grupo controle (5,8 vs 4,1 kg, respectivamente).

Quinn et al. (2008) avaliaram o desempenho de novilhos alimentados com diferentes níveis de ractopamina, sendo que os animais tratados com 200 mg, por 28 dias antes do abate, apresentaram um aumento de 17% no ganho de carcaça, 15,3% no ganho de peso diário e 17,2% na eficiência alimentar, enquanto os animais que foram alimentados com 300 mg no mesmo período tiveram aumento de 27% no ganho de carcaça. Segundo Schroeder et al. (2003a), dietas com 300mg de ractopamina, aumentaram a força de cisalhamento, reduzindo a maciez.

De acordo com Wheeler e Koohmaraie (1992) diferentes sistemas proteolíticos podem estar envolvidos nos diferentes estágios da degradação proteica, entre os quais encontra-se o sistema calpaína/calpastatina. Os mesmos autores observaram um aumento na atividade da enzima calpastatina em animais tratados com β AA (L644,969) e, conseqüentemente uma redução

na maciez da carne, indicando que houve uma relação consistente entre o sistema proteolítico das calpaínas com a degradação proteica em novilhos. Vários trabalhos relataram uma redução na maciez da carne de bovinos tratados com β AA (VESTERGAARD et al., 1994; AVENDAÑO-REYES et al., 2006).

Isso pode ser explicado pelo fato da calpastatina ser a principal reguladora da atividade proteolítica no *post-mortem*, através da inibição da ação das calpaínas, ou seja, quanto mais elevada a ação das calpastatinas menor será a degradação proteica do músculo (KOOKMARAIE, 1988; KOOHMARAIE ; SHAKELFORD, 1991; MORGAN et al., 1993). Esse fato pode influenciar a cor e a capacidade de retenção de água (GONZALEZ et al., 2009), que podem estar associados a mudança do tipo da fibra (STRYDOM et al., 2009) ou hipertrofia muscular causada pelos promotores de crescimento (KELLERMEIER et al., 2009), podendo reduzir a maciez da carne (HANSEN et al., 2012).

2.1.4. Estrutura muscular

O músculo é formado por três frações proteicas: a miofibrilar, o tecido conectivo e o sarcoplasmático. A regulação da degradação da proteína miofibrilar pode explicar a grande variação da maciez na carne, sendo que esta é considerada a maior fração proteica. As miofibrilas são degradadas em miofilamentos, estes em polipeptídeos e por fim em aminoácidos (KOOHMARAIE et al., 2002). Segundo Reeds et al. (1985), a administração de β AA leva a hipertrofia muscular e ao aumento do conteúdo proteico, provavelmente pela supressão da degradação miofibrilar.

Em relação ao tecido conectivo, a quantidade de colágeno entremeado ao músculo é o que mais afeta a maciez da carne (LEPETIT, 2007). A deposição de colágeno aumenta com a idade do animal, resultando na menor solubilidade durante o cozimento, aumentando a dureza da carne. O tecido conectivo também está diretamente relacionado ao tamanho da fibra muscular, pois conforme aumenta a área de fibra, aumenta também a deposição de tecido conectivo, tornando a carne mais dura (JOO et al., 2013).

2.1.5. Sistema calpaína/calpastatina

As calpaínas são classificadas como proteases neutras ativas por íons de cálcio, sendo responsáveis pela proteólise pós-mortem, aumentando a maciez da carne (GESSINK ; KOOHMARAIE, 1999). Este sistema consiste, em 2 proteases cálcio dependentes sendo a μ - calpaina ou calpaina I (CAPN1) e m-calpaina ou calpaina II (CAPN2), o que difere as duas proteases é a concentração de cálcio requerida para sua ativação, sendo que a CAPN1 necessita de 3-5 μ M, enquanto, que a CAPN2 necessita de 400-800 μ M (GOLL, et al., 2003). A ação dessas enzimas é inibida por um polipeptídeo, calpastatina (CAST) (GIUSTI et al., 2013; PEGGY et al., 2005). Cada molécula de calpastatina possui uma região líder (L) e outras quatro regiões de inibição (I – IV), sendo que cada uma delas pode inibir uma molécula calpaína (GOLL et al., 2003)

No músculo estriado esquelético, o sistema calpaina/calpastatina está envolvido na regulação do *turnover* proteico e crescimento muscular (GOLL et al., 1992), migração de mioblastos (DEDIEU et al., 2003), fusão destes as

fibras musculares (TEMM-GROVE et al., 1999) e desenvolvimento da maciez da carne (KENT et al., 2004).

Segundo Delgado (2001), uma das características que confirmam a relação da calpaína, como reguladora do processo de amaciamento da carne, é o fato de que a actina e a miosina permanecerem inalteradas durante o processo de maturação da carne, pois também são responsáveis pelo o amaciamento.

Kretchmar et al. (1990) observaram mudanças na atividade muscular das calpains e calpastatins, após a suplementação de animais com β AA . Os autores relataram uma redução da atividade da Calpaína I e um aumento da atividade da Calpastatina, sendo que essas alterações são consistentes com a redução da capacidade proteolítica e a degradação miofibrilar, respectivamente, associadas ao aumento da agregação e crescimento proteico (BARDSLEY et al., 1992). Por outro lado, segundo Emori et al. (1987), o fornecimento de β AA causaram um aumento da expressão de RNAm da Calpain II e Calpastatina.

Segundo Bardsley et al. (1992), o aumento da atividade da calpain II e calpastatina em animais suplementados com β AA, reflete as mudanças específicas da expressão do RNAm, sugerindo que o aumento da expressão gênica ou estabilidade do RNAm pode ser parcialmente responsável pela alteração da atividade dessas enzimas.

Outros fatores também podem influenciar no sistema calpaína/calpastatina, como idade, raça, sexo, tipo de músculo, entre outros. Alguns autores têm relatado que a atividade da calpastatina reduz com o aumento da idade do animal (CRUZEN et al., 2014; VEISETH et al., 2004).

Considerando a condição sexual, Morgan et al. (1993), observaram um aumento da atividade calpastatina em touros em comparação com novilhos e isso foi justificado pela presença do hormônio andrógeno (testosterona).

O tipo de músculo também é outro fator que influencia no sistema Calpaína/Calpastatina. Segundo Whipple e Koohmaraie (1992), músculos com mais fibras oxidativas geralmente apresentam melhor atividade das enzimas calpaínas e calpastatina do que músculos com mais fibras glicolíticas.

Com relação a raça, Whipple et al. (1990), que ao comparar a atividade das enzimas nos animais Taurinos e Zebuinos, encontraram aumento da atividade da calpastatina nos animais Zebu e não diferença na atividade das enzimas calpaínas entre os dois grupos genéticos. Ferraz (2009), ao comparar a expressão do gene CAPN2, não observou diferenças em animais Nelore (*B. indicus*) quando comparados a animais Angus (*B. taurus*). Segundo Giusti et al., (2013), resultados de animais da raça Nelore não apresentaram diferenças na expressão dos genes CAPN1 ou CAPN2 em comparação a raça Canchin, justificando que a baixa maciez da carne de animais Zebu provavelmente não é resultado da baixa expressão dos genes CAPN1 ou CAPN2, mas provavelmente do aumento da expressão do gene CAST, inibindo assim a ação das calpaínas.

2.1.6. Perfil morfométrico muscular

O músculo é composto em maior parte pelas fibras musculares, sendo que essa massa muscular é determinada pelo número e tamanho do diâmetro de cada fibra.

Durante a miogênese, ocorre uma grande multiplicação das células musculares que determinará a quantidade de fibras que serão formadas. No entanto, fatores genéticos e comportamentais podem influenciar a miogênese pré-natal. Já o crescimento pós-natal do tecido músculo esquelético se dá pelo aumento do comprimento e circunferência das fibras musculares e não pelo aumento do número de fibras, ou seja, a hiperplasia da fibra muscular é determinada durante a gestação, após só pode ser alterado o tamanho da fibra, hipertrofia (REHFELDT et al., 2004).

Segundo Rehfeldt et al. (2000) a hipertrofia das fibras musculares pós-natal é inversamente correlacionada com o número total de fibras, ou seja, a taxa de crescimento das fibras musculares é menor quando há um alto número de fibras.

Por isso a nutrição pós-natal é de grande importância, pois uma nutrição inadequada, tanto em quantidade quanto em qualidade de nutrientes (deficiência de proteína e energia), reduz o peso corporal, o peso do músculo esquelético e, em alguns casos, o diâmetro da fibra (BEERWINKLE et al., 1979).

A suplementação com β AA podem influenciar nesse desenvolvimento muscular pois reduz a atividade proteolítica, causando uma hipertrofia muscular sem reduzir o número de fibras (REHFELDT et al., 2004)

De acordo com a técnica de histoquímica, as fibras são classificadas em fibras do tipo I (lenta oxidativa), tipo IIA (rápida oxidativa-glicolítica) e do tipo IIB (rápida glicolítica), de acordo com as diferentes atividades de ATPase (SCHIAFFINO ; REGGIANI, 1996). Porém de acordo com as técnicas de imunohistoquímica, as fibras se distinguem através do metabolismo oxidativo

das enzimas, sendo as de fibra de contração lenta oxidativa (SO), fibra de contração rápida oxidativa-glicolítica (FOG) e a fibra de contração rápida glicolítica (FG) (PETER et al., 1972).

Segundo alguns autores (VESTERGAARD et al., 1994; RAJAB et al., 2000; BRICOUT et al., 2004) bovinos suplementados com β AA tem aumento da percentagem das fibras do tipo IIA em relação as do tipo I e, de acordo com Oksbjerg et al. (1995), os β AA aumentam a área da fibra e causam uma conversão do tipo de fibra IIA para IIB. Segundo Owens et al. (1994), animais com alta produção de músculo tem, proporcionalmente, maior quantidade de fibra do tipo IIB que está relacionada a hipertrofia muscular.

As características sexuais também são responsáveis pela diferenciação das fibras musculares, pois o número de fibras e tamanho da área são controladas pelos hormônios sexuais, sendo que as diferenças existentes das fibras entre fêmeas e machos podem ser causadas pelo hormônio andrógeno durante a fase pré-natal (KLONT et al., 1998; OZAWA et al., 2000; REHFELDT et al., 2004).

Após o nascimento, a testosterona estimula a hipertrofia das fibras musculares, através do aumento da proliferação das células satélites, cuja fusão com as fibras musculares aumentam tanto o material genético quanto a deposição de proteínas para a determinada fibra, aumentando assim a síntese de proteína muscular, sem aumentar o número de fibras (FLORINI, 1987; COLLINS, 2006). Segundo Seideman e Crouse (1986), machos não-castrados possuem maior diâmetro fibra de muscular do que animais castrados e fêmeas. Por outro lado, Koohmaraie et al. (2014), não encontraram efeito dos β AA ou

condição sexual de cordeiros, na distribuição das fibras no músculo *Longissimus dorsi*.

2.1.7. Sarcômero

O sarcômero é a menor unidade contrátil estrutural repetitiva da miofibrila e é composto por proteínas como a actina e miosina, que possuem a função de contração e relaxamento muscular. Durante a conversão do músculo em carne, o encurtamento do músculo é afetado pelas condições do pré-rigor, e quando o músculo é exposto ao frio antes do *rigor mortis*, ocorre o chamado *cold shortening*, processo que pode aumentar de quatro a cinco vezes a força para cisalhar uma amostra de carne, reduzindo a maciez da carne.

A variação da maciez é um ponto crítico da indústria de carne, sendo que este é um dos critérios mais exigidos pelo consumidor para um produto de qualidade. Segundo Koohmaraie et al. (2002) os principais fatores intrínsecos que influenciam a maciez da carne são o tecido conectivo, comprimento do sarcômero e a proteólise das proteínas miofibrilares.

O comprimento do sarcômero é um potente contribuidor para a determinação da dureza da carne, pois, de acordo com Marsh e Carse (1974) e Herring et al. (1965) músculos com sarcômero mais longo têm menor resistência a força de cisalhamento. Segundo Wheeler e Koohmaraie (1999) o encurtamento do sarcômero pode reduzir os sítios para a proteólise miofibrilar, influenciando negativamente na maciez da carne. Esses autores compararam o comprimento de sarcômero do músculo *Longissimus dorsi* normal com um que sofreu encurtamento pelo frio, e observaram valores de 1,69 μm para 1,36 μm , respectivamente.

O rápido resfriamento da carcaça pode causar o encurtamento das fibras musculares, ocultando assim os locais de reconhecimento das enzimas, reduzindo o acesso dos substratos e reduzindo a atividade proteolítica da carne (GIUSTI et al., 2013). Esse fator pode ser prevenido pela quantidade correta de gordura de acabamento, tendo por objetivo a proteção da carcaça contra o rápido resfriamento e assim o encurtamento das fibras (LESSER, 1993).

Segundo Berge et al. (1993); Lee e Kim (1994); Koohmaraie et al. (2014), o efeito dos β AA sobre a redução da maciez ocorreu sem nenhuma interferência do comprimento de sarcômero. No entanto, foi observado efeito da condição sexual, sendo que ovinos machos castrados tiveram maior comprimento de sarcômero que animais não-castrados (KOOHMARAIIE et al., 2014)

2.1.8. Tecido Adiposo

Outro efeito que tem sido observado pelo uso dos β AA é a redução da quantidade de gordura na carcaça. Estudos demonstraram que o uso prolongado de um β AA, causou um aumento da atividade lipolítica, redução na atividade lipogênica ou ambos, observado pelo aumento das concentrações plasmáticas de ácidos graxos não-esterificados (MERSMANN, 1989c, 1995; MILLS e MERSMANN, 1995). Um aumento na concentração plasmática de ácidos graxos não-esterificados também foram observados em suínos (MERSMANN, 1987; HU et al., 1988; ADEOLA et al., 1992b) e em bovinos (BLUM ; FLUECKIGER, 1988; EISEMANN et al., 1988).

Hue et al. (1988) observaram aumento dos adipócitos no tecido subcutâneo após a administração do β AA cimaterol aumetando o diâmetro de

60 para 90 μ m. No entanto, foi observado redução da gordura renal e omental em cordeiros após a utilização de implantes de cimaterol (FENNESSY et al., 1990). Por outro lado, Shackelford et al. (1992), não observaram diferenças no peso das gorduras renal-pélvica em cordeiros suplementados com a β AA L644,969.

Uma das chaves desse processo lipolítico causado pelos β AA pode ser a redução da ação da insulina, que tem função anabólica, aumentando a lipogênese e potencialmente inibindo as taxas lipolíticas (MOHAMMADI et al., 2006). Segundo Mersmann (1998), uma redução da insulina plasmática acarretará redução da lipogênese e aumento da lipólise. Hausman et al. (1989), observaram redução na sensibilidade à insulina nos adipócitos de ratos suplementados com ractopamina, fato semelhante também foi observado em suínos (LIU e MILLS, 1990). No entanto, foi observado o aumento da sensibilidade a insulina após o fornecimento crônico de β AA (BUDOHOSKI et al., 1987), indicando uma dessensibilização dos receptores aos beta agonistas, assim reduzindo o efeito dos promotores de crescimento.

Em ruminantes, a glicose provinda da produção de propionato, principalmente de dietas a base de milho, fornece quantidade de carbono insuficiente para síntese de ácidos graxos no interior dos tecidos, que conta com a baixa atividade das enzimas ATP citrato liase e malato desidrogenase (LALLOTIS et al., 2010) e está altamente relacionado ao aumento da deposição de gordura intramuscular (SMITH ; CROUSE, 1984). Segundo Gotoh (2003); Hwang et al. (2010) a deposição de gordura intramuscular está positivamente correlacionada com a porcentagem de fibras musculares vermelhas

(Oxidativas), e negativamente correlacionada com as fibras musculares brancas (Glicolíticas),

Já o acetato, absorvido pelo epitélio ruminal ou intestinal, é transformado na mitocôndria através da oxidação pela enzima acetil-CoA sintetase, em acetil-CoA, que por sua vez é utilizado para a síntese de ácidos graxos, sendo convertido em Malonil-CoA através da enzima acetil-CoA carboxilase. A partir do Malonil-CoA ocorrem diversas reações químicas até obter o ácido palmítico livre, que é utilizado como substrato na síntese de ácidos graxos através do alongamento e/ou dessaturação no retículo endoplasmático (LALLOTIS et al., 2010). O acetato está relacionado com o aumento da deposição de gordura subcutânea (SMITH ; CROUSE, 1984).

Assim, de acordo com o manejo alimentar podem ocorrer variações tanto no local de deposição da gordura como na diferenciação das fibras musculares, influenciando assim a qualidade final do produto (carne).

Nos últimos anos, a preocupação com a quantidade e qualidade da gordura nos alimentos aumentou, principalmente pela possível relação com doenças como arterosclerose, diabetes, problemas cardíacos e outros. Um dos alimentos mais discutidos é a carne vermelha, que por um lado é rica em proteína e micronutrientes, mas por outro, contém altos níveis de ácidos graxos saturados. Segundo WHO (2003), é recomendado que o total de gordura na alimentação seja entre <15 – 30% e que as saturadas fiquem abaixo de 10%.

A gordura na carne bovina é dividida em gordura intermuscular (entre os músculos), intramuscular e a subcutânea, e dependendo do tipo de corte esta pode variar. A gordura é um importante fator determinante da qualidade, influenciando tanto nas características sensoriais e instrumentais da carne,

estas análises possuem correlação positiva com a gordura intramuscular acima de 14-20% (SCOLLAN et al., 2006; THOMPSON, 2004).

Segundo Rathmann et al. (2012), a maioria dos trabalhos com suplementação de β AA indicam um aumento da área de olho de lombo (AOL) e redução da espessura de gordura subcutânea (EGS), sendo que ao comparar animais do grupo controle com os suplementados com Zilpaterol por 20 dias, observaram o aumento da AOL (86,16 vs 91,76 cm²) e redução da EGS (1,54 vs 1,46 cm).

Todavia, diferentes β AA não são igualmente potentes. As células e tecidos variam de acordo com os tipos de β AA e as vias metabólicas vinculadas a eles. Pela mesma razão, a magnitude do efeito de β AA sobre o metabolismo da gordura, é também associada à dose, duração e tipo de tratamento e também a espécie (DUNSHEA et al., 2005).

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar os efeitos dos β AA em bovinos, entretanto, a maior parte deles foram realizados em condições diferentes das normalmente encontradas no Brasil, entre as quais é possível citar a raça, o sexo dos animais, o grau de acabamento no momento do abate, o tempo de confinamento, entre outros.

Outro fator a ser considerado é a condição sexual dos animais. Sabe-se que animais castrados apresentam maior deposição de gordura que os animais não-castrados. Assim, visando a qualidade do produto final tanto pela proteção da carcaça contra o frio quanto pela suculência adicionada na carne, a gordura deve ser um item de preocupação, já que muitos trabalhos citam a redução dessa em animais suplementados com β AA. Para tanto, a imunocastração

pode ser de grande importância ao associar-se aos melhoradores de desempenho.

Andreo et al. (2013), avaliaram bovinos Nelore imunocastrados e não-castrados e observaram que os imunocastrados obtiveram maior espessura de gordura subcutânea e grau de acabamento que os animais não-castrados, justificando que os não-castrados depositam gordura mais tardiamente que os castrados por causa da deposição muscular estimulada pela testosterona. Esses resultados estão de acordo com o relatado por D'Occhio, Aspden & Trigg (2001), que também encontraram maior espessura de gordura subcutânea em animais imunocastrados em relação aos não-castrados. Por outro lado, Ribeiro et al. (2004), não observaram diferenças na área de olho de lombo ou espessura de gordura subcutânea entre animais imunocastrados e não-castrados.

2.2. Agonistas beta-adrenérgicos

Uma das estratégias que pode ser utilizada com o objetivo de melhorar o desempenho de bovinos de corte na fase de confinamento é o uso dos aditivos melhoradores de desempenho, como os β AA.

Agonista é um composto sintético que se liga a um receptor orgânico e imita a atividade de um mediador biológico natural, tendo, em geral, uma ação mais potente que o mediador endógeno (FIEMS, 1987). Os β AA são uma classe de compostos farmacológicos, que possuem estrutura química similar a um grupo natural de compostos chamados catecolaminas, que apresentam uma potente ação anabólica sobre o músculo esquelético.

Os β AA são assim chamados porque agem nas células via β -receptores de membrana, que podem ser classificados em três tipos: β 1 característicos nos músculos cardíaco, tecido intestinal e sistema nervoso central; os β 2 característicos nos tecidos não-neurais, principalmente nos brônquios e músculo uterino e os β 3, encontrados predominantemente nos tecidos adiposos branco e marrom, mas também encontrado no intestino e possivelmente nos músculos esquelético e cardíaco. Entretanto, esses receptores ocorrem em vários tecidos e órgãos que estão diretamente ligados com o crescimento, incluindo o tecido adiposo, músculo esquelético (lipólise, glicogenólise, aumento da contratilidade e captação de K^+) e alguns órgãos neuroendócrinos (YANG ; MCELLIGOTT, 1989).

Os β AA de interesse na produção animal são o cloridrato de ractopamina e cloridrato de zilpaterol, os quais afetam principalmente os receptores do tipo β 2, porém algum efeito também é verificado sobre os demais receptores (WARRIS, 2000). Segundo Anderson et al. (2004) a ractopamina é seletiva para os receptores β 1, enquanto o zilpaterol é seletivo para os receptores β 2, no entanto, altas doses de ractopamina pode fazer com que ela se ligue também nos receptores β 2.

A busca por compostos que pudessem ser utilizados no tratamento de doenças bronco constritoras levou ao desenvolvimento de substâncias β AA específicas. Muitas dessas substâncias foram introduzidas na terapêutica, como isoproterenol, metaproterenol, albuterol, carbuterol, fenoterol e clenbuterol. Todos esses compostos são estruturalmente semelhantes à adrenalina, porém com relativa especificidade para os receptores β 2, com ação menos acentuada sobre o coração (β 1).

Segundo Sumano et al. (2002), na década de 80, pesquisadores da empresa Cyanamid Laboratories, publicaram dados sobre a modulação do crescimento dos animais utilizando o clenbuterol, demonstrando que a administração oral desse β AA em bovinos, aves, suínos e ovinos aumentava a massa muscular e diminuía a gordura corporal. Poucos anos depois surgiram outros β AA como o cimaterol, ractopamina, zilpaterol, L664,969, salbutamol.

O zilpaterol e a ractopamina, são substâncias atualmente liberadas para uso em bovinos de corte em alguns países, devido ao seu pequeno potencial broncodilatador ou ação cardíaca, em comparação com o clenbuterol. Segundo Sumano et al. (2002), a atividade cardioestimulante do clenbuterol é aproximadamente 2.000 vezes superior ao zilpaterol.

De acordo com Avendaño-Reyes et al. (2006), animais alimentados com dois diferentes tipos de β AA (zilpaterol e ractopamina) apresentaram maior ganho médio diário (26 e 24%, respectivamente), e, segundo Boler et al. (2012), os animais alimentados com ractopamina tiveram aumento de 2 a 5 % no peso de carcaça quente, em comparação com o grupo controle. Da mesma forma, Schroeder (2004) revisando a literatura sobre o uso do zilpaterol em confinamentos de diferentes regiões dos Estados Unidos, observou um aumento no ganho médio diário e na eficiência alimentar, em comparação com o grupo sem suplementação. Segundo Johnson et al. (2014), os β AA aumentam de 11 a 39% a área da fibra muscular, aumentando de 8 a 40% a massa muscular total.

A ação dos β AA no aumento da massa muscular, parece ocorrer em função do aumento da taxa de síntese e/ou pela redução da degradação proteica. Reeds et al. (1985) estimaram que entre 15 a 22% da energia gasta

por um animal em crescimento é utilizada para o *turnover* proteico. Desta forma, uma redução na taxa de degradação poderia causar um impacto positivo considerável no custo de produção dos bovinos pelo aumento da eficiência de utilização da energia

Os beta receptores fazem parte da família dos receptores acoplados a proteína G (GPCR; JOHNSON et al., 2014). Quando os β AA se ligam aos seus receptores na proteína G, estimulam a via adenilato ciclase a produzir em grande escala o 3,5 monofosfato de adenosina (AMPc) através do trifosfato de adenosina (ATP). Este AMPc ao se ligar a proteína quinase A (PKA) faz com que ela se fosforilize liberando diversos resíduos metabólicos hormonais, regulando processos metabólicos como a contração muscular, lipólise e glicogenólise, sendo o principal mecanismo de ação dos β AA (Mersmann, 1998).

Um desses resíduos da fosforilação da PKA é o hormônio sensível a lipase (HSL) que resulta na parcial hidrólise do triacilglicerol (TAG) gerando a lipólise como efeito da utilização dos β AA (Figura 1). Outro fator determinante da lipólise é a fosforilação do Acetyl-CoA carboxylase, inibindo a biossíntese *de novo* dos ácidos graxos. Esses dois sistemas reduzem a agregação de ácidos graxos no tecido adiposo (RICKS et al., 1984; OSCAR, 1995)

Figura 1: Interação das proteínas que mediam a mobilização lipídica nos adipócitos.

Fonte: Adaptado de JOHNSON et al. (2014).

Nesse contexto, os ácidos graxos são armazenados nas células de gordura na forma de triacilglicerol (glicerol + 3 ácidos graxos), e quando ocorre o redirecionamento energético para a produção muscular pelo βAA, ocorre a hidrólise dos triacilgliceróis, liberando ácidos graxos não-esterificados no sangue, fornecendo energia para o animal depositar mais proteína. Isso também ocorre com a glicose e essa ação é conhecida como repartição de nutrientes (ANDERSON et al., 2004; Figura 2)

Figura 2: Mecanismo proposto da ativação pelos agonistas beta-adrenérgicos que reduz a deposição de tecido adiposo e aumenta o crescimento muscular.

Fonte: Adaptado de JONHSON et al. (2014).

A ação da hipertrofia muscular causada pelos β AA pode ser ocasionada por vários processos, como a inibição do *turnover* proteico e a síntese de proteína miofibrilar, que ocorre pelo aumento da transcrição do gene dessa proteína (JOHNSON et al., 2014). O *turnover* é caracterizado pela diferença entre a degradação e a síntese miofibrilar no músculo esquelético. É esse sistema que define a deposição ou não de proteína (JOHNSON et al., 2014). Porém ainda existem outros fatores a serem estudados que envolvem a hipertrofia muscular.

Segundo Johnson et al. (2014), o hormônio do crescimento insulina como fator de crescimento (IGF-I), também tem uma relação com o processo de aumento da musculatura causado pelos β AA. O IGF-I estimula a proliferação e diferenciação das células satélites, se unindo as fibras musculares, primeiro no sentido longitudinal aumentando os sarcômeros e

depois a área pela deposição de proteínas miofibrilares, dando suporte ao desenvolvimento pós-natal do animal, aumentando assim a massa muscular, porém, sem aumentar o conteúdo do DNA.

De acordo com Miller et al. (2015), existem variações nos dados observados sobre os β AA e a proliferação e/ou diferenciação das células satélites. No entanto, a maioria dos dados indicam que não há alteração do conteúdo do DNA no músculo em animais suplementados com β AA. Walker et al. (2006), compararam as concentrações de RNAm para IGF-I em bovinos suplementados ou não com ractopamina e observaram uma redução do RNAm no músculo *Longissimus dorsi* nos animais tratados.

Efeito semelhante foi observado por Beermann et al. (1987), que relataram uma redução dos níveis de IGF-I no sangue de cordeiros suplementados por 84 dias com cimaterol, passando de 46,5% para 21,5% em comparação com cordeiros não-suplementados.

Outra suposição é que o aumento da expressão de alguns genes, como da calpaína e da calpastatina, ocorre através da ativação e posterior fosforilação da proteína CREB (cAMP response element-binding, ou, elemento resposta do AMPc junto a proteína de ligação) no núcleo celular pela PKA, que ao se ligar ao elemento de resposta da AMPc denominado CRE (cAMP response elemento, ou, elemento de resposta do AMPc), estimula a transcrição de alguns genes, aumentando o RNAm em células musculares (LODISH et al., 2005; Figura 3)

Figura 3: Mecanismo de ação do AMPc na expressão gênica

Fonte: Adaptado de Molecular biology of the cell, Garland Science (2008).

Outro fator que contribui para a hipertrofia muscular é a ativação da enzima calpastatina, que inibe a ação da enzima calpaína, responsável pela degradação das miofibrilas. Portanto, se ocorre o aumento de RNAm para calpastatina, possivelmente irá ocorrer um aumento da sua atividade, resultando na redução da degradação muscular e, conseqüentemente, maior acúmulo de tecido muscular (BARDSLEY et al., 1992).

De acordo com Doumit e Koohmaraie (1999), bovinos suplementados com β AA, tiveram aumento de 36% na massa muscular, 96% nos níveis de calpastatina e 76% de aumento na atividade desta.

Outros estudos investigaram o efeito dos β AA sobre a proporção, diferenciação e aumento das fibras musculares. Segundo Miller et al. (1988),

novilhos suplementados com Clenbuterol tiveram aumento do diâmetro das fibras musculares do tipo II e numericamente a do tipo I, em relação a animais não tratados. Efeito semelhante também foi observado por Smith et al. (1995), que relataram um aumento do diâmetro das fibras musculares do tipo IIA em animais suplementados com β AA em relação ao grupo controle. No geral, animais suplementados com β AA tiveram uma fibra muscular com área 50% maior em comparação com animais não tratados (JOHNSON et al., 2014). Portanto, aumentando o diâmetro da fibra muscular pode ser considerado um aumento da massa muscular.

Outra suposição para a hipertrofia muscular é o aumento RNAm para a cadeia de Miosina do tipo IIX. Segundo, Johnson et al. (2014), animais suplementados com Zilpaterol por 30 dias, apresentaram aumento do RNAm da Miosina do tipo IIX no músculo semimembranoso, porém não observaram diferenças no RNAm da miosina do tipo I e IIA. A fosforilação e a posterior ativação do AMPc pela proteína quinase A, está positivamente relacionada ao aumento do RNAm da Miosina. Os mesmos autores observaram que ao injetar o ativador do AMPc, houve um aumento da fosforilação e um aumento do RNAm da miosina, que é uma proteína que compõem a miofibrila e auxilia no processo de contração muscular. Nesse contexto, o aumento da concentração de RNAm para Miosina, provavelmente irá causar um aumento da síntese muscular.

Essas possíveis reações ocorrem nos tecidos periféricos e nas células que apresentarem os receptores beta, como é o caso das células multinucleadas dos músculos esqueléticos. Segundo Johnson et al. (2014), bovinos apresentam 96 a 99% dos receptores para β AA do tipo β 2 e de 1 a 4%

entre os receptores $\beta 1$ e $\beta 3$, sugerindo que o que regula a intensidade da ação desses β AA é a quantidade de receptores presentes na célula. Por esse motivo sabe-se que o efeito do zilpaterol é mais pronunciado, em comparação ao da ractopamina, o que pode ser explicado pela maior quantidade de receptores $\beta 2$ que são seletivos ao zilpaterol. Porém, a constante ligação, ou seja, o uso prolongado dos promotores, podem causar a desensibilização ou inativação dos receptores, gerando um *down regulation* negativo.

Embora o mecanismo exato pelo qual os β AA atuam não seja completamente compreendido, sabe-se que eles modificam a bioquímica dos processos de crescimento dos tecidos, aumentando a lipólise, diminuindo a lipogênese (DUNSHEA 1993; LIU ; MILLS 1989; MERSMANN 1998), assim como atuam diminuindo a degradação (KOOHMARAIIE et al.,1991; WHEELER ; KOOHMARAIIE 1992) e aumentando a síntese de proteína (EISEMANN et al.,1988; HELFERICH et al., 1990; SMITH et al., 1989).

Segundo dados da FAO (2012), mais de 20 países usam a ractopamina como suplementação para gado de corte, e de acordo com Canadian Food inspection Agency (2010) e Merck (2009) apenas 5 países usam o zilpaterol como suplemento para gado de corte. O poder residual desses β AA é encontrado em maior quantidade nos rins, fígado e pulmão (SMITH; PAULSON, 1997).

2.3. Imunocastração

Entre as principais características desejadas pela indústria estão o peso da carcaça, a idade do animal e o acabamento de gordura. O peso do animal, da carcaça e a idade dos animais são características mais facilmente

controladas pelo produtor, em comparação com o acabamento de gordura, e por isso que esse critério é o que mais desclassifica carcaças.

Um dos principais aspectos relacionados a deposição de gordura na carcaça, e conseqüentemente sobre a qualidade da carne, é o sexo do animal, pois ele exerce um efeito direto sobre o crescimento dos tecidos, bem como sobre a distribuição dos mesmos na carcaça (BERG ; BUTTERFIELD, 1979).

Segundo Roça et al. (2011a), em bovinos de corte, a castração é uma prática que tem como objetivo obter animais mais dóceis, facilitando o manejo, e a redução de problemas de casco e monta indesejada, auxiliando na redução do estresse do animal e, conseqüentemente, o risco do desenvolvimento de cortes DFD (*dark, firm and dry*), além de apresentar maior deposição de gordura e marmorização da carne.

Por outro lado, machos não-castrados tem maior ganho de peso, melhor conversão alimentar e uma maior proporção músculo:osso do que machos castrados e fêmeas a uma mesma percentagem de gordura (LUCHIARI FILHO, 2000). Além disso, a maior parte das indústrias brasileiras não diferenciam as carcaças de acordo com características qualitativas, muito menos beneficiam financeiramente o produtor por estas características, desta forma, muitos produtores preferem não castrar os animais, em função da melhor eficiência no desempenho e maior peso de carcaça, principal fator considerado na remuneração recebida pelo produtor.

Nos animais não-castrados, a testosterona exerce várias funções de regulação hormonal, dentre as quais, pelo aumento da deposição muscular, que segundo Andreo et al. (2013), pode estar relacionado ao aumento da atividade das calpastatinas (síntese muscular), com maior inibição das

calpaínas (degradação muscular), que também está diretamente relacionado a maciez da carne.

Outra função da testosterona é a redução da ação miostatina (KAWADA, OKUNO E ISHII, 2006), que é uma proteína da família da transformação do fator de crescimento (TGF) – β , e desempenha um papel fundamental no desenvolvimento muscular (ARCE et al., 2005). O TGF- β é um regulador negativo da síntese muscular em várias espécies (MC PHERRON E LEE, 1997), sendo responsável pela inibição da ativação, proliferação e diferenciação das células satélites (KAWADA, OKUNO E ISHII, 2006), inibindo, portanto, a formação de novas fibras (MCCROSKERY et al., 2003). Deane et al. (2013), observaram *in vitro* a redução da expressão de RNAm para miostatina nos mioblastos e aumentando a hipertrofia nos miotubos, quando administrado testosterona.

Recentemente, foram desenvolvidas vacinas capazes de inibir temporariamente a liberação dos hormônios sexuais masculinos e femininos, através da estimulação da produção de anticorpos que neutralizam o fator hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH). O GnRH é normalmente secretado pelo hipotálamo e, ao se ligar a hipófise, estimula a liberação de hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH), que tem como ação a estimulação da função testicular e ovariana, gerando o comportamento natural do animal. No caso dessa vacina, conhecida como imunocastração, a neutralização causada do GnRH, inibe a produção dos hormônios LH e FSH, impedindo a estimulação testicular ou ovariana (ROÇA et al., 2011b)

Segundo Roça et al. (2011a) esses produtos são uma alternativa imunológica a castração cirúrgica, facilitando o manejo dos bovinos, promovendo o bem-estar animal, com melhora da qualidade da carne, controlando o comportamento sexual e aumento do potencial de produtividade.

Amatayakul-Chantler et al. (2013), compararam duas técnicas de castração (cirúrgica e imunocastração) e observaram que após duas semanas, os animais castrados cirurgicamente apresentaram várias complicações, tais como secreção purulenta, miíase, funiculite do cordão espermático e hemorragia, sendo que alguns animais apresentaram mais de uma complicação. Por outro lado, os animais imunocastrados não apresentaram efeitos adversos sistêmicos ou localizados.

Estudos relativos aos efeitos da imunocastração no desempenho e características de carcaça de bovinos são escassos. De acordo com Roça et al. (2011b) animais terminados em pastagem, que receberam duas ou três doses de vacina de imunocastração (Bopriva[®]), não apresentaram diferenças na maioria das características de carcaça, quando comparados aos animais castrados cirurgicamente.

Segundo Amatayakul-Chantler et al., (2013), bovinos Nelore imunocastrados apresentaram maior área de olho de lombo em comparação com os castrados cirurgicamente e não diferiram no peso de carcaça quente, espessura de gordura subcutânea e rendimento de carcaça. Os autores também não encontraram diferenças para o pH, maciez, cor da carne, perdas por cocção e cor da gordura. Esses resultados são indicativos de que a imunocastração é uma alternativa para evitar o estresse do animal com a castração cirúrgica, visando o bem-estar animal.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da imunocastração e do fornecimento de β AA (Zilpaterol e Ractopamina), sobre características de qualidade da carne de bovinos Nelore confinados.

4. REFERÊNCIAS

ADEOLA, O.; MCBRIDE, B. W.; YOUNG, L. G. Metabolic responses induced by isoproterenol in ractopamine-fed pigs. **J. Nutr.** v.122, p.1280-1286,1992b.

ANDERSON, P.T.; JOHNSON, B.J.; DIKEMAN, M. Metabolic Modifiers. Encyclopedia of Meat Sciences, v.2, p.538-546, 2004

ANDREO, N.; BRIDI, A.M.; TARSITANO, M.A.; PERES, L.M.; BARBON, A.P.A.C.; ANDRADE, E.L.; PROHMANN, P.E.F. Influência da imunocastração (Bopriva®) no ganho de peso, características de carcaça e qualidade de carne de bovinos Nelore. **Revista Ciências Agrárias**, v.34, p. 4121-4132, 2013.

AMATAYAKUL-CHANTLER, S.; HOE, F.; JACKSON, J. A.; ROCA, R. O.; STEGNER, J. E.; KING, V.; HOWARD, R.; LOPEZ, E.; WALKER, J. Effects on performance and carcass and meat quality attributes following immunocastration with the gonadotropin releasing factor vaccine Bopriva or surgical castration of *Bos indicus* bulls raised on pasture in Brazil. **Meat Science**, Amsterdam, v. 95, n. 1, p. 78-84, 2013.

ARCE, V.M.; CARNEIRO, I.; FERNÁNDEZ-NOCELO, S.; DEVESA, J. La miostatina: un regulador autocrino/paracrino del desarrollo muscular. **Endocrinol Nutr.**, v.52, p-350-357, 2005.

AVENDAÑO-REYES, L., TORRES-RODRÍGUEZ, V., MERAZ-MURILLO, F. J., PÉREZ-LINARES, C.FIGUEROA-SAAVEDRA, F., ROBINSON, P. H. Effect of two β -adrenergic agonists on finishing performance, carcass characteristics, and meat quality of feedlot steers. **Journal of Animal Science**, 84, p. 3259–3265, 2006.

BARDSLEY, R.G.; ALLCOCK, S.M.J. DAWSON, J.M.; DUMELOW, N.W.; HIGGINS, J.A.; LASSLETT, Y.V.; LOCKLEY, A.K.; PARR, T.; BUTTERY, P.J. Effect of β -agonists on expression of calpain and calpastatin activity in skeletal muscle. **Biochimie**. v. 74, p.267-273, 1992.

BEERWINKLE, D.L., MARCHELLO, J.A., DRYDEN, F.D. Histological and histochemical characteristics of Longissimus and semitendinosus muscle of feedlot and range steers. **Journal of Animal Science**, v.48, Suppl.1, 212, 1979.

BEERMANN, D. H.; BUTLER, W. R.; HOGUE, D. E.; FISHELL, V. K.; DALRYMPLE, R. H.; RICKS, C. A.; SCANES, C. G. Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. **Journal of Animal Science** 65:1514-1524, 1987.

BERG, R.T., BUTTERFIELD, R.M. El crecimiento Del ganado vacuno y la producción de carne de vacuno **In: Nuevos conceptos sobre desarrollo de ganado vacuno.** Zaragoza: Acribia.. p.16-29, 1979.

BERGE, PH., CULIOLI, J., OUALI, A., PARAT, M. F. Performance, muscle composition and meat texture in veal calves administered a b-agonist (clenbuterol). **Meat Science**, 33, 191–206, 1993.

BLUM, J. W.; FLUECKIGER, N. Early metabolic and endocrine effects of perorally administered b-adrenoceptor agonists in calves. **Eur. J. Pharmacol.** v.151, p.177-187, 1988.

BRASIL. Instrução Normativa 13/2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2004.

BRICOUT, V.A.; SERRURIER, B.D.; BIGARD, A.X. Clembuterol treatment affects myosin heavy chain isoforms and MyoD content similarly in intact and regenerated soleus muscles. **Acta Physiol.Scand**, v. 180, p.271-280, 2004.

BOLER, D. D.; SHRECK, A. L.; FAULKNER, D. B.; KILLEFER, J.; MCKEITH F. K., HOMM, J. W.; SCANGA, J. A. Effect of ractopamine hydrochloride (Optaflexx) dose on live animal performance, carcass characteristics and tenderness in early weaned beef steers. **Meat Science**. 92:458–463, 2012.

BUDOHOSKI, L., CHALLISS, R.A.J., DUBANIEWICZ, A., KACIUBA-USCILKO, H., LEIGHTON, B., LOZEMAN, F.J., NAZAR, K., NEWSHOLME, E.A., PORTA, S. Effects of prolonged elevation of plasma adrenaline concentration in vivo on insulin-sensitivity in soleus muscle of the rat. **Biochem. J.** 244, 655–660, 1987.

CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY. Ractopamine hydrochloride, medicating ingredient brochures no. 82. Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Canada, 2010.

COLLINS, C. A. Satellite cell self-renewal. *Curr. Opin. Pharmacol.* 6:301–306, 2006.

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

DEANE, C.S.; HUGHES, D.C.; SCULTHORPE, N; LEWIS, M.P.; STEWART, C.E.; SHARPLES, A.P. Impaired hypertrophy in myoblasts is improved with testosterone administration. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 138, p. 152-161, 2013.

DEDIEU, S.; MAZERES, G.; POUSSARD, S.; BRUSTIS, J.J.; COTTIN, P. *Biol. Cell.* v.95, p.615–623, 2003.

DELGADO, E. F. Fatores bioquímicos que afetam a maciez da carne. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA CARNE. 1., 2001, Campinas. Anais. Campinas: CTC/ITAL, 2001.

D'OCCHIO, M. J.; ASPDEN, W. J.; TRIGG, T. E. Sustained testicular atrophy in bulls actively immunized against GnRH: potential to control carcass characteristics. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p.47-58, 2001

DOUMIT, M.E.; KOOHMARAIE, M. Immunoblot analysis of calpastatin degradation: Evidence for cleavage by calpain in postmortem muscle. **Journal of Animal Science**, v.77, p. 1467–1473, 1999.

DUNSHEA, F. R. Effect of metabolism modifiers on lipid metabolism in the pig. **Journal of Animal Science**, 71, 1966–1977, 1993.

DUNSHEA, F. R., D'SOUZA, D. N., PETHICK, D. W., HARPER, G. S., WARNER, R. D. Effects of dietary factors and other metabolic modifiers on quality and nutritional value of meat. **Meat Science**, 71, p. 8–38, 2005.

EISEMANN, J. H., HUNTINGTON, G. B., FERRELL, C. L. Effects of dietary clenbuterol on metabolism of the hindquarters in steers. **Journal of Animal Science**, 66, p. 342–353, 1988.

EMORI, Y.; KAWASAKI, H.; IMAJOH, S.; IMAHORI, K.; SUZUKI, K. Biochemistry. v.84, p. 3590 – 3594, 1987.

FENNESSY, P.F., MCEWAN, J.C., LORD, E.A., GREER, G.J., BAIN, W.E., JOHNSTONE, P.D., KNOWLER, M.A., DALRYMPLE, R.H., INGLE, D.A. Effect of cimaterol implants on lamb growth and carcass traits. N. Z. **J. Agric. Res.** v.33, p.413–427, 1990.

FERRAZ, A. L. J. (2009). Análise da expressão gênica no músculo esquelético de bovinos das raças Nellore e Aberdeen angus e sua relação com o desenvolvimento e a carne maciez da carne. Tese de doutorado, apresentada na FCAV, UNESP Jaboticabal.

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

FIEMS, L. O. Effect of b-adrenergic agonists in animal production and their mode of action. **Annales Zootechnie**, v.36, p. 271–290, 1987.

FLORINI, J.R. Hormonal control of muscle growth. **Muscle Nerve**. v.10, p. 577-598, 1987.

Food and Agriculture Organization of United Nations. **Statistical Databases FAOSTATS**. Agriculture, 2011. Disponível on-line via WWW. URL: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acesso em 21 de fevereiro de 2014.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2012. Information sheet – Discussion on ractopamine in codex and in the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). FAO, Rome, Italy, 26 April 2012, p. 1–2. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Ractopamine_info_sheet_Codex-JECFA_rev_26April2012__2_.pdf. (Accessed 24 March 2015.)

GEESINK, G.H.; KOOHMARAIE, M. Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under *postmortem* conditions. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 77, p. 2685-2692, 1999.

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

GOLL, D.E.; THOMPSON, V.F.; LI, H.; WEI, W. Cong Physiol. Rev. v.83, p.731–801, 2003.

GONZALEZ, J. M., JOHNSON, S. E., THRIFT, T. A., SAVELL, J. D., OUELLETTE, S. E., JOHNSON, D. D. Effects of ractopamine-hydrochloride on the fiber type distribution and shelf-life of six muscles of steers. **Journal of Animal Science**, v.87, p. 1764–1771, 2009.

GOTOH, T. Histochemical properties of skeletal muscles in Japanese cattle and their meat production ability. **Journal of Animal Science**. v.74; p.339-354, 2003.

HANSEN, S.; FRYLINCK, L.; STRYDOM, P.E. The effect of vitamin D3 supplementation on texture and oxidative stability of beef loins from steers treated with zilpaterol hydrochloride. **Meat Science**, v. 90, p. 145-151, 2012.

HAUSMAN, D.B., MARTIN, R.J., VEENHUIZEN, E.L., ANDERSON, D.B. Effect of ractopamine on insulin sensitivity and response of isolated rat adipocytes. **Journal of Animal Science** v.67, p.1455– 1464, 1989.

HELFERICH, W. G., JUMP, D. B., ANDERSON, D. B., SKJAERLUND, D. M., MERKEL, R. A., BERGEN, W. Skeletal muscle α -actin synthesis is increased pretranslationally in pigs fed the phenethanolamine ractopamine. **Endocrinology**, v.126, p. 3096–3100, 1990.

HERRING, H. K., CASSENS, R. G., BRISKEY, E. J. Further studies on bovine muscle tenderness as influenced by carcass position, sarcomere length, and fiber diameter. **J. Food Sci.** v.30, p.1049–1054, 1965.

HILTON, G. G., MONTGOMERY, J. L., KREHBIEL, C. R., YATES, D. A., HUTCHESON, J. P., NICHOLS, W. T. et al. Effects of feeding zilpaterol hydrochloride with and without monensin and tylosin on carcass cutability and meat palatability of beef steers. **Journal of Animal Science**, v.87, p.1394–1406, 2009.

HOPE-JONES, M., STRYDOM, P.E., FRYLINCK, L., WEBB, E.C. The efficiency of electrical stimulation to counteract the negative effects of β -agonists on meat tenderness of feedlot cattle. **Meat Science**. v. 86, p.699-705, 2010.

HOWARD, S. T., D. R. WOERNER, D. J. VOTE, J. A. SCANGA, R. J. ACHESON, P. L. CHAPMAN, T. C. BRYANT, J. D. TATUM, K. E. BELK. Effects of ractopamine hydrochloride and zilpaterol hydrochloride supplementation on carcass cutability of calf-fed Holstein steers. **Journal of Animal Science**. v.92, p. 369–375, 2014.

HU, C. Y.; NOVAKOFSKI, J.; MERSMANN, H. J. Clenbuterol stimulated increase of plasma free fatty acids in reserpinized pigs. **Comp. Biochem. Physiol.** v.91C, p.619-622, 1988.

HU, C.Y., SURYAWAN, A., FORSBERG, N.E., DALRYMPLE, R.H., RICKS, C.A., 1988. Effects of cimaterol on sheep adipose tissue lipid metabolism. **Journal of Animal Science**. 66, 1393–1400.

HWANG, Y. H., KIM, G. D., JEONG, J. Y., HUR, S. J., JOO, S. T. The relationship between muscle fiber characteristics and meat quality traits of highly marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers. **Meat Science**, 86, 456–461, 2010.

IBRAHIM, R. M., GOLL, D. E., MARCHELLO, J. A., DUFF, G. C., THOMPSON, V. F., MARES, S. W., AHMAD, H. A. Effect of two dietary concentrate levels on tenderness, calpain and calpastatin activities, and carcass merit in Waguli and Brahman steers. **Journal of Animal Science**, v.86, n.7, p.1426–1433, 2008.

JOHNSON, B.J.; SMITH, S.B.; CHUNG, K.Y. Historical Overview of the Effect of B-Adrenergic Agonists on Beef Cattle Production. **Asian Australas J. Anim. Sci.** v.27, n.5, p.757-766, 2014.

JOO, S.T.; KIM, G.D.; HWANG, Y.H.; RYU, Y.C. Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics. **Meat Science**, v.95, p.828-836, 2013.

KAWADA,S.; OKUNO,M.; ISHII,N. Testosterone causes the decrease in the content of skeletal muscle myostatin, **International Journal of Sport and Health Science** , v.4 , p. 44–48, 2006.

KELLERMEIER, J. D., TITTOR, A. W., BROOKS, J. C., GALYEAN, M. L., YATES, D. A., HUTCHESON, J. P. NICHOLS,W. T., STREETER,M. N., JOHNSON, B. J., MILLER,M. F. Effects of zilpaterol hydrochloride with or without an estrogen-trenbelone acetate terminal implant on carcass traits, retail cut-out, tenderness, and muscle fibre diameter in finishing steers. **Journal of Animal Science**, v.87, p. 3702–3711, 2009.

KENT, M.P.; SPENCER, M.J.; KOOHMARAIE, M. Postmortem proteolysis is reduced in transgenic mice overexpressing calpastatin. **Journal of Animal Science**.v.82, p.794–801,2004.

KLONT, R.E., BROCKS, L., EIKELENBOOM, G. Muscle fibre type and meat quality. **Meat Science**. v.49,p. 219–229, 1998.

KOOHMARAIE, M. The role of endogenous proteases in meat tenderness. In: RECIPROCAL MEAT CONFERENCE, 41, Wyoming. **Proceedings...**Champaign: AMSA, p.89-100,1988.

KOOHMARAIE, M., SHACKELFORD, S. D., MUGGLI-COCKETT, N. E., STONE, R. T. Effect of the -adrenergic agonist L644,969 on muscle growth, endogenous proteinase activities, and post-mortem proteolysis in wether lambs. **Journal of Animal Science**, v.69, p.4823–4835,1991.

KOOHMARAIE, M., SHAKELFORD, S. D. Effect of calcium chloride infusion on the tenderness of lambs fed a beta-adrenergic agonist. **Journal of Animal Science**, v.69, p. 2463, 1991.

KOOHMARAIE, M.; KENT, M.P.; SHAKELFORD, S.D. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, Barking, v. 62, p. 354-352, 2002.

KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L. Effects of a β -Adrenergic Agonist (L-644,969) and Male Sex Condition on Muscle Growth and Meat Quality of Callipyge Lambs. **Journal of Animal Science**, v.74, p.70-79, 2014.

KRETCHMAR, D.H. Alterations in postmortem degradation of myofibrillar proteins in muscle of lambs fed a β -adrenergic agonist. **Journal of Animal Science** v.68, p.1760-1772, 1990.

LALLOTIS, G. P.; BIZELIS I.; ROGDAKIS, E. Comparative Approach of the de novo Fatty Acid Synthesis (Lipogenesis) between Ruminant and Non Ruminant Mammalian Species: From Bio-chemical Level to the Main Regulatory Lipogenic Genes. **Current Genomics**, Berlin, v. 11, n. 3, 2010.

LANNA, D.P.D.; FERRAZ, J.B.S.; ALMEIDA, R. Integrando genética e nutrição no sistema de pastejo. In: SEMINÁRIO NACIONAL SOBRE PRODUÇÃO DE CARNE COM QUALIDADE. Ministério da Agricultura: 2004. (CD-ROM)

LEE, Y. B., KIM, Y.S. Muscle characteristics and meat tenderness of cimaterol-fed lambs. **J. Food Sci.** p.59-33, 1994.

LEPETIT, J. A theoretical approach of the relationships between collagen content, collagen cross-links and meat tenderness. **Meat Science**, v.76, n.1, p.147-159, 2007.

LESSER, W. Marketing Livestock and Meat, Food Products Press. v.2, n.5, p. 209-214, 1993.

LIU, C. Y., MILLS, S. E. Determination of the affinity of ractopamine and clenbuterol for the beta-adrenoceptor of the porcine adipocyte. **Journal of Animal Science**, v.67, p. 2937-2942, 1989.

LIU, C.Y., MILLS, S.E. Decreased insulin binding to porcine adipocytes in vitro by beta-adrenergic agonists. **Journal of Animal Science**. v.68, p.1603-1608, 1990.

LODISH, H. et al., *Biologia Celular e Molecular*. 5ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2005.

LUCHIARI FILHO, A. *Pecuária da carne bovina*. São Paulo: LinBife, p.134, 2000.

MARSH, B. B., CARSE, W. A. Meat tenderness and the sliding-filament hypothesis. **J. Food Technol.** v.9, p.129–139, 1974.

MCCROSKERY, S.; THOMAS, M.; MAXWELL, L.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. **J Cell Biol.** v.162, p.1135-47, 2003.

MCPHERRON, A.C.; LEE, S. J.; Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene, *Proceedings of the National Academy of Science*. v.94, p.12457–12461, 1997.

MERCK. ZILMAX. Merck, Whitehouse Station, NJ. [http:// www.merck-animal-health.com/zilmax/zilmaxinfocenter.aspx](http://www.merck-animal-health.com/zilmax/zilmaxinfocenter.aspx) (Accessed 04 August 2014.), 2009.

MERSMANN, H. J. Acute metabolic effects of adrenergic agents in swine. **Am. J. Physiol.** v.252, p.E85-E95, 1987.

MERSMANN, H. J. Acute changes in blood flow in pigs infused with B-adrenergic agonists. **Journal of Animal Science** 1989c.

MERSMANN, H. J. Species variation in mechanisms for modulation of growth by beta-adrenergic receptors. **J. Nutr.** v.125, p.1777S–1782S, 1995..

MERSMANN, H. J. Overview of the effects of b-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. **Journal of Animal Science**, v.76, p. 160–172, 1998.

MILLEN, D.D.; PACHECO, R.D.L.; ARRIGONI, M.D.B.; GALYEAN, M.L.; VASCONCELOS, J.T. A snapshot of management practices and nutritional

recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science**, v.87, p.3427-3439, 2009.

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

MILLER, E.K.; CHUNG, K.Y.; HUTCHESON, J.P.; YATES, D.A.; SMITH, S.B.; JOHNSON, B.J. Zilpaterol hydrochloride alters abundance of β -adrenergic receptors in bovine muscle cells but has little effect on de novo fatty acid biosynthesis in bovine subcutaneous adipose tissue explants. **Journal of Animal Science** v.90, p.1317-1327, 2015.

MILLER, M. F.; GARCIA, D.K.; COLEMAN, M.E.; EKEREN, P.A.; LUNT, D.K.; WAGNER, K.A.; PROCKNOR, M.; WELSH, T.H.; JR., AND SMITH, S.B. Adipose tissue, longissimus muscle and anterior pituitary growth and function in clenbuterol-fed heifers. **Journal of Animal Science** v.66, n.12, 1988.

MILLS, S., MERSMANN, H.J. Beta-adrenergic agonists, their receptors, and growth: special reference to the peculiarities in pigs. In: S. B. Smith and D. R. Smith (Ed.) *The Biology of Fat in Meat Animals: Current Advances*. **American Society of Animal Science**, Champaign, IL. p 1-34, 1995.

MOHAMMADI, M; ABAZARI, M.; NOUROZI, M. Effects of two beta-adrenergic agonists on adipose tissue, plasma hormones and metabolites of Moghani ewes. **Small Ruminant Research**, v. 63, p.84-90, 2006.

MORGAN, J.B.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; SAVELL, J.W.; CROUSE, J.D. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in the *Longissimus* muscle of young bulls and steers. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 71, p. 1471, 1993.

NRC-National Research Council. *The national science education standards*. Washington, DC: National Academy Press, 1996.

OSCAR, T. P. Lipid mobilization from chicken fat cells. In: *Biology of Fat in Meat Animals: Current Advances* (Eds. S. B. Smith and D. R. Smith). American Society of Animal Science, Champaign, IL, USA. p.93-112,1995.

OKSBJERG, N., PETERSEN, J.S., SORENSEN, M.T., HENCKEL, P., AGERGAARD, N., BEJERHOLM, C., ERLANDSEN, E. The influence of porcine growth hormone on muscle fibre characteristics, metabolic potential and meat quality. **Meat Science**. v.39, p.375–385,1995.

OZAWA, S., MITSUHASHI, T., MITSUMOTO, M., MATSUMOTO, S., ITOH, N., ITAGAKI, K., KOHNO, Y., DOHGO, T., The characteristics of muscle fiber types of longissimus thoracis muscle and their influences on the quantity and quality of meat from Japanese Black steers. **Meat Science**. v.54, p.65–70, 2000.

OWENS, P.C., CAMPBELL, R.G., FRANCIS, G.L., QUINN, K.J. Growth hormone, gender, and insulin-like growth factors: relationship to growth performance in pigs. **Journal of Animal Science** v.72, p.253–259,1994.

PEGGY, R.; JAYAT-VISNOLES, C.; LAFORÊT, M.P.; LEVÉZIEL, H.; AMARGER,V. Four promoters direct expression of the calpastatin gene. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.437, p.69-77, 2005.

PETER, J.B.; BARNARD, R.J.; EDGERTON, V.R.; GILLESPIE, C.A.; STEMPEL, K.E. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. **Biochemistry**, v.11, p.2627-2633, 1972.

PRESTON, R.L. Management of high concentrate diets in feedlot. In: *SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE GADO DE CORTE*.Campinas. Anais... Campinas: CBNA, p.82-89,1998.

QUINN, M. J., REINHARDT, C. D., LOE, E. R., DEPENBUSCH, B. E., CORRIGAN, M. E., MAY, M. L., et al. The effects of ractopamine-hydrogen chloride (Optaflexx) on performance, carcass characteristics, and meat quality of finishing feedlot heifers. **Journal of Animal Science**, v.86, n.4, p.902–908, 2008.

RAJAB, P., FOX, J., RIAZ, S.; TOMLINSON,D.; BALL,D.; GREENHAFF,P.L. Skeletal muscle myosin heavy chain isoforms and energy metabolism after clenbuterol treatment in the rat. **Am J Physiol** .v.279, p.R1076–R1081, 2000.

RATHMANN, R. J., MEHAFFEY, J. M., BAXA, T. J., NICHOLS, W. T., YATES, D. A., HUTCHESON, J. P.,et al. Effects of duration of zilpaterol hydrochloride and days on the finishing diet on carcass cutability, composition, tenderness, and skeletal muscle gene expression in feedlot steers. **Journal of Animal Science**, v.87, p.3686–3701, 2009.

RATHMANN, R.J.,BERNHARD, B.C., SWINGLE, R.S., LAWRENCE, T.E.,NICHOLS, W.T., YATES, D. A., HUTCHESON, J.P.,STREETER, M.N., BROOKS, J.C., MILLER, M.F., JOHNSON, B.J. Effects of zilpaterol hydrochloride and days on the finishing diet on feedlot performance, carcass characteristics, and tenderness in beef heifers. **Journal of Animal Science**. v. 90, p.3301-3311, 2012.

REEDS, P. J., M. F. FULLER, B. A. NICHOLSON. Metabolic basis of energy expenditure with particular reference to protein. In J. Garrow and D. Halliday (Ed.) *Substrate and Energy Metabolism in Man*. John Libbey, London. p 46, 1985.

REHFELDT,C., FIEDLER, I., DIETL, G., ENDER, K., Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. **Livestock Production Science**, v.66, p.177-188, 2000.

REHFELDT, C., FIEDLER, I., STICKLAND, N.C., Number and size of muscle fibres In relation to meat production. **In:** te pes, m.f.w., everts, m.e., haagsman, h.p. (eds.), *Muscle Development of Livestock Animals*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 1–38,2004.

RIBEIRO, E. L. A.; HERNANDEZ, J. A.; ZANELLA, E.L.; SHIMOKOMAKI, M.; PRUDÊNCIO-FERREIRA,S. H.; YOUSSEF, E.; RIBEIRO, H. J. S. S.; BOGDEN,R.; REEVES, J. J. Growth and carcass characteristics of pasture fed LHRH immunocastrated, castrated and intact *Bos indicus* bulls. **Meat Science**, Amsterdam, v. 68, n. 2,p. 285-290, 2004.

RICKS, C. A., DALRYMPLE, R.H., BAKER, P.K., AND INGLE, D.L. Use of a B-agonist to alter fat and muscle deposition in steers. **Journal of Animal Science** v.59,p.1247-1255. 1984.

ROÇA, R. O. ; HOE, F. ; ANDRADE, E N ; ARAUJO, A. P. ; COSTA, Q. P. B. ; SIGARINI, C. O. ; POLIZEL NETO, A. ; ATHAYDE, N. B. ; DELBEM, N. L. C. ; GIRAO, L. V. C. Imunocastração de bovinos criados em pasto: composição centesimal e propriedades sensoriais da carne. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2011, Florianópolis. CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2011a.

ROÇA, R.O.; JACKSON, J.A., HOE, F.; STEGNER, J.; CARVALHO, F.S.R.; SILVA, C.R.; LOPEZ, E.; KING, V.; AMATAYAKUL-CHANTLER, S. Bopriva®: it's effect on meat and carcass quality in male cattle on pasture. In: International Congress on Meat Science and Technology, 57, 2011. Ghent: Bélgica. 2011b.

SEIDEMAN, S.C.; CROUSE, J.D.; CROSS, H.R. Effect of feeding regimen and vacuum-packaged storage on sensory and physical properties of beef steaks. **J. Food Prot.** 45:1227,1982.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. **Physiol Rev.** v.76,p.371–423,1996.

SCHROEDER, A. L.; POLSER, D.M.; LAUDERT, S.B.; VOGEL, G.J. Effect of Optaflexx on sensory properties of beef. Optaflexx Exchange No. 3. Elanco Animal Health, Greenfield, IN. 2003a.

SCHROEDER, A. L. The effect of Optaflexx™ on growth performance and carcass traits of steers and heifers. Pages 65–81 in Proc. 19th Annu. Southwest Nutrition and Management Conf., Univ. Arizona, Tucson, 2004.

SCOLLAN, N.; HOCQUETTE, J-F; NUERNBERG, K; DANNENBERGER, D; RICHATDSON, I; MOLONEY, A. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. **Meat Science**, v. 74, p. 17-33, 2006.

SHACKELFORD, S.D., EDWARDS, J.W., SMARR, E.K., SAVELL, J.W., Retail cut yields of Rambouillet wether lambs fed the beta-adrenergic agonist L644,969. **Journal of Animal Science** v.70, p.161–168,1992.

SMITH, S.B.; CROUSE, J.D. Relative Contributions of Acetato, Lactato ang Glucose to lipogenesis in Bovine intramuscular and subcutaneous Adipose tissue.**Journal of nutrition.** p.792-800, 1984.

SMITH, S. M., GARCIA, D. K., ANDERSON, D. B. Elevation of a specific mRNA in longissimus muscle of steers fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, v.67, p. 3495–3502, 1989.

SMITH,S.B.;DAVIS,S.K.;WILSON,J.J.;STONE,R.T.;WU,F.Y.;GARCIA,D.K.;LUNT,.K.; SCHIAVETTA, A.M. Bovine fast-twitch myosin light chain 1: cloning and mRNA amount in muscle of cattle treated with clenbuterol. **Am. J. Physiol.** v.268, p.858-865, 1995.

SMITH, D. J.; PAULSON, G.D. Distribution, elimination, and residues of clenbuterol HCL in Holstein calves. **Journal of Animal Science** v.75;p.454-461,1997.

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

SUMANO H, OCAMPO L, GUTIÉRREZ L CLENBUTEROL, et al .β-agonistas, ¿Una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública? **Vet Mex**,v. 33,p.137-160, 2002

TEMM-GROVE, C.J., WERT, D., THOMPSON, V.F., ALLEN, R.E., GOLL, D.E. Microinjection of calpastatin inhibits fusion in myoblasts. **Exp. Cell. Res.**, v. 247, n.1, p. 293-303, 1999.

THOMPSON, J. M. The effects of marbling on flavor and juiciness scores of cooked beef, after adjusting to a constant tenderness. **Aust. J. Exp. Agric.** 44:645–652, 2004.

USDA. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. Agriculture, U. S. D.O. www.fas.usda.gov , 2013.

VEISETH, E., SHACKELFORD, S. D., WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M. Factors regulating lamb longissimus tenderness are affected by age at slaughter. **Meat Science**. v.68, n.4, p.635–640,2004.

VESTERGAARD, M., K. SEJRSEN, S. KLAstrup. Growth, composition and eating quality of Longissimus dorsi from young bulls fed the β -agonist cimaterol at consecutive developmental stages. **Meat Science**. v.38, p.55–66, 1994.

WARRIS, P.D. The handle of cattle preslaughter and its effects on carcass and meat quality. **Applied Animal Behaviour Science**, v.28, p171-186, 2000.

WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M. Effects of the β -adrenergic agonist L644,969 on muscle protein turnover, endogenous proteinase activities, and meat tenderness in steers. **Journal of Animal Science**, 70, p. 3035–3043,1992.

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

WHIPPLE, G., KOOHMARAIE, M. Effects of lamb age, muscle type, and 24-hour activity of endogenous proteinases on postmortem proteolysis. **Journal of Animal Science**. v.70, n.3, p.798–804.1992.

WHEELER, T. L. M. KOOHMARAIE. The extent of proteolysis is independent of sarcomere length in lamb longissimus and psoas major. **Journal of Animal Science**. v.77,p.2444–2451,1999.

WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases.Report of a joint WHO/FAO expert consultation. WHO technical report series 916, Geneva. 2003.

YANG,Y.T.; McELLIGOTT, M.A. Multiple actions of β -adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. **Biochem.J.** v.261, p. 1-10, 1989.

Capítulo 2

Efeito da imunocastração e de agonistas beta-adrenérgicos sobre características físicas, químicas e sensoriais da carne de bovinos

Nelore confinados

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido para avaliar o efeito da imunocastração e do fornecimento de agonistas beta-adrenérgicos (β AA) sobre a qualidade da carne de bovinos Nelore. Foram utilizados noventa e seis bovinos Nelore, sendo que metade dos animais ($n=48$) receberam uma dose da vacina de imunocastração, e após 30 dias receberam a segunda dose. A outra metade dos animais ($n=48$) não recebeu nenhuma dose da vacina. Durante 70 dias os animais foram alimentados com uma dieta padrão composta de 24% volumoso e 76% de concentrado. Após 70 dias de confinamento os animais foram divididos em três grupos, dentro de bloco (peso inicial) e condição sexual e foram alimentados por 30 dias, com umas das seguintes dietas: CON – dieta padrão utilizada na fase anterior, sem a adição de β AA; ZIL – dieta padrão acrescida de 80 mg/dia Cloridrato de Zilpaterol; RAC – dieta padrão acrescida de 300 mg/dia Cloridrato de Ractopamina. Ao final desse período os animais foram abatidos e colhidas amostras do músculo *Longissimus dorsi* para as avaliações de maciez, cor, lipídeos totais, perfil de ácidos graxos e análise sensorial do consumidor. As amostras foram maturadas nos tempos de 0, 7, 14 ou 21 dias e posteriormente foi determinado a cor, força de cisalhamento e perdas por cocção. Não foi observada interação entre condição sexual e β AA para a maioria das análises realizadas. Ao avaliar o efeito da condição sexual, apenas as características de cor L^* , a^* e b^* foram significativas, sendo que os animais imunocastrados apresentaram maiores intensidades em relação aos não-castrados. Na análise sensorial não houve efeito da condição sexual, porém uma tendência da carne dos animais não-castrados serem mais macia

que dos castrados. Quanto aos lipídios totais e o perfil de ácidos graxos, os animais castrados apresentaram maiores valores de lipídios totais, ácido oleico, palmítico e total de monoinsaturados, enquanto os não castrados apresentaram maiores valores para esteárico e behênico. Já, quanto ao efeito dos β AA, a força de cisalhamento foi significativa indicando que o grupo controle não se diferiu do grupo ractopamina, apresentando uma carne mais macia, em comparação ao grupo do zilpaterol. Na análise sensorial, os β AA apresentaram efeito sobre as notas da textura e qualidade global, sendo que os animais do grupo controle receberam as maiores notas que os grupos ractopamina e zilpaterol, que não diferiram entre si. Já em relação ao perfil de ácidos graxos, os ácidos mirístico e palmítico foram encontrados em maiores proporções nos animais do grupo controle e Ractopamina, enquanto que os ácidos heptadecanoico, linoleico, araquidônico ácido C20:3 N6C8C11C14, ômega 6 e uma tendência para os valores do total de AGP serem maiores no grupo Zilpaterol. Não houve diferenças nos valores de lipídeos totais para os β AA.

PALAVRAS-CHAVE: Perfil de ácidos graxos, Lipídeos totais, Análise sensorial, Maciez.

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effect of immunocastration and Beta adrenergic agonist (β AA) supplementation on meat quality of Nellore . Ninety-six Nellore were fed in this trial; half of the animals ($n = 48$) received one dose of immunocastration vaccine on d 0, and received another dose at d 30. The other half of animals ($n = 48$) received no vaccine. Animals were fed with a standard diet consisting of 24% forage and 76% concentrate for 70 d. After 70 d of the standard diet, animals were divided into three groups, and were fed 30 d with one of the following diets: CON - standard diet used in the previous phase, without the addition of β AA; ZIL - standard diet plus 80 mg/d Zilpaterol hydrochloride; RAC - standard diet plus 300 mg/d Ractopamine hydrochloride . After this period, animals were slaughtered and the Longissimus dorsi was sampled to evaluate tenderness ratings, color values, total lipid content, fatty acid profile, and consumer sensory analysis. Samples were aged for 0 , 7, 14 or 21 d, subsequently instrumental color , shear force, and cooking loss values were collected. The effect of sexual condition significantly effected color values (L^* , a^* , and b^*), immunocastrated animals showed higher values than non-castrated animals. Consumer panelists did not observe a significant effect of sexual condition for percieved tenderness; however, there was a tendecy for the meat of non castrated animals to be more tender compared to castrates. Castrated animals showed higher total lipid values of oleic , palmitic, and total monounsaturated fatty acids, while non castrated showed higher values for stearic and behenic acids. Shear force measurements indicated that the control group did not differ from the ractopamine group, with more tender meat coming

from the zilpaterol group. Treatment of β AA effected texture and overall quality percieved by consumer panelists. Meat from animals in the control group received the highest scores for these attributes compared to ractopamine and zilpaterol groups. The ractopamine and zilpaterol groups did not differ after sensory evaluation. Myristic and palmitic acids were found in higher proportions in the control and Ractopamine groups; while heptadecanoic acid, linoleic acid, arachidonic acid ,C20:3 N6C8C11C14, omega 6, andtotal AGP tended to be higher in the Zilpaterol group. There were no differences observed in total lipid values for β AA administration.

KEYWORDS : Fatty acids , total lipids , sensory analysis , tenderness .

Lista de tabelas

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Composição percentual da dieta utilizada (na matéria seca).....	75
Tabela 2 - Médias, desvio padrão (DP), mínimo (Mín) e máximo (Máx), para as características de carcaça.....	84
Tabela 3 - Médias, erro padrão da média (EPM) e probabilidades das características de qualidade de carne do m. <i>Longissimus dorsi</i> de bovino Nelore, de acordo com a condição sexual (CS) e o tempo de maturação.....	86
Tabela 4 - Médias, erro padrão da média (EPM) e probabilidades das características de qualidade de carne em função da suplementação com agonistas beta-adrenérgicos (β AA) e do tempo de maturação.....	90
Tabela 5 - Médias, erro padrão da média (EPM) e probabilidades da análise sensorial da carne do m. <i>Longissimus dorsi</i> em função da condição sexual (CS) e da suplementação com agonistas beta-adrenérgicos (β AA).....	92
Tabela 6 - Perfil dos principais ácidos graxos do m. <i>Longissimus dorsi</i> em função da condição sexual (CS) e da suplementação com agonistas beta-adrenérgicos (β AA).....	96
Tabela 7 - Relações do perfil de ácidos graxos do m. <i>Longissimus dorsi</i> em função da condição sexual (CS) e da suplementação com agonista beta-adrenérgicos (β AA).....	98

Sumário

Capítulo 2	66
Efeito da imunocastração e de agonistas beta-adrenérgicos sobre características físicas, químicas e sensoriais da carne de bovinos Nelore confinados	66
RESUMO	67
ABSTRACT	69
1. INTRODUÇÃO	73
2. MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1. Animais e alimentação	74
2.2. Imunocastração e fornecimento dos agonistas beta-adrenérgicos	76
2.3. Abate	77
2.4. Análises instrumentais	78
2.5. Perfil de ácidos graxos	79
2.6. Lipídios totais	81
2.7. Análise Sensorial	81
2.8. Análises estatísticas	83
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	83
3.1. Características qualitativas da carne	84
3.1.1. Condição sexual	84
3.1.2. Agonistas beta-adrenérgicos	88
3.2. Análise sensorial	91
3.3. Perfil de ácidos graxos	95
4. CONCLUSÕES	100
5. REFERÊNCIAS	101

1. INTRODUÇÃO

Os β AA tem sido largamente utilizados por outros países pela indústria da carne como objetivo de aumentar a produção de carne magra. Embora o mecanismo exato pelo qual os β AA atuam não seja completamente compreendido, sabe-se que eles modificam a bioquímica dos processos de crescimento dos tecidos, diminuindo a degradação proteica (WHEELER ; KOOHMARAIE, 1992) e aumentando a síntese de proteína (HELFERICH et al., 1990; SMITH et al., 1989). Eles também atuam aumentando a lipólise pelo aumento da ação das lipases, e diminuem a lipogênese ou ambas (DUNSHEA, 1993; LIU ; MILLS, 1989; MERSMANN, 1998) .

Por outro lado, o fornecimento de β AA pode resultar em uma redução da qualidade da carne devido a menor deposição de gordura. Isso pode ser de particular interesse em animais que produzem carne magra, aonde o uso dos β AA pode ter um impacto negativo.

Uma alternativa para aumentar a gordura na carcaça é através da castração dos animais. Sabe-se que os animais castrados tem uma maior deposição de gordura quando comparados aos não-castrados. No entanto, essa prática tem apresentado uma certa rejeição por reduzir o ganho de peso (15 a 18%) dos animais castrados em comparação aos não-castrados.

No entanto, a técnica de imunocastração através de vacinas de GnRH, tem demonstrado ser uma alternativa para aumentar a deposição de gordura (DUNSHEA et al., 2005), com um pequeno impacto no crescimento muscular e desempenho dos animais. Essa prática pode ser utilizada em combinação com outras tecnologias, tais como os β AA, resultando em uma interação positiva

tanto para o desempenho do animal como para a qualidade da carne, devido ao aumento da deposição de gordura na carcaça.

Vários estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos dos β AA em bovinos, no entanto, a maioria desses estudos foram realizados em diferentes condições normalmente encontradas no Brasil, principalmente, em relação a raça Nelore (*Bos indicus*), cujo os trabalhos são escassos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da imunocastração e do fornecimento de β AA (Zilpaterol e Ractopamina) nas características de carcaça e qualidade de carne em bovinos Nelore confinados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – FZEA/USP, em Pirassununga/SP.

Este projeto foi avaliado e autorizado pelo comitê de ética animal da Universidade de São Paulo, com protocolo nº 13.1.541.74.0 em 16 de maio de 2013 e também pelo comitê de ética humano na plataforma Brasil, com o parecer nº 456.305 em 13 de novembro de 2013.

2.1. Animais e alimentação

Foram utilizados noventa e seis bovinos Nelore machos, com peso médio inicial no início do experimento de 409 ± 50 kg e idade média de 20 meses, recriados em pastagem sem suplementação.

Metade dos animais ($n=48$) dentro de cada condição sexual (24 imunocastrados e 24 não-castrados), foi distribuída, de acordo com o peso inicial (bloco), em quatro baias (12 animais por baia), sendo dois piquetes com

animais imunocastrados e dois com animais não-castrados. Os piquetes eram equipados com portões eletrônicos (American Calan Inc., Northwood, NH, USA) que permitiram o controle individual da alimentação. A outra metade dos animais (n=48) foi distribuída em baias individuais. Ambas as instalações continham cocho coberto, piso de concreto e bebedouros automáticos. Posteriormente, os animais foram submetidos a um período de adaptação às dietas e instalações por um período de 21 dias.

A alimentação foi realizada diariamente com uma dieta contendo 76% de concentrado e 24% de volumoso (Tabela 1) formulada utilizando o programa RLM 3.2 (Ração de Lucro Máximo). A cada dois dias as sobras eram retiradas, pesadas e amostradas para determinação da matéria seca. O ajuste da oferta de alimento foi realizado diariamente com base na avaliação das sobras do dia anterior, com uma oferta de matéria seca 10% superior ao consumo observado para assegurar que não haja falta ou excesso de alimento no cocho.

Tabela 1 - Composição percentual da dieta utilizada (na matéria seca).

INGREDIENTES	% da matéria seca
Silagem de milho	24,18
Milho Grão Seco	31,82
Farelo de Soja 45%	12,17
Polpa cítrica peletizada	30,0
Uréia	1,22
Núcleo Mineral ¹	0,60
NUTRIENTES	
Proteína Bruta, %	16,3
Proteína Degradável no Rúmen, %	10,02
NDT, % ²	78,25

¹ NC Beef Performa (Nutron) composto/kg (cálcio 160,0 g, cobalto 21,6 mg, cobre 360,0 mg, enxofre 22,9 g, ferro 420,0 mg, fósforo 17,0 mg, iodo 21,6 mg, magnésio 14,3 g, manganês 720,0 mg, monensina 714,3 mg, NNP 395,0 g, Selênio 6,0 mg, sódio 57,0 g, vitamina A 71.500,0 UI, vitamina D3 8.940,0 UI, vitamina E 208,0 UI, zinco 1.715,0 mg)

² - Estimado através de fórmula de Weiss et al. (1992).

2.2. Imunocastração e fornecimento dos agonistas beta-adrenérgicos

Nove dias antes da chegada ao confinamento, os animais foram identificados e pesados individualmente e separados em dois blocos, de acordo com o peso. Metade dos animais de cada bloco recebeu uma dose de vacina para imunocastração (Bopriva[®], Zoetis Indústria de Produtos Veterinária LTDA, São Paulo, SP, Brasil), que foi repetida após 30 dias da primeira aplicação, enquanto a outra metade dos animais não recebeu a vacina.

Em seguida, os animais foram transferidos para as instalações de confinamento do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, em Pirassununga/SP/Brasil

Após 70 dias de confinamento os animais foram divididos em três grupos, dentro de bloco (peso inicial) e condição sexual (imunocastrado ou não) e foram alimentados com uma das seguintes dietas: CON – dieta padrão utilizada na fase anterior, sem a adição de β AA; ZIL – dieta padrão acrescida de 80 mg/dia Cloridrato de Zilpaterol (MSD Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil); RAC – dieta padrão acrescida de 300 mg/dia Cloridrato de Ractopamina (Elanco Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil).

Os β AA foram incorporados à mistura mineral, de modo a conter as concentrações supracitadas. Após 30 dias de recebimento dos tratamentos, os animais foram pesados no mesmo dia, sendo que os animais do tratamento ZIL receberam a dieta controle por mais dois dias, enquanto que os animais do tratamento RAC, continuaram recebendo o produto até o momento do

embarque para o abate, acrescido de mais um dia entre transporte e o abate dos animais, totalizando 3 dias de carência exigido pela legislação para o zilpaterol.

2.3. Abate

Ao final do período experimental, os animais foram transportados por aproximadamente 200 km onde foram abatidos em frigorífico comercial (Frigorífico Dom Glutão; Ibitinga/SP).

Os animais foram divididos em dois grupos para o abate (48 animais) em cada dia, respeitando a diferença de tempo do abate do primeiro bloco para o segundo de 7 dias, sendo em duas semanas consecutivas. Dessa forma, as datas foram devidamente ajustadas de maneira a fixar o período de oferecimento dos tratamentos (30 dias), o tempo após a aplicação da vacina de imunocastração (93 dias após a aplicação da 2ª dose) e o tempo de carência (3 dias)

No dia anterior ao abate do bloco pré-estabelecido, os mesmos foram submetidos a jejum de sólidos por aproximadamente 16h.

O abate foi realizado de acordo com procedimentos humanitários, conforme exigido pela legislação brasileira. Os animais foram insensibilizados através do atordoamento com pistola pneumática penetrante e imediatamente após foi realizada a sangria pela seção dos grandes vasos do pescoço.

Em seguida realizou-se a esfolagem, durante esta etapa as carcaças foram identificadas e foi coletada uma amostra do músculo *Longissimus dorsi* para posterior análise de expressão gênica das enzimas calpaína e calpastatina.

Essas amostras foram imediatamente identificadas, embaladas em papel alumínio e armazenadas em nitrogênio líquido para posterior análise.

Em seguida as meias-carcaças foram pesadas individualmente e enviadas para a câmara fria. O pH e a temperatura das carcaças foram avaliadas após 1h e 24h de resfriamento, no músculo *Longissimus dorsi* na região entre a 12ª e a 13ª costelas.

Após 48h de resfriamento, a meia carcaça direita de cada animal foi dividida na região da 12ª e a 13ª costelas, para a coleta de amostras do músculo *Longissimus dorsi*. Foram retiradas seis amostras (2,5 cm de espessura cada) a partir da 12ª costela, no sentido caudocranial, para realização de análises de qualidade instrumental (4), sensorial (1), ácidos graxos e perfil morfométrico (1).

2.4. Análises instrumentais

A partir da coleta das amostras, as mesmas foram identificadas individualmente e embaladas a vácuo e em seguida maturadas (0-4 °C) por 0, 7, 14 ou 21 dias. Após cada período de maturação previamente estabelecido, as amostras foram retiradas das embalagens para pesagem do exsudato e da amostra.

Em seguida as amostras foram deixadas em exposição ao ambiente por 20 minutos para determinação da cor objetiva utilizando o sistema CIELab (CIE, 1986), onde L* é o croma associado à luminosidade (L*=0 - preto, 100 - branco), a* é o croma que varia do verde (-) ao vermelho (+), e b*, que varia do azul (-) ao amarelo (+). A medida da cor foi realizada em três pontos distintos da amostra, utilizando um espectrofotômetro modelo CM2500d (Konica Minolta

Brasil, São Paulo, Brasil), com iluminante padrão D65, ângulo de observação de 10° e abertura do obturador de 30mm. Os valores de cor foram considerados como a média das três leituras.

Após foi inserido um termômetro no centro geométrico de cada amostra e as mesmas foram colocadas em forno elétrico industrial (Modelo F130/L – Fornos Elétricos Flecha de Ouro Ind. e Com. Ltda, São Paulo, Brasil) a 170°C até atingirem temperatura interna de 40°C, quando foram viradas e permaneceram até atingir a temperatura interna de 71°C, conforme recomendado pela American Meat Science Association (AMSA, 1995).

As amostras permaneceram em temperatura ambiente (22°C) até resfriarem, foram novamente pesadas, envolvidas em filme plástico e colocadas em geladeira (4-6°C) até o dia seguinte, quando foram retirados 6 a 8 cilindros (1,27 cm de diâmetro) de cada amostra, no sentido paralelo ao das fibras. Em seguida os cilindros foram cisalhados utilizando um equipamento Warner-Bratzler shear force para determinação da força de cisalhamento. A força de cisalhamento de cada amostra foi considerada como a média das 6 a 8 repetições.

2.5. Perfil de ácidos graxos

As amostras do músculo Longissimus (aproximadamente 100 g) foram utilizadas para a análise do perfil de ácidos graxos. Foi utilizada uma sub amostra de aproximadamente 2,8 g do centro do músculo Longissimus, homogeneizada e adicionada em um tubo Falcon de 50 mL. A extração foi realizada pelo método de Folch et al. (1957). Os lipídeos foram extraídos por

homogeneização da amostra com uma solução de clorofórmio e metanol 2:1 em homogenizador Ultra Turrax Marconi®. Em seguida, os lipídeos foram isolados após a adição de solução de NaCl a 1,5%.

A gordura separada foi metilada e os ésteres metílicos foram formados de acordo com Kramer et al. (1997). Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (CG-2010 Plus - Shimadzu, auto injetor AOC 20i), usando coluna capilar SP-2560 (100 m x 0,25 mm de diâmetro com 0,02 mm de espessura, Supelco, Bellefonte, PA). A temperatura inicial foi de 45°C, com aquecimento progressivo até chegar a 175°C, mantendo-se por 27 minutos. Em seguida, um novo aumento de 4°C/minuto foi iniciado até 215°C, mantendo-se durante 35 minutos.

Foi utilizado Hidrogênio (H₂) como gás de arraste com fluxo de 40 cm³/s. Os ácidos graxos foram identificados de acordo com o tempo de retenção dos ésteres de metil das amostras com os padrões 463 Nu-Chex®, ácido vacênico C18:1 trans-11 (V038-1G, Sigma®), C18:2 trans-10 cis-12 (UC-61M 100mg), CLA e C18:2 cis-9, trans-11 (UC-60M 100mg), (Sigma®) e ácido tricosanóico (Sigma®). Os ácidos graxos foram quantificados por normalização da área dos picos dos ésteres de metil, com uso do Software GS solution 2.42. Os ácidos graxos foram expressos em porcentagem do total de metil éster quantificado. As análises foram realizadas no Laboratório de Ciência da Carne na FMVZ/USP, Pirassununga, São Paulo, Brazil.

2.6. Lipídios totais

Foram realizadas as análises de lipídios totais de 94 animais. Sendo que as amostras utilizadas foram dos bifes assados, que sobraram, após a retirada dos cilindros para a análise de força de cisalhamento. Estas amostras foram totalmente trituradas em um processador (Modelo Mixer Walita RI1364 com microprocessador – Philips do Brasil LTDA, Divisão Walita – Varginha, Minas Gerais). Após foram pesados 3 g de amostra e colocados em um erlenmeyer, e adicionados os reagentes de acordo com protocolo de extração pela metodologia (BLIGH ; DYER,1959, com modificações citadas por REZENDE, 2009).

2.7. Análise Sensorial

As análises sensoriais foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA – USP), em cabines individuais, com utilização de iluminação branca para avaliação da suculência, textura, aroma, sabor e qualidade global.

Para realizar essa avaliação foram utilizadas 96 amostras do músculo *Longissimus dorsi* mantidas em câmara fria (0-2 °C) por 96h após o abate.

Os bifes foram retirados das embalagens e colocadas em bandejas de plástico devidamente identificadas, com uma solução de salmoura a 10% por 15 minutos, fazendo com que os bifes ficassem imersos na salmoura para garantir que a salga fosse homogênea.

Em seguida as amostras foram transferidas para uma bandeja de alumínio e levadas ao forno a 180°C, onde foram assadas utilizando o mesmo procedimento adotado para as amostras utilizadas na análise instrumental. Após a retirada dos bifes do forno, eles foram cortados em amostras em forma de paralelepípedos de 2,5 x 1,5 x 1,5 cm e mantidos nas bandejas junto com o caldo da carne em estufa (60 °C) até o momento da degustação.

Foi aplicado o teste sensorial de aceitação do consumidor, utilizando-se escala hedônica estruturada de nove pontos, variando de “desgostei muitíssimo” (nota 1) a “gostei muitíssimo” (nota 9) (Figura 1). As amostras (n=6) foram entregues aos provadores (n=100) de forma monádica em copos plásticos brancos, codificados com números de três dígitos, acompanhados de um copo de água e um biscoito tipo água e sal, para ser utilizado pelo provador entre as amostras para limpar o paladar (MEILGAARD et al., 1987).

Figura 1- Ficha de avaliação sensorial.

Nome: _____		Idade: _____		Provador nº: _____	
Você está recebendo uma amostra de CARNE BOVINA . Por favor, avalie o produto e marque na escala o quanto você gostou ou desgostou das seguintes características:					
Número da amostra _____		Nota			
ESCALA 1-Detestei 2-Desgostei muito 3-Desgostei moderadamente 4-Desgostei ligeiramente 5-Nem gostei/nem desgostei 6-Gostei ligeiramente 7-Gostei moderadamente 8-Gostei muito 9-Adorei	AROMA		Comentários:		
	TEXTURA		Comentários:		
	SUCULÊNCIA		Comentários:		
	SABOR		Comentários:		
	QUALIDADE GLOBAL		Comentários:		

2.8. Análises estatísticas

As características de qualidade da carne avaliadas em diferentes tempos de maturação, foram analisadas como medidas repetidas no tempo, considerando um arranjo fatorial 2 x 3 x 4 (condição sexual x tratamentos x tempos de maturação) utilizando o procedimento *Mixed* do *Software* SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Quando foi verificado efeito significativo dos fatores principais ou da interação, as médias foram comparadas pelo teste T de Student.

Foram considerados como efeitos fixos o bloco (peso inicial) e as instalações (bacias individuais ou coletivas), bem como os efeitos da condição sexual, tratamento e a interação condição sexual x tratamento. O animal foi considerado como unidade experimental.

Para as características da análise sensorial, além dos efeitos descritos no modelo anterior, também foi incluído o provador como efeito aleatório.

As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$ e tendência quando o $0,05 < P < 0,10$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados de desempenho e características de carcaça foram apresentados na dissertação Antonelo (2015), e uma tabela descritiva estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Médias, desvio padrão (DP), mínimo (Mín) e máximo (Máx), para as características de carcaça.

Variáveis	<i>Média</i>	DP	Mínimo	Máximo
Peso inicial, kg	409	50,0	300	538
Peso aos 70 dias, kg	502	52,2	394	632
Peso de abate, kg	537	55,8	388	668
Área de olho de lombo, cm ²	82,2	0,74	64,7	99,4
Espessura de gordura subcutânea, mm	4,8	0,22	0,0	10,0
pH 1h	6,7	0,35	6,0	7,8
pH 24h	5,6	0,34	4,8	6,6

Não houve interação entre a condição sexual e os β AA para a maioria das características de carne avaliadas, por isso os resultados estão apresentados separadamente.

3.1. Características qualitativas da carne

3.1.1. Condição sexual

Em relação as análises de qualidade de carne, a força de cisalhamento e perdas por cocção não foram influenciadas pela condição sexual (Tabela 3).

Foi observada uma interação entre a condição sexual e o tempo de maturação para a força de cisalhamento ($P=0,0053$), sendo que os animais não-castrados tiveram uma carne mais macia (menor força de cisalhamento) do que os animais imunocastrados no tempo zero ($P=0,0131$; Tabela 3). No entanto, após 7, 14 ou 21 dias de maturação, não houve diferença entre os tratamentos.

O resultado para força de cisalhamento, não era o esperado, pois esperava-se que os animais não castrados, sob ação da testosterona, fossem apresentar uma carne menos macia que os animais imunocastrados. Segundo

Andreo et al. (2013), a testosterona está relacionada ao aumento da atividade da calpastatina sobre a calpaína, reduzindo a proteólise muscular.

Outro fator considerado, é que os animais não castrados, supostamente possam apresentar menor quantidade de gordura subcutânea servindo como isolante térmico, possibilitando um maior encurtamento pelo frio da carcaça, tornando a carne mais dura, o que de fato ocorreu, segundo Antonelo (2015), os animais não castrados apresentaram menor espessura de gordura que os animais imunocastrados (4,7 vs 5,0 mm; $P=0,0404$), no entanto, pode ser que essa pequena diferença tenha sido suficiente para a proteção da carcaça contra o frio.

No entanto, a condição sexual não teve efeito sobre a força de cisalhamento ($P=0,3012$), contudo, as médias estão acima dos valores considerados uma carne macia, que é de aproximadamente 4,5 kg (ASTM, 2011). Segundo Miguel et al. (2013) e Cook et al. (2000), não observaram efeito da castração sobre a maciez da carne de bovinos.

Tabela 3 - Médias, erro padrão da média (EPM) e probabilidades das características de qualidade de carne do m. *Longissimus dorsi* de bovino Nelore, de acordo com a condição sexual (CS) e o tempo de maturação.

Características	CS ¹	Tempos de maturação				EPM	Pr>F		
		0	7	14	21		CS	Tempo	CS x Tempo
Força de cisalhamento, kg	IM	6,3	4,5	2,9	2,9	0,23	0,3012	<0,0001	0,0053
	NC	5,2	4,2	3,4	3,1				
Perda por cocção, %	IM	20,5	23,3	23,2	22,2	1,22	0,8876	0,3727	0,5742
	NC	20,3	22,6	21,8	23,9				
Cor L*	IM	35,9	36,4	36,5	36,9	1,13	<0,0001	0,3909	0,4385
	NC	33,9	32,5	32,9	33,9				
Cor a*	IM	14,2	14,6	14,8	15,8	0,30	0,0017	<0,0001	0,2023
	NC	13,7	13,4	14,1	14,4				
Cor b*	IM	8,1	9,9	10,3	11,8	0,42	<0,0001	<0,0001	0,1383
	NC	6,2	7,8	8,9	9,2				

¹ IM – Imunocastrado; NC- Não castrado

No entanto, segundo Andreo et al. (2013), que compararam bovinos Nelore imunocastrados com bovinos não-castrados, encontraram menor força de cisalhamento em animais imunocastrados (6,42 vs 7,95 kg, respectivamente), concluindo que os animais imunocastrados apresentam carne mais macia que os não-castrados, relacionando isso com a maior atividade das calpaínas nos imunocastrados, aumento da proteólise muscular (CULLER et al., 1978).

Para a característica perda por cocção, não foi observado o efeito da castração, mantendo-se similares aos animais imunocastrados e os não-castrados.

As características cor L^* (35,9 vs 33,9; $P < 0,0001$), a^* (14,2 vs 13,7; $P = 0,0017$) e b^* (8,1 vs 6,2; $P < 0,0001$) os valores foram superiores nos animais imunocastrados em relação aos não-castrados (Tabela 3).

A maior intensidade da cor L^* para os animais imunocastrados pode estar relacionado ao maior teor de gordura, produzindo maior refletância que os animais não-castrados, os quais possuem uma carne mais escura, corroborando com esses dados, Rodrigues et al. (2004) e Miguel et al. (2013), ao avaliarem a cor da carne de bovinos imunocastrados, observaram que a cor L^* , a^* e b^* foram maiores do que nos animais não-castrados.

De acordo com Ashmore et al. (1973) e Page et al. (2001), menores valores da cor L^* em animais não-castrados, pode estar relacionado ao maior estresse pré abate, aumentando o pH muscular, que por volta de 6.0 promove o aumento do consumo de oxigênio mitocondrial muscular, reduzindo assim a oximioglobina, apresentando uma carne mais escura.

Segundo Andreo et al. (2013), também foi observado maiores valores da cor a^* (12,55 vs 15,02; $P=0,02$; intensidade de vermelho) e cor b^* (8,20 vs 9,58; $P=0,04$; intensidade do amarelo) em bovinos imunocastrados em relação aos não castrados, mas não houve diferença para a cor L^* (luminosidade). Diferindo dos autores Amatayakul-Chantler et al. (2012), que não observaram diferenças para a cor da carne L^* , a^* e b^* de bovinos imunocastrados e não-castrados.

Considerando a cor como um dos atributos decisivos no momento da compra da carne pelo consumidor, a carne dos animais imunocastrados pode apresentar uma vantagem no poder de compra em relação a de animais não-castrados pois possuem as maiores intensidades da cor L^* , a^* e b^* , apresentando uma tonalidade mais avermelhada, sendo, talvez mais atrativa ao consumidor.

3.1.2. Agonistas beta-adrenérgicos

Ao observar o efeito dos β AA nas análises de qualidade de carne, as características força de cisalhamento e cor a^* foram significativas, já perda por cocção, cor b e cor L^* não foram influenciados pelos tratamentos (Tabela 4).

A relação calpaína:calpastatina é responsável pela a maior parte do processo de proteólise no postmortem e no desenvolvimento da maciez da carne. Neste estudo, não foi observado interação entre condição sexual e a suplementação com β AA para força de cisalhamento.

No entanto ao se avaliar apenas o efeito dos β AA sobre a força de cisalhamento, foi observado que os animais suplementados com ZIL tiveram

maior força de cisalhamento (mais dura; $P=0,0214$) quando comparados com os grupos RAC e CON. Isso sugere a influência de outros fatores na maciez da carne, que não seja a ação da calpastatina, justificando por todas as médias estarem acima dos parâmetros de uma carne considerada macia, que é até 4,5 kg (ASTM, 2011).

Garmyn e Miller (2014) observaram que animais suplementados com Zilpaterol ou Ractopamina apresentam maior força de cisalhamento em comparação com o controle (sem suplementação), ou seja, uma carne mais dura, sendo que os dois β AA não diferiram entre si estatisticamente. Já Garmyn et al. (2014) classificaram que os animais tratados com Zilpaterol apresentaram uma carne menos macia (alta força de cisalhamento), enquanto os animais que receberam Ractopamina ficaram em um nível intermediário e o controle teve uma carne mais macia.

Segundo Weber et al. (2013), bifes de bovinos suplementados com Zilpaterol tiver maiores valores para força de cisalhamento do que os bifes de bovinos suplementados com Ractopamina (5,5 vs 4,1 kg; respectivamente).

Para a característica de perda por cocção, não foi observado efeito dos β AA, ou seja, o grupo controle e os β AA se mantiveram iguais ($P=0,5201$). Esses resultados diferem do estudo de Garmyn et al. (2014), na qual as carnes de animais suplementados com β AA apresentaram maior perda por cocção em relação aos animais não suplementados.

Tabela 4 - Médias, erro padrão da média (EPM) e probabilidades das características de qualidade de carne em função da suplementação com agonistas beta-adrenérgicos (β AA) e do tempo de maturação.

Características	β AA ¹	Tempo de maturação, dias				EPM	Pr>F		
		0	7	14	21		β AA	Tempo	β AA x Tempo
Força de cisalhamento, kg	CON	5,6 ^b	3,7	3,1	2,9	0,28	0,0214	<0,0001	0,2051
	RAC	5,5 ^b	4,7	3,1	2,6				
	ZIL	6,1 ^a	4,7	3,4	3,5				
Perda por cocção, %	CON	20,4	22,1	21,3	22,3	1,49	0,5201	0,3727	0,7753
	RAC	21,5	22,7	22,9	24,7				
	ZIL	19,3	24,1	23,2	22,2				
Cor L*	CON	35,0	34,1	34,5	36,6	1,23	0,8123	0,3909	0,3832
	RAC	34,6	35,4	34,9	35,2				
	ZIL	35,0	34,0	34,8	34,5				
Cor a*	CON	14,2 ^a	14,4	14,6	16,1	0,36	0,0050	<0,0001	0,1900
	RAC	14,2 ^a	14,2	14,9	15,2				
	ZIL	13,4 ^b	13,5	13,8	14,0				
Cor b*	CON	7,1	9,4	9,9	11,7 ^a	0,48	0,0859	<0,0001	0,0328
	RAC	7,1	8,7	9,9	10,2 ^b				
	ZIL	7,3	8,5	9,0	9,5 ^b				

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste T (P<0,05).

¹CON- Controle; RAC- Ractopamina; ZIL- Zilpaterol.

Para a característica cor, a intensidade do a^* sofreu efeito dos β AA, sendo que a carne dos animais tratados com Zilpaterol apresentou menor intensidade (13,4) diferindo da cor da carne dos animais tratados com Ractopamina (14,2) e grupo controle (14,2; $P=0,0050$), que não diferiram entre si. Assim, sugere-se que a carne dos animais suplementados com Zilpaterol é mais escura, ou seja, com menor intensidade do vermelho (Tabela 4).

Foi observada uma interação significativa entre o tempo de maturação e os tratamentos apenas para a característica b^* da cor ($P=0,0328$; Tabela 4).

Nos tempos 0, 7 e 14 dias de maturação, os tratamentos não diferiram entre si, no entanto aos 21 dias, a carne dos animais do grupo controle apresentaram maior intensidade da cor b^* em relação aos tratamentos Ractopamina e Zilpaterol, que permaneceram iguais entre si (Tabela 4). Isso pode estar relacionado a maior atividade das calpaínas em animais do grupo controle, sendo responsável pela proteólise muscular, que aumenta conforme os dias do tempo de maturação, reduzindo o oxigênio disponível e então convertendo oximioglobina em metamioglobina, que apresenta uma coloração mais amarelada.

3.2. Análise sensorial

Com relação a análise sensorial, foi observado uma tendência de maior escore de qualidade global ($P=0,0556$) e textura ($P=0,0949$) para os animais não castrados, em comparação aos imunocastrados (Tabela 5). Esses resultados estão em consonância com àqueles observados para força de cisalhamento, onde maior maciez foi observada na carne de animais não-castrados.

Tabela 5 - Médias, erro padrão da média (EPM) e probabilidades da análise sensorial da carne do *m. Longissimus dorsi* em função da condição sexual (CS) e da suplementação com agonistas beta-adrenérgicos (β AA).

Características	Condição sexual ¹		β AA ²			EPM	P-valor		
	IM	NC	CON	RAC	ZIL		CS	β AA	CS x β AA
Aroma	6,0	6,0	6,1	6,0	6,0	0,08	0,6434	0,6920	0,8934
Textura	5,6	5,8	6,1 ^a	5,6 ^b	5,6 ^b	0,12	0,0949	0,0175	0,1050
Suculência	6,0	6,1	6,2	5,9	6,0	0,07	0,3248	0,4825	0,3248
Sabor	6,3	6,3	6,5	6,2	6,3	0,07	0,9726	0,2073	0,4090
Qualidade Global	6,1	6,3	6,4 ^a	6,0 ^b	6,1 ^b	0,07	0,0556	0,0401	0,5505

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste T ($P < 0,05$).

¹ IM- Imunocastrados; NC – Não castrados

² CON- Controle; RAC- Ractopamina; ZIL- Zilpaterol.

Assim, pode-se sugerir uma tendência do consumidor a preferir a carne dos animais não-castrados, neste caso, talvez um painel com equipe treinada fosse mais acurado para essa característica. Já os outros atributos não apresentaram diferenças.

Por outro lado, Fernandes et al. (2008), ao compararem touros, bovinos castrados e fêmeas da raça Canchin, na análise sensorial com consumidores, observaram melhores notas de textura em animais castrados e fêmeas em comparação com touros, justificando que os animais castrados apresentaram maior espessura de gordura subcutânea, assim protegendo a carcaça de baixas temperaturas servindo como isolante térmico, minimizando o encurtamento das fibras musculares pelo frio.

Analisando-se o efeito dos β AA sobre as características sensoriais da carne, observou-se que houve efeitos dos mesmos sobre a textura ($P=0,0175$) e qualidade global ($P=0,0401$), sem efeito sobre as demais características avaliadas. Com relação à textura e a qualidade global, maiores escores foram observados para os tratamentos sem β AA, sendo que o ZIL e a RAC não diferiram entre si para nenhuma das características avaliadas. Dessa forma, pode-se concluir que a carne dos animais do grupo controle foram preferidas pelos consumidores em relação a carne dos animais tratados com β AA.

Estes resultados vão de acordo com as análises de força de cisalhamento, cujo os animais do grupo ZIL apresentaram maiores valores em comparação aos do grupo CON e RAC, sendo, assim uma carne menos macia e menos aceita pelos consumidores. No entanto, na análise de força de cisalhamento não foi observado diferença entre os grupos CON e RAC, diferente do observado no

teste de aceitação, indicando que os consumidores são mais sensíveis para identificação da maciez da carne.

No entanto, Platter et al. (2008), descreve que mesmo com o aumento da força de cisalhamento em bifes de bovinos suplementados com Ractopamina, o impacto na aceitabilidade do consumidor foi mínimo. Discordando com os resultados obtidos neste trabalho, que observou que pequenas diferenças na força de cisalhamento foram identificadas na análise sensorial, afetando a aceitabilidade do consumidor, e isto está diretamente relacionado a aceitação global da carne, sendo que as notas foram semelhantes para o atributo textura e aceitação global, indicando que um atributo está vinculado ao outro.

Como suposição, os animais do grupo controle podem ter apresentado melhores notas por dois motivos: 1- maior espessura de gordura subcutânea do que os tratados com β AA, já que é esperado menor deposição de gordura nesses animais devido a lipólise causada pelos promotores de crescimento e 2- pela menor atividade da calpastatina nesses animais, assim aumentando a proteólise causada pela calpaína.

Segundo Garmyn et al. (2014), ao avaliar novilhos suplementados com β AA (Ractopamina e Zilpaterol) através da análise sensorial com consumidores, observaram menores valores para os atributos textura e qualidade global em carnes de animais suplementados com Zilpaterol em comparação aos grupos controle e Ractopamina. Por outro lado, Hilton et al. (2009) ao avaliar a carne de bovinos suplementados com Zilpaterol, não observou diferenças para os atributos sabor, suculência e qualidade global na análise de aceitação pelo consumidor.

3.3. Perfil de ácidos graxos

A condição sexual não influenciou os totais de ácidos graxos saturados e insaturados, porém os animais imunocastrados tiveram maior percentagem de ácidos graxos monoinsaturados ($P=0.0022$), enquanto os não castrados tenderam ($P=0,0763$) a ter maior percentagem de poliinsaturados (Tabela 6).

As maiores concentrações de ácidos graxos moninsaturados nos animais imunocastrados ocorreram basicamente em função das maiores concentrações de C16:1 ($P=0,0018$) e C18:1 ($P=0,0021$)

Os animais não-castrados apresentaram maiores concentrações dos ácidos C18:0 ($P=0,0057$) e o C22:0 ($P=0,0190$) em comparação ao imunocastrados. Por outro lado, os animais imunocastrados apresentaram maiores valores para o ácido C18:1 C9 ($P=0,0021$), C16:1C9 ($P=0,0018$) que os não-castrados. (Tabela 6)

Resultados similares foram observados por Padre et al. (2006), que ao avaliarem o perfil de ácidos graxos da carne de bovinos, observaram que animais castrados apresentaram maiores valores para C16:0 e C18:1, enquanto os bovinos não-castrados apresentaram maiores valores para C18:0. Prado et al., (2003), também observaram maiores proporções dos ácidos C16:0 (23,24%), C18:0 (15,76%) e C18:1(39,59%), ao avaliarem o músculo *Longissimus* de bovinos Nelore castrados. Por outro lado, Ruiz et al. (2005) não encontraram diferenças entre bovinos castrado e não-castrados para os ácidos C16:0 (26,58% vs 25,13%, respectivamente) e C18:1 (34,04% vs 35,17%, respectivamente).

Tabela 6 - Perfil dos principais ácidos graxos do m. *Longissimus dorsi* em função da condição sexual (CS) e da suplementação com agonistas beta-adrenérgicos (β AA)

Ácidos graxos (%)	Condição sexual ¹		β AA ²				Pr>F		
	IM	NC	CON	RAC	ZIL	EPM	CS	β AA	CS x β AA
Saturado (AGS)*	39,4	40,2	40,9	39,8	38,7	0,65	0,3607	0,1128	0,3203
C14:0 (mirístico)	2,4	2,3	2,5 ^a	2,4 ^a	2,2 ^b	0,09	0,1672	0,0170	0,6393
C15:0 (pentadenóico)	0,3	0,42	0,3	0,4	0,3	0,07	0,1199	0,9775	0,9958
C16:0 (palmitico)	23,1	22,6	23,7 ^a	23,1 ^a	21,9 ^b	0,38	0,2510	0,0095	0,6481
C17:0 (heptadecanoico)	0,8	0,8	0,8	0,9	0,8	0,04	0,8050	0,6581	0,8474
C18:0 (esteárico)	12,6	13,8	13,1	13,0	13,4	0,35	0,0057	0,7399	0,1262
C20:0 (araquídico)	<0,01	<0,01	0,1	<0,01	<0,01	0,08	0,3936	0,4884	0,5269
C22:0 (Behenico)	<0,01	0,1	<0,01	<0,01	0,1	0,02	0,0190	0,0802	0,9588
Monoinsaturado (AGM)*	46,0	43,0	44,8	45,2	43,5	0,75	0,0022	0,3024	0,4438
C14:1 c9 (miristoleico)	0,7	0,6	0,7	0,7	0,5	0,05	0,0713	0,1203	0,6657
C16:1 c9 (palmitoleico)	3,0	2,6	2,9	2,8	2,6	0,08	0,0018	0,1311	0,3450
C18:1 c9 (oleico)	36,1	33,3	35,2	35,2	33,7	0,65	0,0021	0,2878	0,6097
C18:1 c11 (Vacenico)	1,6	1,5	1,6	1,5	1,5	0,03	0,0714	0,5430	0,0065
C15:1 c10 (Pentadecanoico)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,6295	0,9773	0,2670
C20:1 c11 (Eicosenóico)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	0,4399	0,3554	0,9682
C17:1 t10 (heptadecanoico)	1,8	2,2	1,7 ^b	1,9 ^b	2,4 ^a	0,16	0,1002	0,0385	0,5060
C17:1 c10	1,1	1,1	1,0	1,0	1,1	0,03	0,7952	0,0855	0,0718
Poliinsaturado (AGP)*	10,6	12,8	10,3	11,1	13,7	0,95	0,0763	0,0747	0,6983
C18:3 n3 (linolênico)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,02	0,1129	0,4187	0,5844
C18:2 n6 (linoleico)	6,7	7,8	6,7 ^b	6,5 ^b	8,5 ^a	0,50	0,1157	0,0302	0,3285
CLA c9 t11	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,02	0,4487	0,7489	0,7066
C20:4 n6 (Araquidônico)	1,9	2,2	1,8 ^b	1,8 ^b	2,6 ^a	0,24	0,2568	0,0464	0,3593
C22:3 n3 c13;16;19	<0,01	0,2	<0,01	0,2	<0,01	0,07	0,3515	0,2799	0,4765
C20:5 n3 c5;8;11;14;17	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,03	0,1909	0,3739	0,6240
C20:3 n6 c8;11;14	0,6	0,6	0,5 ^b	0,5 ^b	0,7 ^a	0,07	0,6121	0,0062	0,1800
C22:4 n6 c7;10;13;16	0,1	0,2	0,2	0,1	0,2	0,02	0,1658	0,2815	0,5930
C22:5 n3 c7;10;13;16;19	0,6	0,7	0,6	0,6	0,8	0,06	0,8126	0,0541	0,7713

<i>Insaturado (AGI)*</i>	56,7	56,0	55,3	56,5	57,3	0,60	0,3270	0,0978	0,2774
---------------------------------	------	------	------	------	------	------	--------	--------	--------

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste T ($P < 0,05$).

*Somatória de todos os ácidos graxos correspondentes a cada categoria

¹ IM- Imunocastrados; NC – Não castrados

² CON- Controle; RAC- Ractopamina; ZIL- Zilpaterol.

Em ambas as condições sexuais, cerca de 80% de todos os ácidos graxos encontrados são representados pelo ácido C18:1 C9, C16:0, C18:0 e C18:2 n6, o que corrobora com os autores Rule et al. (1995), que também observaram esse resultado ao comparar animais castrados e não-castrados.

Segundo Eichhorn et al. (1985), ao comparar o perfil de ácidos graxos de bovinos castrados e não castrados, observaram que o animais castrados apresentam maiores valores para os ácidos C14:0, C15:1 C10, C16:0, C16:1C9 e C18:1 C9 e menores valores para os ácidos C18:2 n6, C18:3 n3 e C20:4 N6 em comparação aos animais não-castrados, sendo resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho.

A condição sexual também não influenciou as relações AGI:AGS, AGP:AGS e $\omega 6:\omega 3$ (Tabela 7).

Este resultados são semelhantes aos encontrados por Padre et al. (2006), que não observaram diferenças entre animais castrados e não-castrados para o valor total de AGP e para as relações AGP:AGS e $\omega 6:\omega 3$, no entanto, o valor total de AGM foi maior nos animais castrados e o valor total de AGS foi maior nos animais não-castrados.

O isômero 18:2 C9 T1, conhecido como CLA não apresentou diferença em relação a condição sexual. Esses resultados foram diferentes dos relatados por Padre et al. (2006) que observaram maiores concentrações de CLA na carne de bovinos castrados em comparação com os não-castrados, concluindo que em

100g de carne de animais castrados ocorre o consumo de 47,99 mg de CLA, enquanto que em animais não-castrados o consumo é de 23,24 mg de CLA.

De uma forma geral, os outros ácidos não foram afetados pela condição sexual. No entanto, os lipídios totais apresentaram 0,860 mg a mais em animais imunocastrados em relação aos não-castrados (Tabela 7), o que pode ser explicado pela afirmação dos autores Prior et al. (1983) and Field (1971), que a testosterona aumenta a lipólise, através da inibição da atividade das enzimas lipogênicas. Padre et al. (2006) ao compararem o perfil de ácidos graxos da carne de bovinos ½ Nelore x ½ Aberdeen Angus não-castrados e castrados, sendo que os maiores valores para lipídios totais foram para animais castrados (3,38%) em relação aos não castrados (1,71%).

Tabela 7 - Relações do perfil de ácidos graxos do m. Longissimus dorsi em função da condição sexual (CS) e da suplementação com agonista beta-adrenérgicos (βAA).

Ácidos graxos	Condição sexual ¹			βAA ²			P-valor		
	IM	NC	CON	RAC	ZIL	EPM	CS	βAA	CS X βAA
AGI:AGS ³	1,455	1,425	1,369	1,450	1,502	0,03	0,5394	0,0845	0,2898
AGP:AGS ⁴	0,276	0,340	0,261	0,293	0,370	0,03	0,1163	0,0808	0,5841
ω-6 ^a	9,346	11,087	9,187 ^b	9,373 ^b	12,089 ^a	0,80	0,0931	0,0393	0,4794
ω-3 ^b	1,231	1,700	1,134	1,713	1,549	0,26	0,1567	0,3341	0,6099
ω6:ω3	8,173	8,025	8,376	7,267	8,653	0,55	0,8384	0,2621	0,3114
Lipídios totais	3,205	2,338	2,988	2,814	2,512	0,48	0,0023	0,3652	0,3088

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste T (P<0,005).

^aω-6 (C18:2n6t+ C18:2n6c + C18:3n6 + C20:2n6 c11;c14 + C20:3n6 c8;11;14 + C20:4n6 + C22:4n6 c7;10;13;16)

^bω-3 (C18:3n3 + C20:5n3 c5;8;11;14;17 + C22:3n3 c13;16;19 + C22:5n3 c7;10;13;16;19+ C22:6n3 c4;7;10;13;16;19)

¹ IM- Imunocastrados; NC – Não castrados

² CON- Controle; RAC- Ractopamina; ZIL- Zilpaterol.

³ AGI:AGS – Ácidos graxos insaturados: ácidos graxos saturados.

⁴ AGP:AGS – Ácidos graxos poli-insaturados: ácidos graxos saturados

Ao avaliar o efeito dos β AA sobre o perfil de ácidos graxos, os ácidos C14:0 ($P=0,0170$) e C16:0 ($P=0,0095$) foram maiores para os animais do grupo controle e tratados com Ractopamina, em relação aos tratados com Zilpaterol. No entanto, os animais suplementados com Zilpaterol apresentaram maiores valores para C17:1 T10 ($P=0,0385$), C18:2 n6 ($P=0,0302$), C20:4 N6 ($P=0,0464$), ácido C20:3 N6 C8 C11 C14 ($P=0,0062$), $\omega 6$ ($P=0,0393$) e uma tendência a ter maiores valores para o total de AGP ($P=0,0747$) do que os animais suplementados com Ractopamina e grupo controle (Tabelas 6 e 7).

A maior proporção dos ácidos C20:4 N6, C18:2 n6 e $\omega 6$ e uma tendência de maiores valores do total de poliinsaturados em animais suplementados com zilpaterol pode sugerir alguma alteração no processo de biohidrogenação no rúmen causada por este beta agonista, aumentando a passagem dos poliinsaturados para o duodeno e a absorção destes. Segundo Holanda et al. (2011), o processo de biohidrogenação não é 100% completo para todos os poliinsaturados, sendo que alguns como o ácido linoleico, linolênico e outros podem alcançar o duodeno e serem absorvidos. O processo de biohidrogenação visa a conversão dos ácidos graxos insaturados em saturados, através da adição de um íon de hidrogênio em uma dupla ligação.

Esta suposição também pode ser questionada ao observar maiores valores para ácidos graxos saturados em animais do grupo controle e suplementados com ractopamina, como é o caso dos ácidos C16:0 e C14:0. Se a ractopamina não influencia na biohidrogenação, é normal esperar maiores valores para ácidos graxos saturados como também no grupo controle. No entanto, se o zilpaterol influencia no processo de biohidrogenação aumentando a passagem e a

absorções dos ácidos graxos poliinsaturados, é normal se esperar menores valores de ácidos graxos saturados, pois não ocorreu a total biohidrogenação.

Existem poucos trabalhos avaliando e discutindo o perfil de ácidos graxos na carne de animais suplementados com β AA. Choi et al. (2013), não observaram diferenças no perfil de ácidos graxos, como também no valor total dos AGP e AGS de bovinos suplementados com Zilpaterol por 20 dias e comparação com grupo não tratado.

4. CONCLUSÕES

A condição sexual e a suplementação com os agonistas beta-adrenérgicos (Cloridrato de Ractopamina e Cloridrato de Zilpaterol) não influenciaram a maioria das características de qualidade da carne de bovinos Nelore confinados.

5. REFERÊNCIAS

AMATAYAKUL-CHANTLER, S., JACKSON, J. A., STEGNER, J., KING, V., RUBIO, L. M. S., HOWARD, R., LOPEZ, E., & WALKER, J. Immunocastration of *Bos indicus*-Brown Swiss cross bulls in a feedlot with the gonadotrophin releasing hormone vaccine Bopriva provides improved performance and meat quality. **Journal Animal Science**, v.90, n.11, p. 3718–3728, 2012.

AMATAYAKUL-CHANTLER, S.; HOE, F.; JACKSON, J. A.; ROCA, R. O.; STEGNER, J. E.; KING, V.; HOWARD, R.; LOPEZ, E.; WALKER, J. Effects on performance and carcass and meat quality attributes following immunocastration with the gonadotropin releasing factor vaccine Bopriva or surgical castration of *Bos indicus* bulls raised on pasture in Brazil. **Meat Science**, Amsterdam, v. 95, n. 1, p. 78-84, 2013.

AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION (AMSA). Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness measurements of fresh meat. National Live Stock and Meat Board, Chicago, IL. 1995.

ANDREO, N.; BRIDI, A.M.; TARSITANO, M.A.; PERES, L.M.; BARBON, A.P.A.C.; ANDRADE, E.L.; PROHMANN, P.E.F. Influência da imunocastração (Bopriva®) no ganho de peso, características de carcaça e qualidade de carne de bovinos Nelore. **Revista Ciências Agrárias**, v.34, p. 4121-4132, 2013.

ANTONELO, D.S. Efeito da imunocastração e de beta-agonistas adrenérgicos sobre o desempenho, perfil sanguíneo, comportamento ingestivo e características de carcaça de bovinos Nelore confinados. 2015. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-28042015-095048/pt-br.php>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2016.

ASHMORE, C. R., CARROLL, F., DOERR, L., TOMPKINS, G., STOKES, H., & PARKER, W. Experimental prevention of dark-cutting meat. **Journal of Animal Science**, v.36, p. 33–36, 1973.

ASTM International. 2011. F2025-11. Standard specification for tenderness marketing claims associated with meat cuts derived from beef. Am. Soc. Testing Mater. Int., West Conshohocken, PA.

BLIGH, E. C., DYER, W.J. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physion.**, v.37, p. 911-917, 1959.

CHOI, C.B.; JUNG, K.K.; CHUNG, K.Y.; YANG, B.S.; CHIN, K.B.; SUH, S.W.; OH, D.H.; JEON, M.S.; BAEK, K.H.; LEE, S.O.; KIM, S.I.; LEE, Y.H.; YATES, D.A.; HUTCHESON, J.P.; JOHNSON, B.J. Administration of Zilpaterol hydrochloride alters feedlot performance, carcass characteristics, muscle, and fat profiling in finishing Hanwoo steers. **Livestock Science**. v.157, p.435-441, 2013.

COOK, R. B., POPP, J. D., KASTELIC, J. P., ROBBINS, S.; HARLAND, R. The effects of active immunization against GnRH on testicular development, feedlot performance, and carcass characteristics of beef bulls. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 2778–2783, 2000.

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

DUNSHEA, F. R. Effect of metabolism modifiers on lipid metabolism in the pig. **Journal of Animal Science**, 71, 1966–1977, 1993.

EICHHORN, J.M., BAILEY, C.M., BLOMQUIST, G.J. Fatty acid composition of muscle and adipose tissue from crossbred bulls and steers. **Journal of Animal Science**. v.61, p. 892– 904, 1985.

EISEMANN, J. H., HUNTINGTON, G. B., FERRELL, C. L. Effects of dietary clenbuterol on metabolism of the hindquarters in steers. **Journal of Animal Science**, 66, p. 342–353, 1988.

FERNANDES, A.R.M.; SAMPAIO, A.A.M.; HENRIQUE, W.; OLIVEIRA, E.A.; TULLIO, R.R.; PERECIN, D. Características da carcaça e da carne de bovinos sob diferentes dietas, em confinamento. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.1, p.139-147, 2008.

FIELD, R. A. Effect of castration on meat quality and quantity. **Journal of Animal Science**. v.32, n.5, p.849–857, 1971.

FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissues. **J. Biol.Chem.**, v.226, p.497-509, 1957.

GARMYN, A.J.; MILLER, M.F. Meat science and muscle biology symposium – implant and beta agonist impacts on beef palatability. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 10-20, 2014.

GARMYN, A.J.; BROOKS, J.C.; HODGEN, J.M.; NICHOLS, W.T.; HUTCHESON, J.P.; RATHMANN, R.J.; MILLER, M.F. Comparative effects of supplementing beef steers with zilpaterol hydrochloride, ractopamine hydrochloride, or no beta agonist on strip loin composition, raw and cooked color properties, shear force, and consumer assessment of steaks aged for fourteen or twenty-one days post-mortem. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 3670-3684, 2014.

HELFERICH, W. G., JUMP, D. B., ANDERSON, D. B., SKJAERLUND, D. M., MERKEL, R. A., BERGEN, W. Skeletal muscle α -actin synthesis is increased pretranslationally in pigs fed the phenethanolamine ractopamine. **Endocrinology**, v.126, p. 3096–3100, 1990.

HILTON, G. G., J. L. MONTGOMERY, C. R. KREHBIEL, D. A. YATES, J. P. HUTCHESON, W. T. NICHOLS, M. N. STREETER, J. R. BLANTON JR., M. F. MILLER. Effects of feeding zilpaterol hydrochloride with and without monensin and tylosin on carcass cutability and meat palatability of beef steers. **Journal of Animal Science**. v.87, p.1394–1406, 2009.

HOLANDA, M. A. C.; HOLANDA, M. C. R.; MENDONÇA JÚNIOR, A. F. Suplementação dietética de lipídios na concentração de ácido linoleico conjugado na gordura do leite. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.5, n.3, p.221-229, 2011.

KRAMER, J. K. G.; FELLNER, V.; DUGAN, M. E. R.; SAUER, F. D.; MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids*, v.32, p.1219-1228, 1997.

KOOHMARAIE, M., SHACKELFORD, S. D., MUGGLI-COCKETT, N. E., STONE, R. T. Effect of the α -adrenergic agonist L644,969 on muscle growth, endogenous proteinase activities, and post-mortem proteolysis in wether lambs. **Journal of Animal Science**, v.69, p.4823–4835, 1991.

HOPE-JONES, M., STRYDOM, P.E., FRYLINCK, L., WEBB, E.C. The efficiency of electrical stimulation to counteract the negative effects of β -agonists on meat tenderness of feedlot cattle. **Meat Science**. v. 86, p.699-705, 2010.

HOU, X.; LIANG, R.; MAO, Y.; ZHANG, Y.; NIU, L.; WANG, R.; LIU, C.; LIU, Y.; LUO, X. Effect of suspension method and aging time on meat quality of Chinese fattened cattle *M. Longissimus dorsi*. **Meat Science**. v.96, p.640-645, 2014.

HOWARD, S. T., D. R. WOERNER, D. J. VOTE, J. A. SCANGA, R. J. ACHESON, P. L. CHAPMAN, T. C. BRYANT, J. D. TATUM, K. E. BELK. Effects of ractopamine hydrochloride and zilpaterol hydrochloride supplementation on carcass cutability of calf-fed Holstein steers. **Journal of Animal Science**. v.92, p. 369–375, 2014.

LI, K., ZHANG, Y., MAO, Y., CORNFORTH, D., DONG, P., WANG, R., ZHU, H., LUO, X. Effect of very fast chilling and ageing time on ultra-structure and meat quality characteristics of Chinese yellow cattle *M. Longissimus lumborum*. **Meat Science**. v.92, p.795–804, 2012.

LIU, C. Y., MILLS, S. E. Determination of the affinity of ractopamine and clenbuterol for the beta-adrenoceptor of the porcine adipocyte. **Journal of Animal Science**, v.67, p. 2937–2942, 1989.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton: CRC, v.2., p. 159, 1987.

MERSMANN, H. J. Acute changes in blood flow in pigs infused with B-adrenergic agonists. **J. Anim. Sci.** 1989.

MERSMANN, H. J. Overview of the effects of b-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. **Journal of Animal Science**, v.76, p. 160–172, 1998.

MIGUEL, Z.G.; FARIA, H.M.; ROÇA, O.R.; SANOT, T.C.; SUMAN, S.P.; FAITARONE, A.B.G.; DELBEM, N.L.C.; GIRAO, L.V.C.; HOMEM, J.M.; BARBOSA, E.K.; SU, L.S.; RESENDE, F.D.; SIQUEIRA, G.R.; MOREIRA, A.D.; SAVIAN T.V. Immunocastration improves carcass traits and beef color attributes in Nellore and Nellore x Aberdeen Angus crossbred animals finished in feedlot. **Meat Science**. 2013.

MILLS, S., MERSMANN, H.J. Beta-adrenergic agonists, their receptors, and growth: special reference to the peculiarities in pigs. In: S. B. Smith and D. R. Smith (Ed.) The Biology of Fat in Meat Animals: Current Advances. **American Society of Animal Science**, Champaign, IL. p 1-34, 1995.

PADRE, R.G.; ARICETTI, J.A.; MOREIRA, F.B.; MIZUBUTI, I.Y.; PRADO, I.N.; VISENTAINER, J.V.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. Fatty acid profile, and chemical composition of Longissimus muscle of bovine steers and bulls finished in pasture system. **Meat Science**, v.74, p. 242-248, 2006.

PAGE, L. K., WULF, D. M., SCHWOTZER, T. R. A survey of beef muscle color and pH. **Journal of Animal Science**, v.79, p.678–687,2001.

PLATTER, W. J.; W. T. CHOAT. Balancing beef quality and red meat yield with ractopamine hydrochloride. In: Proc. Reciprocal Meat Conf. v.61, p.1–6, 2008.

PRADO, I. N., MOREIRA, F. B., MATSUSHITA, M., & SOUZA, N. E. Longissimus dorsi fatty acids composition of Bos indicus and Bos indicus · Bos taurus crossbred steers finished on pasture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.4, p.601–608,2003.

PRIOR, R.L., SMITH, S.B., SCHANBACHER, B.D., MERSMANN, H.J.; Lipid metabolism in finishing bulls and steers implanted with oestradiol-17h-dipropionate. **Anim. Prod.** v.37, p. 81– 88,1983.

RENERRE, M. Effects of age and slaughterweight on the colour of beef (Friesian and Charolais breeds). *Sciences des Aliments*, v. 2, p.17–30,1982.

REZENDE, F. M. Prospecção da influência de marcadores genéticos sobre características de crescimento, carcaça e qualidade de carne em bovinos da raça Nelore.2009. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/744/74131/tde-03062009-094616/>>. Acesso em : 2016-04-19.

RODRIGUES, V.C.; ANDRADE, I.F. Características Físico-Químicas da carne de bubalinos e de bovinos castrados e inteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33; n.6; p. 1839-1849, 2004.

RUIZ, M. R., MATSUSHITA, M., VISENTAINER, J. V., HERNANDEZ, J. A., RIBEIRO, E. L. A. Proximate chemical composition and fatty acid profiles of Longissimus thoracis from pasture fed LHRH immunocastrated and intact Bos indicus bulls. **Journal of Animal Science**,v.1, n.35, p.13–18,2005.

RULE, D. C., MACNEIL, M. D., SHORT, R. E. Influence of sire growth potential, time on feed, and growing-finishing strategy on cholesterol and fatty acids of ground carcass and Longissimus muscle of beef steers. **Journal of Animal Science**, v.75, n.6, p.1525–1533,1997.

RULE, D.C., SMITH, S.B., ROMANS, J.R. Fatty acid composition of muscle and adipose tissue of meat animals. In: Smith, S.B., Smith, D.R. (Eds.), *The Biology of Fat in Meat Animals*. American Society of Animal Science, Champaign,IL, pp. p.144– 165,1995.

SMITH, S. M., GARCIA, D. K., ANDERSON, D. B. Elevation of a specific mRNA in longissimus muscle of steers fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, v.67, p. 3495–3502, 1989.

WEBER, M.J.; DIKEMAN, M.E.; JAEGER, J.R.; UNRUH, J.A.; MURRAY, L.; HOUSER, T.A.; Effects of feeding a single or sequence of beta-adrenergic agonists on cull cow meat quality. **Meat Science**. v.93, p.275-281, 2013.

WEISS, W.P.; CONRAD, H.R.; ST. PIERRE, N.R. A theoretically based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v.39, p.95-110, 1992.

WHEELER, T. L., KOOHMAIAIE, M. Effects of the b-adrenergic agonist L644,969 on muscle protein turnover, endogenous proteinase activities, and meat tenderness in steers. **Journal of Animal Science**, 70, p. 3035–3043, 1992.

Capítulo 3

Características morfológicas e moleculares da carne de bovinos Nelore imunocastrados ou não e suplementados com agonistas beta-adrenérgicos

RESUMO

O fornecimento de promotores de crescimento para animais confinados permite um maior ganho de peso e aumento da massa muscular no entanto promove redução da deposição de gordura, para amenizar essa lipólise causada a técnica da castração pode ser uma alternativa. Este trabalho foi desenvolvido para avaliar o efeito da imunocastração e do fornecimento de Agonistas beta-adrenérgicos (β AA) sobre as características morfológicas e moleculares da carne de bovinos Nelore. Foram utilizados noventa e seis bovinos Nelore, sendo que metade dos animais ($n=48$) receberam uma dose da vacina de imunocastração, e após 30 dias receberam a segunda dose. A outra metade dos animais ($n=48$) não recebeu nenhuma dose da vacina. Durante 70 dias os animais foram alimentados com uma dieta padrão composta de 24% volumoso e 76% de concentrado. Após 70 dias de confinamento os animais foram divididos em três grupos, dentro de bloco (peso inicial) e condição sexual e foram alimentados por 30 dias, com umas das seguintes dietas: CON – dieta padrão utilizada na fase anterior, sem a adição de β AA; ZIL – dieta padrão acrescida de 80 mg/dia Cloridrato de Zilpaterol; RAC – dieta padrão acrescida de 300 mg/dia Cloridrato de Ractopamina. Ao final desse período, os animais foram abatidos e foram colhidas amostras do músculo *Longissimus dorsi* para as avaliações de comprimento de sarcômero, perfil morfométrico muscular e expressão gênica das enzimas calpaína e calpastatina. Para a maioria das características avaliadas não foram observadas interações entre os tratamentos. Não foi observado qualquer efeito dos tratamentos para a análise de comprimento de sarcômero. Em relação ao perfil morfométrico muscular, a condição sexual não afetou a área das fibras, no entanto, afetou a frequência das fibras, sendo que

nos animais imunocastrados (IM) apresentaram maior frequência para as fibras oxidativas (FO) e glicolíticas (FG) do que os animais não castrados (NC). Por outro lado, os animais NC apresentaram maior frequência das fibras oxidativas-glicolíticas (FOG) em comparação aos IM. Já em relação aos β AA, os animais do grupo CON e ZIL apresentaram maior área para as FO em comparação ao grupo RAC, enquanto que para as FOG, os animais do grupo CON tiveram maior área do que os animais do grupo RAC e ZIL. No entanto, ao verificar a frequência das fibras, os animais do grupo ZIL, tiveram maior frequência para as FO e menor para FG em comparação aos animais do grupo CON e RAC. Para a análise de expressão gênica, não foi observado efeito da condição sexual e nem dos β AA sobre a expressão dos genes. Conclui-se que a condição sexual e a suplementação com os β AA pode alterar o perfil morfométrico muscular, sem, contudo, alterar a expressão dos genes e do comprimento de sarcômero.

PALAVRAS-CHAVE: Capaína, Calpastatina, sarcômero e fibra muscular

ABSTRACT

Animals are fed growth promoters to promote increased weight gain and muscle mass, with decreases to fat deposition. As an alternative to this method lypolysis is minimized through the technique of castration. This study was conducted to evaluate the effect of immunocastration and supplementation of Beta adrenergic agonist (β AA) on morphological and molecular characteristics of Nellore meat. Ninety-six Nellore were used in this study; half of the animals ($n = 48$) received one dose of immunocastration vaccine on d 0, and received another dose at d 30. The other half of the animals ($n = 48$) did not receive any vaccine. Animals were fed with a standard diet consisting of 24% forage and 76% concentrate, for 70 d. After 70 d of the standard diet, animals were divided into three groups, and fed 30 d with one of the following diets: CON - standard diet used in the previous phase, without the addition of β AA; ZIL - standard diet plus 80 mg/d Zilpaterol hydrochloride; or RAC - standard diet plus 300 mg/d Ractopamine hydrochloride. After this period animals were slaughtered and the *Longissimus dorsi* was sampled to evaluate sarcomere length, morphometric muscle profile, and gene expression of calpain and calpastatin enzymes. No effect of treatment for sarcomere length was observed. The area of morphometric muscle was not affected by sexual condition; however, sexual condition did affect fiber frequency. . A higher frequency of slow-twitch oxidative (SO), and fast-twitch glycolytic (FG) fibers were observed for immunocastrated animals (IM) compared to non castrated animals (NC). NC animals had a higher frequency of fast-oxidative glycolytic (FOG) fibers compared to IM. A relationship to β AA was also observed, animals in the CON and ZIL group had greater area for SO compared to the RAC

group, Animals in the CON group had larger area for FOG compared to animals in RAC and ZIL groups. However, animals in the ZIL group had a higher frequency of SO and lower FG frequency than animals of the CON and RAC group. Gene expression did not differ as an effect of sexual condition and β AA. This study found that sexual condition and supplementation with β AA can change the morphometric muscle profile, but does not alter gene expression or sarcomere length.

KEYWORDS : Capain , calpastatin , sarcomere and muscle fiber

Lista de tabelas

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Composição percentual da dieta utilizada (na matéria seca).	119
Tabela 2 - Médias, erro-padrão da média (EPM) e probabilidades da área ($\mu\text{m}^2 \times 1000$) e frequência (%) dos diferentes tipos de fibras musculares, em função da condição sexual (CS) e dos agonistas beta-adrenérgicos (βAA)	126
Tabela 3 - Médias, erro-padrão da média (EPM) e probabilidades da expressão gênica relativa, em função da condição sexual (CS) e dos agonistas beta-adrenérgicos (βAA).....	133

Índice de figuras

Figura 1 - Efeito da condição sexual e da suplementação com agonistas beta-adrenérgicos no comprimento de sarcômero, μm	132
Figura 2 - Relação entre a força de cisalhamento e a expressão do gene CAPN1 na carne.....	135
Figura 3 - Relação entre a força de cisalhamento e a expressão do gene CAPN2 na carne.....	136
Figura 4 - Relação entre a força de cisalhamento e a expressão do gene CAST na carne.....	136

SUMÁRIO

Capítulo 3	108
Características morfológicas e moleculares da carne de bovinos Nelore imunocastrados ou não e suplementados com agonistas beta-adrenérgicos	108
RESUMO	109
ABSTRACT	111
1. <i>INTRODUÇÃO</i>	116
2. <i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	118
2.1. Animais e alimentação	118
2.2. Imunocastração e fornecimento dos agonistas beta-adrenérgicos	120
2.3. Abate	121
2.4. Comprimento de sarcômero	122
2.5. Perfil morfométrico do tecido muscular esquelético	122
2.6. Avaliação da expressão gênica de Calpaína 1, Calpaína 2 e Calpastatina	124
2.7. Análises estatísticas	125
3. <i>RESULTADOS E DISCUSSÕES</i>	126
3.1. Perfil morfométrico muscular	126
3.2. Comprimento de sarcômero	132
3.3. Expressão dos genes CAPN1, CAPN2 e CAST	133
4. <i>CONCLUSÕES</i>	137
5. <i>REFERÊNCIAS</i>	138

1. INTRODUÇÃO

A suplementação de bovinos com promotores de crescimentos, como os agonistas beta-adrenérgicos (β AA), tem sido relacionada a uma redução na maciez da carne (STRYDOM et al., 2009; HILTON et al., 2009; KELLERMEIER et al., 2009; RATHMANN et al., 2009; HOPE-JONES et al., 2010, HOWARD et al., 2014).

A maciez da carne é diretamente relacionada com o tamanho e frequência das fibras musculares e tecido conectivo, conforme aumenta a área de fibra, aumenta também a deposição de tecido conectivo, tornando a carne mais dura (JOO et al., 2013). As fibras podem ser classificadas de acordo com seu metabolismo, sendo fibras de contração lenta oxidativa (SO) e fibras de contração rápida que são divididas em: Fibras de contração rápida glicolíticas (FG) e fibras de contração rápida oxidativa- glicolítica (FOG) (PETER et al., 1972).

A frequência das fibras pode variar de acordo com diferentes músculos, sendo que em bovinos as fibras do músculo *Longissimus dorsi* (LM) são classificadas em FO (Tipo I), FG (Tipo IIB + IIAB) e FOG (Tipo IIA) (PICARD et al., 1998). Os β AA podem afetar a capacidade metabólica do músculo de cordeiro e bovino, isso foi observado após a suplementação de cordeiros e bovinos com β AA, estes animais apresentaram aumento das fibras glicolíticas e redução das oxidativas (ZIMMERLI ; BLUM, 1990; FIEMS et al., 1993).

A maciez da carne também pode ser influenciada pelo encurtamento do sarcômero, alguns estudos observaram que o maior comprimento de sarcômero está associado com maior maciez da carne avaliada através da análise sensorial e força de cisalhamento (SMULDERS et al., 1990), no entanto, alguns estudos

não observaram qualquer efeito no comprimento de sarcômero após a suplementação com os β AA (LEE ; KIM, 1994).

Os BAA podem também afetar a expressão de alguns genes como a calpaína, que é uma das enzimas responsáveis pela degradação proteica, estando diretamente relacionada ao aumento da maciez da carne. Segundo Koohmaraie et al. (1991), cordeiros e bovinos suplementados com β AA tiveram uma redução na atividade da μ -calpaina, um aumento de 10 -20% na atividade da m-calpaina e aumento de 60-100% na atividade da calpastatina. Wheeler e Koohmaraie (1992) observaram um aumento na atividade da enzima calpastatina em animais tratados com β AA (L644,969) e, conseqüentemente uma redução na maciez da carne, indicando que houve uma relação consistente entre o sistema proteolítico das calpaínas com a degradação proteica em novilhos.

Outro fator a influenciar a maciez da carne é a condição sexual, pois também pode alterar a frequência e área das fibras musculares, de acordo com Clancy et al. (1986), touros apresentaram aumento na porcentagem das FOG acompanhado pela redução das FG no músculo *Longissimus dorsi* quando comparados com novilhos. No entanto, outros autores não observaram diferenças na frequência das fibras de acordo com a condição sexual (SINK et al., 1985; CORNFORTH et al., 1980).

A condição sexual também pode afetar a expressão dos genes calpaína e calpastatina, sendo que animais castrados apresentam aumento das enzimas m-calpaina (KOOHMARAIE, et al., 2014) e redução da atividade da calpastatina, resultando em uma carne mais macia (MORGAN et al., 1993 a,b).

Muitos estudos têm sido conduzidos para avaliar os efeitos dos β AA em bovinos, no entanto, a maioria desses estudos foram conduzidos em diferentes condições das normalmente encontradas no Brasil, entre os quais podemos citar raça, condição sexual dos animais, tempo de confinamento, grau de acabamento no momento do abate, entre outros. Por isso, o objetivo deste estudo foi determinar os efeitos da imunocastração e β AA (Zilpaterol e Ractopamina) no perfil morfométrico muscular, comprimento de sarcômero e expressão gênica na carne de bovinos Nelore.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – FZEA/USP, em Pirassununga/SP.

Este projeto foi avaliado e autorizado pelo comitê de ética animal da Universidade de São Paulo, com protocolo nº 13.1.541.74.0 em 16 de maio de 2013 e também pelo comitê de ética humano através da plataforma Brasil, com o parecer nº 456.305 em 13 de novembro de 2013.

2.1. Animais e alimentação

Foram utilizados noventa e seis bovinos Nelore machos, com peso médio inicial no início do experimento de 409 ± 50 kg e idade média de 20 meses, recriados em pastagem sem suplementação.

Metade dos animais ($n=48$) dentro de cada condição sexual (24 imunocastrados e 24 não-castrados), foi distribuída, de acordo com o peso inicial (bloco), em quatro baias (12 animais por baia), sendo dois piquetes com animais

imunocastrados e dois com animais não-castrados. Os piquetes eram equipados com portões eletrônicos (American Calan Inc., Northwood, NH, USA) que permitiram o controle individual da alimentação. A outra metade dos animais (n=48) foi distribuída em baias individuais. Ambas as instalações continham cocho coberto, piso de concreto e bebedouros automáticos. Posteriormente, os animais foram submetidos a um período de adaptação às dietas e instalações por um período de 21 dias.

A alimentação foi realizada diariamente com uma dieta contendo 76% de concentrado e 24% de volumoso (Tabela 1). A cada dois dias as sobras eram retiradas, pesadas e amostradas para determinação da matéria seca. O ajuste da oferta de alimento foi realizado diariamente com base na avaliação das sobras do dia anterior, com uma oferta de matéria seca 10% superior ao consumo observado para assegurar que não haja falta ou excesso de alimento no cocho.

Tabela 1 - Composição percentual da dieta utilizada (na matéria seca).

INGREDIENTES	% da matéria seca
Silagem de milho	24,18
Milho Grão Seco	31,82
Farelo de Soja 45%	12,17
Polpa cítrica peletizada	30,0
Uréia	1,22
Núcleo Mineral ¹	0,60
NUTRIENTES	
Proteína Bruta, %	16,3
Proteína Degradável no Rúmen, %	10,02
NDT, % ²	78,25

¹ NC Beef Performa (Nutron) ;² - Estimado através de fórmula de Weiss et al. (1992).

2.2. Imunocastração e fornecimento dos agonistas beta-adrenérgicos

Nove dias antes da chegada ao confinamento, os animais foram identificados e pesados individualmente e separados em dois blocos, de acordo com o peso. Metade dos animais de cada bloco recebeu uma dose de vacina para imunocastração (Bopriva®, Zoetis Indústria de Produtos Veterinária LTDA, São Paulo, SP, Brasil), que foi repetida após 30 dias da primeira aplicação, enquanto a outra metade dos animais não recebeu a vacina.

Em seguida, os animais foram transferidos para as instalações de confinamento do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, em Pirassununga/SP/Brasil

Após 70 dias de confinamento os animais foram divididos em três grupos, dentro de bloco (peso inicial) e condição sexual (imunocastrado ou não) e foram alimentados com umas das seguintes dietas: CON – dieta padrão utilizada na fase anterior, sem a adição de β AA; ZIL – dieta padrão acrescida de 80 mg/dia Cloridrato de Zilpaterol (MSD Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil); RAC – dieta padrão acrescida de 300 mg/dia Cloridrato de Ractopamina (Elanco Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil).

Os β AA foram incorporados à mistura mineral, de modo a conter as concentrações supracitadas. Após 30 dias de recebimento dos tratamentos, os animais foram pesados no mesmo dia, sendo que os animais do tratamento ZIL receberam a dieta controle por mais dois dias, enquanto que os animais do tratamento RAC, continuaram recebendo o produto até o momento do embarque para o abate (dois dias). A retirada do tratamento ZIL três dias antes do abate foi

realizada em função do período de carência exigido pela legislação para esse produto.

2.3. Abate

Posteriormente, os animais foram transportados por aproximadamente 200 km onde foram abatidos em frigorífico comercial (Frigorífico Dom Glutão; Ibitinga/SP).

Os animais foram divididos em dois grupos para o abate (48 animais) em cada dia, respeitando a diferença de tempo do abate do primeiro bloco para o segundo de 7 dias, sendo em duas semanas consecutivas. Dessa forma, as datas foram devidamente ajustadas de maneira a fixar o período de oferecimento dos tratamentos (30 dias), o tempo após a aplicação da vacina de imunocastração (93 dias após a aplicação da 2ª dose) e o tempo de carência (3 dias)

No dia anterior ao abate do bloco pré-estabelecido, os mesmos foram submetidos a jejum de sólidos por aproximadamente 16h.

O abate foi realizado de acordo com procedimentos humanitários, conforme exigido pela legislação brasileira. Os animais foram insensibilizados através do atordoamento com pistola pneumática penetrante e imediatamente após foi realizada a sangria pela seção dos grandes vasos do pescoço.

Em seguida realizou-se a esfola, durante esta etapa as carcaças foram identificadas e foi coletada uma amostra do músculo *Longissimus dorsi* para posterior análise de expressão gênica das enzimas calpaína e calpastatina. Essas amostras foram imediatamente identificadas, embaladas em papel alumínio e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido para posterior análise.

Em seguida as meias-carcaças foram pesadas individualmente e enviadas para a câmara fria. Após 48h de resfriamento, a meia carcaça direita de cada animal foi dividida na região da 12^a e a 13^a costelas, para a coleta de amostras do músculo *Longissimus dorsi*. Foi retirada uma amostra (2,5 cm de espessura cada) na 12^a costela, no sentido caudocranial, para realização das análises do perfil morfométrico.

2.4. Comprimento de sarcômero

As sobras dos cilindros dos bifes utilizados para realização da força de cisalhamento foram embaladas e congeladas (-20°C) para subsequente mensuração do comprimento de sarcômero de acordo com Cross et al. (1981).

Foram coletadas seis amostras/ cilindros (2mm x 2mm x 3mm) de cada bife paralelas a orientação da fibra, sendo que de cada amostra foram dissecadas seis fibras para a mensuração do sarcômero por difração a laser, conforme descrito por (KOOLMEES et al.,1986) utilizando um equipamento laser Helium Neon Laser - Model 05-LHR-021 (Melles Griot, IDEX Health & Science, LLC, Rochester, Nova York, EUA) assim cada observação do comprimento de sarcômero representará 36 fibras

2.5. Perfil morfométrico do tecido muscular esquelético

As amostras para determinação do perfil morfométrico foram colhidas 48 horas após o abate e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior determinação do tipo de fibras musculares, de acordo com a metodologia descrita por Hadlich (2006).

As amostras foram analisadas pela técnica de histoquímica para verificação da atividade contrátil da ATPase, conforme metodologia descrita por Brooke e Kaiser (1970). As fibras foram classificadas em oxidativa de contração lenta (FO, metabolismo oxidativo e coloração vermelha), oxidativas-glicolíticas de contração rápida (FOG, metabolismo oxidativo-glicolítico e coloração intermediária) ou glicolíticas de contração rápida (FG, metabolismo glicolítico e coloração branca), conforme proposto por Peter et al. (1972).

Os cortes histológicos com 10 μm de espessura, foram realizados através da câmara de um micrótomo criostato (Cryocut-1800- Reichert-Jung), permanecendo a -20°C . Após o processo de elaboração das lâminas, estas foram utilizadas para demonstração da atividade da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Tetrazólio Redutase (NADH-TR) segundo a técnica de Pearse (1972) modificada por Dubowitz e Brooke (1984).

Para a identificação dos tipos de fibras, cada lâmina foi analisada em 10 diferentes campos microscópicos com área de $1057 \times 855 \mu\text{m}$, percorrendo toda a lâmina utilizando uma câmara Newbauer acoplada a um microscópio óptico com ocular de 12,5X e objetiva de 40X. Em cada campo de visualização as fibras eram contadas e classificadas de acordo com a nomenclatura adotada, citada acima.

Foram avaliadas a área de no mínimo 60 fibras de cada nomenclatura, através do programa de análise de imagens UTHSCSA Image Tool.

2.6. Avaliação da expressão gênica de Calpaína 1, Calpaína 2 e Calpastatina

Foram colhidas amostras do músculo *Longissimus dorsi* entre a 12ª e 13ª costelas logo após a esfolia do animal, estas amostras foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, e mantidas à -80°C até extração do RNA total. O RNA total foi extraído de acordo com o protocolo do fabricante (RNeasy Fibrous Tissue, Quiagen, EUA). Brevemente as amostras foram maceradas junto ao nitrogênio líquido com o pistilo em um cadinho, colocadas em um tubo de 1,5ml e adicionados os reagentes de acordo com o protocolo do fabricante, seguindo sequencialmente os passos por ele determinado.

A concentração do RNA total de todas as amostras foi estimada por espectrofotometria (Nano Drop, Biophotometer, Eppendorf®, Hamburg, Alemanha) e sua pureza foi estimada pela razão das absorbâncias à 230, 260 e 280nm. Apenas foram utilizadas amostras com razão A260/280 entre 1,8 e 2,0 e A230/260 acima de 2,0. Posteriormente a integridade destas amostras foram avaliadas pelo RIN (*RNA Integrity Number*) seguindo-se o protocolo do fabricante (RNA-Nano chip, Bioanalyser, EUA) sendo excluídas amostras que apresentassem o valor de RIN inferior à 8.

Para avaliação da expressão gênica foi utilizado sistema Taqman com pares de primers e sondas produzidas pelo fabricante (Life technologies, EUA). Os ensaios utilizados foram Calpaína-1 (Bt03213558_g1), Calpaína-2 (Bt03817738_m1) e Calpastatina (Bt03212306_m1), sendo utilizado a expressão do RNA ribossomal 18s como controle endógeno (4318413E - VIC MGB). As reações foram realizadas em termociclador StepOne® (Life Technologies, EUA) utilizando os reagentes DNASE I (RNASE – free) e FG RNA to cDNA (4387408)

(Life Technologies, EUA). O cálculo da expressão gênica relativa foi realizado de acordo com Livak e Schittgen (2001).

2.7. Análises estatísticas

As análises do perfil morfométrico muscular e comprimento de sarcômero, foram analisadas como um arranjo fatorial 2 x 3 (condição sexual x tratamentos) utilizando o procedimento *Mixed* do *Software* SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Quando foi verificado efeito significativo dos fatores principais ou da interação, as médias foram comparadas pelo teste T de Student.

Foi considerado como efeitos fixos 6 blocos (distribuição dos pesos) e a instalação (bacias individuais ou coletivas), bem como os efeitos de condição sexual, tratamento e a interação condição sexual x tratamento. O animal foi considerado como unidade experimental.

Os dados da análise de expressão gênica foram avaliados também como arranjo fatorial 2 x 3 (condição sexual x tratamentos), somente que utilizando o procedimento *GENMOD* do *Software* SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) com a distribuição do tipo Poisson.

As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando o $P < 0,05$ e tendência quando o $0,05 < P < 0,10$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Perfil morfométrico muscular

Foram observadas interações entre a condição sexual e os β AA para as áreas das fibras musculares oxidativas-glicolíticas ($P=0,0037$) e glicolíticas ($P=0,0005$; Tabela 2).

Tabela 2- Médias, erro-padrão da média (EPM) e probabilidades da área ($\mu\text{m}^2 \times 1000$) e frequência (%) dos diferentes tipos de fibras musculares, em função da condição sexual (CS) e dos agonistas beta-adrenérgicos (β AA).

Características	Tratamentos						EPM	P-valor		
	Controle		Ractopamina		Zilpaterol			CS	βAA	CS x βAA
	IM ¹	NC ²	IM	NC	IM	NC				
Fibra de contração lenta oxidativa										
Área	3,7 ^{aA}	3,5 ^{aA}	2,5 ^{aB}	2,1 ^{aB}	3,3 ^{aA}	3,1 ^{aA}	0,215	0,3549	0,0004	0,9241
Frequência	7,6 ^{aB}	7,4 ^{aB}	9,4 ^{aB}	4,3 ^{bC}	15,4 ^{aA}	15,6 ^{aA}	0,80	0,0432	<0,0001	0,0218
Fibra de contração rápida oxidativa-glicolítica										
Área	3,6 ^{bA}	4,5 ^{aA}	3,3 ^{aA}	2,7 ^{aB}	3,4 ^{aA}	3,2 ^{aB}	0,141	0,8482	<0,0001	0,0037
Frequência	26,4 ^{aA}	25,8 ^{aB}	21,0 ^{bB}	33,2 ^{aA}	27,3 ^{aA}	28,3 ^{aB}	1,27	0,0001	0,4006	<0,0001
Fibra de contração rápida glicolítica										
Área	5,7 ^{bB}	7,3 ^{aA}	6,5 ^{aBA}	6,0 ^{aB}	7,1 ^{aA}	6,2 ^{bB}	0,213	0,8346	0,5157	0,0005
Frequência	65,7 ^{aB}	66,8 ^{aA}	69,6 ^{aA}	62,5 ^{bB}	57,2 ^{aC}	56,0 ^{aC}	0,80	0,0180	<0,0001	0,0043

^{a,b} Letras minúsculas diferentes na mesma linha, dentro de tratamento, diferem entre si pelo teste T ($P<0,05$).

^{A,B} Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, dentro de condição sexual, diferem entre si pelo teste T ($P<0,05$).

¹ IM= Imunocastrado; ²NC= Não-castrado

Na interação entre os tratamentos para a área das fibras oxidativa-glicolíticas nos animais do grupo controle, foi observado que os animais não castrados tiveram maior área que os imunocastrados ($P=0,0073$), já nos animais

do grupo ractopamina e zilpaterol, não houve diferenças entre os imunocastrados e não castrados ($P=0,0542$ e $P=0,4289$, respectivamente), porém no grupo ractopamina os imunocastrados tiveram uma tendência a apresentar maior área que os animais não castrados.

Esse aumento da área das fibras oxidativa-glicolíticas nos animais não castrados, pode ser pelo efeito anabólico da testosterona sob esse grupo de animais, estimulando a hipertrofia muscular, aumento da área da fibra, para posterior diferenciação em fibras glicolíticas, que também apresentou maior área para os animais não castrados. Segundo Seideman e Crouse (1986), machos não-castrados possuem maior diâmetro fibra de muscular do que animais castrados e fêmeas. Young e Bass (1984), concluíram que a desacelerada transformação das fibras do tipo IIA para IIB pode ser por causa da presença dos andrógenos.

A área das fibras glicolíticas nos animais do grupo CON, os animais não castrados apresentaram maior área que os animais imunocastrados ($P=0,0018$), enquanto que, para os animais do grupo RAC, não houve diferença entre os não castrados e imunocastrados ($P=0,2728$), e para os animais do grupo ZIL, a área foi maior para animais imunocastrados do que os não castrados ($P=0,0296$).

Esse aumento da área das fibras glicolíticas para os animais imunocastrados suplementados com Zilpaterol, não era o esperado, pois esperava-se o efeito aditivo do hormônio testosterona com o promotor de crescimento para os animais não castrados do grupo ZIL. No entanto, existem poucos trabalhos avaliando o perfil muscular em relação a condição sexual e os β AA em animais *Bos Indicus*, assim dificultando o entendimento do efeito raça, condição sexual e β AA sobre o perfil muscular do músculo *Longissimus*.

Gonzalez et al. (2007), suplementaram vacas de descarte com a combinação de implante hormonal e Ractopamina por 35 dias, e observou aumento da área e diâmetro das fibras do tipo I (oxidativa) e nenhuma alteração no tamanho da fibra do tipo II, sugerindo que a síntese proteica é limitada em animais mais velhos.

Quanto a frequências das fibras, não foram observadas interações para as fibras oxidativas nos animais do grupo CON e ZIL para os imunocastrados e não castrados, no entanto, foi observado que nos animais do grupo RAC, os imunocastrados tiveram maior frequência de fibras oxidativas que os animais não castrados ($P=0,0009$).

Já em relação a frequência das fibras oxidativas-glicolíticas, os animais do grupo CON e ZIL não apresentaram interações com os animais imunocastrados e não castrados, no entanto, foi observado interação entre β AA e condição sexual para os animais do grupo RAC, sendo que a frequência dessas fibras foi maior para os animais não castrados do que os imunocastrados.

A frequência das fibras glicolíticas nos animais do grupo controle e zilpaterol não apresentou diferenças entre os animais imunocastrados e não castrados, porém, nos animais do grupo ractopamina, os imunocastrados tiveram maior frequência do que os não castrados ($P=0,0001$).

A interação observada no grupo ractopamina, em que os animais imunocastrados apresentam menor frequência para fibras oxidativas-glicolíticas em relação aos animais não castrados, pode sugerir que, como os animais imunocastrados não sofrem ação hormonal, as fibras intermediárias (oxidativas-glicolíticas) já se diferenciaram para as fibras oxidativas e/ou glicolíticas, por isso o aumento da frequências dessas fibras nos animais imunocastrados em relação

ao não castrados, enquanto, que nos animais não castrados as fibras intermediárias ainda não se diferenciaram, pois ainda estão sofrendo ação hormonal e do β AA, para posterior diferenciação.

De acordo com Koohmaraie et al. (2014), não observaram interações na percentagem de fibras no músculo *Longissimus* entre cordeiros tratados com β AA em diferentes condições sexuais.

Os efeitos dos tratamentos e da condição sexual sobre a área e a frequência das fibras estão apresentados na Tabela 2.

A condição sexual não afetou a área das fibras mais afetou a frequências das fibras, indicando que animais imunocastrados tiveram maior frequência das fibras oxidativas ($P=0,0432$) e glicolíticas ($P=0,0180$) do que animais não castrados. No entanto, os animais não castrados apresentaram maior frequência das fibras oxidativas-glicolíticas ($P=0,0001$) em relação aos animais imunocastrados.

O efeito observado na frequência das fibras em relação a condição sexual, pode ser explicado pela presença do hormônio andrógeno, sendo que os animais imunocastrados sem o efeito hormonal provavelmente tiveram maiores transformações das fibras oxidativas-glicolíticas em oxidativa ou glicolíticas, assim já definindo o perfil muscular. No entanto nos animais não castrados com o efeito hormonal, sugere-se que a fibras oxidativas-glicolíticas vão se diferenciando em outros tipo de fibra de acordo com a necessidade durante o crescimento muscular. Yoshioka et al. (2007), estabeleceu que a hipertrofia muscular pode ser estimulada pelo tratamento com testosterona no período pós-natal de maneira direta ou indireta, através da proliferação de celular satélites e síntese de proteica.

Alguns trabalhos descrevem nenhuma mudança nas fibras do tipo I (oxidativa) de acordo com a condição sexual, mas descrevem que as fibras glicolíticas do tipo IIB são em maior frequência encontrados em novilhos quando comparados com as fibras do tipo IIA (oxidativa-glicolítica) (BRANDSTETTER et al., 1998). Young e Bass (1984), concluiu que a desacelerada transformação das fibras do tipo IIA para IIB pode ser por causa da presença dos andrógenos, o que corrobora com os resultados encontrados neste trabalho.

Ao avaliar o efeito dos β AA, foram observadas diferenças na área das fibras, sendo que animais do grupo CON e ZIL tiveram altos valores para área das fibras oxidativas quando comparados com animais do grupo RAC ($P=0,0004$). Por outro lado, a área das fibras oxidativas-glicolíticas foi maior para animais do grupo CON em relação aos do grupo RAC e ZIL ($P<0,0001$) e a área das fibras glicolíticas não foi afetada pelos β AA .

Quanto a frequência das fibras, houve efeito dos β AA, sendo que os animais do grupo ZIL tiveram maior frequência das fibras oxidativas ($P<0,0001$) e baixa frequência das fibras glicolíticas ($P=0,0180$) quando comparados aos animais do grupo CON e RAC. Os β AA não afetaram a frequência das fibras oxidativas-glicolíticas ($P=0,4006$).

Segundo McGilchrist et al. (2016), ao comparar animais Angus selecionados geneticamente para maior ganho muscular com animais de menor ganho muscular, os animais selecionados para maior ganho muscular apresentaram hipertrofia muscular e redução da deposição de gordura, porém com aumento da frequência das fibras oxidativa e redução das fibras glicolíticas. No entanto, a área de todos os tipos de fibras musculares foi maior nos animais que apresentaram hipertrofia muscular. Também foi observada redução da

enzima lactato desidrogenase, indicando redução da capacidade glicolítica do músculo e aumento das enzimas citrato sintase e isocitrato desidrogenase, indicando aumento da capacidade oxidativa muscular nos animais com aumento da hipertrofia muscular. Sendo semelhantes aos resultados encontrados neste trabalho, em que a hipertrofia causada pelo ZIL influenciou no aumento das fibras oxidativas.

Resultados diferentes foram encontrados por Moloney et al. (1990) e Wheeler e Koohmaraie (1992), observaram que as fibras de contração rápida são mais responsivas a suplementação com ZIL. Animais suplementados com RAC tiveram uma diferenciação das fibras do tipo I para o tipo IIA, e novilhos e vacas de descartes, suplementados com ZIL, tiveram mais fibras glicolíticas do que oxidativa (GONZALEZ et al., 2008; GONZALEZ et al., 2009).

Segundo Aalhus et al. (1992), a percentagem de fibras vermelhar (Tipo I) não foi afetada após a suplementação de 20 mg/kg de RAC, no entanto, aumentou percentagem de fibras brancas (Tipo IIB) e reduziu a fibras intermediárias (Tipo IIA). De acordo com Kirchofer et al. (2002), o músculo *Longissimus* de bovinos possui mais que 40% de fibras do tipo IIB, sendo considerado um músculo glicolítico com mais fibras brancas.

Vestergaard et al. (1994); Rajab et al. (2000); Bricout et al. (2004), observaram que os β AA aumentaram a frequência das fibras do tipo IIA em relação as fibras do tipo I em bovinos e em camundongos. No entanto, outros estudos não observaram qualquer efeito de agentes anabólicos na distribuição das fibras (ONO et al., 1996; FRITSCHÉ et al., 2000).

3.2. Comprimento de sarcômero

Não foi observado interação entre a condição sexual e os β AA ($P=0,9306$) e também não foram observados os efeitos da condição sexual ($P=0,2929$) ou dos β AA ($P=0,8567$) no comprimento de sarcômero (Figura 1).

Strydom et al. (2011), Strydom et al. (2009) e Hope-Jones et al. (2010), avaliaram o uso dos β AA em novilhos, e não observaram efeito da suplementação no comprimento dos sarcômeros 1 dia no post-mortem. Por outro lado, Williams et al. (1987) sugeriu que animais tratados com β AA podem ter problemas com o rápido resfriamento da carcaça por apresentar menor espessura de gordura subcutânea, podendo causar o encurtamento do sarcômero pelo frio, afetando diretamente na maciez da carne.

Figura 1 - Efeito da condição sexual e da suplementação com agonistas beta-adrenérgicos no comprimento de sarcômero, μm .

IM- Imunocastrados; NC – Não castrados
CON- Controle; RAC- Ractopamina; ZIL- Zilpaterol

Quanto a condição sexual, Lucero-Borja et al. (2014) ao compararem a carne de novilhas, novilhos e vacas não observaram diferenças no comprimento

de sarcômero, o que também foi relatado pelos autores Okeudo e Moss (2008), que avaliaram diferentes métodos de castração de cordeiros. Os trabalhos citados apresentam resultados que corroboram com os encontrados neste trabalho.

3.3. Expressão dos genes CAPN1, CAPN2 e CAST

Não foi observada nenhuma interação entre condição sexual e β AA ($P>0,05$) para os genes CAPN1 (μ - calpaina), CAPN2 (m-calpaina) e CAST (calpastatina) (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias, erro-padrão da média (EPM) e probabilidades da expressão gênica relativa, em função da condição sexual (CS) e dos agonistas beta-adrenérgicos (β AA).

Características	CS ¹		β AA ²			EPM	P- valor		
	IM	NC	CON	RAC	ZIL		CS	β AA	CS x β AA
μ - calpaina	0,99	0,96	1,17	1,07	0,74	0,192	0,864	0,255	0,368
m-calpaina	0,85	1,14	1,26	1,10	0,68	0,191	0,231	0,081	0,412
Calpastatina	0,98	1,11	1,30	1,23	0,71	0,186	0,620	0,072	0,261

¹ IM- Immunocastrado; NC- Não-castrado

² CON- controle; RAC- Ractopamina; ZIL - Zilpaterol

Não foi observado o efeito da condição sexual na expressão nos genes CAPN1, CAPN2 e CAST. Esses resultados não eram os esperados, pois alguns autores relatam o efeito da condição sexual na expressão desses genes. Koohmaraie et al. (2014), observaram que cordeiros castrados apresentaram alta expressão do gene m-calpaina logo após o abate e alta expressão da calpastatina aos 7 e 20 dias no postmortem quando comparados com cordeiros não castrados. Por outro lado, Morgan et al. (1993 b), observaram a redução da

atividade da calpastatina em animais castrados logo após o abate e após 24h do post mortem, justificando que o hormônio andrógeno pode aumentar a atividade da calpastatina em touros quando comparados a novilhos.

Não foi observado efeito dos β AA na expressão dos genes ($P>0,05$), no entanto houve uma tendência dos genes CAST e CAPN2 serem maiores para animais do grupo CON e RAC quando comparados com os do grupo ZIL. A expressão do gene CAPN1 não foi afetada pela suplementação com os β AA.

Estes resultados não foram os esperados, porque vários trabalhos na literatura descrevem que os β AA podem afetar a expressão dos genes, principalmente aumentando a atividade da calpastatina e reduzindo a atividade da calpaina (HOPE-JONES et al., 2010; MORGAN et al., 1993b). Muitos fatores, como espécie, raça, condição sexual e outras variações genéticas podem influenciar na atividade da calpastatina (KOOHMARAIE et al., 1995) e na expressão RNAm (BRADSLET et al., 1992).

No entanto, alguns autores não observaram efeitos dos β AA na expressão da m- e μ -calpain (STRYDOM et al., 2009), enquanto, Rathmann et al. (2009); Hilton et al., (2009) e Korn et al., (2014), observaram que bovinos suplementados com Zilpaterol, tenderam a reduzir a expressão da CAPN1, porém sem aumentar a atividade e a expressão de RNAm para CAST.

Alguns trabalhos relatam que animais suplementados com β AA apresentaram aumento na atividade das calpastatinas, conseqüentemente, redução na proteólise muscular e aumento da força de cisalhamento (queda da maciez) (LORENZEN et al., 2000; KOOHMARAIE et al., 1995; KOOHMARAIE et al., 1991).

Este trabalho avaliou somente a expressão dos genes e não a atividade. A ausência de diferença estatística na expressão dos genes de acordo com os tratamentos pode ser atribuído a dose e a duração da suplementação, pois a resposta máxima dos β AA é dependente dessas variáveis, sendo que a exposição constante dessas moléculas aos receptores pode causar a desensibilização ou inativação dos receptores (JOHNSON et al., 2014), gerando um “*down regulation*” na expressão RNAm.

Não foram observadas correlações entre a força de cisalhamento e a expressão dos genes CAPN1 (-0,12338; $P=0,3018$), CAPN2 (-0,16948; $P=0,1547$) e CAST (-0,11945; $P=0,3176$) em bovinos Nelore (Figura 2, 3, 4). A correlação entre CAPN1 e CAST foi significativamente maior que 0,90 ($P<0,0001$), e entre a CAPN2 e CAST foi de 0,96 ($P<0,0001$), indicando a presença efetiva das enzimas calpaina e calpastatina no músculo, porém sem efeito direto na maciez da carne.

Figura 2 - Relação entre a força de cisalhamento e a expressão do gene CAPN1 na carne.

Figura 3 - Relação entre a força de cisalhamento e a expressão do gene CAPN2 na carne.

Figura 4 - Relação entre a força de cisalhamento e a expressão do gene CAST na carne.

Esses resultados também não eram os esperados, porque a calpastatina está diretamente associado a alta força de cisalhamento, enquanto a calpaina com a baixa força de cisalhamento. Isso pode ser justificado pelo não efeito dos

tratamentos na expressão da calpastatina assim não influenciando na maciez, sendo mais um motivo para sugerir influência de outras enzimas no processo de amaciamento da carne.

Outros autores observaram resultados semelhantes, sugerindo uma possível uma explicação para estes resultados, pois os animais eram jovens e podem expressar outras enzimas envolvidas no processo de renovação proteica (GIUSIT et al., 2013). Segundo Goll et al. (1991) e Koohmaraie (1996), a proteólise mediada pela calpaina é crucial para a maciez da carne.

4. CONCLUSÕES

A condição sexual e a suplementação com os agonistas beta-adrenérgicos (Cloridrato de Ractopamina e Cloridrato de Zilpaterol) não afetaram o comprimento de sarcômero e expressão dos genes calpaína e calpastatina, porém, afetaram o perfil morfométrico muscular de bovinos Nelore confinados.

5. REFERÊNCIAS

AALHUS, J. L.; SCHAEFER, A.L.; MURRAY, A.C.; JONES, D.M. The effect of ractopamine on myofibre distribution and morphology and their relation to meat quality in swine. **Meat Science**. v.31, p.397–409,1992.

ASTM International. F2025-11. Standard specification for tenderness marketing claims associated with meat cuts derived from beef. Am. Soc. Testing Mater. Int., West Conshohocken, PA. 2011.

BRADSLET, R.G.; ALLCOCK, S.M.J.; DAWSON, J.M.; DUMELOW, N.W.; HIGGINS, J.A.; LASSLETT, Y.V.; LOCKLEY, A.K.; PARR, T.; BUTTERY, P.J. Effect of β -agonists on expression of calpain and calpastatin activity in skeletal muscle. **Biochimie**, v.74, p.267-273,1992.

BRANDSTETTER, A.M.; PICARD, B.; GEAY, Y. Muscle fibre characteristics in four muscles of growing male cattle II. Effect of castration and feeding level. **Livestock Production Science**, v.53, p.25-36,1998.

BRICOUT, V. A.; SERRUIER, B. D.; BIGARD, A. X. Clenbuterol treatment affects myosin heavy chain isoforms and MyoD content similarly in intact and regenerated soleus muscles. **Acta Physiol. Scand.** v.180, p.271–280, 2004.

BROOKE, M.H.; KAISER, K. Muscle fiber type: how many and what kind? **Archives of Neurology**, v.23, p.369-379,1970.

CLANCY, M.J.; LESTER, J.M.; ROCHE, J.F. The effects of anabolic agents and breed on the fibers of the longissimus muscle of male cattle. **Journal of Animal Science**, v.63, p.83-91,1986.

COOK, R. B., POPP, J. D., KASTELIC, J. P., ROBBINS, S.; HARLAND, R. The effects of active immunization against GnRH on testicular development, feedlot performance, and carcass characteristics of beef bulls. **Journal of Animal Science**, v.78, p.2778–2783,2000.

CORNFORTH, D. P.; HECKER, A. L.; CRAMER, D. A.; SPINDLER, A. A.; MATHIAS, M. M. Maturity and its relationship to muscle characteristics of cattle. **Journal of Animal Science**, v.50, p.75-80,1980.

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

DUBOWITZ, V.; BROOKE, M.. Muscle biopsy: a modern approach. London: W.B. Saunders Company, p.472,1984.

DUNSHEA, F. R. Effect of metabolism modifiers on lipid metabolism in the pig. **Journal of Animal Science**, v. 71, p.1966–1977, 1993.

EISEMANN, J. H., HUNTINGTON, G. B., FERRELL, C. L. Effects of dietary clenbuterol on metabolism of the hindquarters in steers. **Journal of Animal Science**, v.66, p.342–353,1988.

FIEMS, L. O.,BATJOENS, P.;UYTTERHAEGEN, L.; MOERMANS, R.J.; VAN HOFF, J.; BOUCQUE, C.V. The effects of cimaterol on myofiber and metabolic aspects in different strains of Belgian White-Blue bulls. In: Proc. 39th Int. Congr. on Meat Sci. And Tech. **p** 23 (Abstr.),1993.

FRITSCH, S.; SOLOMON,M.B.; PAROCZAY,E.W.; RUMSEY, T.S. Effects of growth-promoting implants on morphology of Longissimus and Semitendinosus muscles in finishing steers. **Meat Science**. v.56, p.229–237, 2000.

GARMYN, A. J.; BROOKS, J.C.; HODGEN, J. M.; NICHOLS, W.T.; HUTCHESON, J.P.; RATHMANN, R.J.; MILLER, M.F. Comparative effects of supplementing beef steers with zilpaterol hydrochloride, ractopamine hydrochloride, or no beta agonist on strip loin composition, raw and cooked color properties, shear force, and consumer assessment of steaks aged for fourteen or twenty-one days postmortem. **Journal of Animal Science**, v.92, p.3670-3684, 2014.

GOLL, D. E.; TAYLOR, R.G.; CHRISTIANSEN,J.A.; THOMPSON, V.F. Role of proteinases and protein turnover in muscle growth and meat quality. Pages 25–33 in Proc. 44th Annu. Reciprocal Meat Conf., Kansas State Univ., Manhattan. Natl. Livest. And Meat Board, Chicago, IL. 1991.

GONZALEZ, J.M.; CARTER, J.N.; JOHNSON, D.D.; OUELLETTE, S.E.; JOHNSON, S.E. Effect of ractopamine-hydrochloride and trenbolone acetate on longissimus muscle fiber area, diameter, and satellite cell numbers in cull beef cows. **Journal of Animal Science**, v.85, p.1893-1901, 2007.

GONZALEZ, J. M.; DIJKHUIS, R.D.; JOHNSON, D.D.; CARTER, J.N.; JOHNSON, S.E. Differential response of cull cow muscles to the hypertrophic actions of ractopamine-hydrogen chloride. **Journal of Animal Science**, v.86, p.3568–3574, 2008.

GONZALEZ, J. M.; JOHNSON S.E.; THRIFT, T.A.; SAVELL, J.D.; OUELLETTE, S.E.; JOHNSON, D.D. Effect of ractopamine hydrochloride on the fiber type distribution and shelf-life of six muscles of steers. **Journal of Animal Science**, v.87, p.1764–1771, 2009.

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

HADLICH, J.C. et al. Efeito do colágeno na maciez da carne de bovinos de distintos grupos genéticos. **Acta Scientiarum Animal Science**, Maringá, v. 28, n.1, p. 57-62, 2006.

HELFERICH, W. G., JUMP, D. B., ANDERSON, D. B., SKJAERLUND, D. M., MERKEL, R. A., BERGEN, W. Skeletal muscle α -actin synthesis is increased pretranslationally in pigs fed the phenethanolamine ractopamine. **Endocrinology**, v.126, p.3096–3100, 1990.

HILTON, G.G.; MONTGOMERY, J.L.; KREHBIEL, C.R.; YATES, D.A.; HUTCHESON, J.P.; NICHOLS, W.T.; STREETER, M.N.; BLANTON JR., J.R.; MILLER, M.F.. Effects of feeding zilpaterol hydrochloride with and without monensin and tylosin on carcass cutability and meat palatability of beef steers. **Journal of Animal Science**, v.87, p.1394–1406, 2009.

HOPE-JONES, M., STRYDOM, P.E., FRYLINCK, L., WEBB, E.C. The efficiency of electrical stimulation to counteract the negative effects of β -agonists on meat tenderness of feedlot cattle. **Meat Science**, v.86, p.699-705, 2010.

HOWARD, S. T., WOERNER D. R., VOTE D. J., SCANGA J. A., ACHESON R. J., CHAPMAN P. L., BRYANT T. C., TATUM J. D., BELK K. E. Effects of ractopamine hydrochloride and zilpaterol hydrochloride supplementation on carcass cutability of calf-fed Holstein steers. **Journal of Animal Science**, v.92, p.369–375,2014.

JOHNSON, B.; SMITH, S.B.; CHUNG, K.Y. Historical overview of the Effect of β -Adrenergic Agonists on beef cattle production. **Asian Australas.** v.27, p.757-766,2014.

JOO, S.T.; KIM, G.D.; HWANG, Y.H.; RYU, Y.C. Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics. **Meat Science.** v.95, p.828-836, 2013.

KIRCHOFER, K.S., CALKINS, C.B., GWARTNEY, B.L. Fiber type composition of muscles of the beef chuck and round. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2872–2878,2002.

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

KOOHMARAIE, M., SHACKELFORD, S. D.,WHEELER, T. L., LONERGAN, S. M., DOUMIT, M. E. A muscle hypertrophy condition in lamb (callipyge): Characterization of effects on muscle growth and meat quality traits. **Journal of Animal Science**, v.73, p.3596–3607,1995.

KOOHMARAIE, M.. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Science.** v.43, p.S193–S201, 1996.

KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L. Effects of a b-Adrenergic Agonist (L-644,969) and Male Sex Condition on Muscle Growth and Meat Quality of Callipyge Lambs. **Journal of Animal Science**, v.74, p.70-79, 2014.

KOOLMEES, P. A., BIJKER, P. G., VAN LOGTESTIJN, J. G., TUINSTRAMELGERS, J. Histometrical and chemical analysis of mechanically deboned pork, poultry and veal. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1830–1837,1986.

KORN, K.T.; LEMENAGER, R.P.; CLAEYS, M.C.; WADDELL, J.N.; ENGSTROM, M.; SCHOONMAKER, J.P.; Supplemental vitamin D3 and zilpaterol hydrochloride. II. Effect on calcium concentration, muscle fiber type, and calpain gene expression of feedlot steers. **Journal of Animal Science**, v.91, p.3332-3340,2013

LEE, Y. B.;KIM, Y.S.Muscle characteristics and meat tenderness of cimaterol-fed lambs. **J. Food Sci.** v.59, p.33,1994.

LIU, C. Y.; MILLS, S. E. Determination of the affinity of ractopamine and clenbuterol for the beta-adrenoceptor of the porcine adipocyte. **Journal of Animal Science**, v.67, p.2937–2942,1989.

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

LORENZEN, C.L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S.D.; JAHOOOR, F.; FREETLY, H. C.; WHEELER, T.L.; SAVEL, J.W.; FIOROTTO, M.L. Protein kinetics in callipyge lambs. **Journal of Animal Science**,, v.78,p.78-87, 2000.

LUCERO-BORJA, J.; POUZO, L.B.; TORRE, M.S.; LANGAMAN, L.; CARDUZA, F.; CORVA, P.M.; SANTINI, F.J.; PAVAN, E. Slaughter weight, sex and age effects on beef shear force and tenderness. **Livestock Science**. v.163, p.140-149,2014.

MCGLICHRIST, P.; GREENWOOD, P.L.; PETHICK D.W.; GARDNER, G.E. Selection for increased muscling in Angus cattle did not increase the glycolytic potential or negatively impact pH decline, retail colour stability or mineral contente.**Meat Science**. v. 114, p. 8-17, 2016.

MERSMANN, H. J. Overview of the effects of b-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. **Journal of Animal Science**, v.76, p.160 - 172,1998.

MIGUEL, Z.G.; FARIA, H.M.; ROÇA, O.R.; SANOT, T.C.; SUMAN, S.P.; FAITARONE, A.B.G.; DELBEM, N.L.C.; GIRAO, L.V.C.; HOMEM, J.M.; BARBOSA, E.K.; SU, L.S.; RESENDE, F.D.; SIQUEIRA, G.R.; MOREIRA, A.D.; SAVIAN T.V. Immunocastration

improves carcass traits and beef color attributes in Nellore and Nellore x Aberdeen Angus crossbred animals finished in feedlot. **Meat Science**. v.96, p.884-891,2013.

MOLONEY, A. P., ALLEN, P.; ROSS, D.B.; OLSON, G.; CONVEY, E.M. Growth, feed efficiency and carcass composition of finishing Friesian steers fed the beta-adrenergic agonist L-644,969. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1269–1277, 1990.

MORGAN, J. B., WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; CROUSE, J.D.; SAVELL, J.W. Effect of castration on myofibrillar protein turnover, endogenous proteinase activities, and muscle growth in bovine skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, v.71, p.408,1993a.

MORGAN, J. B., WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; SAVELL, J.W.; CROUSE, J.D. Meat tenderness and the calpain proteolytic system in longissimus muscle of young bulls and steers. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1471,1993b.

ONO, Y.; SOLOMON, M.B.; ELSASSER, T.H.; RUMSEY, T.S.; MOSELEY, W.M. Effects of Synovex-S₂ and recombinant bovine growth hormone (Somavubove) on growth responses of steers: II-Muscle morphology and proximate composition of muscles. **Journal of Animal Science**, v.74, p.2929–2934, 1996.

OKEUDO, N.J.; MOSS, B.W. Production performance and meat quality characteristics of sheep comprising four sex-types over a range of slaughter weights produced following commercial practice. **Meat Science**, v.80, p.522-528,2008.

PETER, J.B.; BARNARD, R.J.; EDGARTON, V.R.; GILLESPIE, C.A.; STAMPEL, G.E. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. **Biochemistry**, v.11, p.2627, 1972.

PICARD, B., DURIS, M.P., JURIE, C., Classification of bovine muscle fibres by different histochemical techniques. **Histochem. J.** v.30, p.473–479,1998.

RAJAB, P.; FOX, J.; RIAZ, S.; TOMLINSON, D.; BALL, D.; GREENHAFF, P.L. Skeletal muscle myosin heavy chain isoforms and energy metabolism after clenbuterol treatment in the rat. *J. Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, v.279, p.1076-1081,2000.

RATHMANN, R.J.; MEHAFFEY, J.M.; BAXA, T.J.; NICHOLS, W.T.; YATES, D.A.; HUTCHESON, J.P.; BROOKS, J.M.; JOHNSON, B.J.; MILLER, M.F. Effects of duration of zilpaterol hydrochloride and days on the finishing diet on carcass cutability, composition, tenderness, and skeletal muscle gene expression in feedlot steers. **Journal of Animal Science**, v.87, p.3686–3701, 2009.

SEIDEMAN, S.C., CROUSE, J.D., The effects of sex condition, genotype and diet on bovine muscle fibre characteristics. **Meat Science**. v.17, p.55–72, 1986.

SINK, J. D., TURGUT, H., & MANN, O. M. Dynamics of physiological changes in bovine myofibers during growth and sexual development. *Experimental Cell Biology*, v.53, p.170-179, 1985.

SMITH, S. M.; GARCIA, D. K.; ANDERSON, D. B. Elevation of a specific mRNA in longissimus muscle of steers fed ractopamine. **Journal of Animal Science**, v.67, p.3495–3502, 1989.

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

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

STRYDOM, P.E.; HOPE-JONES, M.; FRYLINCK, L.; WEBB, E.C. The effects of a beta-agonist treatment, Vitamin D3 supplementation and electrical stimulation on meat quality of feedlot steers. **Meat Science**, v.89, p.462-468, 2011.

VESTERGAARD, M.; HENCKEL, P.; OKSBJERG, N.; SEJRSEN, K. The effect of cimaterol on muscle fiber characteristics, capillary supply, and metabolic potentials of longissimus and semitendinosus muscles from young Friesian bulls. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2298-2306, 1994.

ZIMMERLI, U. V., BLUM, J.W. Acute and long term metabolic, endocrine, respiratory, cardiac and skeletal muscle activity changes in response to perorally administered (3-drenoceptor agonists in calves. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.** 63:157, 1990.

WEISS, W.P.; CONRAD, H.R.; ST. PIERRE, N.R. A theoretically based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Animal Feed Science and Technology**, v.39, p.95-110, 1992.

WILLIAMS, P. E. V., PAGLIANI, L., INNES, G. M., PENNIE, K., HARRIS, C. I., GARTHWAITE, P. Effects of a β -agonist (clenbuterol) on growth, carcass composition, protein and energy metabolism of veal calves. **British Journal of Nutrition**, v.57, p.417–428, 1987.

WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Effects of the β -adrenergic agonist L644,969 on muscle protein turnover, endogenous proteinase activities, and meat tenderness in steers. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3035–3043, 1992.

YOSHIOKA, M., BOIVIN, A., BOLDUC, C., ST-AMAND, J., Gender difference of androgen on skeletal muscle transcriptome. **J.Mol. Endocrinol.** v.39, p.119–133, 2007.

YOUNG, O.A., BASS, J.J., Effect of castration on bovine muscle composition. **Meat Science**. v.11, p.139–156, 1984.