UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CRISTINA TSCHORNY MONCAU

**Caracterização da qualidade da carne de bovinos cruzados terminados
em confinamento: uma abordagem proteômica**

Pirassununga

2016

CRISTINA TSCHORNY MONCAU

**Caracterização da qualidade da carne de bovinos cruzados terminados
em confinamento: uma abordagem proteômica**

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 Doutora em Ciências do programa de pós-graduação em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro

Pirassununga

2016

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

Moncau, Cristina Tschorny
M737c Caracterização da qualidade da carne de bovinos
cruzados terminados em confinamento: uma abordagem
proteômica / Cristina Tschorny Moncau; orientador
Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro. --
Pirassununga, 2016.
78 f.

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

1. Desmina. 2. Enriquecimento funcional. 3.
HSP. 4. *Longissimus thoracis*. 5. Maciez da carne. I.
Balieiro, Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho, orient.
II. Título.

Dedico...

À minha amada mãe, Elvira Tschorny Moncau, por todos estes 35 anos de carinho, compreensão, amizade, companheirismo e amor.

Aos meus queridos irmãos Jorge, Betinho e Regina, que me acompanharam e apoiaram durante estes anos de estudos.

*Ao meu eterno pai, José de Barros Moncau (in memoriam).
Pai, mais uma etapa concluída! Tenho certeza que o senhor me acompanhou durante todos esses anos, e me fez superar cada obstáculo. A saudade aperta meu coração neste momento, mas sei que o senhor está aqui, na primeira fila, aplaudindo nossa conquista, com um sorriso iluminado no rosto. Te amo eternamente!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me deu forças para terminar esta jornada tão árdua.

À minha família, que sempre me apoiou e incentivou a seguir os meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Júlio Cesar de Carvalho Balieiro, por mais esta oportunidade, ensinamentos, paciência e confiança.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), pelas oportunidades de crescimento pessoal e formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LnBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Engenharia e Materiais (CNPEN), em especial à Romênia Ramos Domingues, pela realização das análises de espectrometria de massas.

À Mônica Gonçalves da Silva, minha terapeuta e amiga. Sem nossos encontros teria desistido de tudo. Você me ajudou a enxergar e valorizar apenas o necessário para ser feliz. Agradeço do fundo do coração sua ajuda!

Ao Prof. Dr. Joanir Pereria Eler e à Dra. Alessandra Fernandes Rosa, por terem confiado mais uma vez em minha capacidade em desenvolver uma parcela do auxílio financeiro e projeto de pós-doc, respectivamente. Sem esta oportunidade não teria terminado meu doutorado... Muito obrigada!

A Fernanda Salvato, pelas dicas na realização das análises dos resultados de proteômica. Obrigada pela paciência!

À Dra. Mirele Daiana Poleti, por me auxiliar durante minhas dúvidas com as análises proteômicas.

À Bárbara e Renan Vignato, pelo companheirismo dentro e fora da faculdade. A amizade de vocês e os conselhos me fizeram superar todos os obstáculos deste doutorado. Obrigada!

À Simone Raymundo de Oliveira, bela surpresa de amizade conquistada neste doutorado. Obrigada por me socorrer toda vez que desabava em pessimismo e descrença da minha capacidade.

À Dra. Juliana Barbosa Casals, vizinha e amiga. Muito obrigada por me mostrar que não seria fácil, mas que eu seria capaz de vencer esta batalha. E principalmente por cuidar sempre dos meus pets.

À minha querida amiga Sabrina Ribeiro de Almeida Queiroz, por sempre me ouvir, me incentivar e mostrar que Deus possui planos muito maiores para nós.

À Elisângela Chicaroni de Mattos Oliveira pela amizade e momentos de descontração na hora do cafezinho.

Às companheiras de laboratório Leydiana e Mikaele. Obrigada pela parceria em desvendar os mistérios das análises proteômicas.

Aos colegas e amigos que conquistei nestes longos anos de FZEA, e que participaram de alguma forma de todas as conquistas que obtive até aqui. Citar nomes seria impossível, mas todos estão registrados em minha memória e coração. Obrigada!

Aos meus pets Logan, Milly, Barney e Toddy. O amor incondicional desses “filhos” me fez ver que a vida é muito mais simples do que pensamos. Basta amar e ser amado. E só!

E a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

***“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância.”***

John F. Kennedy

***“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes.”***

Marthin Luther King

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi quantificar as concentrações de *heat shock protein* (HSP) 27 e 70 no músculo *Longissimus thoracis* bovino e avaliar o perfil proteico das amostras no decorrer do processo de maturação, bem como, a relação com as características de qualidade da carne. Foram utilizados 191 animais $\frac{1}{2}$ Simental Sul Africano x $\frac{1}{2}$ Nelore ($\frac{1}{2}$ S x $\frac{1}{2}$ N), castrados e terminados em confinamento. Para qualidade da carne mensurou-se os valores de pH, cor (L^* , a^* e b^*), perda de água por cocção (PAC) e força de cisalhamento (FC) em dois tempos de maturação (um e 14 dias). Para a quantificação de HSP 27 e 70 foram selecionadas 40 amostras em função dos valores de FC, e separadas em dois grupos (mais e menos macia) com 20 amostras cada, dentro de cada tempo de maturação (48h e 14 dias). Para realização da análise proteômica foram selecionados três animais de cada grupo e tempo de maturação. A concentração de HSP 27 apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tempos de maturação dentro dos dois grupos estudados. Já para a HSP 70 verificou-se diferença significativa ($P < 0,05$) apenas para as amostras do grupo mais macia. A análise de correlação mostrou que as HSP 27 e 70 não interferiram nas características de qualidade da carne. A análise proteômica identificou seis proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) e o enriquecimento funcional demonstrou que essas proteínas estão relacionadas com processos biológicos e componentes celulares. A desmina e a glicérol-3-fosfato desidrogenase demonstraram correlação com a FC e coloração da carne, respectivamente. Os resultados indicam que as HSP 27 e 70 não podem ser apontadas como biomarcadores eficientes para qualidade de carne em animais $\frac{1}{2}$ S x $\frac{1}{2}$ N. Já a glicérol-3-fosfato desidrogenase demonstrou forte potencial em prever a estabilidade da cor da carne. Desmina pode ser apontada como um importante biomarcador candidato associado à maciez da carne em animais $\frac{1}{2}$ S x $\frac{1}{2}$ N.

Palavras chave: Desmina. Enriquecimento funcional. HSP. *Longissimus thoracis*. Maciez da carne.

ABSTRACT

The aim of this work was to quantify the concentrations of heat shock protein (HSP) 27 and 70 in *Longissimus thoracis* muscle and evaluate the protein profile of the samples during the aging process and its relationship with meat quality characteristics. A total of 191 steers $\frac{1}{2}$ Simmental South African x $\frac{1}{2}$ Nellore ($\frac{1}{2}$ S x $\frac{1}{2}$ N) feedlot-finished, were used in this work. For meat quality, pH values, color values (L^* , a^* and b^*), cooking loss (CL) and shear force (SF) were measured in two aging times (one and 14 days). For quantification of HSP 27 and 70, 40 samples were selected according to the SF values and separated into two groups (more and less tender) with 20 samples each, according to the aging time (one and 14 days). To perform the proteomic analysis were selected three animals from each group and aging time. The concentration of HSP 27 showed a significant difference ($P < 0.05$) between aging times within both groups. As for the HSP 70, there was a significant difference ($P < 0.05$) for the tenderness samples. Correlation analysis showed that the HSP 27 and 70 didn't affect the meat quality traits. The proteomic analysis identified six proteins differentially expressed ($P < 0.05$) and functional enrichment analysis demonstrated that these proteins are associated with biological processes and cellular components. Desmin and glycerol-3-phosphate dehydrogenase showed correlation with meat traits of SF and color, respectively. The results indicate that HSP 27 and 70 could not be identified as effective biomarkers for meat quality in $\frac{1}{2}$ S x $\frac{1}{2}$ N. However, glycerol-3-phosphate dehydrogenase showed a strong potential in predicting meat color stability. Desmin can be shown as a candidate biomarker associated with meat tenderness in $\frac{1}{2}$ S x $\frac{1}{2}$ N.

Keywords: Desmin. Functional enrichment. HSP. *Longissimus thoracis*. Meat tenderness.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gel de eletroforese unidimensional	23
Figura 2 – Esquema do ciclo de Cori.....	39
Figura 3 – Via KEGG 00010 (Glicólise/Gliconeogênese)	45
Figura 4 – Rede de interação proteína-proteína das proteínas totais em relação a maciez do músculo <i>Longissimus thoracis</i> de ½ Simental Sul Africano x ½ Nelore.....	47
Figura 5 – Rede de interação proteína-proteína das proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) em relação a maciez do músculo <i>Longissimus thoracis</i> de ½ Simental Sul Africano x ½ Nelore.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Número de observações (N), média, erro padrão (EP), coeficiente de variação (CV), valores de máximo e mínimo para as características de qualidade da carne	27
Tabela 2 – Número de observações (N), média, erro padrão (EP), coeficiente de variação (CV), valores de máximo e mínimo das mensurações de quantidade de HSP 27 e 70	30
Tabela 3 – Estimativas de média e erro padrão (EP) da concentração de HSP 27 e HSP 70 em um e 14 dias de maturação em relação à maciez da carne (mais macia e menos macia).....	31
Tabela 4 – Coeficientes de correlação entre as concentrações de HSP 27 e HSP 70 e as características de qualidade de carne (fenótipo).....	33
Tabela 5 – Resumo das análises de variância ($P < 0,05$) das proteínas diferencialmente abundantes	35
Tabela 6 – Estimativas de média e erro padrão (EP) das abundâncias das proteínas significativas ($P < 0,05$) em relação a maciez da carne (mais e menos macia) e tempo de maturação (um e 14 dias).....	35
Tabela 7 – Estimativas de média e erro padrão (EP) da abundância da proteína α -actinina 3 (Q0III9) em um e 14 dias de maturação em relação à maciez da carne (mais macia e menos macia).....	37
Tabela 8 – Estimativas de média e erro padrão (EP) da abundância da proteína fosfoglicerato mutase 2 (Q32KV0) em um e 14 dias de maturação em relação à maciez da carne (mais macia e menos macia).....	39
Tabela 9 – Coeficientes de correlação entre as proteínas diferencialmente abundantes e as características de qualidade de carne e concentração de HSP 27 e 70	41
Tabela 10 – Categorias significativas ($FDR < 0,05$) pela análise de enriquecimento funcional das proteínas diferencialmente abundantes, realizada no String 10.0.....	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Local.....	18
3.2	Animais e amostras	18
3.3	Análises físico-químicas	19
3.3.1	Cor e pH.....	19
3.3.2	Perda de água por cocção e força de cisalhamento	20
3.4	Quantificação de <i>heat shock proteins</i> (HSP 27 e HSP 70).....	20
3.5	Análise proteômica	21
3.5.1	Extração e quantificação de proteínas	21
3.5.2	Eletroforese unidimensional – SDS/PAGE.....	22
3.5.3	Digestão <i>in gel</i>	23
3.5.4	Identificação das proteínas	24
3.6	Análise estatística	25
3.7	Análise de enriquecimento funcional.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	Análises físico-químicas	27
4.2	Quantificação de <i>heat shock protein</i> (HSP 27 e HSP 70)	30
4.3	Análise proteômica	34
4.3.1	Enriquecimento funcional.....	42
5	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de proteína animal e desde a década de 2000 consolidou-se como uma potência mundial na produção e exportação de carne bovina. Em 2004 assumiu a primeira colocação dentre os exportadores e desde então vem se mantendo entre os três principais fornecedores mundiais, enviando carne para mais de 140 países (ABIEC, 2016a; BRASIL, 2014). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, a expectativa é que a produção brasileira de carne bovina seja responsável em suprir 44,5% do mercado mundial até 2020 (BRASIL, 2016a).

Com o quinto maior território do mundo, o Brasil possui aproximadamente 174 milhões de hectares voltados para a produção pecuária. Estima-se que 97% do rebanho brasileiro seja criado em sistema extensivo (com suplementação mineral), justificando a ocupação de 20% do território nacional com amplas áreas de pastagem (ABIEC, 2016a). Com aproximadamente 219,2 milhões de bovinos (USDA, 2016), o Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo. Aproximadamente 80% desse efetivo é composto por *Bos taurus indicus*, que são animais comprovadamente mais resistentes as doenças e possuem boa tolerância ao calor. O Nelore se destaca como o principal representante dessa subespécie, compreendendo 90% da população zebuína do país (ABIEC, 2016b). Essa ampla representatividade deve-se ao fato da raça ser extremamente rústica e possuir uma boa prolificidade, além da excelente adaptação às condições ambientais e ao sistema de produção brasileiro (CARVALHO, 2008).

O rebanho brasileiro ainda é composto por uma parcela (aproximadamente 20%) de *Bos taurus taurus*, concentrados principalmente na região sul do país. Com clima mais ameno e pastagens com maior valor nutritivo, os taurinos se adaptaram perfeitamente ao ambiente. Aberdeen Angus, Red Angus, Hereford e Simental são as principais raças taurinas criadas no país, e esses animais são criados em sistemas mais adaptados às suas necessidades, no que se refere a nutrição e controle de parasitas (ABIEC, 2016b).

Uma estratégia adotada pelos pecuaristas brasileiros para melhorar a produtividade do rebanho, é a utilização de cruzamentos industriais entre

zebuínos e taurinos. Essa ferramenta vem adquirindo muitos adeptos devido a heterose gerada, onde o cruzamento entre raças diferentes resulta em animais com melhor desempenho no que se refere à produtividade, resistência e precocidade quando comparados aos seus pais (ABIEC, 2016b).

A capacidade materna e a adaptabilidade são critérios relevantes a serem analisados no momento do cruzamento, uma vez que são características importantes nas condições de criação extensiva do ambiente tropical. Com isso, programas de cruzamentos vem utilizando animais Nelore e Simental para gerar um produto de qualidade superior. Os zebuínos possuem reconhecida contribuição na simplificação do manejo, devido sua adaptação ao sistema de produção extensivo e os taurinos demonstram excelência na precocidade de crescimento, no acabamento da carcaça e precocidade sexual (MARQUES, 2016).

Juntamente com a técnica de cruzamento, e com a finalidade de aumentar a eficiência e a produtividade da pecuária de corte, algumas estratégias como o uso do confinamento na fase de terminação, o semiconfinamento e a suplementação dos animais nos períodos de seca, vem sendo adotado pelos produtores. Com isso, ocorre redução do ciclo de produção e obtenção de uma carcaça mais bem-acabada, permitindo assim uma ampla diversificação de produtos a partir de um ambiente mais rústico. Atualmente, o Brasil pode atender uma vasta gama do mercado consumidor, desde nichos mais específicos, como carnes mais nobres (boutiques de carne e mercados estrangeiros) a cortes de menor valor, com maior ou menor teor de gordura (ABIEC, 2016a, b).

Para aumentar a competitividade da carne bovina nos mercados interno e externo, agregando valor e diversidade ao portfólio de produtos, a melhoria e padronização da qualidade da carne é primordial. Essa qualidade é dependente de diversos fatores intrínsecos (raça, sexo e idade) e extrínsecos (nutrição, manejo e ambiente) aos animais. Esses fatores, isolados ou em conjunto, serão responsáveis em definir a qualidade físico-química e sensorial da carne (BRIDI; CONSTANTINO, 2009).

A maciez é um dos principais atributos relacionado à qualidade da carne, uma vez que está diretamente relacionada à satisfação do consumidor. Garantir uma consistência na qualidade da carne, no que diz respeito a palatabilidade,

em especial a maciez, contribuirá para oportunidades de *marketing* mais rentáveis a toda cadeia produtiva da carne (MULLINS et al., 2016).

O mecanismo de amaciamento da carne vem sendo estudado há décadas por cientistas da carne, mas esses esforços ainda não foram capazes de elucidar todas as fases do processo. Porém, existe um consenso sobre duas questões principais: o primeiro passo da conversão do músculo em carne é o início da apoptose celular; e os mecanismos de amaciamento da carne são de natureza enzimática, envolvendo diversos sistemas proteolíticos intracelulares (OUALI et al., 2013). Apesar desse consenso, algumas dúvidas ainda permanecem, principalmente em relação as atividades das *heat shock proteins* (HSPs) nesse processo.

As HSPs são proteínas chaperonas (proteínas auxiliares), que possuem capacidade de interagir de forma reversível com outras proteínas, auxiliando na formação, dobramento e transporte transmembrana (CASTRO et al., 2013). Foram verificadas pela primeira vez em estudo de indução de estresse térmico em células de *Drosophila* e por isso nomeadas como proteína de choque térmico (HSP). Hoje é sabido que o aumento da síntese de HSP não ocorre unicamente em função do aumento de temperatura, mas sim a qualquer tipo de estresse suficientemente intenso (CASTRO et al., 2013; GERALDO, 2013).

Quando o organismo é submetido a condições ambientais adversas (estresse), o metabolismo tende a sintetizar mais HSP, auxiliando as células na identificação de proteínas danificadas e subsequente reparo. Além disso, as HSP possuem papel fundamental na manutenção da vida celular, uma vez que inibem a apoptose.

No momento do abate, o aporte de oxigênio e controle nervoso deixam de chegar à musculatura, levando o organismo a adaptar a maioria de seus processos metabólicos (ALVES; GOES; MANCIO, 2005). Na tentativa de manter a homeostase celular, o organismo aumenta a concentração de diversas proteínas de choque térmico, para evitar o aparecimento da morte celular por apoptose, impedindo dessa forma a degradação de proteínas musculares (OUALI et al., 2013).

Devido a sua função anti-apoptótica, estudos na área de qualidade da carne envolvendo as HSPs se tornaram importantes, uma vez que as células

musculares estão envolvidas no processo de apoptose *post mortem*, durante a transformação do músculo em carne. A função protetora das HSPs atrasa o processo de maturação da carne, atenuando a degradação de proteínas miofibrilares (OUALI et al., 2006).

A taxa de degradação das proteínas miofibrilares e consequente impacto à maciez vão depender da extensão da degradação da HSP 27 presente na amostra (BALAN; KIM; BLIJENBURG, 2014), uma vez que essa proteína está diretamente relacionada com a estabilidade da actina do citoesqueleto (BONCORAGLIO; MINOIA; CARRA, 2012). A HSP 70 possui papel fundamental no mecanismo de reparo proteico (renaturação) em células submetidas ao estresse, além da função de orientar no enovelamento de proteínas recém-sintetizadas (CASTRO et al., 2013).

Diversos estudos vêm mostrando as diferenças de abundância das HSPs e sua relação com as características de qualidade da carne, como maciez, cor e capacidade de retenção de água (LOMIWES et al., 2014). Pesquisas apontam a presença aumentada de HSP 27 nas amostras de carnes menos macias (BERNARD et al., 2007; CARVALHO et al., 2014; HWANG et al., 2005; KIM et al., 2008; PULFORD et al., 2008, 2009). O mesmo acontece com a HSP 70, onde animais com carne mais macia apresentam menor abundância desta proteína (CARVALHO et al., 2014; PICARD et al., 2010, 2014).

Devido a estreita relação entre a presença das HSPs e as características de qualidade da carne, muitos estudos apontam essas proteínas como possíveis biomarcadores de qualidade (BALAN; KIM; BLIJENBURG, 2014; CASSAR-MALEK; PICARD, 2016; KIM et al., 2011; OUALI et al., 2013; ZHANG et al., 2010). Porém, estudos mais recentes mostram que a abundância das HSPs varia conforme a raça, idade, condição sexual e musculatura investigada (MULLINS et al., 2016; PICARD et al., 2014).

As duas últimas décadas têm testemunhado os avanços técnicos no campo da genômica, proteômica e transcriptômica. Em particular, a combinação bem-sucedida entre proteômica e ciência da carne, gerou um avanço para a compreensão profunda da conversão do músculo em carne (WU et al., 2016). Com o intuito de verificar com maior eficiência as mudanças que ocorrem nos músculos durante o processo *post mortem*, a análise proteômica da carne

tornou-se um processo amplamente utilizado nas pesquisas (HWANG et al., 2005; JIA et al., 2006a, b, 2007; LAMETSCH; BENDIXEN, 2001).

Proteômica pode ser definida como a ciência que estuda as proteínas presentes em um determinado momento (WILKINS et al., 1996). É de natureza dinâmica em relação ao genoma e pode ser influenciada por diversos fatores relacionados com a síntese ou degradação de proteínas (JOSEPH; NAIR; SUMAN, 2015). Portanto, a proteômica é a ligação molecular entre a informação genética e características de qualidade da carne, que são fenotipicamente expressas a partir do genoma sob diferentes condições ambientais (HOLLUNG et al., 2007).

O processo de amaciamento da carne tem sido amplamente analisado e diversas alterações nas proteínas estruturais e miofibrilares foram relatadas durante o armazenamento *post mortem* (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010; LAMETSCH et al., 2003; MARINO et al., 2014; TAYLOR et al., 1995). A degradação *post mortem* de algumas proteínas musculares, como desmina, troponina T, titina e nebulina, não afetam apenas a maciez da carne, mas também determinam a quantidade de perda de água durante o processo de maturação e cozimento (GEESINK; KOOHMARAIE, 1999; HOPKINS; THOMPSON, 2002; HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010; LI et al., 2014). A alteração ou degradação das proteínas estruturais e miofibrilares, mesmo que em pequena extensão, pode resultar em modificações no músculo esquelético e, conseqüentemente, levar a grandes mudanças na qualidade final da carne (CONTRERAS-CASTILLO et al., 2016; LOMIWES et al., 2013; WU; CLERENS; FAROUK, 2014).

A capacidade de retenção de água (CRA) é uma característica comumente analisada em amostras maturadas, e está diretamente relacionada com a maciez final da carne. A diminuição da CRA da carne implica em perdas no valor nutritivo devido ao exudato liberado, resultando em carne mais seca e com menor maciez (ZEOLA et al., 2007). Foram verificadas mudanças no perfil proteico de amostras de músculo *Longissimus lumborum* bovino, estocadas por zero, um e sete dias. Essas proteínas foram relacionadas com o metabolismo de carbono, glicólise, metabolismo do piruvato e biossíntese de aminoácidos na análise de bioinformática, sendo três delas indicadas como potenciais

biomarcadores de capacidade de retenção de água – miosina de cadeia leve, HSP 27 e triose - fosfato isomerase. Amostras com menor CRA apresentaram maior abundância de HSP 27 e triose – fosfato isomerase e menor abundância de miosina (ZUO et al., 2016).

A cor da carne *in natura* é um dos atributos mais importantes que influenciam a intenção de compra e sua deterioração é considerada indesejável pelos consumidores, levando à rejeição do produto (CANTO et al., 2015). Estudos apontam que a coloração da carne é uma característica altamente específica de cada músculo (JOSEPH et al., 2012; KING; SHACKELFORD; WHEELER, 2011; MC KENNA et al., 2005) e o *Longissimus lumborum* (LL) é o que apresenta maior estabilidade da cor, devido ao baixo consumo de oxigênio (O'KEEFFE; HOOD, 1982) e alta atividade redutora da metamioglobina (LEDWARD, 1985; SEYFERT et al., 2006). Abordagens proteômicas documentaram a contribuição das proteínas sarcoplasmáticas na alteração da cor nas amostras cárneas (JOSEPH et al., 2012; NAIR et al., 2016). Já a manutenção da estabilidade da cor estaria envolvida com a abundância de proteínas chaperonas e antioxidantes nas amostras (HWANG et al., 2005; JOSEPH et al., 2012). No entanto, os mecanismos moleculares das variações da cor da carne ainda não estão completamente compreendidos, sendo necessário a realização de novas pesquisas para investigar as mudanças pós-traducionais das proteínas, bem como a importância da mitocôndria na manutenção/alteração da estabilidade da cor da carne (JOSEPH; NAIR; SUMAN, 2015).

O uso da proteômica no campo da ciência da carne ganhou robustez e precisão nas últimas décadas, e os avanços nas técnicas de espectrometria de massas e bioinformática, tem sido amplamente utilizadas para explicar as bases fundamentais dos fenômenos de qualidade da carne.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Quantificar as concentrações de HSP 27 e 70, assim como traçar o perfil proteico do músculo *Longissimus thoracis* de animais machos castrados, ½ Simental Sul Africano x ½ Nelore, terminados em confinamento, analisando o comportamento dessas proteínas no decorrer do processo de maturação (um e 14 dias) e sua relação com as características de qualidade da carne (pH, cor, perda de água por cocção e força de cisalhamento).

2.2 Objetivos específicos

- (i) Avaliar as características indicadoras da qualidade da carne de bovinos machos castrados, ½ Simental Sul Africano x ½ Nelore, terminados em confinamento;
- (ii) Quantificar as concentrações de HSP 27 e 70, em músculo *Longissimus thoracis* de bovinos machos castrados, ½ Simental Sul Africano x ½ Nelore, terminados em confinamento;
- (iii) Correlacionar as concentrações de HSP 27 e 70 com as características indicadoras da qualidade da carne (pH, cor, perda de água por cocção e força de cisalhamento);
- (iv) Caracterizar o perfil proteico de bovinos machos castrados, ½ Simental Sul Africano x ½ Nelore, terminados em confinamento;
- (v) Correlacionar as proteínas diferencialmente abundantes com as características indicadoras da qualidade da carne (pH, cor, perda de água por cocção e força de cisalhamento) e com as concentrações de HSP 27 e 70.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local

A presente pesquisa foi conduzida na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), sediada na cidade de Pirassununga – São Paulo. As análises de maciez da carne foram realizadas no Laboratório de Avaliação Animal e Qualidade de Carne (LAAQC), do Departamento de Zootecnia (ZAZ). A quantificação das HSPs foi realizada no Laboratório de Estudos Avançados em Ciência da Carne (LEACC), do Departamento de Medicina Veterinária (ZMV), assim como a corrida eletroforética e a digestão das proteínas. A identificação das proteínas foi realizada no Laboratório Nacional de Biociências do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LnBio - CNPEM), localizado em Campinas – São Paulo.

3.2 Animais e amostras

Neste trabalho foram avaliados 191 bovinos machos castrados, provenientes do cruzamento entre fêmeas Nelore e machos Simental Sul Africano. Os animais, pertencentes a Agropecuária Zurita, foram recriados a pasto e terminados em confinamento.

Após o desmame, que aconteceu aos oito meses de vida, os animais permaneceram a pasto até atingirem peso vivo de aproximadamente 350kg, sendo então transferidos para o confinamento. A dieta inicial (crescimento) no confinamento foi composta por 70% de volumoso e 30% de concentrado (70:30), sendo administrada até que os animais atingissem 400kg de peso vivo. Em seguida, como dieta de terminação, foi ofertada ração formada por 56% de volumoso e 44% de concentrado (56:44), até que os animais chegassem ao peso final de aproximadamente 500kg e idade média de 18-20 meses.

Ao término do período de confinamento os animais foram transportados para o frigorífico, localizado a 210km da fazenda. Os animais foram submetidos ao jejum de sólidos por aproximadamente 12 horas, para então serem abatidos

conforme exigido pela legislação brasileira. A insensibilização foi realizada através de atordoamento por pistola pneumática penetrante (concussão cerebral), e a sangria se deu pela seção dos grandes vasos do pescoço. Prosseguiu-se então com a esfolagem, evisceração, divisão e lavagem das carcaças, conforme procedimento padrão do frigorífico.

Após o abate as carcaças foram mantidas refrigeradas em câmara fria (0° a 2°C) por 48 horas, quando então foram mensurados os valores de pH. Foi realizada a desossa, onde dois bifes de 2,54cm foram retirados do músculo *Longissimus thoracis*, na região entre 10ª e 12ª costelas. Esses bifes foram então embalados individualmente a vácuo, em filme plástico de alta barreira, e mantidos em processo de maturação em câmara fria (0° a 2°C) por um e 14 dias.

No momento da realização da análise de maciez, após cada período de maturação, foram coletados aproximadamente 5g de carne de cada bife, e essas amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, para realização das análises de quantificação de HSP 27 e 70 e análise proteômica. Em seguida, foram mensurados os dados de qualidade da carne (pH, cor, perdas de água por cocção e força de cisalhamento).

3.3 Análises físico-químicas

3.3.1 Cor e pH

O valor de pH foi medido com auxílio de pHmetro digital portátil (*Oakton, pH 11 Series*), nos bifes maturados por um e 14 dias.

Os valores de cor foram mensurados com colorímetro portátil (*Konica Minolta, CM-2500d*), nos dois tempos de maturação (um e 14 dias). Foi utilizado a escala L*, a* e b*, do sistema CIE (1976), com fonte de luz de D₆₅, ângulo de observação de 10° e abertura da célula de medida de 30mm. A calibração do aparelho se deu através de medição de um padrão branco (L* = 93,80, a* = -0,89 e b* = 0,95) e preto (L* = 1,19, a* = 1,27 e b* = 1,92). As medidas foram realizadas em três pontos distintos do bife, evitando-se região com nervuras, e utilizando-se como valor determinado a média dessas três medições.

3.3.2 Perda de água por cocção e força de cisalhamento

A perda de água por cocção (PAC) e a força de cisalhamento (FC) foram realizadas conforme metodologia proposta pela *American Meat Science Association* – AMSA (1995).

Ao término de cada tempo de maturação os bifes foram assados em forno elétrico (Feixa de Ouro, F05) com temperatura controlada (170°C). O monitoramento da temperatura interna das amostras foi realizado por termopares digitais *Data Logger (700-10s, Gulterm)*. Para manutenção de um cozimento uniforme, os bifes foram virados ao atingir 42°C e aos 71°C retirados do forno. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e embaladas em filme plástico. Os bifes foram armazenados em geladeira comum (4°C) por 24 horas.

Os valores de PAC foram calculados através dos pesos das amostras antes e depois do cozimento e apresentadas em porcentagem.

Para mensuração da força de cisalhamento, foram retirados, com auxílio de vazador elétrico (*Ferrari, FG-13B*), de seis a oito cilindros de 1,27cm de diâmetro (1/2”) de cada bife. Esses foram então cisalhados no aparelho tipo *Warner-Bratzler Shear Force* mecânico (*Salter, 235*), utilizando-se sonda com deslocamento de 500mm/min de velocidade. A força de cisalhamento deu-se pela média aritmética dos cilindros retirados de cada bife.

3.4 Quantificação de *heat shock proteins* (HSP 27 e HSP 70)

Para realização desta análise, foram escolhidos 40 animais. A seleção deu-se pelos valores de pH e variação de FC obtidos nas análises anteriores. Todos os animais selecionados para essa análise tiveram pH final entre 5,21 e 5,79. Para característica de maciez, foram escolhidos 20 animais com maior variação de FC e 20 animais com menor variação de FC, caracterizando animais com carne mais macia e menos macia, respectivamente. A quantificação foi realizada nas 40 amostras (20 mais macias e 20 menos macias), nos dois tempos de maturação (um e 14 dias), totalizando 80 amostras.

As amostras (250µg) foram homogeneizadas com auxílio de um dispersor (*IKA, Ultra Turrtec T-10*) em 2,5mL de tampão de extração fosfato-salino (PBS) 10x concentrado, por 15 segundos a 30000rpm. O homogenato foi centrifugado a 10000g, a 4°C por 30 minutos, e o sobrenadante estocado a -80°C.

As quantificações foram realizadas em *kits* imunoenzimáticos disponíveis comercialmente (*MyBioSource's, Bovine Heat Shock Protein 27 ELISA Kit* e *Bovine Heat Shock Protein 70 ELISA Kit*) e utilizados conforme instrução do fabricante. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

Foi realizada, em duplicata, a quantificação das proteínas totais das amostras pela metodologia de Bradford (1976). Dessa forma, os resultados das quantificações de HSP 27 e HSP 70 foram expressos em função da quantidade de proteína total de cada amostra (pg HSP/mg Proteína total).

3.5 Análise proteômica

Para realização desta análise, foram separados seis animais dos 40 selecionados anteriormente para a quantificação das HSPs. Foram escolhidos três animais com FC mais baixa e três animais com FC mais alta (extremos de maciez), caracterizando animais com carne mais macia e menos macia, respectivamente. A análise proteômica das seis amostras foi realizada em cada tempo de maturação (um e 14 dias), totalizando 12 amostras.

3.5.1 Extração e quantificação de proteínas

A extração foi realizada conforme proposto por Lametsch et al. (2003). Foram pesados 500µg de cada amostra e adicionados 2mL de tampão de extração (Ureia 8M, Tioureia 2M, CHAPS 2%, DTT 65mM) e 1% de inibidor de protease (*GE Healthcare*). As amostras foram então homogeneizadas (*IKA, Ultra Turrtec T-10*) por um minuto, a 30000rpm. Em seguida, o extrato foi agitado (*Heidolph, Unimax 2010*) vigorosamente por 30 minutos a 4°C, sendo posteriormente centrifugados a 4°C, por mais 30 minutos, a 10000g. O sobrenadante foi transferido para microtubos e estocados a -80°C.

A quantificação das proteínas de cada amostra foi realizada com auxílio do kit comercial *PlusOne 2-D Quant* (GE Healthcare), seguindo instruções do fabricante.

3.5.2 Eletroforese unidimensional – SDS/PAGE

A eletroforese unidimensional foi realizada em cuba horizontal (GE Healthcare, Amersham™ ECL™ Gel Box) com capacidade para um gel (GE Healthcare, Amersham™ ECL™ Gel 10%) por corrida. Foram realizadas duas corridas, onde cada gel recebeu seis amostras.

Para realização da eletroforese, o gel foi previamente tratado, conforme solicitado pelo fabricante. Foram acrescentados 90mL de tampão de corrida Laemmli (1970) 1x concentrado (25mM tris base, 192mM glicina, 0,1% SDS) em cada um dos dois compartimentos da cuba. Em seguida, o gel foi colocado na cuba e iniciou-se uma pré-corrida de 12 minutos a 160V.

As amostras (extratos proteicos) foram diluídas em tampão (0,5M tris - HCl – pH 6,8, glicerol, 10% SDS, 2-mercaptoetanol, 1% azul de bromofenol), aquecidas a 100°C por quatro minutos e em seguida pipetadas no gel previamente preparado. Cada amostra foi pipetada em um “pocinho” distinto, contendo aproximadamente 50µg de proteína em cada solução (tampão + extrato). No primeiro “pocinho” do gel foi pipetado 10µL do marcador de peso molecular, com escala proteica de 10 a 170kDa (*Thermo Scientific, PageRuler Prestained Protein Ladder*). A corrida foi realizada a 160V por vinte minutos, até atingir ¼ da capacidade total do gel. Esse procedimento foi realizado conforme solicitado pelo LnBio - CNPEM, para que as proteínas ficassem concentradas em uma menor quantidade de gel, facilitando a digestão das mesmas e otimizando o processo de identificação.

Os géis foram colocados em solução de fixação (ácido acético 10%, etanol 40%), sob agitação (*Heidolph, Unimax 2010*), por 30 minutos. Em seguida foram transferidos para solução corante (8% sulfato de amônio, 0,8% ácido fosfórico, 0,08% azul de coomassie G-250, 20% metanol) por 45 minutos (Figura 1), sob agitação (*Heidolph, Unimax 2010*). O excesso de corante foi retirado por meio de lavagens com água destilada.

Figura 1 – Gel de eletroforese unidimensional

A 1ª coluna, da esquerda para a direita, representa o marcador de peso molecular (10-170kDa) e as 2ª a 7ª colunas representam as amostras analisadas.

Fonte: Própria autoria.

3.5.3 Digestão *in gel*

Cada amostra do gel (“pocinho”) foi dividida em cinco pequenos pedaços e cada subparcela foi picotada em fragmentos de aproximadamente 1mm³ e acondicionados em microtubos devidamente identificados. Com isso, foi gerado um novo subgrupo de amostras, totalizando 60 unidades.

A digestão das proteínas do gel foi realizada conforme proposto por Shevchenko et al. (2006). A primeira etapa consistiu em retirar todo o corante do gel, através de três lavagens consecutivas, de 10 minutos cada, com solução de descoloração (ACN 50% em AmBic 25mM). Em seguida, as amostras foram desidratadas com ACN 100%, por 10 minutos, sendo essa etapa repetida mais uma vez. O excesso de ACN foi retirada dos tubos com auxílio de pipeta e o resíduo remanescente evaporou naturalmente a temperatura ambiente. A etapa seguinte realizada foi a redução (DTT 20mM em AmBic 50mM), onde os fragmentos de gel permaneceram por 40 minutos a 56°C. Após a incubação, os microtubos foram rapidamente centrifugados para completa remoção da solução de redução dos géis. Na sequência as amostras foram alquiladas (IAA 55mM em AmBic 50mM) e incubadas no escuro, em temperatura ambiente por 30 minutos. O excesso de solução de alquilação foi retirada após centrifugação e os fragmentos de gel foram lavados com solução AmBic 25mM. Após esta fase, as amostras foram mais uma vez desidratadas com ACN 100%, conforme descrito anteriormente.

Para a digestão das proteínas do gel, foram utilizados 30µL tripsina (Promega, *Sequencing grade modified trypsin*), com concentração de 20ng/µL, em cada amostra. Essas foram incubadas por 15 minutos a 4°C, para que a tripsina penetrasse nos fragmentos de gel. Em seguida, o excesso de tripsina foi retirado e acrescentou-se solução AmbiC 50mM até a cobertura completa do gel. Essas amostras foram então mantidas a 37°C por 14 horas. A reação de digestão foi então interrompida com adição de solução bloqueadora (ácido fórmico 5% em ACN 50%). O sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo microtubo (microtubo digestão).

Os fragmentos de gel ainda receberam solução de eluição I (ácido fórmico 1% em metanol 60%) e eluição II (ácido fórmico 1% em ACN 50%). As amostras foram incubadas por 15 minutos a 40°C e agitadas em *vortex* a cada cinco minutos. Tanto a eluição I quanto a II foram realizadas por duas vezes. Em cada etapa de eluição, o sobrenadante foi recuperado e colocado no microtubo da digestão. Em seguida, os fragmentos foram mais uma vez desidratados, conforme descrito anteriormente, e o sobrenadante foi recuperado para o microtubo da digestão. Esses tubos foram então colocados em concentrador a vácuo, à temperatura ambiente, para secagem quase que completa (~1µL/tubo) do sobrenadante.

As amostras foram ressuspendidas em 10µL TFA 0,1%, agitadas em *vortex* e dessalinizadas com auxílio de colunas de fase reversa C-18 (*Millipore, Zip Tip*), conforme orientação do fabricante. Em seguida as amostras foram secas em concentrador a vácuo à temperatura ambiente.

3.5.4 Identificação das proteínas

As amostras foram ressuspendidas em 30µL de solução de ácido fórmico 0,1% em acetonitrila 50%, homogeneizadas em *vortex* e centrifugadas à temperatura ambiente por cinco minutos. Em seguida, 15µL do sobrenadante foram pipetados em tubo *vial* e congelado a -20°C até o momento da injeção da amostra do espectrômetro de massas.

Para a análise de proteína, uma alíquota de 4,5µL foi separada através de coluna de fase reversa C18 (100µm x 100mm), utilizando-se cromatógrafo de

alto desempenho *nanoAcquity* (Waters, *nanoACQUITY Ultra Performance LC*) acoplado ao espectrômetro de massas (Waters, *Q-TOF Premier*) com fonte de ionização tipo *nanoelectrospray*, a uma taxa de fluxo de 0,6µL/min. Foi utilizado gradiente de 2-90% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% por 50 minutos. A tensão de *nanoelectrospray* foi ajustada para 3,5kV, com voltagem de cone de 30V e temperatura da fonte de 100°C. O instrumento foi operado no modo "top three", em que um espectro de MS é adquirido seguido por MS/MS dos três principais picos mais intensos detectados.

Os espectros foram adquiridos utilizando o *software MassLynx* v.4.1, sendo os arquivos de dados brutos (.raw) convertidos para o formato "peak list" (.mgf) pelo *software Mascot Distiller* v.2.3.02 (Matrix Science Ltd.), onde as proteínas foram identificadas. A carbamidometilação foi utilizada como modificação fixa, a oxidação de metionina como modificação variável, máximo de um sítio de clivagem de tripsina perdido e tolerância de 0,1Da para fragmentação (MS/MS). Os resultados encontrados foram confrontados com o banco de dados *UniProt Bos taurus* 2015 (5993 sequências revisadas). Os dados em formato .dat obtidos foram analisados com o *software Scaffold* v.4.5.3 (Proteome Software) e a quantificação das proteínas foi realizada através da contagem de espectros totais normalizados.

3.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando um modelo linear misto, contemplando os efeitos fixos de grupo de carne (menos macia x mais macia), tempo de maturação (um dia x 14 dias *post mortem*), interação entre o tipo de carne e o tempo de maturação, além dos efeitos aleatórios animal e resíduo. Foi considerado que as medidas foram repetidas nas mesmas unidades experimentais, adotando matriz não-estruturada para avaliação das covariâncias entre as mensurações. Primeiramente foram avaliadas as concentrações de HSP 27 e HSP 70 e as variáveis indicadoras da qualidade da carne (pH, cor, PAC e FC), e posteriormente, a abundância das proteínas identificadas e as variáveis indicadoras da qualidade da carne (pH, cor, PAC e FC).

As análises foram realizadas com auxílio do procedimento PROC MIXED do programa *Statistical Analysis System* (SAS), versão 9.1.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Para avaliar as possíveis relações existentes entre as concentrações das HSPs, variáveis indicadoras da qualidade da carne e proteínas diferencialmente abundantes, foram realizadas análises de correlação Momento-Produto de *Pearson*, por meio do procedimento PROC CORR do programa supracitado.

3.7 Análise de enriquecimento funcional

A análise de interação proteína-proteína, anotação para termos da ontologia gênica (*Gene Ontology* - GO) e identificação de vias metabólicas (KEGGs – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) foram realizadas por meio do programa *String* 10.0 (SZKLARCZYK et al., 2015), considerando um score de confiança de 0,4 para as interações. Um teste exato de Fisher foi realizado contra o genoma de *Bos taurus* para avaliar a significância dos termos de GO, os quais são divididos em três subcategorias que incluem componente celular (CC), função molecular (FM) e processos biológicos (PB).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises físico-químicas

A Tabela 1 apresenta os números de observações (N), estimativas de médias (média), erro padrão (EP), coeficientes de variação (CV), mínimo e máximo para as características relacionadas à qualidade da carne maturada por um e 14 dias, das 40 amostras selecionadas.

Tabela 1 – Número de observações (N), média, erro padrão (EP), coeficiente de variação (CV), valores de máximo e mínimo para as características de qualidade da carne

Fenótipo	N	Média	EP	CV	Mínimo	Máximo
pH 1d	23	5,4665	0,1076	1,9684	5,2100	5,6500
pH 14d	33	5,5982	0,1221	2,1816	5,2900	5,8400
PAC 1d	40	27,6031	4,7276	17,1271	17,8526	42,2171
PAC 14d	39	28,1451	3,1992	11,3669	22,0033	36,0754
L* 1d	40	31,5968	5,0644	16,0281	19,9100	38,5000
L* 14d	39	30,7351	5,4986	17,8902	19,4500	43,3400
a* 1d	40	14,5733	3,5459	24,3319	8,9600	24,1500
a* 14d	39	16,2846	2,9567	18,1567	10,6100	21,5000
b* 1d	40	9,7420	4,2376	43,4982	4,6900	21,0500
b* 14d	39	15,6636	4,9071	31,3283	6,9500	22,7400
FC 1d	40	8,5875	1,4805	17,2407	4,0500	11,2500
FC 14d	39	4,7436	1,8437	38,8672	1,9500	9,7500

pH 1d e 14d = pH intramuscular mensurado a um e 14 dias de maturação; PAC 1d e 14d = perda de água por cocção (%) mensurada nos bifes com um e 14 dias de maturação; L*, a* e b* 1d e 14d = mensuração de cor realizada nos bifes com um e 14 dias de maturação; FC 1d e 14d = força de cisalhamento (kg) determinada nos bifes com um e 14 dias de maturação. Mensurações realizadas no músculo *Longissimus thoracis*.

Frylinck et al. (2013) verificaram pH_{20h} médio de 5,64 para animais Simental cruzados terminados em confinamento. Lage et al. (2012) encontraram valores similares para pH_{24h} (5,69), ao trabalharem com animais ½ Simental x ½ Nelore, também terminados em confinamento. As mensurações citadas apontam para valores de pH de carnes normais, corroborando com os resultados encontrados neste estudo. Com a morte do animal, o sistema circulatório entra em colapso e inicia-se então a glicólise *post mortem*, que irá resultar no acúmulo de ácido láctico no músculo e consequente declínio do pH. Nos bovinos essa queda do pH é lenta, iniciando-se em valores próximos de 7,0 até atingir 5,4 a

5,8 em carnes normais, após 24 horas *post mortem* (MALTIN et al., 2003; TORNBERG, 1996; WULF, 2002; YOUNG et al., 2004).

Os valores médios de PAC foram semelhantes aos resultados encontrados em outras pesquisas. Whipple et al. (1990a), trabalhando com animais cruzados (taurino x zebuino) verificaram uma variação de valores PAC de 26,1 a 31,6%, em carnes maturadas por um e 14 dias. Aroeira et al. (2016) verificaram valores semelhantes para animais Angus e Nelore, com médias de 21,06% e 29,96% em amostras com zero e 14 dias de maturação. Soji e Muchenje (2016) observaram média de 25,2% de PAC em estudo com gado Simental. Porém, em pesquisa realizada por Lage et al. (2012), onde amostras de *Longissimus* foram desossadas e diretamente congeladas, foram verificados valores de PAC de 17,76%, para animais cruzados (Nelore x Simental), assim como resultados observados por Chambaz et al. (2003), que verificaram valores de PAC médios de 17,1% aos 14 dias de maturação em amostras de Simental.

A perda de água durante a cocção está diretamente relacionada com a capacidade de retenção de água (CRA) e possuem relação inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a CRA, menor a PAC na amostra. É possível observar que os valores de PAC encontrados na literatura e neste experimento são muito variados. Isso acontece porque a CRA é influenciada por diversos fatores, como espécie, idade, função muscular, velocidade e extensão da queda do pH, velocidade de resfriamento, acondicionamento da carne e quantidade de gordura intramuscular. Somando-se a isso, durante o processo de cozimento, os valores de PAC podem ser maiores ainda, dependendo do tempo e temperatura de cozimento. Amostras com maior quantidade de gordura intramuscular tendem a ter menos perda também, possivelmente devido às mudanças estruturais ocasionadas pelo aumento da CRA gerada pela presença de gordura. Adicionalmente, ainda ocorrem alterações significativas nas proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas (desnaturação proteica), diminuindo ainda mais a CRA da amostra. O ponto de menor CRA das proteínas musculares é quando as carnes atingem o pH final de 5,4 - 5,5. Essas proteínas encontram-se com aproximação máxima dos filamentos grossos e finos, acarretando na diminuição ou até no desaparecimento do espaço entre eles. Tal condição impossibilita a ligação destas moléculas com a água, reduzindo sua CRA. Sendo assim, valores

de pH final alto tendem a gerar carnes com PAC menores; já a queda acelerada do pH durante o *rigor mortis* aumenta o valor de perda de exsudato durante o cozimento. (LAWRIE, 2005). Todas essas especificidades irão interferir diretamente na qualidade da carne, em especial na maciez.

Em estudo realizado com animais Simental, Soji e Muchenje (2016) verificaram valores médios de L* (31,1), a* (14,5) e b* (10,8) bem semelhantes aos encontrados no presente estudo. Frylinck et al. (2013) e Chambaz et al. (2003) encontraram valores para L* e a* dentro da mesma média, mas com diferentes valores de b* (6,3 e 4,1 respectivamente). A mudança da cor na carne é resultado de diversas alterações bioquímicas que ocorrem na mioglobina. Segundo Karamucki et al. (2011), valores baixos de b* são caracterizados por uma maior concentração de deoximioglobina (mioglobina reduzida) na amostra, caracterizada pela cor vermelho-púrpura. A maior concentração deste composto na carne pode ser justificada pelo uso de embalagem à vácuo nas amostras. Neste tipo de acondicionamento, ocorre a formação de metamioglobina, que é a mioglobina oxidada (cor marrom). Com a ausência de oxigênio no ambiente, o pigmento de metamioglobina será reduzido pelas condições redutoras normais da carne, formando a deoximioglobina (RAMOS; GOMIDE, 2007).

Em experimento com Simental Sul Africano cruzado terminado em confinamento, Frylinck et al. (2009) verificaram média de valores de força de cisalhamento (FC) de 9,52kg e 6,22kg aos um e 14 dias de maturação, respectivamente. A variação de aproximadamente 35% nos valores de FC corroboram com a encontrada nesta pesquisa, onde foi verificado uma variação de 45% entre um e 14 dias de maturação. Esta melhora nos valores de maciez (queda na FC) se deve a proteólise das proteínas miofibrilares, que são evidenciadas durante o processo de maturação da carne (KOOHMARAIE, 1996).

Soji e Muchenje (2016), estudando diversas raças, verificaram valores médios de força de cisalhamento de 4kg para raça Simental, em amostras maturadas por sete dias. Nossas amostras, maturadas por 14 dias, atingiram valores médios superiores ao citado anteriormente. Essa diferença pode ser explicada pela interferência do genótipo *Bos taurus indicus* existente no cruzamento, uma vez que animais zebuínos tendem a ter uma carne menos macia, conforme descrito por diversos pesquisadores (CROUSE et al., 1989;

JOHNSON et al., 1990; RESTLE et al., 1999; SHACKELFORD et al., 1991; WHIPPLE et al., 1990a, b).

4.2 Quantificação de *heat shock protein* (HSP 27 e HSP 70)

Na Tabela 2 estão descritos os números de observações (N), estimativas de médias (média), erro padrão (EP), coeficientes de variação (CV), mínimo e máximo das mensurações de quantidade de HSP 27 e 70 das carnes maturadas por um e 14 dias.

Tabela 2 – Número de observações (N), média, erro padrão (EP), coeficiente de variação (CV), valores de máximo e mínimo das mensurações de quantidade de HSP 27 e 70

Variável	N	Média	EP	CV	Mínimo	Máximo
HSP 27 1d	40	192,2229	42,6265	22,1755	140,2530	377,2747
HSP 27 14d	40	153,2607	50,7206	33,0943	77,3518	256,3910
HSP 70 1d	40	23,5616	8,5310	36,2072	11,7026	45,3661
HSP 70 14d	40	29,6935	7,9502	26,7743	14,4892	54,0781

HSP 27 1d e 14d = concentração de HSP 27 ((pg/mg)/prot. total) determinada nas amostras com um e 14 dias de maturação; HSP 70 1d e 14d = concentração de HSP 70 ((pg/mg)/prot. total) determinada nas amostras com um e 14 dias de maturação. Mensurações realizadas no músculo *Longissimus thoracis*.

É possível verificar que a concentração média de HSP 27 diminuiu durante o período de maturação (Tabela 2). Já os valores médios de HSP 70 tiveram leve aumento de um para 14 dias de maturação (Tabela 2). Nossas amostras tiveram uma variação de pH de 5,21 a 5,65 nas amostras com um dia de maturação e 5,29 a 5,84 nas amostras com 14 dias de maturação (Tabela 1). Pulford et al. (2008) afirmam que quando o ambiente atinge o ponto isoelétrico (pI) de uma proteína, a falta de carga líquida reduz a solubilidade desta proteína e provoca sua precipitação, eliminando sua influência no processo *post mortem* do músculo. O pI da HSP 70 está em torno de 5,5, valor este muito próximo ao pH final da carne e que nos leva a crer que estas proteínas estão precipitadas (inativas) nas amostras. Já a HSP 27 possui pI mais alto, próximo de 5,98, o que a faz manter suas atividades por mais tempo.

As concentrações de HSP 27 no grupo mais macia foram significativamente ($P < 0,05$) menores entre os tempos de maturação (Tabela 3).

O mesmo ocorre com o grupo menos macia, que tiveram valores significativamente ($P < 0,05$) menores aos 14 dias de maturação (Tabela 3). Já quando comparamos as concentrações dentro do mesmo tempo de maturação, verifica-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos mais e menos macia, tanto para um dia quanto para 14 dias de maturação (Tabela 3).

Ao se avaliar as médias das concentrações de HSP 70 no grupo mais macia, podemos verificar que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tempos de maturação, com um aumento da concentração de proteína do primeiro para o 14° dia. No grupo menos macia, não foi verificada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tempos de maturação, assim como nas comparações dentro do período de maturação em relação aos grupos mais e menos macia (Tabela 3).

Tabela 3 – Estimativas de média e erro padrão (EP) da concentração de HSP 27 e HSP 70 em um e 14 dias de maturação em relação à maciez da carne (mais macia e menos macia)

Grupo	HSP 27					
	1d			14d		
	Média	EP		Média	EP	
Mais macia	185,5400	9,5339	A, a	156,7600	11,4617	B, a
Menos macia	198,9000	9,5339	A, a	149,7600	11,4617	B, a
	HSP 70					
	1d			14d		
	Média	EP		Média	EP	
Mais macia	21,3995	1,8678	B, a	31,5468	1,7501	A, a
Menos macia	25,7237	1,8678	A, a	27,8401	1,7501	A, a

Médias na mesma linha e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si, ao nível de significância de 5%. Médias na mesma coluna e seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si, ao nível de significância de 5%.

Mullins et al. (2016) afirmam que a HSP 27, $\alpha\beta$ -cristalina e HSP 70 trabalham em parceria para a manutenção da vida celular após uma situação de estresse, evitando assim a apoptose. A HSP 27 e a $\alpha\beta$ -cristalina exercem função de proteção contra a degradação e desnaturação proteica miofibrilar, liberando as proteínas danificadas para a HSP 70, que irá renaturar a proteína, renovando sua atividade biológica (WANG; SPECTOR, 2001). Pelo o exposto, esperava-se que as concentrações de HSP 27 e HSP 70 tivessem comportamento similar.

Porém, verificou-se que a HSP 70 sofreu aumento de concentração no decorrer do tempo de maturação.

Contreras-Castillo et al. (2016), estudando o comportamento das características de qualidade da carne em carcaças estimuladas e não estimuladas eletricamente e em diferentes faixas de pH (baixo, intermediário e alto), verificaram maiores concentrações de HSP 27 em carnes maturadas até 28 dias, em amostras com pH baixo ($\leq 5,79$) e sem estimulação. Já Lomiwes et al. (2013), em estudo semelhante, porém sem estimulação elétrica, encontraram concentrações menores de HSP 27, em pH baixo ($\leq 5,79$), conforme o aumento do tempo de maturação, resultados que corroboram com os encontrados na presente pesquisa.

Diversos estudos inferem que a diminuição da presença das HSP 27 e 70 interfere positivamente na maciez da carne, resultando em amostras mais macias (BERNARD et al., 2007; CARVALHO et al., 2014; KIM et al., 2008). Porém, com os resultados encontrados nesta pesquisa, é possível verificar que a concentração de HSP 27 presente nas amostras não interferiu na maciez da carne, uma vez que houve comportamento semelhante de queda de concentração nos dois grupos analisados (mais e menos macia) no decorrer da maturação. O resultado corrobora com os relatados por Contreras-Castillo et al. (2016) e Lomiwes et al. (2013), que afirmam que a HSP 27, em pH baixo ($\leq 5,79$), não exerce influência sobre a maciez da carne.

Com os resultados encontrados neste trabalho, a HSP 70 pode estar interferindo positivamente no processo de amaciamento da carne, uma vez que sua concentração aumentou no decorrer do processo de maturação nos dois grupos estudados, demonstrando diferença significativa no grupo mais macia. Porém, esses resultados são inversos ao encontrados em literatura, uma vez que diversos pesquisadores (BERNARD et al., 2007; CARVALHO et al., 2014; KIM et al., 2008) afirmam que a diminuição da HSP 70 interfere positivamente no amaciamento da carne. Dessa forma, estudos mais aprofundados devem ser realizados para a confirmar os efeitos da HSP 70 no processo de amaciamento da carne.

Foram realizadas análises de correlação e verificou-se que essas foram baixas (Tabela 4), indicando que as concentrações das HSP não interferiram nas

características de qualidade da carne. Para a HSP 27, apenas L* com um e 14 dias tiveram correlação positiva, sendo as demais todas negativas. Já para a HSP 70, as variáveis PAC um e 14 dias, L* 14 dias, a* e b* um dia e FC 14 dias tiveram correlação negativa e as demais positiva.

Tabela 4 – Coeficientes de correlação entre as concentrações de HSP 27 e HSP 70 e as características de qualidade de carne (fenótipo)

Fenótipo	HSP 27	HSP 70
pH 1d	-0,03851	0,09480
pH14d	-0,16522	0,02677
PAC 1d	-0,14000	-0,16556
PAC 14d	-0,28204	-0,03572
L* 1d	0,20596	0,08637
L* 14d	0,30864	-0,40734
a* 1d	-0,11794	-0,26349
a* 14d	-0,11508	0,19677
b* 1d	-0,05743	-0,07286
b* 14d	-0,36626	0,16327
FC 1d	-0,26876	0,03245
FC 14d	-0,12169	-0,07711

pH 1d e 14d = pH intramuscular mensurado a um e 14 dias de maturação; PAC 1d e 14d = perda de água por cocção (%) mensurada nos bifes com um e 14 dias de maturação; L*, a* e b* 1d e 14d = mensuração de cor realizada nos bifes com um e 14 dias de maturação; FC 1d e 14d = força de cisalhamento (kg) determinada nos bifes com um e 14 dias de maturação. Mensurações realizadas no músculo *Longissimus thoracis*.

Chulayo, Bradley e Muchenje (2016) verificando o efeito do estresse gerado pelo transporte em bovinos, observaram correlação negativa entre a HSP 70 e alguns parâmetros de qualidade da carne, como pH_{final}, a*, b* e FC. Porém, a quantificação da HSP 70 foi realizada em plasma sanguíneo, e não no músculo, o que pode justificar correlações diferentes das encontradas na presente pesquisa

Yu et al. (2009) estudando o efeito do estresse do tempo de transporte e sua relação com as características de qualidade da carne de suínos, verificaram que a HSP 27 possui correlação positiva com a FC, inferindo que menores concentrações desta proteína na amostra geram carnes com menor FC, ou seja, mais macias. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos com bovinos (BERNARD et al., 2007; CARVALHO et al., 2014; KIM et al., 2008).

Picard et al. (2014) quantificaram a abundância relativa de 21 proteínas previamente identificadas como boas preditoras de maciez, dentre elas as HSP

27 e 70, em dois músculos distintos (*Longissimus thoracis* – LT, e *Semitendinosus* - ST) e em três raças diferentes (Aberdeen Angus, Limousin e Blond d'Aquitaine). Esses pesquisadores verificaram que existe comportamento diferente das proteínas nos diferentes músculos e raças, justificando que cada musculatura possui propriedades contráteis e metabólicas distintas, interferindo diretamente na maciez. O estudo ainda aponta que a HSP 27 não foi correlacionada com a maciez da carne no músculo LT, sugerindo que esta característica está sujeita a diversos processos biológicos, como a apoptose, o estresse oxidativo e proteólise. Assim, cada processo age de forma distinta nos diferentes músculos. Já as HSP 70-1A e 70-1B apresentaram correlação positiva com a FC nos diferentes grupos estudados, indicando esta proteína como um potencial biomarcador para maciez.

Em estudo para analisar as concentrações basais (*in vivo*) de HSP 27 e 70 em LT de bovinos, Mullins et al. (2016) verificaram diferença significativa ($P < 0,05$) nas concentrações quando comparado *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*. Os animais zebus apresentaram maiores valores para ambas HSPs. A idade também foi comparada, e apesar de não haver diferença significativa entre as faixas etárias, houve uma maior quantificação das HSP nos animais mais velhos. Esses resultados reforçam os encontrados por Picard et al. (2014) e demonstram a importância de se isolar todos os possíveis fatores que interferem no processo de quantificação de HSP, para avaliar a correlação com as características de qualidade da carne e a possível indicação como biomarcador para maciez.

4.3 Análise proteômica

A análise de bioinformática resultou em 99 espectros de massa distintos nas 12 amostras estudadas (APÊNDICE A). Para realização da análise de variância ($P < 0,05$), foi avaliada a presença de cada proteína em pelo menos duas das três amostras experimentais, totalizando 56 proteínas a serem investigadas (APÊNDICE B, C e D). A análise de variância apontou sete proteínas diferencialmente abundantes, sendo que quatro proteínas sofreram

efeito de tratamento (mais macia x menos macia), uma sofreu efeito de tempo (um dia x 14 dias) e duas sofreram interação tratamento x tempo (Tabela 5).

Tabela 5 – Resumo das análises de variância ($P < 0,05$) das proteínas diferencialmente abundantes

Proteína	Efeito	GL num	GL den	Valor de F	Prob > F
O62654	TRAT	1	8	6,10	0,0387
Q2KJJ9	TRAT	1	8	8,00	0,0222
Q5EA88	TRAT	1	8	7,00	0,0294
P19858	TRAT	1	8	7,76	0,0237
Q2KJJ9	TEMPO	1	8	8,00	0,0222
Q0III9	TRAT*TEMPO	1	8	5,43	0,0481
Q32KV0	TRAT*TEMPO	1	8	8,66	0,0186

O62654 = desmina; Q2KJJ9 = frutose-1,6-bifosfatase isoenzima 2; Q5EA88 = glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD(+)], citoplasmática; P19858 = L-lactato desidrogenase cadeia A; Q0III9 = α -actinina 3; Q32KV0 = fosfoglicerato mutase 2.

TRAT = efeito de tratamento (mais macia x menos macia); TEMPO = efeito de tempo (um x 14 dias); GL num = grau de liberdade do numerador; GL den = graus de liberdade do denominador; Prob = probabilidade.

As proteínas desmina (O62654), frutose-1,6-bifosfatase isoenzima 2 (Q2KJJ9), glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD(+)] citoplasmática (Q5EA88) e L-lactato desidrogenase cadeia A (P19858) apresentaram maior abundância nas amostras menos macia. A proteína Q2KJJ9 apresentou maior abundância nas amostras maturadas por 14 dias (Tabela 6).

Tabela 6 – Estimativas de média e erro padrão (EP) das abundâncias das proteínas significativas ($P < 0,05$) em relação a maciez da carne (mais e menos macia) e tempo de maturação (um e 14 dias)

Proteína	Mais macia			Menos macia		
	Média	EP		Média	EP	
O62654	7,1667	2,0514	B	14,3333	2,0514	A
Q2KJJ9	0,6667	0,1667	B	1,3333	0,1667	A
Q5EA88	0,3333	0,3118	B	1,5000	0,3118	A
P19858	23,3333	2,8771	B	34,6667	2,8771	A
	1d			14 dias		
	Média	EP		Média	EP	
Q2KJJ9	0,6667	0,1667	B	1,3333	0,1667	A

O62654 = desmina; Q2KJJ9 = frutose -1, 6 - bifosfatase isoenzima 2; Q5EA88 = glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD(+)], citoplasmática; P19858 = L-lactato desidrogenase cadeia A.

Médias na mesma linha e seguidas por uma mesma letra não diferem entre si, ao nível de significância de 5%.

A desmina (O62654) é uma das proteínas presente na extremidade do disco Z das miofibrilas da fibra muscular. A miofibrila é formada por uma sequência de inúmeros sarcômeros, compostos basicamente por feixes de filamentos finos (Banda I) e grossos (Banda A), responsáveis pela contração muscular. A desmina (O62654) possui função de unir os filamentos finos de actina ao disco Z, mantendo a integridade do sarcômero e consequentemente da célula muscular (NELSON; COX, 2011).

Diversos estudos inferem que a degradação da desmina (O62654) é responsável em perturbar a integridade da miofibrila, gerando dessa forma carnes mais macias (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010; STARKEY et al., 2016; SUWANDY et al., 2015a, b). A diferença de abundância de desmina (O62654) observada pode estar relacionada com a maior degradação dessa proteína nas amostras mais macia. Dessa forma, nossos resultados corroboram com os estudos anteriores, uma vez que foi notada menor presença de desmina (O62654) nas amostras mais macia (Tabela 6), caracterizando um possível enfraquecimento das ligações estruturais das miofibrilas, afetando dessa forma o desenvolvimento da maciez nessas amostras. Essa proteína desempenha um papel importante no processo de proteólise *post mortem* e tem sido indicada como um marcador de amaciamento da carne (SUWANDY et al., 2015b).

A proteína glicerol-3-fosfato desidrogenase (Q5EA88) é uma enzima chave na biossíntese de triacilgliceróis. Quando o organismo dispõe de suprimento abundante de alimento, mas não está crescendo ativamente, desvia grande parte dos ácidos graxos para a síntese de gordura de reserva (NELSON; COX, 2011). Kim et al. (2010) verificaram que a maior presença dessa proteína em carnes de suínos estaria associada com a maior deposição de gordura intramuscular.

Nossas amostras apresentaram maior abundância de glicerol-3-fosfato desidrogenase (Q5EA88 – Tabela 6) no grupo menos macia, indicando que a deposição de gordura intramuscular não foi suficiente para geração de carnes mais macias. A deposição de gordura intramuscular acontece de forma mais tardia, sendo o último tipo de gordura a ser depositada no animal. Além disso, animais com sangue zebuino tendem a gerar carnes com pouca gordura

intramuscular quando comparada aos taurinos. Dessa forma, a maior abundância dessa enzima em nossas amostras indica que o animal estaria depositando gordura, porém não na forma de gordura intramuscular.

Quando comparamos a abundância da proteína α -actinina 3 (Q0III9) no grupo mais macia, podemos verificar que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tempos de maturação, com aumento de abundância de um para 14 dias. Já para o grupo menos macia não observamos diferenças do decorrer da maturação. O mesmo acontece quando comparamos as abundâncias dentro dos tempos de maturação para os grupos mais e menos macia (Tabela 7).

Tabela 7 – Estimativas de média e erro padrão (EP) da abundância da proteína α -actinina 3 (Q0III9) em um e 14 dias de maturação em relação à maciez da carne (mais macia e menos macia)

Grupo	Q0III9					
	1d			14 dias		
	Média	EP		Média	EP	
Mais macia	55,0000	2,6458	B, a	68,3333	2,6458	A, a
Menos macia	61,6667	2,6458	A, a	62,6667	2,6458	A, a

Médias na mesma linha e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si, ao nível de significância de 5%. Médias na mesma coluna e seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si, ao nível de significância de 5%.

Assim como a desmina (O62654), a α -actinina 3 (Q0III9) é uma proteína estrutural e é considerada a principal proteína do disco Z, desempenhando um papel importante na manutenção da integridade da miofibrila. Sua degradação ocorre de forma mais lenta quando comparada com a desmina (O62654). Em estudo analisando o comportamento da α -actinina em músculo bovino, Hwan e Bandman (1989) observaram que sua degradação sofre influência da temperatura e tempo de estocagem. Amostras refrigeradas a 4°C só começaram a degradar a proteína a partir da 2ª para a 3ª semana de maturação. Nossos resultados mostram que a presença da α -actinina 3 (Q0III9) variou no grupo mais macia, tendo uma maior abundância aos 14 dias de maturação (Tabela 7). Porém, vale ressaltar que o processo de amaciamento envolve diversas proteínas, e que o comportamento isolado de uma determinada proteína não é capaz de explicar com eficácia o processo de amaciamento da carne.

Estudos realizados em humanos, demonstram que a α -actinina 3 (Q0III9) é uma proteína altamente especializada, e sua presença está associada as fibras

do tipo II do músculo esquelético (MAC ARTHUR; NORTH, 2004). Essas fibras possuem alta capacidade de contração rápida, e utilizam o sistema anaeróbico para gerar energia. Pesquisadores afirmam que a presença de α -actinina 3 (Q0III9) no músculo está associada a atividade física de alta performance (DJINOVIC-CARUGO, 2008; MILLS et al., 2001; SJÖBLOM; SALMAZO). Além disso, as α -actininas interagem com enzimas metabólicas, como a frutose-1,6-bifosfatase (Q2KJJ9), gerando um mecanismo de regulação desta enzima, responsável em disponibilizar metabólitos necessários para geração de energia no próprio disco Z (LEK; NORTH, 2010; MAC ARTHUR; NORTH, 2004; SJÖBLOM; SALMAZO; DJINOVIC-CARUGO, 2008).

Em musculatura de contração rápida, a demanda por energia é tão grande que o fluxo sanguíneo não consegue fornecer oxigênio e combustível na velocidade necessária para gerar quantidade suficiente de energia somente via aeróbica. Sendo assim, o glicogênio armazenado na musculatura do animal é degradado, gerando o piruvato. Esse produto é então convertido em lactato, pela enzima L-lactato desidrogenase (P19858), através da fermentação láctica (NELSON; COX, 2011).

A presença associada destas três proteínas (α -actinina 3 – Q0III9, frutose-1,6-bifosfatase – Q2KJJ9 e L-lactato desidrogenase – P19858) nas amostras estudadas indica que, possivelmente, os animais passaram por uma atividade física intensa momentos antes do abate. Como a α -actinina 3 (Q0III9) esta associada a proteínas do tipo II, seria correto inferir que estes animais responderam ao estímulo “estressor”. Essa hipótese fica reforçada com a presença das enzimas frutose-1,6-bifosfatase (Q2KJJ9 – gliconeogênese) e L-lactato desidrogenase (P19858), indicando que o ciclo de Cori (Figura 2) estava ativo devido a situação de esforço físico. Porém, o papel destas enzimas no processo *post mortem* e nas características de qualidade de carne ainda não está bem descrito, necessitando de maiores estudos para elucidar seu mecanismo de funcionamento no processo de maturação da carne.

Figura 2 – Esquema do ciclo de Cori

As setas em vermelho tracejado indicam as reações metabólicas envolvidas no ciclo em uma situação de esforço físico. As setas em verde pontilhado mostram as reações que ocorrem no período de descanso.

Fonte: autor desconhecido.

Para a proteína fosfoglicerato mutase 2 (Q32KV0) verificamos que houve diferença significativa ($P < 0,05$) no grupo mais macia, com aumento de abundância do primeiro para o 14º dia de maturação. No grupo menos macia, o resultado foi invertido, com diminuição de abundância com o passar dos dias de maturação. Quando comparamos a abundância da proteína nos grupos mais e menos macia dentro de um dia de maturação, verificamos que houve diferença significativa ($P < 0,05$), com maior abundância no grupo menos macia. Tal diferença não foi observada nas amostras de 14 dias de maturação (Tabela 8).

Tabela 8 – Estimativas de média e erro padrão (EP) da abundância da proteína fosfoglicerato mutase 2 (Q32KV0) em um e 14 dias de maturação em relação à maciez da carne (mais macia e menos macia)

Grupo	Q32KV0					
	1d			14 dias		
	Média	EP		Média	EP	
Mais macia	16,3333	1,7559	B, b	21,3333	1,7559	A, a
Menos macia	22,0000	1,7559	A, a	16,6667	1,7559	B, a

Médias na mesma linha e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si, ao nível de significância de 5%. Médias na mesma coluna e seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si, ao nível de significância de 5%.

A fosfoglicerato mutase 2 (Q32KV0) é uma enzima da via glicolítica que converte o 3 - fosfoglicerato em 2 - fosfoglicerato. A glicólise é responsável em gerar energia para a contração muscular, além de fornecer energia para as exigências de crescimento animal (DOHERTY et al., 2004; TELTATHUM; MEKCHAY, 2009). A maior abundância de fosfoglicerato mutase pode indicar a possibilidade de rápido declínio pH *post mortem* associada com elevada atividade glicolítica (JOSEPH; NAIR; SUMAN, 2015), sugerindo que este aumento de atividade ocorra na tentativa de manter a produção de energia (MARINO et al., 2014).

Estudos mostram que carnes menos macias apresentam menores níveis de enzimas glicolíticas em suas amostras (D'ALESSANDRO et al., 2012). Em análise proteômica de carne de frango, foi verificada menor abundância de fosfoglicerato mutase em amostras mais macias (MEKCHAY et al., 2010). Resultado inverso foi encontrado por Desai et al. (2016), que verificaram maior abundância dessa proteína em amostras mais macia de frango. Clerens et al. (2016) relataram diferenças de abundância da fosfoglicerato mutase em diferentes músculos de animais Angus, com maior abundância no músculo *Longissimus thoracis* e *Longissimus lumborum*.

Nossos resultados apresentaram uma menor abundância de fosfoglicerato mutase 2 (Q32KV0) no grupo mais macia com um dia de maturação (Tabela 8), corroborando com D'Alessandro; Zolla (2013) e Mekchay et al. (2010). Também foi verificado menor abundância no grupo menos macia com 14 dias de maturação (Tabela 8), nos levando a crer que essa queda de abundância não favoreceu o amaciamento da carne. Porém, quando analisamos a enzima em função do tempo de maturação, verificamos maior abundância nas amostras com 14 dias de maturação no grupo mais macia (Tabela 8). Esse resultado nos leva a acreditar que a função dessa proteína no processo de amaciamento da carne ainda não está totalmente elucidado. Porém, podemos afirmar que sua presença tem contribuição efetiva no processo de melhoria da maciez.

As proteínas diferencialmente abundantes (Tabela 5) foram correlacionadas com as características de qualidade da carne (pH, PAC, L*, a*,

b* e FC), bem como com as concentrações de HSP 27 e 70 através da análise de correlação de *Pearson* (Tabela 9).

Tabela 9 – Coeficientes de correlação entre as proteínas diferencialmente abundantes e as características de qualidade de carne e concentração de HSP 27 e 70

Fenótipo	Q0III9	O62654	Q2KJJ9	Q5EA88	P19858	Q32KV0
pH	-0,02257	-0,15242	0,12048	-0,47182	-0,44049	0,21125
PAC	-0,28981	-0,26320	-0,44251	-0,40386	-0,48398	-0,30621
L*	0,33053	0,32412	0,13212	0,22875	0,06645	0,49187
a*	-0,05078	-0,50602	0,09652	-0,48805	-0,22649	-0,56468
b*	0,20250	-0,41261	0,44576	-0,67956	-0,42775	-0,08262
FC	-0,41841	0,83013	0,13595	0,57669	0,47834	-0,14659
HSP 27	0,04978	-0,29086	-0,52677	-0,17528	-0,38146	0,25193
HSP 70	0,43943	-0,32739	0,30279	-0,20525	0,18763	0,19506

Q0III9 = α -actinina 3; O62654 = desmina; Q2KJJ9 = frutose-1,6-bifosfatase isoenzima 2; Q5EA88 = glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD(+)], citoplasmática; P19858 = L-lactato desidrogenase cadeia A; Q32KV0 = fosfoglicerato mutase 2.

pH = pH intramuscular *post mortem*; PAC = perda de água por cocção (%); L*, a* e b* = mensuração de cor; FC = força de cisalhamento (kg); HSP 27 = concentração de HSP 27; HSP 70 = concentração de HSP 70. Mensurações realizadas no músculo *Longissimus thoracis*.

Foi observada correlação positiva ($r = 0,83013$) entre a proteína desmina (O62654) e a FC, indicando que a menor abundância desta proteína diminuiu a FC das amostras. Este resultado reitera os encontrados por diversos pesquisadores, que verificaram aumento da degradação da desmina (O62654) em carnes mais macias. (HUFF-LONERGAN; ZHANG; LONERGAN, 2010; STARKEY et al., 2016; SUWANDY et al., 2015a, b). Nossos resultados indicam que a desmina é uma forte candidata a biomarcador de maciez da carne.

A proteína glicerol-3-fosfato desidrogenase (Q5EA88) apresentou correlação negativa ($r = -0,67956$) com o parâmetro b* de cor, indicando que maior abundância desta proteína gerou carnes com menores teores de b* (Tabela 9). A mudança da coloração, de vermelho púrpura para marrom, é devida a oxidação da mioglobina e consequente formação de metamioglobina na carne. Essa mudança está relacionada com a taxa de consumo de oxigênio de cada musculatura no *post mortem*, que é regulada por enzimas mitocondriais (SEYFERT et al., 2006), como a glicerol-3-fosfato desidrogenase (Q5EA88). Wu et al. (2016) estudando correlação entre abundância de proteínas e características de cor da carne, inferiram que esta enzima tem forte potencial em

predizer a estabilidade da cor em músculo *Longissimus lumborum* de bovinos. Porém, esse mecanismo ainda não está bem caracterizado, sendo necessário estudos que relacionem a atividade mitocondrial com a estabilidade de cor da carne (SEYFERT et al., 2006).

4.3.1 Enriquecimento funcional

A análise de enriquecimento funcional das proteínas diferencialmente abundantes tem como finalidade compreender mais profundamente os resultados encontrados na análise proteômica. Com a grande diversidade de fatores que influenciam a qualidade da carne, as análises de bioinformática e enriquecimento funcional tem sido amplamente utilizadas (D'ALESSANDRO et al., 2012; HUANG et al., 2014; LIU et al., 2016; WU et al., 2015, 2016; ZUO et al., 2016).

A ontologia gênica - *Gene Ontology* (GO) - e a análise de interação proteína-proteína das proteínas diferencialmente abundantes correlacionadas com a maciez da carne foram analisadas no *String* 10.0 (SZKLARCZYK et al., 2015). O enriquecimento funcional (FDR < 0,05) foi avaliado e classificado de acordo com os processos biológicos, componentes celulares e vias metabólicas (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* - KEGG). Não foi encontrada nenhuma proteína enriquecida para função molecular em nossos resultados (Tabela 10), possivelmente devido ao pequeno número de proteínas utilizadas nas análises.

Foi verificado que as proteínas diferencialmente abundantes estão envolvidas em processos biológicos (Tabela 10), como processo metabólico do carboidrato (GO.0005975), gluconeogênese (GO.0006094), processo metabólico do carboidrato de organismo único (GO.0044723) e processo metabólico do nucleotídeo nicotinamida (GO.0046496). A proteína glicerol-3-fosfato desidrogenase (Gene: GPD1) participa dos quatro processos biológicos, demonstrando sua complexidade devido a participação em diferentes atividades metabólicas. Conforme descrito anteriormente, esta enzima foi associada com deposição de gordura intramuscular (KIM et al., 2010) e alterações na coloração da carne (WU et al., 2016). Porém, sua participação nas modificações das

características de qualidade da carne ainda é um fenômeno pouco compreendido e necessita de maior aprofundamento, uma vez que estudos diretamente relacionados com a atividade dessa enzima em diferentes músculos bovinos ainda são escassos (SEYFERT et al., 2006).

No enriquecimento para componente celular (Tabela 10), as proteínas foram relacionadas com o Disco Z (GO.0030018), exossomo extracelular (GO.0070062), Banda I (GO.0031674), miofibrila (GO.0030016) e região extracelular (GO.0005576). A proteína desmina (Gene: DES) foi relacionada com todos os componentes celulares encontrados, evidenciando sua importância na estruturação muscular. Já a proteína frutose-1,6-bifosfatase (Gene: FBP2), que também está presente em todos os componentes celulares, é uma enzima glicolítica e sua presença está relacionada com a geração de energia, conforme explicado anteriormente.

Dentre as vias metabólicas encontradas neste trabalho, verificamos que a via da Glicólise/Gliconeogênese (Figura 3) foi a que apresentou maior diferença estatística (Tabela 10). As proteínas frutose-1,6-bifosfatase (3.1.3.11), fosfoglicerato mutase 2 (5.4.2.11) e L-lactato desidrogenase (1.1.1.27) são enzimas envolvidas na via glicolítica, conforme destacado na Figura 3. Estudos sugerem que a presença elevada de enzimas glicolíticas nas amostras influenciam a maciez, gerando carnes mais macias (D'ALESSANDRO et al., 2012; D'ALESSANDRO; ZOLLA, 2013; ZUO et al., 2016).

Tabela 10 – Categorias significativas (FDR < 0,05) pela análise de enriquecimento funcional das proteínas diferencialmente abundantes, realizada no *String* 10.0

ID	Descrição	N ¹	FDR ²	Genes
<i>Processos biológicos</i>				
GO.0005975	Processo metabólico do carboidrato	4	0,00099	<i>FBP2, GPD1, LDHA, PGAM2</i>
GO.0006094	Gliconeogênese	2	0,01860	<i>FBP2, GPD1</i>
GO.0044723	Processo metabólico do carboidrato de organismo único	3	0,01860	<i>FBP2, GPD1, PGAM2</i>
GO.0046496	Processo metabólico do nucleotídeo nicotinamida	2	0,04660	<i>GPD1, PGAM2</i>
<i>Componente celular</i>				
GO.0030018	Disco Z	2	0,00885	<i>DES, FBP2</i>
GO.0070062	Exossomo extracelular	4	0,00885	<i>DES, FBP2, GPD1, LDHA</i>
GO.0031674	Banda I	2	0,00990	<i>DES, FBP2</i>
GO.0030017	Sarcômero	2	0,01110	<i>DES, FBP2</i>
GO.0030016	Miofibrila	2	0,01290	<i>DES, FBP2</i>
GO.0005576	Região extracelular	4	0,01790	<i>DES, FBP2, GPD1, LDHA</i>
<i>Vias metabólicas</i>				
00010	Glicólise/Gliconeogênese	3	0,000131	<i>FBP2, LDHA, PGAM2</i>
01120	Metabolismo microbiano em diversos ambientes	3	0,001110	<i>FBP2, LDHA, PGAM2</i>
05412	Cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito (ARVC)	2	0,015600	<i>ACTN3, DES</i>
01200	Metabolismo do carbono	2	0,026000	<i>FBP2, PGAM2</i>

¹ Número de genes identificados por termo. ² Valor de P ajustado para *false discovery rate* (FDR). GO = *Gene Ontology*. ACTN3 = gene da proteína α -actinina 3. DES = gene da proteína da desmina. FBP2 = gene da proteína frutose-1,6-bifosfatase isoenzima 2. GPD1 = gene da proteína glicerol-3-fosfato desidrogenase. LDHA = gene da proteína L-lactato desidrogenase. PGAM2 = gene da proteína fosfoglicerato mutase 2.

Figura 3 – Via KEGG 00010 (Glicólise/Gliconeogênese)

Embora seja difícil traçar uma conclusão do enriquecimento pela ontologia gênica, a interação proteína-proteína poderia mostrar mais informações para uma melhor compreensão das vias metabólicas relacionadas à maciez da carne. A Figura 4 ilustra a interação entre as proteínas totais encontradas no presente estudo, onde os nódulos representam proteínas do banco de dados de *Bos taurus* e as linhas representam as associações funcionais previstas.

É possível verificar que diversas proteínas participam do complexo mecanismo de maturação da carne e que apesar das atuais análises de bioinformática resultarem em uma visão mais detalhada de como essas proteínas se comportam, mais trabalhos são necessários para entender as mudanças nos níveis metabólicos responsáveis pela descoloração, amaciamento e demais características de qualidade da carne durante o armazenamento *post mortem*.

A Figura 5 ilustra a interação entre as proteínas que foram diferencialmente abundantes, onde os nódulos representam proteínas do banco de dados de *Bos taurus* e as linhas representam as associações funcionais previstas. Como é possível verificar, três proteínas não apresentaram interação significativa com as demais proteínas do mapa (ACTN3, DES e FBP2). As proteínas que sofreram interação proteína-proteína foram a glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD1), fosfoglicerato mutase 2 (PGAM2) e L-lactato desidrogenase (LDHA).

Figura 5 – Rede de interação proteína-proteína das proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) em relação a maciez do músculo *Longissimus thoracis* de ½ Simental Sul Africano x ½ Nelore

Os nódulos representam proteínas do banco de dados de *Bos taurus* e as linhas representam as associações. Os dados foram elaborados através do *String* 10.0. ACTN3 = gene da proteína α -actinina 3. DES = gene da proteína da desmina. FBP2 = gene da proteína frutose-1,6-bifosfatase isoenzima 2. GPD1 = gene da proteína glicerol-3-fosfato desidrogenase. LDHA = gene da proteína L-lactato desidrogenase. PGAM2 = gene da proteína fosfoglicerato mutase 2.

As proteínas fosfoglicerato mutase 2 (PGAM2) e L-lactato desidrogenase (LDHA) são enzimas glicolíticas, enquanto a glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPD1) parece estar relacionada com o estresse oxidativo, uma vez que é encontrada na mitocôndria da célula (SEYFERT et al., 2006). As interações entre essas proteínas confirmam a análise dos resultados apresentados anteriormente, mostrando que existe uma relação estreita entre a abundância dessas proteínas com as características de qualidade da carne.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados encontrados no presente trabalho, é possível afirmar que as correlações entre as concentrações de HSP 27 e 70 e as características de qualidade de carne do grupo estudado foram baixas, sugerindo que para animais $\frac{1}{2}$ Simental Sul Africano x $\frac{1}{2}$ Nelore, castrados, terminados em confinamento e com valor de pH_{final} normal ($\leq 5,79$), as HSP 27 e 70 não poderiam ser apontadas como biomarcadores eficientes para qualidade de carne. A análise proteômica e de enriquecimento funcional demonstrou que as proteínas diferencialmente abundantes estão relacionadas com processos biológicos e componentes celulares. Os resultados obtidos indicam que a proteína desmina é uma forte candidata a biomarcador de maciez da carne, devido sua alta correlação com a força de cisalhamento. A proteína glicerol-3-fosfato desidrogenase apresentou alta correlação com valores de b*, demonstrando potencial em predizer a estabilidade da cor. Esses resultados contribuem para melhor compreensão das mudanças no proteoma que podem estar envolvidos com a estabilidade da cor e maciez da carne.

REFERÊNCIAS

- ALVES, D. D.; GOES, R. H. T. B.; MANCIO, A. B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, GO, v. 6, n. 3, p. 135-149, Jul./Set. 2005.
- AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. **Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness of fresh meat**. Champaign: AMSA, 1995. p. 1-33.
- AROEIRA, C. N.; TORRES FILHO, R. A.; FONTES, P. R.; GOMIDE, L. A. M.; RAMOS, A. L. S.; LADEIRA, M. M.; RAMOS, E. M. Freezing, thawing and aging effects on beef tenderness from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 116, p. 118-125, Jun. 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. **Pecuária brasileira**. São Paulo: ABIEC, 2016a. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp>. Acesso em: 06 jun. 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. **Rebanho bovino brasileiro**. São Paulo: ABIEC, 2016b. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp>. Acesso em: 06 jun. 2016.
- BALAN, P.; KIM, Y. H. B.; BLIJENBURG, R. Small heat shock protein degradation could be an indicator of the extent of myofibrillar protein degradation. **Meat Science**, Barking, GBR v. 97, n. 2, p. 220-222, Jun. 2014.
- BERNARD, C.; CASSAR-MALEK, I.; LE CUNFF, M.; DUBROEUCQ, H.; RENAND, G.; HOCQUETTE, J. F. New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v. 55, n. 13, p. 5229-5237, Jun. 2007.
- BONCORAGLIO, A.; MINOIA, M.; CARRA, S. The family of mammalian small heat shock proteins (HSPBs): Implication in protein deposit diseases and motor neuropathies. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [S.I.], v. 44, n. 10, p. 1657-1669, Oct. 2012.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, USA, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, May 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportação**. Brasília, DF: MAPA, 2016a. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acesso em: 06 jun. 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano mais pecuária**. Brasília, DF: MAPA, 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/Publicacao_v2.pdf>. Acesso em: 09 jun. 2016.

BRIDI, A. M.; CONSTANTINO, C. Qualidade e avaliação de carcaças e carnes bovinas. In: CONGRESSO PARANAENSE DOS ESTUDANTES DE ZOOTECNIA, 30., 2009, Maringá. **Anais...** Maringá: APEZ, 2009.

CANTO, A. C. V. C. S.; SUMAN, S. P.; NAIR, M. N.; LI, S.; RENTFROW, G.; BEACH, C. M.; SILVA, T. J. P.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D.; GRAYSON, A.; MCKEITH, R. O.; KING, D. A. Differential abundance of sarcoplasmic proteome explains animal effect on beef *Longissimus lumborum* color stability. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 102, p. 90-98, Apr. 2015.

CARVALHO, M.E. **Caracterização da frequência de polimorfismo em genes ligados à maciez da carne em bovinos da raça Nelore**. 2008. 56 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

CARVALHO, M. E.; GASPARIN, G.; POLETI, M. D.; ROSA, A. F.; BALIEIRO, J. C. C.; LABATE, C. A.; NASSU, R. T.; TULLIO, R. R.; REGITANO, L. C. A.; MOURÃO, G. B.; COUTINHO, L. H. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a *Bos indicus* breed. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 96, n. 3, p. 1318-1324, Mar. 2014.

CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B. Expression marker-based strategy to improve beef quality. **Scientific World Journal**, [S.l.], v. 2016, 2016.

CASTRO, S. V.; LOBO, C. H.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. Proteínas de choque térmico HSP 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, [S.l.], v. 7, n. 4, p. 261-271, 2013.

CHAMBAZ, A.; SCHEEDER, M. R. L.; KREUZER, M.; DUFEY, P. -A. Meat quality of Angus, Simmental, Charolais and Limousin steers compared at the same intramuscular content. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 63, n. 4, p. 491-500, Apr. 2003.

CHULAYO, A. Y.; BRADLEY, G.; MUCHENJE, V. Effects of transport distance, lairage time and stunning efficiency on cortisol, glucose, HSPA1A and how they relate with meat quality in cattle. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 117, p. 89-96, Jul. 2016.

CIE. **Recommendations on uniform color spaces, color difference equations, psychometric color terms**. Commission Internationale de l'Eclairage, Paris. Sup. 2 to CIE Publication n. 15 (E - 1 1.3.1) 1978, 1971/(TC - 1 - 1), 1976.

CLERENS, S.; THOMAS, A.; GATHERCOLE, J.; PLOWMAN, J. E.; YU, T. Y.; GROSVENOR, A. J.; HAINES, S. R.; DOBBIE, P.; TAUKIRI, K.; ROSENVOLD, K.; DYER, J. M.; DEB-CHOUDHURY, S. Proteomic and peptidomic differences and similarities between four muscle types from New Zealand raised Angus steers. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 121, p. 53-63, Nov. 2016.

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

CROUSE, J. D.; CUNDIFF, V.; KOCH, R. M.; KOOHMARAIE, M.; SEIDEMAN, S. C. Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* inheritance for carcass beef characteristics and meat palatability. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v. 67, n. 10, p. 2661-2668, 1989.

D'ALESSANDRO, A.; MARROCCO, C.; RINALDUCCI, S.; MIRASOLE, C.; FAILLA, S.; ZOLLA, L. Chianina beef tenderness investigated through integrated Omics. **Journal of Proteomics**, [S.l.], v. 75, n. 14, p. 4381-4398, Jul. 2012.

D'ALESSANDRO, A.; ZOLLA, L. Meat science: From proteomics to integrated omics towards system biology. **Journal of Proteomics**, [S.l.], v. 78, p. 558-577, Jan. 2013.

DESAI, M. A.; JACKSON, V.; ZHAI, W.; SUMAN, S. P.; NAIR, M. N.; BEACH, C. M.; SCHILLING, M. W. Proteome basis of pale, soft, and exudative-like (PSE-like) broiler breast (*Pectoralis major*) meat. **Poultry Science**, Champaign, USA, Jul. 2016.

DOHERTY, M. K.; MCLEAN, L.; HAYTER, J. R.; PRATT, J. M.; ROBERTSON, D. H.; EL-SHAFFI, A.; GASKELL, S. J.; BEYNON, R. J. The proteome of chicken skeletal muscle: Changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. **Proteomics**, Weinheim, DEN, v. 4, n. 7, p. 2082-2093, Jul. 2004.

FRYLINCK, L.; STRYDOM, P. E.; WEBB, E. C.; DU TOIT, E. Effect os South African beef production systems on *post-mortem* muscle energy status and meat quality. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 93, n. 4, p. 827-837, Apr. 2013.

FRYLINCK, L.; VAN WYK, G. L.; SMITH, T. P. L.; STRYDOM, P. E.; VAN MARLE-KÖSTER, E.; WEBB, E. C.; KOOHMARAIE, M.; SMITH, M. F. Evaluation of biochemical parameters and genetic markers for association with meat tenderness in South African feedlot cattle. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 83, n.4, p. 657-665, Dec. 2009.

GEESINK, G. H.; KOOHMARAIE, M. *Postmortem* proteolysis and calpain/calpastatin activity in callipyge and normal lamb *biceps femoris* during extended *postmortem* storage. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v. 77, n. 6, p. 1490-1501, Jun. 1999.

GERALDO, A. C. A. P. M. **Termotolerância em fêmeas bovinas**: abordagens celular e fisiológica. 201393 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

HOLLUNG, K.; VEISETH, E.; JIA, X.; FAERGESTAD, E. M.; HILDRUM, K. I. Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 77, n. 1, p. 97-104, Sep. 2007.

HOPKINS, D. L.; THOMPSON, J. M. The degradation of myofibrillar proteins in beef and lamb using denaturing electrophoresis - an overview. **Journal and Muscle Foods**, Trumbull, USA, v. 13, p. 81-102, 2002.

HUANG, H.; LARSEN, M. R.; PALMISANO, G.; DAI, J.; LAMETSCH, R. Quantitative phosphoproteomic analysis of porcine muscle within 24 h *post-mortem*. **Journal of Proteomics**, [S.I.], v. 106, p. 125-139, Jun. 2014.

HUFF-LONERGAN, E.; ZHANG, W.; LONERGAN, S. M. Biochemistry of *postmortem* muscle – Lessons on mechanisms of meat tenderization. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 86, n. 1, p. 184-195, Sep. 2010.

HWAN, S. F.; BANDAM, E. Studies of desmin and α - actinin degradation in bovine *semitendinosus* muscle. **Journal of Food Science**, Chicago, USA, v. 54, n. 6, p. 1426-1430, Nov. 1989.

HWANG, I. H.; PARK, B. Y.; KIM, J. H.; CHO, S. H.; LEE, J. M. Assessment of *postmortem* proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig *longissimus*. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 69, n. 1, p. 79-91, Jan. 2005.

JIA, X.; EKMAN, M.; GROVE, H.; FAERGESTAD, E. M.; AASS, L.; HILDRUM, K. I.; HOLLUNG, K. Proteome changes in bovine *Longissimus thoracis* muscle during the early *postmortem* storage period. **Journal of Proteome Research**, Washington, USA, v. 6, n. 7, p. 2720-2731, Jul. 2007.

JIA, X.; HILDRUM, K. I.; WESTAD, F.; KUMMEN, E.; AASS, L.; HOLLUNG, K. Changes in enzymes associated with energy metabolism during the early *post mortem* period in *Longissimus thoracis* bovine muscle analyzed by proteomics. **Journal of Proteome Research**, Washington, USA, v. 5, n. 7, p. 1763-1769, Jul. 2006a.

JIA, X.; HOLLUNG, K.; THERKILDSEN, M.; HILDRUM, K. I.; BENDIXEN, E. Proteome analysis of early *post-mortem* changes in two bovine muscle types: *M. Longissimus dorsi* and *M. Semitendinosus*. **Proteomics**, Weinheim, USA, v. 6, n. 3, p. 936-944, Feb. 2006b.

JOHNSON, D. D; HUFFMAN, R. D; WILLIAMS, S. E.; HARGROVE, D. D. Effects of percentage Brahman and Angus breeding, age-season of feeding and slaughter end point on meat palatability and muscle characteristics. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v. 68, n. 7, p. 1980-1986, Jul. 1990.

JOSEPH, P.; NAIR, M. N.; SUMAN, S. P. Application of proteomics to characterize and improve color and oxidative stability of muscle foods. **Food Research International**, Barking, GBR, v. 76, n. 4, p. 938-945, Oct. 2015.

JOSEPH, P.; SUMAN, S. P.; RENTFROW, G.; LI, S.; BEACH, C. M. Proteomics of muscle-specific beef color stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v. 60, n. 12, p. 3196-3203, Mar. 2012.

KARAMUCKI, T.; GARDZIELEWSKA, J.; RYBARCZYK, A.; JAKUBOWSKA, M.; NATALCZYK-SZYMKOWSKA. Usefulness of selected methods of colour change measurement for pork quality assessment. **Czech Journal of Food Sciences**, Praha, SVK, v. 29, n. 3, p. 212-218, 2011.

KIM, N. K.; CHO, S.; LEE, S. H.; PARK, H. R.; LEE, C. S.; CHO, Y. M.; CHOY, Y. H.; YOON, D.; IM, S. K.; PARK, E. W. Proteins in *longissimus* muscle of Korean native cattle and their relationship to meat quality. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 80, n. 4, p. 1068-1073, Dec. 2008.

KIM, N. K.; LIM, D.; LEE, S. H.; CHO, Y. M.; PARK, E. W.; LEE, C. S.; SHIN, B. S.; KIM, T. H.; YOON, D. Heat shock protein B1 and its regulator genes are negatively correlated with intramuscular fat content in the *longissimus thoracis* muscle of Hanwoo (Korean cattle) steers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v. 59, n. 10, p. 5657-5664, May 2011.

KIM, N. K.; PARK, H. R.; LEE, H. C.; YOON, D.; SON, E. S.; KIM, Y. S.; KIM, S. R.; KIM, O. H.; LEE, C. S. Comparative studies of skeletal muscle proteome and transcriptome profilings between pig breeds. **Mammalian Genome**, [S.l.], v. 21, n. 5-6, p. 307-319, Jun, 2010.

KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L. Relative contributions of animal and muscle effects to variation in beef lean color stability. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v. 89, n. 5, p. 1434-1451, May 2011.

KOOHMARAIE, M. Biochemical factor regulation the toughening and tenderization processes of meat. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 43, Supl. 1, p. 193-201, 1996.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, GBR, v. 227, p. 680-685, Aug. 1970.

LAGE, J. F.; PAULINO, P. V. R.; VALADARES FILHO, S. C.; SOUZA, E. J. O.; DUARTE, M. S.; BENEDETI, P. D. B.; SOUZA, N. K. P.; COX, R. B. Influence of genetic type and level of concentrate in the finishing diet on carcass and meat quality traits in beef heifers. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 90, n. 3, p. 770-774, Mar. 2012.

LAMETSCH, R.; BENDIXEN, E. Proteome analysis applied to meat science: characterizing *post mortem* changes in porcine muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v. 49, n. 10, p. 4531-4537, Oct. 2001.

- LAMETSCH, R.; KARLSSON, A.; ROSENVOLD, K.; ANDERSEN, H.J.; ROEPSTORFF, P.; BENDIXEN, E. *Postmortem* proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v. 51, n. 24, p. 6992-6997, Nov. 2003.
- LAWRIE, R. A. **Ciência da carne**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- LEDWARD, D. A. *Post-slaughter* influences on the formation of metmyoglobin in beef muscles. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 15, n. 3, p. 149-171, 1985.
- LEK, M.; NORTH, K. N. Are biological sensors modulated by their structural scaffolds? The role of the structural muscle proteins alpha-actinin-2 and alpha-actinin-3 as modulators of biological sensors. **FEBS Letters**, Amsterdam, NED, v. 584, n. 14, p. 2974-2980, Jul. 2010.
- LI, P.; WANG, T.; MAO, Y.; ZHANG, Y.; NIU, L.; LIANG, R.; ZHU, L.; LUO, X. Effect of ultimate pH on *postmortem* myofibrillar protein degradation and meat quality characteristics of chinese yellow crossbreed cattle. **Scientific World Journal**, [S.l.], v. 2014, Aug. 2014.
- LIU, S.; HAN, W.; JIANG, S.; ZHAO, C.; WU, C. Integrative transcriptomics and proteomics analysis of *longissimus dorsi* muscles of Canadian double-muscling Large White pigs. **Gene**, [S.l.], v. 577, n. 1, p. 14-23, Feb. 2016.
- LOMIWES, D.; FAROUK, M. M.; FROST, D. A.; DOBBIE, P. M.; YOUNG, O. A. Small heat shock proteins and toughness in intermediate pHu beef. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 95, n. 3, p. 472-479, Nov. 2013.
- LOMIWES, D.; FAROUK, M. M.; WIKLUND, E.; YOUNG, O. A. Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: A review. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 96, n. 1, p. 26-40, Jan. 2014.
- MAC ARTHUR, D. G.; NORTH, K. N. A gene for speed? The evolution and function of alpha-actinin-3. **BioEssays**, Cambridge, GBR, v. 26, n. 7, p. 786-795, Jul. 2004.
- MALTIN, C.; BALCERZAK, D.; TILLEY, R.; DELDAY, M. Determinant of meat quality: tenderness. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, GBR, v. 62, n. 2, p. 337-347, May. 2003.
- MARINO, R.; ALBENZIO, M.; DELLA MALVA, A.; CAROPRESE, M.; SANTILLO, A.; SEVI, A. Changes in meat quality traits and sarcoplasmic proteins during aging in three different cattle breeds. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 98, n. 2, p. 178-186, Oct. 2014.
- MARQUES, L. F. A. Cruzamento industrial. **BeefPoint**, Piracicaba, 2016. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/radares-tecnicos/melhoramento-genetico/cruzamento-industrial-4763/>>. Acesso em: 11 Jul. 2016.

MC KENNA, D. R.; MIES, P. D.; BAIRD, B. E.; PFEIFFER, K. D.; ELLEBRACHT, J. W.; SAVELL, J. W. Biochemical and physical factors affecting discoloration characteristics of 19 bovine muscles. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 70, n. 4, p. 665-682, Aug. 2005.

MEKCHAY, S.; TELTATHUM, T.; NAKASATHIEN, S.; PONGPAICHAN, P. Proteomic analysis of tenderness trait in Thai native and commercial broiler chicken muscles. **The Journal of Poultry Science**, [S.l.], v. 47, n. 1, p. 8-12, Jan. 2010.

MILLS, M. A.; YANG, N.; WEINBERGER, R. P.; VANDER WOUDE, D. L.; BEGGS, A. H.; EASTEAL, S.; NORTH, K. N. Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. **Human Molecular Genetics**, Oxford, GBR, v. 10, n. 13, p. 1335-1346, Jun. 2001.

MULLINS, C. R.; ZERBY, H. N.; FITZPATRICK, L. A.; PARKER, A. J. *Bos indicus* cattle possess greater basal concentrations of HSP27, alpha B-crystallin, and HSP70 in skeletal muscle in vivo compared with cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v. 94, n. 1, p. 424-429, Jan. 2016.

NAIR, M. N.; SUMAN, S. P.; CHATLI, M. K.; LI, S.; JOSEPH, P.; BEACH, C. M.; RENTFROW, G. Proteome basis for intramuscular variation in color stability of beef *semimembranosus*. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 113, p. 9-16, Mar. 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Coordenação da tradução de Fabiana Horn. Revisão técnica de Carla Dalmaz e Sandra Estrazulas Farias. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

O'KEEFFE, M.; HOOD, D. E. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation on beef from muscles of differing colour stability. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 7, n. 3, p. 209-228, Nov. 1982.

OUALI, A.; GAGAOUA, M.; BOUDIDA, Y.; BECILA, S.; BOUDJELLAL, A.; HERRERA-MENDEZ, C. H.; SENTANDREU, M. A. Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 95, n. 4, p. 854-870, Dec. 2013.

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

PICARD, B.; BERRI, C.; LEFAUCHEUR, L.; MOLETTE, C.; SAYD, T.; TERLOUW, C. Skeletal muscle proteomics in livestock production. **Briefings in Functional Genomics**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 259-278, May 2010.

PICARD, B.; GAGAOUA, M.; MICOL, D.; CASSAR-MALEK, I.; HOCQUETTE, J. F.; TERLOUW, C. E. Inverse relationships between biomarkers and beef tenderness according to contractile and metabolic properties of the muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v. 62, n. 40, p. 9808-9818, Oct. 2014.

PULFORD, D. J.; DOBBIE, P.; FRAGA VAZQUEZ, S.; FRASER-SMITH, E.; FROST, D. A.; MORRIS, C. A. Variation in bull beef quality due to ultimate muscle pH is correlated to endopeptidase and small heat shock protein levels. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 83, n. 1, p. 1-9, Sep. 2009.

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

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2007.

RESTLE, J.; VAZ, F. N.; QUADROS, A. R. B.; MÜLLER, L. Características de carcaça e da carne de novilhos de diferentes genótipos de Hereford X Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 28, n. 6, p. 1245-1251, 1999.

SEYFERT, M.; MANCINI, R. A.; HUNT, M. C.; TANG, J.; FAUSTMAN, C.; GARCIA, M. Color stability, reducing activity, and cytochrome c oxidase activity of five bovine muscles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, USA, v. 54, n. 23, p. 8919-8925, Nov. 2006.

SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; MILLER, M. F.; CROUSE, J. D.; REAGAN, J. O. An evaluation of tenderness of the *longissimus* muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v. 69, n. 1, p. 171-177, Jan. 1991.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLI, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, London, GBR, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2006.

SJÖBLOM, B.; SALMAZO, A.; DJINOVIC-CARUGO, K. Alpha-actinin structure and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, SWI, v. 65, n. 17, p. 2688-2701, Sep. 2008.

SOJI, Z.; MUCHENJE, V. Effect of genotype and age on some carcass and meat quality traits of beef carcasses subjected to the South African classification system. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 117, p. 205-211, Jul. 2016.

STARKEY, C. P.; GEESINK, G. H.; COLLINS, D.; ODDY, V. H.; HOPKINS, D. L. Do sarcomere length, collagen content, pH, intramuscular fat and desmin degradation explain variation in the tenderness of three ovine muscles? **Meat Science**, Barking, GBR, v. 113, p. 51-58, Mar. 2016.

SUWANDY, V.; CARNE, A.; VAN DE VEN, R.; BEKHIT, A. E. D. A.; HOPKINS, D. L. Effect of pulsed electric field on the proteolysis of cold boned beef *M. Longissimus lumborum* and *M. Semimembranosus*. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 100, p. 222-226, Feb. 2015.

SUWANDY, V.; CARNE, A.; VAN DE VEN, R.; BEKHIT, A. E. D. A.; HOPKINS, D. L. Effect of pulsed electric field treatment on hot-boned muscles of diferente potential tenderness. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 105, p. 25-31, Jul. 2015.

SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; WYDER, S.; FORSLUND, K.; HELLER, D.; HUERTE-CEPAS, J.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; SANTOS, A.; TSAFOU, K. P.; KUHN, M.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; MERING, C. STRING v10: protein - protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic Acids Research Advance, Nucleic Acids Research**, Oxford, GBR, v. 43, p. 447-452, Jan. 2015.

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

TELTATHUM, T.; MEKCHAY, S. Proteome changes in Thai indigenous chicken muscle during growth period. **International Journal of Biological Sciences**, [S.I.], v. 5, n. 7, p. 679-685, Oct. 2009.

TORNBERG, E. Biophysical aspects of meat tenderness. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 43, Supl. 1, p. 175-191, 1996.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Livestock and poultry: world markets and trade**. USDA, 2016. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/data/livestock-and-poultry-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 06 jun. 2016.

WANG, K.; SPECTOR, A. ATP causes small heat shock proteins to release denatured protein. **European Jorunal of Biochemistry**, [S.I.], v. 268, n. 24, p. 6335-6345, Dec. 2001.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M. E.; CROUSE, J. D. Predicting beef-*longissimus* tenderness from various biochemical and histological muscle traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v. 68, n. 12, p. 4193-4199, Dec. 1990a.

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

WILKINS, M. R.; PASQUALI, C.; APPEL, R. D.; OU, K.; GOLAZ, O.; SANCHEZ, J. C.; YAN, J. X.; GOOLEY, A. A.; HUGHES, G.; HUMPHERY-SMITH, I.; WILLIAMS, K. L.; HOCHSTRASSER, D. F. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Biotechnology**, Frankfurt, GER, v. 14, n. 1, p. 61-65, Jan. 1996.

WU, G.; CLERENS, S.; FAROUK, M. M. LC MS/MS identification of large structural proteins from bull muscle and their degradation products during *post mortem* storage. **Food Chemistry**, London, GBR, v. 150, p. 137-144, May 2014.

WU, W.; GAO, X. G.; DAI, Y.; FU, Y.; LI, X. M.; DAI, R. T. *Post-mortem* changes in sarcoplasmic proteome and its relationship to meat color traits in *M. semitendinosus* of Chinese Luxi yellow cattle. **Food Research International**, Barking, GBR, v. 72, p. 98-105, Jun. 2015.

WU, W.; YU, Q. Q.; FU, Y.; TIAN, X. J.; JIA, F.; LI, X. M.; DAI, R. T. Towards muscle-specific meat color stability of Chinese Luxi yellow cattle: A proteomic insight into *post-mortem* storage. **Journal of Proteomics**, [S.I.], v. 147, p. 108-118, Sep. 2016.

WULF, D. M.; EMNETT, R. S.; LEHESKA, J. M.; MOELLER, S. J. Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm, and dry) beef, and cooked beef palatability. **Journal of Animal Science**, Champaign, USA, v. 80, n. 7, p. 1895-1903, Jul. 2002.

YOUNG, O. A.; WEST, J.; HART, A. L.; VAN OTTERDIJK, F. F. H. A method for early determination of meat ultimate pH. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 66, n. 2, p. 493-498, Feb. 2004.

YU, J.; TANG, S.; BAO, E.; ZHANG, M.; HAO, Q.; YUE, Z. The effect of transportation on the expression of heat shock proteins and meat quality of *M. longissimus dorsi* in pigs. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 83, n. 3, p. 474-478, Nov. 2009.

ZEOLA, N. M. B. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; SILVA SOBRINHO, A. G.; BARBOSA, J. C. Cor, capacidade de retenção de água e maciez da carne de cordeiro maturada e injetada com cloreto de cálcio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, BRA, v. 59, n. 4, p. 1058-1066, Ago. 2007.

ZHANG, Q.; LEE, H. G.; HAN, J.; KIM, E. B.; KANG, S. K.; YIN, J.; BAIK, M.; SHEN, Y.; KIM, S. H.; SEO, K. S.; CHOI, Y. J. Differentially expressed proteins during fat accumulation in bovine skeletal muscle. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 86, n. 3, p. 814-820, Nov. 2010.

ZUO, H.; HAN, L.; YU, Q.; NIU, K.; ZHAO, S.; SHI, H. Proteome changes on water-holding capacity of yak *longissimus lumborum* during postmortem aging. **Meat Science**, Barking, GBR, v. 121, p. 409-419, Nov. 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Proteínas totais identificadas na análise de espectrometria de massas

(continua)

Acesso Uniprot	Nome da Proteína	Gene	Sequência de cobertura (%)	Peptídeo único
P62261	<i>14-3-3 protein epsilon</i>	<i>YWHAE</i>	7,45	1
Q29RZ0	<i>Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial</i>	<i>ACAT1</i>	4,03	1
P51122	<i>Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A</i>	<i>ANP32A</i>	5,22	1
P20004	<i>Aconitate hydratase, mitochondrial</i>	<i>ACO2</i>	5,51	2
P68138	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	<i>ACTA1</i>	53,10	5
P60712	<i>Actin, cytoplasmic 1</i>	<i>ACTB</i>	21,30	0
P07033	<i>Acyolphosphatase-2</i>	<i>ACYP2</i>	13,10	1
P00570	<i>Adenylate kinase isoenzyme 1</i>	<i>AK1</i>	12,90	2
A5PJR4	<i>Adenylosuccinate synthetase isozyme 1</i>	<i>ADSSL1</i>	4,60	1
P02722	<i>ADP/ATP translocase 1</i>	<i>SLC25A4</i>	4,03	1
P20000	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>	<i>ALDH2</i>	3,27	1
Q3ZC55	<i>Alpha-actinin-2</i>	<i>ACTN2</i>	1,57	0
Q0III9	<i>Alpha-actinin-3</i>	<i>ACTN3</i>	35,20	19
A5D7D1	<i>Alpha-actinin-4</i>	<i>ACTN4</i>	5,60	1
P02510	<i>Alpha-crystallin B chain</i>	<i>CRYAB</i>	7,43	1
Q9XSJ4	<i>Alpha-enolase</i>	<i>ENO1</i>	10,80	0
P81287	<i>Annexin A5</i>	<i>ANXA5</i>	4,98	1

APÊNDICE A – Proteínas totais identificadas na análise de espectrometria de massas

(continuação)				
Acesso Uniprot	Nome da Proteína	Gene	Sequência de cobertura (%)	Peptídeo único
P33097	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	<i>GOT1</i>	4,84	1
P19483	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	<i>ATP5A1</i>	3,98	1
P00829	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	<i>ATP5B</i>	13,60	4
P13621	<i>ATP synthase subunit O, mitochondrial</i>	<i>ATP5O</i>	7,98	1
Q0IIG5	<i>ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type</i>	<i>PFKM</i>	5,91	4
Q3ZC09	<i>Beta-enolase</i>	<i>ENO3</i>	24,20	3
Q3SZX4	<i>Carbonic anhydrase 3</i>	<i>CA3</i>	29,20	7
P00432	<i>Catalase</i>	<i>CAT</i>	3,98	1
Q29RK1	<i>Citrate synthase, mitochondrial</i>	<i>CS</i>	4,94	1
Q148F1	<i>Cofilin-2</i>	<i>CFL2</i>	12,00	1
Q9XSC6	<i>Creatine kinase M-type</i>	<i>CKM</i>	34,90	8
Q3ZBP1	<i>Creatine kinase S-type, mitochondrial</i>	<i>CKMT2</i>	5,97	2
P23004	<i>Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial</i>	<i>UQCRC2</i>	3,53	1
P68530	<i>Cytochrome c oxidase subunit 2</i>	<i>MT-CO2</i>	8,81	1
Q01321	<i>Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4</i>	<i>NDUFA4</i>	14,60	1
P00125	<i>Cytochrome c1, heme protein, mitochondrial</i>	<i>CYC1</i>	3,69	1
P21793	<i>Decorin</i>	<i>DCN</i>	6,67	1

APÊNDICE A – Proteínas totais identificadas na análise de espectrometria de massas

(continuação)

Acesso Uniprot	Nome da Proteína	Gene	Sequência de cobertura (%)	Peptídeo único
O62654	<i>Desmin</i>	<i>DES</i>	16,20	4
Q2KJJ9	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2</i>	<i>FBP2</i>	5,01	1
P11116	<i>Galectin-1</i>	<i>LGALS1</i>	11,90	1
Q3ZBD7	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	<i>GPI</i>	2,69	1
P28801	<i>Glutathione S-transferase P</i>	<i>GSTP1</i>	8,10	1
P10096	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>GAPDH</i>	37,20	8
Q5EA88	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic</i>	<i>GPD1</i>	13,20	2
P79334	<i>Glycogen phosphorylase, muscle form</i>	<i>PYGM</i>	39,20	28
Q27975	<i>Heat shock 70 kDa protein 1^a</i>	<i>HSPA1A</i>	2,03	1
Q3T149	<i>Heat shock protein beta-1</i>	<i>HSPB1</i>	37,80	4
Q148F8	<i>Heat shock protein beta-6</i>	<i>HSPB6</i>	6,10	1
P01966	<i>Hemoglobin subunit alpha</i>	<i>HBA</i>	10,60	1
P02070	<i>Hemoglobin subunit beta</i>	<i>HBB</i>	8,28	1
P0C0S9	<i>Histone H2A type 1</i>	<i>N/A</i>	14,60	1
Q2M2T1	<i>Histone H2B type 1-K</i>	<i>HIST1H2BK</i>	11,90	1
P62803	<i>Histone H4</i>	<i>N/A</i>	9,71	1
P06394	<i>Keratin, type I cytoskeletal 10</i>	<i>KRT10</i>	1,71	1

APÊNDICE A – Proteínas totais identificadas na análise de espectrometria de massas

(continuação)

Acesso Uniprot	Nome da Proteína	Gene	Sequência de cobertura (%)	Peptídeo único
A1L595	<i>Keratin, type I cytoskeletal 17</i>	<i>KRT17</i>	2,95	1
Q148H6	<i>Keratin, type I cytoskeletal 28</i>	<i>KRT28</i>	1,94	1
Q5XQN5	<i>Keratin, type II cytoskeletal 5</i>	<i>KRT5</i>	2,00	1
Q148H7	<i>Keratin, type II cytoskeletal 79</i>	<i>KRT79</i>	2,24	1
P19858	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	<i>LDHA</i>	46,70	9
Q5E9B1	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>	<i>LDHB</i>	8,08	1
Q3T145	<i>Malate dehydrogenase, cytoplasmic</i>	<i>MDH1</i>	3,59	1
Q32LG3	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	<i>MDH2</i>	8,88	2
P19879	<i>Mimecan</i>	<i>OGN</i>	5,35	1
P02192	<i>Myoglobin</i>	<i>MB</i>	57,10	7
P80473	<i>Myomesin-1</i>	<i>MYOM1</i>	4,41	1
A0JNJ5	<i>Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform</i>	<i>MYL1</i>	55,70	7
P85100	<i>Myosin light chain 3</i>	<i>MYL3</i>	12,60	0
Q0P571	<i>Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform</i>	<i>MYLPF</i>	48,20	7
Q3SZE5	<i>Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform</i>	<i>MYL2</i>	13,90	2
Q9BE40	<i>Myosin-1</i>	<i>MYH1</i>	1,81	1
Q9BE41	<i>Myosin-2</i>	<i>MYH2</i>	1,19	1

APÊNDICE A – Proteínas totais identificadas na análise de espectrometria de massas

(continuação)

Acesso Uniprot	Nome da Proteína	Gene	Sequência de Peptídeo cobertura (%)	Peptídeo único
Q9BE39	<i>Myosin-7</i>	<i>MYH7</i>	18,80	17
Q8SQ24	<i>Myozenin-1</i>	<i>MYOZ1</i>	13,10	2
P23935	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5</i>	<i>NDUFA5</i>	18,10	1
P34943	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial</i>	<i>NDUFA9</i>	5,00	1
Q2HJ33	<i>Obg-like ATPase 1</i>	<i>OLA1</i>	3,79	1
Q3SX40	<i>PDZ and LIM domain protein 7</i>	<i>PDLIM7</i>	2,83	1
Q5E947	<i>Peroxiredoxin-1</i>	<i>PRDX1</i>	5,03	1
Q9BG13	<i>Peroxiredoxin-2</i>	<i>PRDX2</i>	8,54	1
P13696	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	<i>PEBP1</i>	16,60	2
Q08DP0	<i>Phosphoglucomutase-1</i>	<i>PGM1</i>	7,65	2
Q3T0P6	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	<i>PGK1</i>	2,64	1
Q32KV0	<i>Phosphoglycerate mutase 2</i>	<i>PGAM2</i>	25,30	6
Q3SYR3	<i>Probable C->U-editing enzyme APOBEC-2</i>	<i>APOBEC2</i>	6,25	1
Q5E946	<i>Protein deglycase DJ-1</i>	<i>PARK7</i>	19,60	2
Q0VCY0	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1</i>	<i>ATP2A1</i>	1,31	1
P02769	<i>Serum albumin</i>	<i>ALB</i>	14,00	7
P31039	<i>Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial</i>	<i>SDHA</i>	2,11	1

APÊNDICE A – Proteínas totais identificadas na análise de espectrometria de massas

(conclusão)				
Acesso Uniprot	Nome da Proteína	Gene	Sequência de cobertura (%)	Peptídeo único
O97680	<i>Thioredoxin</i>	<i>TXN</i>	12,40	1
Q3ZBT1	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	<i>VCP</i>	2,11	1
Q5E956	<i>Triosephosphate isomerase</i>	<i>TPI1</i>	59,00	10
Q0VC48	<i>Tropomodulin-4</i>	<i>TMOD4</i>	4,35	1
Q5KR49	<i>Tropomyosin alpha-1 chain</i>	<i>TPM1</i>	28,90	4
Q5KR48	<i>Tropomyosin beta chain</i>	<i>TPM2</i>	26,10	3
P63315	<i>Troponin C, slow skeletal and cardiac muscles</i>	<i>TNNC1</i>	9,32	1
Q8MKI3	<i>Troponin T, fast skeletal muscle</i>	<i>Tnnt3</i>	24,70	4
Q8MKH6	<i>Troponin T, slow skeletal muscle</i>	<i>TNNT1</i>	17,10	4
P81947	<i>Tubulin alpha-1B chain</i>	<i>N/A</i>	3,10	1
Q6B856	<i>Tubulin beta-2B chain</i>	<i>TUBB2B</i>	5,62	1
P63048	<i>Ubiquitin-60S ribosomal protein L40</i>	<i>UBA52</i>	19,50	2
Q3MHP1	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3</i>	<i>UBE2L3</i>	14,30	1
P48616	<i>Vimentin OS=Bos taurus GN=VIM PE=1 SV=3</i>	<i>VIM</i>	3,00	1

APÊNDICE B – Análise de variância ($P < 0,05$) das proteínas selecionadas (efeito de tratamento)

(continua)

Acesso Uniprot	Nome da proteína	GL Num	GL Den	Valor de F	Prob > F
P33097	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	1	8	0,63	0,4497
Q3SYR3	<i>Probable C->U-editing enzyme APOBEC-2</i>	1	8	3,24	0,1096
P20004	<i>Aconitate hydratase, mitochondrial</i>	1	8	0,03	0,8681
Q3ZC55	<i>Alpha-actinin-2</i>	1	8	2,21	0,1757
Q0III9	<i>Alpha-actinin-3</i>	1	8	0,04	0,8548
P68138	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	1	8	0,08	0,7827
P02769	<i>Serum albumin</i>	1	8	3,17	0,1127
P20000	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>	1	8	0,00	1,0000
Q0VCY0	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1</i>	1	8	2,58	0,1470
P19483	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	1	8	1,82	0,2145
P00829	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	1	8	0,21	0,6567
Q3SZX4	<i>Carbonic anhydrase 3</i>	1	8	2,52	0,1509
Q148F1	<i>Cofilin-2</i>	1	8	0,11	0,7508
P02510	<i>Alpha-crystallin B chain</i>	1	8	1,94	0,2011
O62654	<i>Desmin</i>	1	8	6,10	0,0387

GL Num = grau de liberdade do numerador; GL Den = grau de liberdade do denominador; Prob = probabilidade.

APÊNDICE B – Análise de variância ($P < 0,05$) das proteínas selecionadas (efeito de tratamento)

(continuação)

Acesso Uniprot	Nome da proteína	GL Num	GL Den	Valor de F	Prob > F
Q3ZC09	<i>Beta-enolase</i>	1	8	3,37	0,1038
Q2KJJ9	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2</i>	1	8	8,00	0,0222
P10096	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	1	8	0,41	0,5389
Q3ZBD7	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	1	8	4,50	0,0667
Q5EA88	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic</i>	1	8	7,00	0,0294
P28801	<i>Glutathione S-transferase P</i>	1	8	0,47	0,5108
P0C0S9	<i>Histone H2A type 1</i>	1	8	0,02	0,8921
Q2M2T1	<i>Histone H2B type 1-K</i>	1	8	0,07	0,7978
P01966	<i>Hemoglobin subunit alpha</i>	1	8	0,00	1,0000
P02070	<i>Hemoglobin subunit beta</i>	1	8	0,15	0,7115
Q27975	<i>Heat shock 70 kDa protein 1^a</i>	1	8	0,09	0,7764
Q3T149	<i>Heat shock protein beta-1</i>	1	8	0,07	0,8021
P06394	<i>Keratin, type I cytoskeletal 10</i>	1	8	1,83	0,2133
Q148H6	<i>Keratin, type I cytoskeletal 28</i>	1	8	0,00	1,0000
Q5XQN5	<i>Keratin, type II cytoskeletal 5</i>	1	8	1,35	0,2787

GL Num = grau de liberdade do numerador; GL Den = grau de liberdade do denominador; Prob = probabilidade.

APÊNDICE B – Análise de variância ($P < 0,05$) das proteínas selecionadas (efeito de tratamento)

(continuação)

Acesso Uniprot	Nome da proteína	GL Num	GL Den	Valor de F	Prob > F
P00570	<i>Adenylate kinase isoenzyme 1</i>	1	8	1,57	0,2452
Q9XSC6	<i>Creatine kinase M-type</i>	1	8	0,12	0,7418
Q3ZBP1	<i>Creatine kinase S-type, mitochondrial</i>	1	8	0,68	0,4333
P19858	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	1	8	7,76	0,0237
P11116	<i>Galectin-1</i>	1	8	0,65	0,4419
Q32LG3	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	1	8	1,69	0,2298
Q0P571	<i>Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform</i>	1	8	0,48	0,5064
Q3SZE5	<i>Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform</i>	1	8	0,23	0,6431
P02192	<i>Myoglobin</i>	1	8	3,42	0,1015
Q9BE40	<i>Myosin-1</i>	1	8	0,38	0,5564
A0JNJ5	<i>Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform</i>	1	8	0,17	0,6938
Q8SQ24	<i>Myozenin-1</i>	1	8	4,20	0,0747
Q2HJ33	<i>Obg-like ATPase 1</i>	1	8	1,33	0,2815
P13696	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	1	8	0,67	0,4379
Q0IIG5	<i>ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type</i>	1	8	0,31	0,5928

GL Num = grau de liberdade do numerador; GL Den = grau de liberdade do denominador; Prob = probabilidade.

APÊNDICE B – Análise de variância ($P < 0,05$) das proteínas selecionadas (efeito de tratamento)

					(conclusão)
Acesso Uniprot	Nome da proteína	GL Num	GL Den	Valor de F	Prob > F
Q32KV0	<i>Phosphoglycerate mutase 2</i>	1	8	0,08	0,7831
Q3T0P6	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	1	8	1,75	0,2223
Q08DP0	<i>Phosphoglucomutase-1</i>	1	8	0,47	0,5134
Q9BGI3	<i>Peroxiredoxin-2</i>	1	8	0,31	0,5927
P79334	<i>Glycogen phosphorylase, muscle form</i>	1	8	0,02	0,8973
Q3ZBT1	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	1	8	2,25	0,1720
Q0VC48	<i>Tropomodulin-4</i>	1	8	0,02	0,8798
Q8MKH6	<i>Troponin T, slow skeletal muscle</i>	1	8	0,10	0,7655
Q8MKI3	<i>Troponin T, fast skeletal muscle</i>	1	8	1,32	0,2839
Q5E956	<i>Triosephosphate isomerase</i>	1	8	0,31	0,5927
Q5KR48	<i>Tropomyosin beta chain</i>	1	8	1,06	0,3336

GL Num = grau de liberdade do numerador; GL Den = grau de liberdade do denominador; Prob = probabilidade.

APÊNDICE C – Análise de variância ($P < 0,05$) das proteínas selecionadas (efeito de tempo)

(continua)

Acesso Uniprot	Nome da proteína	GL Num	GL Den	Valor de F	Prob > F
P33097	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	1	8	0,07	0,7978
Q3SYR3	<i>Probable C->U-editing enzyme APOBEC-2</i>	1	8	3,24	0,1096
P20004	<i>Aconitate hydratase, mitochondrial</i>	1	8	0,74	0,4161
Q3ZC55	<i>Alpha-actinin-2</i>	1	8	0,55	0,4788
Q0III9	<i>Alpha-actinin-3</i>	1	8	7,34	0,0267
P68138	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	1	8	0,08	0,7827
P02769	<i>Serum albumin</i>	1	8	0,41	0,5393
P20000	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>	1	8	0,22	0,6499
Q0VCY0	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1</i>	1	8	3,37	0,1038
P19483	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	1	8	0,09	0,7769
P00829	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	1	8	1,92	0,2036
Q3SZX4	<i>Carbonic anhydrase 3</i>	1	8	1,00	0,3466
Q148F1	<i>Cofilin-2</i>	1	8	0,43	0,5293
P02510	<i>Alpha-crystallin B chain</i>	1	8	1,43	0,2667
O62654	<i>Desmin</i>	1	8	3,17	0,1128

GL Num = grau de liberdade do numerador; GL Den = graus de liberdade do denominador; Prob = probabilidade.

APÊNDICE C – Análise de variância ($P < 0,05$) das proteínas selecionadas (efeito de tempo)

(continuação)

Acesso Uniprot	Nome da proteína	GL Num	GL Den	Valor de F	Prob > F
Q3ZC09	<i>Beta-enolase</i>	1	8	0,01	0,9433
Q2KJJ9	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2</i>	1	8	8,00	0,0222
P10096	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	1	8	0,28	0,6137
Q3ZBD7	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	1	8	0,50	0,4996
Q5EA88	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic</i>	1	8	3,57	0,0955
P28801	<i>Glutathione S-transferase P</i>	1	8	0,47	0,5108
P0C0S9	<i>Histone H2A type 1</i>	1	8	0,18	0,6855
Q2M2T1	<i>Histone H2B type 1-K</i>	1	8	0,07	0,7978
P01966	<i>Hemoglobin subunit alpha</i>	1	8	0,08	0,7865
P02070	<i>Hemoglobin subunit beta</i>	1	8	0,15	0,7115
Q27975	<i>Heat shock 70 kDa protein 1^a</i>	1	8	0,47	0,5123
Q3T149	<i>Heat shock protein beta-1</i>	1	8	0,07	0,8021
P06394	<i>Keratin, type I cytoskeletal 10</i>	1	8	0,00	1,0000
Q148H6	<i>Keratin, type I cytoskeletal 28</i>	1	8	0,44	0,5237
Q5XQN5	<i>Keratin, type II cytoskeletal 5</i>	1	8	0,00	0,9472

GL Num = grau de liberdade do numerador; GL Den = graus de liberdade do denominador; Prob = probabilidade.

APÊNDICE C – Análise de variância ($P < 0,05$) das proteínas selecionadas (efeito de tempo)

(continuação)

Acesso Uniprot	Nome da proteína	GL Num	GL Den	Valor de F	Prob > F
P00570	<i>Adenylate kinase isoenzyme 1</i>	1	8	0,08	0,7875
Q9XSC6	<i>Creatine kinase M-type</i>	1	8	0,09	0,7695
Q3ZBP1	<i>Creatine kinase S-type, mitochondrial</i>	1	8	0,13	0,7328
P19858	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	1	8	0,03	0,8739
P11116	<i>Galectin-1</i>	1	8	0,65	0,4419
Q32LG3	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	1	8	0,00	1,0000
Q0P571	<i>Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform</i>	1	8	3,49	0,0988
Q3SZE5	<i>Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform</i>	1	8	0,32	0,5850
P02192	<i>Myoglobin</i>	1	8	1,01	0,3447
Q9BE40	<i>Myosin-1</i>	1	8	0,19	0,6727
A0JNJ5	<i>Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform</i>	1	8	0,49	0,5039
Q8SQ24	<i>Myozenin-1</i>	1	8	4,20	0,0747
Q2HJ33	<i>Obg-like ATPase 1</i>	1	8	0,33	0,5796
P13696	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	1	8	0,67	0,4379
Q0IIG5	<i>ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type</i>	1	8	0,21	0,6607

GL Num = grau de liberdade do numerador; GL Den = graus de liberdade do denominador; Prob = probabilidade.

APÊNDICE C – Análise de variância ($P < 0,05$) das proteínas selecionadas (efeito de tempo)

					(conclusão)
Acesso Uniprot	Nome da proteína	GL Num	GL Den	Valor de F	Prob > F
Q32KV0	<i>Phosphoglycerate mutase 2</i>	1	8	0,01	0,9267
Q3T0P6	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	1	8	0,54	0,4832
Q08DP0	<i>Phosphoglucomutase-1</i>	1	8	0,05	0,8254
Q9BGI3	<i>Peroxiredoxin-2</i>	1	8	0,86	0,3803
P79334	<i>Glycogen phosphorylase, muscle form</i>	1	8	1,14	0,3174
Q3ZBT1	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	1	8	2,25	0,1720
Q0VC48	<i>Tropomodulin-4</i>	1	8	0,22	0,6519
Q8MKH6	<i>Troponin T, slow skeletal muscle</i>	1	8	1,52	0,2521
Q8MKI3	<i>Troponin T, fast skeletal muscle</i>	1	8	1,67	0,2323
Q5E956	<i>Triosephosphate isomerase</i>	1	8	0,22	0,6548
Q5KR48	<i>Tropomyosin beta chain</i>	1	8	1,39	0,2721

GL Num = grau de liberdade do numerador; GL Den = graus de liberdade do denominador; Prob = probabilidade.

APÊNDICE D – Análise de variância ($P < 0,05$) das proteínas selecionadas (interação tratamento x tempo)

(continua)

Acesso Uniprot	Nome da proteína	GL Num	GL Den	Valor de F	Prob > F
P33097	<i>Aspartate aminotransferase, cytoplasmic</i>	1	8	1,12	0,3203
Q3SYR3	<i>Probable C->U-editing enzyme APOBEC-2</i>	1	8	1,96	0,1991
P20004	<i>Aconitate hydratase, mitochondrial</i>	1	8	1,44	0,2643
Q3ZC55	<i>Alpha-actinin-2</i>	1	8	0,94	0,3598
Q0III9	<i>Alpha-actinin-3</i>	1	8	5,43	0,0481
P68138	<i>Actin, alpha skeletal muscle</i>	1	8	1,32	0,2833
P02769	<i>Serum albumin</i>	1	8	0,05	0,8361
P20000	<i>Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial</i>	1	8	0,22	0,6499
Q0VCY0	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1</i>	1	8	2,58	0,1470
P19483	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>	1	8	0,00	0,9547
P00829	<i>ATP synthase subunit beta, mitochondrial</i>	1	8	2,86	0,1290
Q3SZX4	<i>Carbonic anhydrase 3</i>	1	8	0,28	0,6109
Q148F1	<i>Cofilin-2</i>	1	8	2,70	0,1388
P02510	<i>Alpha-crystallin B chain</i>	1	8	1,43	0,2667
O62654	<i>Desmin</i>	1	8	0,16	0,6981

GL Num = grau de liberdade do numerador; GL Den = graus de liberdade do denominador; Prob = probabilidade.

APÊNDICE D – Análise de variância ($P < 0,05$) das proteínas selecionadas (interação tratamento x tempo)

(continuação)

Acesso Uniprot	Nome da proteína	GL Num	GL Den	Valor de F	Prob > F
Q3ZC09	<i>Beta-enolase</i>	1	8	1,38	0,2739
Q2KJJ9	<i>Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2</i>	1	8	0,00	1,0000
P10096	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	1	8	0,87	0,3779
Q3ZBD7	<i>Glucose-6-phosphate isomerase</i>	1	8	2,19	0,1775
Q5EA88	<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic</i>	1	8	3,57	0,0955
P28801	<i>Glutathione S-transferase P</i>	1	8	0,47	0,5108
P0C0S9	<i>Histone H2A type 1</i>	1	8	0,49	0,5037
Q2M2T1	<i>Histone H2B type 1-K</i>	1	8	1,12	0,3203
P01966	<i>Hemoglobin subunit alpha</i>	1	8	1,25	0,2951
P02070	<i>Hemoglobin subunit beta</i>	1	8	1,04	0,3366
Q27975	<i>Heat shock 70 kDa protein 1^a</i>	1	8	0,01	0,9244
Q3T149	<i>Heat shock protein beta-1</i>	1	8	1,26	0,2940
P06394	<i>Keratin, type I cytoskeletal 10</i>	1	8	0,26	0,6258
Q148H6	<i>Keratin, type I cytoskeletal 28</i>	1	8	1,78	0,2191
Q5XQN5	<i>Keratin, type II cytoskeletal 5</i>	1	8	0,12	0,7413

GL Num = grau de liberdade do numerador; GL Den = graus de liberdade do denominador; Prob = probabilidade.

APÊNDICE D – Análise de variância ($P < 0,05$) das proteínas selecionadas (interação tratamento x tempo)

(continuação)

Acesso Uniprot	Nome da proteína	GL Num	GL Den	Valor de F	Prob > F
P00570	<i>Adenylate kinase isoenzyme 1</i>	1	8	1,24	0,2973
Q9XSC6	<i>Creatine kinase M-type</i>	1	8	2,24	0,1728
Q3ZBP1	<i>Creatine kinase S-type, mitochondrial</i>	1	8	0,01	0,9091
P19858	<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	1	8	2,17	0,1785
P11116	<i>Galectin-1</i>	1	8	0,00	1,0000
Q32LG3	<i>Malate dehydrogenase, mitochondrial</i>	1	8	0,31	0,5927
Q0P571	<i>Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform</i>	1	8	2,71	0,1381
Q3SZE5	<i>Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform</i>	1	8	0,69	0,4298
P02192	<i>Myoglobin</i>	1	8	3,82	0,0863
Q9BE40	<i>Myosin-1</i>	1	8	0,59	0,4632
A0JNJ5	<i>Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform</i>	1	8	2,67	0,1411
Q8SQ24	<i>Myozenin-1</i>	1	8	4,20	0,0747
Q2HJ33	<i>Obg-like ATPase 1</i>	1	8	0,33	0,5796
P13696	<i>Phosphatidylethanolamine-binding protein 1</i>	1	8	2,67	0,1411
Q0IIG5	<i>ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type</i>	1	8	0,13	0,7322

GL Num = grau de liberdade do numerador; GL Den = graus de liberdade do denominador; Prob = probabilidade.

APÊNDICE D – Análise de variância ($P < 0,05$) das proteínas selecionadas (interação tratamento x tempo)

					(conclusão)
Acesso Uniprot	Nome da proteína	GL Num	GL Den	Valor de F	Prob > F
Q32KV0	<i>Phosphoglycerate mutase 2</i>	1	8	8,66	0,0186
Q3T0P6	<i>Phosphoglycerate kinase 1</i>	1	8	3,11	0,1156
Q08DP0	<i>Phosphoglucomutase-1</i>	1	8	0,05	0,8254
Q9BGI3	<i>Peroxiredoxin-2</i>	1	8	0,31	0,5927
P79334	<i>Glycogen phosphorylase, muscle form</i>	1	8	0,04	0,8465
Q3ZBT1	<i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>	1	8	2,25	0,1720
Q0VC48	<i>Tropomodulin-4</i>	1	8	0,61	0,4574
Q8MKH6	<i>Troponin T, slow skeletal muscle</i>	1	8	3,43	0,1012
Q8MKI3	<i>Troponin T, fast skeletal muscle</i>	1	8	2,97	0,1232
Q5E956	<i>Triosephosphate isomerase</i>	1	8	1,04	0,3370
Q5KR48	<i>Tropomyosin beta chain</i>	1	8	0,11	0,7526

GL Num = grau de liberdade do numerador; GL Den = graus de liberdade do denominador; Prob = probabilidade.