UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALESSANDRA APARECIDA SILVA

**Efeito de condição sexual, tempo de confinamento, atmosfera modificada,
metabolismo celulares e regiões anatômicas do músculo sobre a oxidação e
outras características de qualidade da carne bovina maturada**

Pirassununga

2014

ALESSANDRA APARECIDA SILVA

Efeito de condição sexual, tempo de confinamento, atmosfera modificada, metabolismo celulares e regiões anatômicas do músculo sobre a oxidação e outras características de qualidade da carne bovina maturada

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 Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

S586e Silva, Alessandra Aparecida
Efeito de condição sexual, tempo de confinamento,
atmosfera modificada, metabolismo celular e regiões
anatômicas do músculo sobre oxidação e outras
características de qualidade da carne bovina maturada /
Alessandra Aparecida Silva. -- Pirassununga, 2014.
72 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.
Orientadora: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo.
1. Aerobiose 2. Anaerobiose 3. Embalagem
4. Fibra muscular 5. Peroxidação lipídica 6. Proteólise
miofibrilar. I. Título.

Á Deus por ter me fortalecido, dado sabedoria e permitido alcançar mais esta vitória. Te amo JESUS acima de tudo e de todos!!!!.

Á minha amada família, preciosos pais Nelson e Lourdes por toda a educação, princípios, empenho e caráter que me passaram... Que Deus lhes pague por tudo.

Em especial ao meu esposo Adalfredo e filhos Victor Hugo e Maria Eduarda por serem o meu porto seguro e o grande estímulo de minha caminhada.

Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), ao programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos e ao Laboratório de Química Biológica, pela acolhida e suporte a minha formação.

À professora Dra. Mariza Pires de Melo pela orientação, oportunidade, amizade e dedicação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo auxílio financeiro fornecido (Processo nº 2010/11013-8) e a bolsa de estudo (Processo nº 2010/08565-9).

Ao professor Dr. Youling Xiong (University of Kentucky) pela oportunidade de estagiar em seu laboratório, pelos conhecimentos transmitidos e grande amizade.

Aos professores Dr. Eduardo Francisquine Delgado e Dra. Carmen Josefina Contreras Castillo pela confiança, apoio e conhecimento transmitido e aos professores Dr. Saulo da Luz e Silva e Dr. Marco Antônio Trindade por todo auxílio prestado.

Aos funcionários do abatedouro escola da FZEA/USP, em especial ao Sr. Benedito e a Camila.

Ao meu esposo Adalfredo Rocha Lobo Júnior, pela paciência e ajuda com as análises estatísticas e tantas outras coisas.

À todos os funcionários do Departamento de Ciências Básicas, Márcia, Márcio... por toda amizade e auxílio. De forma especial a você Silvana por tudo o que fez por mim ao longo dos anos que estive no laboratório de Química Biológica (Que Deus lhe pague).

À equipe e amigos de pós-graduação: Eliane, Patrícia, Silvana, Pamela, Natana, Marcus, Taciana, Tomas, Luciane, Romy, Rafaela, Jéssica..... A todos o meu muito obrigado!!

À todos os que direta ou indiretamente contribuíram com esta pesquisa e finalmente a DEUS, pois sem Ele este trabalho jamais teria sido concluído.

“Porque eis que vem o dia, ardente como uma fomalha. E todos os soberbos, todos os que cometem o mal serão como a palha; este dia que vai vir os queimará – diz o Senhor dos exércitos – e nada ficará: nem raiz, nem ramos. Mas, sobre vós que temeis o meu nome, levantar-se-á o sol de justiça que traz a salvação em seus raios. Saireis e saltareis, livres como os bezerros ao saírem do estábulo. Pisareis aos pés os ímpios, os quais serão pó, sob a planta de vossos pés, no dia em que eu agir – diz o Senhor dos exércitos”.

Malaquias 3:19-21

RESUMO

SILVA, A.A. **Efeito de condição sexual, tempo de confinamento, atmosfera modificada, metabolismo celulares e regiões anatômicas do músculo sobre a oxidação e outras características de qualidade da carne bovina maturada.** 2014. 72 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da castração, tempo de confinamento, metabolismo celular e regiões do musculo sobre a oxidação proteica e lipídica e outras características de qualidade da carne bovina. Oitenta e quatro bovinos (castrados e inteiros) Nelore, confinados por diferentes períodos, foram usados para conduzir estudos em músculos *Longissimus dorsi* e *Biceps femoris*. O segundo musculo foi dividido em duas porções: origem (PO) e inserção (PI). No estudo com *L. dorsi*, bifes foram embalados sob condições de aerobiose (PVC) e anaerobiose (vácuo) e maturados por 1, 3, 5, 7 e 9, e 1, 7, 14 e 21 dias, respectivamente. Para este músculo, nenhuma diferença na estabilidade oxidativa [tióis, carbonilas e Substancias Reativas ao Ácido Tiobarbiturico (TBARS)] e cor entre as carnes dos animais inteiros e castrados foram encontradas. Isto poderia ser explicado pela falta de diferença no status oxidativo inicial, mensurados através da atividade de enzimas antioxidantes, conteúdo de glutathione total e composição de ácidos graxos, entre as condições sexuais. Os resultados também indicaram que a oxidação dos bifes embalados a vácuo leva o dobro de dias para iniciar, em comparação aos bifes em aerobiose. No estudo com o *Bíceps femoris*, os animais foram abatidos com 59 e 129 dias de confinamento e os bifes da PO e PI foram maturados por 1, 30, 60 e 100 dias. Os resultados da atividade das enzimas lactato desidrogenase e citrato sintase mostraram que a PO tem metabolismo mais oxidativo (aeróbio) e a PI glicolítico (anaeróbio). A carne dos animais inteiros tiveram menor

TBARS e maior luminosidade (L^*), perda de peso por cocção (PPC) e força de cisalhamento (FC) em comparação aos animais castrados. A PO foi mais susceptível a oxidação proteica (menor tióis) em comparação a PI. A carne dos animais confinados por 129 dias tiveram maiores PPC e oxidação proteica (menores tióis) em comparação a carne dos animais confinados por 59 dias. Diferenças de estabilidade oxidativa entre a carne de animais castrados e inteiros confinados por menor período desapareceram quando os animais foram confinados por maior período. Valores de pH e tióis na carne dos animais castrados e inteiros foram afetados pelo tempo de maturação. Ambas as condições sexuais tiveram carne com maior valores de pH no dia 30 de maturação e este, se manteve ao longo do tempo. A PO teve maiores valores de TBARS no dia 60, PPC no dia 100 e FC nos dias 30 e 60 de maturação em comparação a PI. Foi observada uma interação entre tempo de confinamento e tempo de maturação para tióis, TBARS, metamioglobina, pH, L^* e FC. Quando comparado aos animais confinados por 59 dias, os animais confinados por 129 dias tiveram: maior oxidação (maior TBARS e menor tióis) nos dias 60 e 100 de maturação; oxidação da mioglobina (metamioglobina) mais tardia, sendo o maior valor obtido no dia 100; menor luminosidade (L^*) em todos os tempos de maturação; maior maciez (menor FC) aos 100 dias de maturação. Os animais confinados por 59 dias tiveram: maior oxidação proteica (menor tióis) e maciez (menor FC) aos 30 dias de maturação. De forma geral, todos os efeitos testados tais como castração, tempo de confinamento, metabolismo celular e regiões do musculo pareceram influenciar sobre a oxidação proteica e lipídica e outras características de qualidade da carne bovina.

Palavras-chave: aerobiose, anaerobiose, castração, embalagem, fibra muscular, peroxidação lipídica, proteólise miofibrilar.

ABSTRACT

SILVA, A.A. **Effect of sexual condition, time on confinement, modified atmosphere, cellular metabolisms and anatomic regions of muscle on the oxidation and other traits of aged beef quality.** 2014. 72 f. Ph.D. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

The objective of this work was to investigate the effect of the castration, time on confinement, cellular metabolism and muscle region on the protein and lipid oxidation, and other traits of beef quality. Eight-four Nellore cattle (steers and bulls), confined for different periods, were used to conduct studies in *Longissimus dorsi* and *Biceps femoris* muscles. The latter muscle was divided in two portions: origin (OP) and insertion (IP). In the study of *L. dorsi* muscle, steaks were packaged under aerobiosis (PVC) and anaerobiosis (vacuum) conditions and aged for 1, 3, 5, 7 and 9, and 1, 7, 14 and 21 days, respectively. For this muscle, no differences in oxidative stability [thiols, carbonyls and Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)] and color between the meat from bulls and steers were found. This could be explained by the lack of differences in initial oxidative status, measured through the activity of the antioxidants enzymes, content of total glutathione and composition of fatty acids, between the sexual conditions. The results also indicated that the oxidation of the steaks vacuum-packaged took about twice more days to start than the steaks under aerobiosis. In the study of *Biceps femoris* muscle, the animals were slaughtered after 59 and 129 days on confinement and the steaks from OP and IP were aged for 1, 30, 60 and 100 days. The results of the lactate dehydrogenase and citrate synthase enzymes activity showed that the OP has a more oxidative metabolism and the IP has a more glycolytic metabolism. The meat from bulls had lower TBARS and higher lightness (L^*), cooking loss (CL) and shear force (SF) in comparison with steers. The OP was more susceptible to protein oxidation (lower thiols) than the

IP. Animals confined for 129 days had meat with higher CL when compared to those ones confined for 59 days. The meat from animals confined for 129 days had higher CL and protein oxidation (lower thiols) in regard to the meat from animals confined for 59 days. Differences in oxidative stability between the meat from steers and bulls confined for shorter period disappeared when the animals were confined for larger period. Values of pH and thiols in meat from steers and bulls were affected by the time of aging. Both the sexual conditions had meat with higher pH values at the day 30 of aging and this was kept across the time. The OP had higher values of TBARS at the day 60, CL at the day 100 and SF at the days 30 and 60 of aging when compared to the IP. It was observed an interaction between confinement time and aging time for thiols, TBARS, metmyoglobin, pH, L^* and SF. When compared to the animals confined for 59 days, the animals confined for 129 days had: higher oxidation (higher TBARS and lower thiols) at the days 60 and 100 of aging; oxidation of myoglobin (metmyoglobin) slower, since the higher value was obtained at the day 100; lower lightness (L^*) in all the times of aging; tender meat (lower SF) at 100 days of aging. The animals confined for 59 days had: higher protein oxidation (lower thiols) and tender meat (lower SF) at 30 days of aging. Overall, all the effects tested such as castration, time on confinement, cellular metabolism and muscle region seemed to influence on the protein and lipid oxidation and other traits of beef quality.

Keywords: aerobiosis, anaerobiosis, castration, lipid peroxidation, muscular fiber, myofibrillar proteolysis, package.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Susceptibilidade oxidativa da carne de bovinos confinados	12
2.2. Tipos de fibras musculares	14
2.3. Oxidação protéica em carnes	16
2.4. Oxidação lipídica em carnes	18
3. HIPÓTESE	20
4. OBJETIVO	20
5. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	21
5.1. Fluxograma do desenvolvimento	21
5.2. Delineamento experimental referente aos estudos com <i>Longissimus dorsi</i>	22
5.3. Delineamento experimental referente aos estudos <i>Biceps femoris</i>	23
6. MATERIAIS E MÉTODOS	24
7. RESULTADOS E DISCUSÃO	35
7.1. Estudos da oxidação proteica e lipídica em músculo <i>Longissimus dorsi</i> , obtidos de bovinos <i>Bos indicus</i> inteiros e castrados, sob duas condições de maturação: vácuo e aerobiose	35
7.2. Estudos da oxidação lipídica e proteica e de qualidade de carne no músculo <i>B. femoris</i> maturado obtidos de bovinos <i>Bos Indicus</i> castrados e inteiros confinados	47
8. CONCLUSÕES	62
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

Mudanças nas condições do músculo *postmortem* como queda de pH e elevação na força iônica fragilizam o sistema de defesa antioxidante, disparando as reações de oxidação da carne (HARRIS et al., 2001); e o que define a estabilidade oxidativa da carne é o balanço entre anti e prooxidantes que inclui concentração de ácidos graxos poliinsaturados, pigmentos heme e íons metálicos catalisadores (MERCIER et al., 2004; JOHNS et al., 1989).

Proteínas de carnes vermelhas e brancas são susceptíveis aos danos causados por oxidação durante processamento e armazenamento (XIONG, 2000; XIONG; DECKER, 1995). Problemas como, sabores indesejáveis, perda de coloração, destruição de nutrientes e formação de compostos tóxicos, são alguns dos aspectos de qualidade de carne afetados, que reduzem sua aceitabilidade pelo consumidor (KANNER, 1994).

Os músculos esqueléticos são compostos basicamente por três tipos de fibras, Vermelha - Tipo I (Contração lenta, metabolismo glicolítico aeróbio), Intermediária - Tipo IIA (Contração rápida, metabolismo glicolítico aeróbio e anaeróbio) e Branco - Tipo IIB (Contração rápida, metabolismo glicolítico anaeróbio) (XIONG, 1994). Sabe-se que aproximadamente 3% do oxigênio consumido pelas células durante o metabolismo aeróbio é convertido em espécies reativas de oxigênio (ERO) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), fator relevante em estudos de metabolismo oxidativo.

Os prooxidantes, de modo geral, contribuem para a geração de espécies altamente oxidantes como o radical hidroxil, radical peroxil, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico que, dentre outros, induzem a oxidação de moléculas como proteínas e lipídios (BUTTERFIELD et al., 1998; BURTON; TRABER, 1990). Normalmente, o grau de oxidação de carne é mensurado por determinação de grupos carbonilas e grupos tiois (oxidação protéica) e peróxidos de lipídio e

produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico - TBARS - (oxidação lipídica) (SANTÉ-LHOUTELLIER et al., 2008; RAMÍREZ; CAVA, 2007; VENTANAS et al., 2006).

Ambos os processos oxidativos, protéico e lipídico estão relacionados principalmente com descoloração e diminuição na maciez da carne. Em se tratando de cor da carne, a oxidação parece afetar a quantidade de ferro livre e ligado ao pigmento heme (ESTÉVEZ et al., 2006). Enquanto que, em maciez, a oxidação tem afetado proteólise miofibrilar, diminuindo a atividade da protease calpaína em carnes maturadas (MADDOCK CARLIN et al., 2006; ROWE et al., 2004ab) e aumentando as ligações resistentes entre proteínas miofibrilares (LUND et al., 2007; ROWE et al., 2004a); sendo que a proteólise miofibrilar é o processo que mais contribui para amaciamento natural da carne (KOOHMARAIE, 1994).

A castração de bovinos pode elevar o teor de gordura na carcaça (DEL CAMPO et al., 2008; JIAO et al., 2009), entretanto, resulta em alterações positivas de comportamento e temperamentos que podem resultar na diminuição da suscetibilidade destes ao estresse oxidativo. Barp et al. (2002) observaram uma diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e da peroxidação lipídica em ratos castrados. Por outro lado, pouco é relatado sobre o efeito de períodos prolongados de confinamento dos animais e sua interação com a castração, tipo de fibra muscular e qualidade de carne bovina. Neste sentido estudar o impacto da oxidação protéica e lipídica sobre características de qualidade da carne bovina maturada neste processo é justificável.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Susceptibilidade oxidativa da carne de bovinos confinados

O sistema de criação em confinamento, associada à castração, de bovinos é uma técnica bastante conhecidas e aplicadas na pecuária de corte, e tem como finalidade elevar a qualidade da carne e aumentar o peso dos animais em curto período de tempo através da incorporação de gordura

na carcaça. Suplementação dos animais com uma dieta de alta energia e, associada, a maiores tempos de confinamento dos animais no período de acabamento têm elevado o peso médio diário e também o teor de gordura intramuscular em bovinos (JIAO et al, 2009).

Uma considerável quantidade dos lipídios presentes no músculo bovino apresenta-se na forma de ácidos graxos insaturados (OKEUDO; MOSS, 2007), podendo aumentar de acordo com a alimentação (DEL CAMPO et al., 2008), idade (WARREN et al., 2008), confinamento (FRANCO et al., 2009), genética (WEEB; O'NEIL, 2008) e pela castração dos animais (WARRISS, 2000). A presença de ácidos graxos insaturados e poliinsaturados na carne tem sido essencial para desencadear o processo de oxidação lipídica e protéica (HOGBERG et al., 2002).

Okeudo e Moss (2007) estudando o perfil de ácidos graxos e gordura intramuscular, em carne de ovinos de diferentes pesos ao abate, observaram que os machos castrados elevaram a porcentagem do ácido graxo saturado 16:0 e do teor de lipídio intramuscular em comparação aos não castrados. Tal alteração no perfil de ácidos graxos pode minimizar a susceptibilidade dos produtos cárneos destes animais a oxidação, uma vez que a oxidação lipídica ocorre a partir de ácidos graxos insaturados (HOGBERG et al., 2002). Touros castrados tiveram menor razão de Omega 6/Omega 3, o que é bastante favorável a prevenção de doenças cardíacas em humanos (MONTEIRO et al., 2006).

Por outro lado, o efeito da castração e confinamento dos animais sobre a oxidação protéica é pouco conhecido. De acordo com alguns pesquisadores existe uma alta correlação positiva entre a oxidação das proteínas e a dos lipídios (VENTANAS et al., 2006; ARMENTEROS et al., 2009), mostrando que possivelmente ambas ocorram simultaneamente.

Para evitar os danos celulares pela oxidação a maioria dos sistemas biológicos usam de sistemas antioxidantes que poderiam converter os produtos gerados pela oxidação em derivados de espécies reativas ao oxigênio não reativos, dentre eles estariam as enzimas antioxidantes (STADTMA; LEVINE, 2000). Esta defesa ainda parece diminuir com a estocagem da carne e de

acordo com o perfil de ácidos graxos (RENERRE et al., 1996). Alguns trabalhos têm explorado a atividade de algumas enzimas antioxidantes afim de melhor entender a susceptibilidade oxidativa de carnes frescas e produtos cárneos (MERCIER et al., 2004; DESCALZO; SANCHO, 2008; MIELNIK et al., 2011; PASTSART et al., 2013).

Considerando ainda isoladamente a castração, bovinos machos e castrados depositam maior quantidade de gordura intramuscular em comparação aos machos inteiros (RODRIGUES; ANDRADE, 2004). Por outro lado, ratos castrados têm apresentado um menor potencial oxidativo observado através da diminuição da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) (BARP et al, 2002) e do conteúdo de TBARS (BARP et al, 2002; JIAO et al, 2009). Muito possível que tal efeito ocorra em razão da falta do hormônio sexual testosterona nos castrados, a qual provocaria alterações no temperamento do animal, podendo resultar em uma menor susceptibilidade ao estresse oxidativo.

2.2. Tipos de fibras musculares

Os bovinos, assim como todos os mamíferos, possuem três tipos de musculatura (músculo liso, músculo estriado cardíaco e estriado esquelético) sendo os estriados, os mais abundantes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O músculo esquelético é composto por diferentes tipos de fibras musculares, as quais se diferenciam basicamente pelo metabolismo, presenças de determinadas enzimas e suas atividades, tipo de contração e quantidade de mioglobina (WARRISS, 2000). Todas as características citadas anteriormente permitem a classificação do tipo de fibra e os principais tipos são apresentados na Figura 1.

Ainda, os músculos são formados por agrupamento de fibras homogêneas e a classificação destes é dada pelo tipo de fibra predominante. Estas possuem diferenças de metabolismo e variam dentro de diferentes regiões de um mesmo músculo, oque pode ser mais bem observado em

músculos grandes como os de bovinos. Diferenças de tipo de fibras e metabolismo das mesmas têm sido observadas nas regiões origem e inserção do musculo *Biceps femoris* bovino (GOTOH, 2003).

Relações entre tipo de fibras e potencial para a maciez do músculo têm sido relatadas. Dentro deste contexto, a taxa de proteólise em músculos de predominância branco de bovinos tem sido mais rápida quando comparada a músculos predominantemente vermelhos, e estes ainda demonstraram uma maior atividade das enzimas calpastatinas (principais inibidores das calpaínas, as quais são responsáveis pelo processo de amaciamento natural da carne) (KOOHARAIE et al., 1988). Por outro lado, outros autores trabalhando com carne suína afirmam que a taxa de proteólise *postmortem* provavelmente depende mais de uma variedade de características específicas do músculo, tais como potencial proteolítico (proporção m ou μ -calpaína:calpastatina) e taxa de declínio de pH do que simplesmente de variações entre tipo de fibras dentro do músculo (CHRISTENSEN et al., 2004).

Diferenças funcionais tais como solubilidade em solução salina e em diferentes pH, viscosidade, elasticidade de gel, entre outras também são relatadas entre músculos brancos (*Pectoralis superficialis*) e vermelhos (*Anterior latissimus dorsi*) de frangos (XIONG, 2000). Sugere-se que diferenças entre estes músculos devem-se a presença de diferentes isoformas e poliformismo da miosina e de outras proteínas miofibrilares nos dois modelos (MORITA et al., 1987; ABERLE et al., 2001; OKUMURA et al., 2005). Maior potencial a oxidação lipídica e protéica também foram observadas para a carne da coxa (músculo vermelho) em comparação a carne do peito (musculo branco) de frangos (SOYER et al., 2010). Os autores justificam tais diferenças pela quantidade de lipídios da coxa (~ 5%) em comparação ao peito (~ 2%) e que substâncias prooxidantes presentes na carne da coxa promoveriam a oxidação lipídica.

Figura 1. Principais características bioquímicas que diferenciam os tipos de fibras musculares.
Fonte: Warriss (2000)

Técnicas como a mensuração da atividade das enzimas lactato desidrogenase (LDH) e a citrato sintase (CS) são comumente empregadas na avaliação de metabolismo celular, auxiliando na caracterização de fibras musculares. A LDH é uma enzima de metabolismo anaeróbio, já a CS de metabolismo oxidativo.

2.3. Oxidação protéica em carnes

A partir do abate do animal e conversão do músculo em carne ocorrem várias alterações bioquímicas como a queda de pH e aumento da força iônica no meio celular. Consequentemente dar-se a o enfraquecimento dos sistemas antioxidantes de defesa e a oxidação é potencializada (HARRIS et al., 2001). A partir de então, na presença de compostos reativos ou de metais catalisadores pode-se ocorrer o processo de oxidação protéica (WOLF et al., 1986). Maiores

concentrações de lipídios insaturados, pigmentos heme e metais de transição servem como precursores ou catalisadores para a produção de espécies reativas de oxigênio (XIONG, 2000). Estes compostos e ou outros agentes oxidantes como a metamioglobina quando reagem com proteínas levam à formação de carbonilas (FEENEY et al., 1975) e diminuição de grupos sulfidrilas, também conhecidos como tióis (XIONG, 2000).

A oxidação protéica é um dos maiores indicadores de deterioração da carne (PARK et al., 2006) sendo responsável por várias modificações biológicas como a fragmentação, agregação e diminuição da solubilidade de proteínas através de modificações dos aminoácidos (TEREVINTO et al., 2010). Os efeitos negativos da oxidação protéica da carne como a diminuição e/ou alteração da maciez e da cor dependem da natureza do aminoácido oxidado (LUND et al., 2007; ROWE et al., 2004ab), capacidade de retenção de água (BERTRAM et al., 2007), estrutura da miosina (XIONG et al., 2009; OOIZUMI; XIONG, 2008) e atividade enzimática (ROWE et al., 2004b).

Na tentativa de minimizar os efeitos negativos á qualidade da carne fresca provocados pela oxidação, pesquisadores tem incorporado agentes antioxidantes na dieta dos animais (SANTÉ-LHOUTELLIER et al., 2008; ESTÉVEZ et al., 2006; ROWE et al., 2004ab) e feito uso de embalagem a vácuo (LUND et al., 2007; DELLES et al., 2011). Medidas como a estabilidade da temperatura na conservação da carne sob refrigeração e diminuição do tempo de congelamento ou refrigeração também tem demonstrado diminuir a oxidação (XIA et al., 2009; SOYER et al., 2010).

O processamento e tempo de maturação da carne também têm influenciado a oxidação protéica (SANTÉ-LHOUTELLIER et al., 2008), no entanto esta é uma prática largamente utilizada no processamento de carnes por resultar de forma natural no amaciamento da mesma. A susceptibilidade de enzimas à oxidação protéica, especificamente da calpaína, importante enzima durante a proteólise de carnes maturadas, tem sido alvo de estudos (GUTTMANN et al., 1997). Neste foco, a inativação da enzima μ ou m-calpaína, que requer condições redundantes para ser ativada e/ou a formação de agregados protéicos insolúveis, têm causado uma carne de menor

maciez (ROWE et al., 2004b). Outros autores indicam que proteínas oxidadas têm uma alta susceptibilidade à proteólise muscular (STADTMAN, 1990).

Diminuição da qualidade da cor da carne, fator este decisivo na compra deste produto, pode ocorrer a partir da oxidação do ferro presente no grupo heme da proteína mioglobina, conduzindo a formação de metamioglobina em que o ferro está no estado férrico. O desenvolvimento da metamioglobina, que resulta na coloração amarronzada da carne, depende essencialmente da taxa de oxidação da mioglobina e consumo de oxigênio (MARTINAUD et al., 1997). Deterioração da cor da carne por processos oxidativos é relatada, também, por Insani et al (2008).

A oxidação protéica em carnes pode ser avaliada por meio de técnica espectrofotométrica de quantificação dos grupos carbonilas (aldeídos e cetonas), pela quantificação do produto gerado da reação entre 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) e os grupos carbonilas de proteínas (OLIVER et al., 1987; LEVINE et al., 1990). Outro método comumente utilizado é a quantificação também espectrofotométrica de grupos tióis, denominados de sulfidrilas (ELLMAN, 1959). Métodos de fluorimetria são bastante empregados para avaliar grupos tióis (VILJANEN et al., 2004; ESTÉVEZ et al., 2008); e outros baseados em análises cromatográficas a partir da quantificação da ditirosina (LEVINE et al., 1994; BERTRAM et al., 2007), destruição do triptofano (BATIFOULIER et al., 2002) e referentes aos produtos da oxidação de lisina, arginina e prolina (ARMENTEROS et al., 2009).

2.4. Oxidação lipídica em carnes

Oxidação lipídica, quando em pequenas proporções, pode contribuir positivamente para qualidade da carne por desenvolver sabor desejável em carne cozida (FARMER, 1992). Entretanto, valores elevados de oxidação lipídica conferem efeitos negativos à qualidade da carne, causando ao decorrer do tempo de armazenamento em detrimento da perda da cor, odor e sabor de carne e

produtos cárneos (GRAY; PEARSON, 1987). Um nível máximo de 1,0 mg de MDA/kg de carne foi definido para uma boa aceitação do consumidor (RIPPOLL et al., 2011).

Carnes contêm lipídios insaturados e componentes prooxidantes em suas composições e isso aumenta sua susceptibilidade para desencadear o processo de oxidação lipídica. Das frações lipídicas no músculo, os fosfolipídios componentes da membrana celular contêm a mais alta proporção de ácidos graxos insaturados e tem sido estabelecido que esta fração seja primariamente responsável por oxidação lipídica em músculos (IGENE et al., 1980). Assim, até mesmo músculos com baixo teor de gordura são susceptíveis à oxidação lipídica, porque a redução no teor de gordura reflete principalmente uma redução de triglicerídeos, enquanto a fração fosfolipídica é menos afetada.

No armazenamento *postmortem*, a interação de espécies reativas de oxigênio, principalmente o radical hidroxil, com lipídios insaturados desencadeia um processo de peroxidação lipídica que leva à formação de peróxidos de lipídios e outros produtos (MONAHAN, 2000). Tal reação pode ser influenciada por fatores extrínsecos como temperatura, tipo de embalagem, tempo de armazenamento e irradiação ionizante (SANTÉ-LHOUTELLIER et al., 2008; OOIZUMI; XIONG, 2008; LUND et al., 2007).

Tecido muscular tem mecanismos antioxidantes endógenos, classificados como antioxidantes preventivos, para controlar oxidação lipídica *in vivo* (SIES, 1986), reduzindo a propagação da reação em cadeia (WAYNER et al., 1987). Estes antioxidantes endógenos reduzem *postmortem*, permitindo que radicais livres como o ânion superóxido elevem a oxidação de oximioglobina a metamioglobina, ativação de leucócitos presentes nos vasos do tecido muscular e oxidação de ácido ascórbico e outros componentes redutores do ferro na carne (KANNER et al., 1987).

Metodologias espectrofotométricas que visam mensurar a oxidação lipídica em carnes e produtos cárneos têm sido utilizadas (OSAWA et al., 2005). Dentre elas estão o teste das

substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o qual quantifica um produto da oxidação lipídica (malondialdeído ou malonaldeído), e o teste que determina o índice de peróxidos lipídicos (AGUIRREZÁBAL et al., 2000; RHEE; MYERS, 2003; BOSELLI et al., 2009).

3. HIPÓTESE

Características fisiológicas do animal (castrado e inteiro), tempo de confinamento e características metabólicas (aeróbia e anaeróbia) do tecido muscular influenciam na oxidação protéica e lipídica e qualidade de carne bovina maturada.

4. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é investigar o efeito da castração, tempo de confinamento, metabolismo celular e regiões do musculo sobre a oxidação proteica e lipídica e outras características de qualidade da carne bovina.

5. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

5.1. Fluxograma do desenvolvimento

n= Número de animais (bovinos)

5.2. Delineamento experimental referente aos estudos com *Longissimus dorsi*

n= Número de animais (bovinos)

5.3. Delineamento experimental referente aos estudos *Biceps femoris*

n= Número de animais (bovinos)

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Animais

Ao todo foram utilizadas amostras de 84 bovinos machos da raça Nelore (*Bos indicus*) com 23-29 meses de idade. Para os estudos com o *Longissimus. dorsi* maturados à vácuo foram 20 animais (10 castrados e 10 inteiros) confinados por 137 dias com 23 meses de idade. Para o *L. dorsi* maturados em aerobiose foram utilizados 12 animais (6 castrados e 6 inteiros) confinados por 115 dias com 25 meses de idade. Nos estudos com *Bíceps femoris* foram utilizados 52 animais que compuseram 2 divisões de grupos por objetivos: 1) 12 animais (6 castrados e 6 inteiros) confinados por 115 dias e com 25 meses destinados para estudo do metabolismo celular de diferentes porções do musculo; 2) 40 animais (18 castrados e 22 inteiros) sendo a metade deles abatidos aos 59 dias de confinamento e com 25 meses e a outra metade abatidos aos 129 dias de confinamento e com 29 meses. Todos os animais receberam uma dieta padrão formulada com uso do programa ‘*National Research Council*’ (NRC) e comum para todos os animais composta de bagaço de cana, grão de milho, farelo de soja, casca de soja, uréia e núcleo mineral balanceada e formulada com uso do programa NRC. A castração cirúrgica dos animais foi realizada em média doze meses antes ao abate destes.

6.2. Amostragem dos músculos *Longissimus dorsi* e *Biceps femoris*

A amostragem dos músculos foi realizada sempre do lado direito das carcaças dos bovinos e sob condições apropriadas e ocorreu no abatedouro escola da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), situada na cidade de Pirassununga - SP.

Para os estudos com *L. dorsi*, as amostras foram colhidas entre a 10^o e 12^o costela dos bovinos, às 48h *post-mortem* e em dois períodos diferentes de confinamento dos animais (137 e 115 dias) e diferentes data de abate para os respectivos estudos em anaerobiose e aerobiose. Os

músculos foram fatiados em bifes de aproximadamente 2,0 cm de espessura e embalados individualmente compondo 2 grupos: os embalados a vácuo (Cryovac, BB-2800) que foram maturados por 1, 7, 14 e 21 dias a $2\pm 2^{\circ}\text{C}$ e os embalados em bandejas de poliestireno e cobertos por filme plástico de policloreto de vinila (PVC) que foram maturados por 1, 3, 5, 7 e 9 dias a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os bifes embalados nas diferentes atmosferas, anaerobiose e aerobiose foram estocados sem a presença de luz em câmara fria com temperaturas controladas como especificado acima. Em cada um dos tempos de maturação os bifes foram retirados das embalagens e submetidos às análises de pH e cor instrumental, seguido de sua subdivisão em pequenas porções para realização das outras análises, sendo que a análise espectrofotométrica de metamioglobina realizada sempre no mesmo dia. As outras partes do bife foram embaladas em papel alumínio e acondicionadas em nitrogênio líquido até o momento dos ensaios. Para as análises de perfil de ácidos graxos, atividade de enzimas antioxidantes e conteúdo do peptídeo glutathiona foram utilizados amostras somente do dia 1 de maturação.

No estudo com o músculo *Biceps femoris*, as coletas ocorreram a partir de três abates dos animais e em mesmo local e condições das coletas para o *L. dorsi*. Como um dos objetivos foi avaliar as diferenças metabólicas das porções do *B. femoris*, primeiramente foram feitas coletas, no momento do abate, das porções alvo de nosso estudo: PO (porção origem do músculo) e PI (porção inserção do músculo) como apresentado na Figura 2. As amostras de aproximadamente 8 cm de comprimento, 6 cm de espessura e 6 cm de profundidade após serem coletadas foram envoltas em talco e acondicionadas em nitrogênio líquido até a realização das análises das enzimas relacionadas ao metabolismo celular (lactato desidrogenase, citrato sintase e Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - Tetrazólio Redutase). Com o objetivo de avaliar a influência do metabolismo do músculo e tempo de confinamento dos bovinos sob características de qualidade da carne maturada foram utilizados músculos *B. femoris* coletados às 24h *post-mortem*, a partir de animais confinados por 59 e 129 dias. Estes músculos foram divididos em duas porções (PO e PI), das quais foram

individualmente fatiadas em bifes de 2,5cm de espessura e de 1,5cm de espessura, embalados a vácuo (Cryovac, BB-2800) e maturados na ausência de luz durante 1,30, 60 e 100 dias a $2\pm 2^{\circ}\text{C}$ em uma estufa climatizada (marca TECNAL, modelo TE-391). Bifes aleatórios de cada tratamento (porção do musculo) e em cada tempo de maturação foi destinado às análises de perda de peso por cocção (PPC) e força de cisalhamento (FC). Outros bifes de 1,5 cm de espessura, também de cada tratamento e diferentes tempos de maturação foram utilizados para análises de pH, cor instrumental e metamioglobina, seguido da subdivisão em pequenas partes as quais foram embaladas em papel alumínio e acondicionadas em nitrogênio liquido até o momento dos ensaios.

Figura 2. Plano de amostragem do *Biceps femoris* PO = Porção Origem do músculo; PI = Porção Inserção do músculo. As regiões de coloração cinza da figura foram desprezadas e os retângulos coloridos foram os locais onde as amostras foram coletadas.

6.3. Valor de pH

As leituras de pH foram realizadas em três pontos dos bifes. Para isso, foi utilizado um medidor de pH portátil para carnes (marca Hanna Instruments, modelo HI99163), com eletrodo de penetração à prova de água com calibração de 4 pontos, compensação automática de temperatura e sensor de temperatura.

6.4. Cor instrumental

Para determinar a coloração dos bifes foi utilizado um colorímetro (Hunter Lab, Modelo Mini Scan XE Plus), previamente calibrado, que possui fonte de luz D_{65} , ângulo de observação de 10° e abertura da célula de medida de 6 mm de diâmetro. Os valores foram expressos na escala CIELAB, na qual o parâmetro L^* corresponde à luminosidade, a^* corresponde à variação de cor de verde (-60) a vermelho (+60) e b^* corresponde à variação de cor de azul (-60) a amarelo (+60). Especificamente em carnes, o valor de a^* corresponde ao teor de vermelho e o valor de b^* ao teor de amarelo.

6.5. Metamioglobina

A concentração da metamioglobina foi determinada de acordo com Krzywicki (1982) e posteriores alterações de Tang, Faustman e Hoagland (2004). Assim, 2 gramas de amostra dos bifes foram homogeneizados com 20 mL de tampão fosfato Na^+/K^+ 0,04 mol/L, pH 6,8, de acordo com Warriss (1979), por 20 segundos em homogeneizador (Marca IKA, modelo T18) a 28.000 rpm. Após deixar esta solução em repouso por 1 hora em gelo, centrifugou-se a 10.000 g, entre 10 e 15 $^\circ\text{C}$, por 30 minutos em centrífuga refrigerada (marca Eppendorf, modelo 5810R). Filtrou-se o sobrenadante em papel filtro Whatman n.1 e o volume da solução foi completado para 25 mL com o tampão fosfato Na^+/K^+ 0,04 mol/L, pH 6,8. Após homogeneizar, filtrou-se em membrana de 0,25 μm (marca Millipore) para evitar turbidez. As absorbâncias do filtrado foram verificadas nos comprimentos de onda de 525, 503, 557 e 582 nm em espectrofotômetro (marca Beckman Coulter, modelo DU800). Durante as análises as amostras foram mantidas em gelo e evitou-se a exposição à luz a fim de evitar alterações no decorrer do procedimento. As análises foram realizadas em duplicata, obtendo-se a média dos valores.

Os conteúdos relativos de desoximioglobina, oximioglobina e metamioglobina foram calculados conforme proposto por Tang, Faustman e Hoagland (2004), de acordo com as equações

(1), (2) e (3), respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem de metamioglobina sobre o conteúdo total de mioglobina.

$$\text{Desoximioglobina (\% DeMb)} = -0,543R_1 + 1,594R_2 + 0,552R_3 - 1,329 \quad (1)$$

$$\text{Oximioglobina (\% MbO}_2\text{)} = 0,722R_1 - 1,432R_2 - 1,659R_3 + 2,599 \quad (2)$$

$$\text{Metamioglobina (\% MetMb)} = -0,159R_1 - 0,085R_2 + 1,262R_3 - 0,520 \quad (3)$$

Onde: R1, R2 e R3 são razões entre as absorbâncias A^{582}/A^{525} , A^{557}/A^{525} e A^{503}/A^{525} , respectivamente.

6.6. Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) e o peptídeo antioxidante glutathiona total (GSH)

Amostras de carne foram homogeneizadas (marca Ika, modelo T18) em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,5, por 60 segundos a uma velocidade de 28.000 rpm. Foi usado a razão 2:10 (p/v) entre o tecido e o tampão na extração de CAT e GPx e a razão 0,5:10 (w/v) na extração da enzima SOD. O homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi usado para determinar a atividade das enzimas.

O sobrenadante foi incubado em ensaio contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, e peróxido de hidrogênio 10 mM por 3 minutos (Beers & Sizer, 1952). A atividade de CAT foi então determinada pela absorbância em 240 nm (25°C) usando um espectrofotômetro (marca Beckman, Fullerton, modelo DU-800). Os resultados foram expressos como U/g de carne.

Para os ensaios de atividade da SOD, os sobrenadantes foram incubados em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4 contendo EDTA 0,1 mM, NBT 50 mM, NADH 78 mM e PMS 3,3 mM por 5 minutos (Ewing; Janero, 1995). A atividade da SOD foi então determinada pela absorbância a

540 nm usando um fotômetro de microplaca (marca Multiskan FC, modelo Thermo Scientific). Os resultados foram expressos em U/g de carne.

A atividade da GPx foi determinada espectrofotometricamente (DU-800, Beckman) com base no decréscimo da concentração de NADPH a 340nm e 37° C, acompanhada por 3 minutos (Paglia; Valentine, 1967). Foi utilizado meio de ensaio contendo tampão fosfato potássio 100 mM, pH 7,0 contendo EDTA 3 mM, NADPH 0,1 mM, GSH 2 mM, GR 2,6 U/mL e cumeno hidroperóxido 1,3 mM. A reação foi iniciada pela adição de cumeno hidroperóxido. A atividade de GPx foi expressada em U/g de carne.

A quantificação do peptídeo GSH nos bifes maturados de acordo com Tietze (1969). Para isso foram homogeneizados 2 gramas de amostra em 10 mL de ácido sulfossalicílico (SSA) 5% contendo EDTA 5 mM, em homogeneizador (marca: IKA, modelo: Turrax T18) em alta velocidade por 60 segundos. O homogenato foi centrifugado por 5 minutos em centrífuga refrigerada (marca Eppendorf, modelo 5810R) a velocidade de 10.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e empregado no ensaio, em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7.5, contendo EDTA 5Mm, de DTNB 60mM, Glutathione Redutase. E, por ultimo adicionou a amostra (homogenato). Paralelamente preparou-se um branco onde a amostra foi substituída por tampão. Após 2 minutos, adicionou-se NADPH 20 mM para iniciar a reação. Os resultados foram expressos em μmol de GSH/g de amostra calculados com base na curva de calibração preparada com GSH (5 a 200 $\mu\text{mol/L}$)

6.7. Atividade das enzimas relacionadas ao metabolismo celular lactato desidrogenase, citrato sintase e NADH-TR

A extração da LDH ocorreu em tampão fosfato sódio 10 mM, pH 7,5, na proporção de 2:10 (p/v) entre tecido e tampão, sob homogeneização em ultra turrax (marca Ika, modelo T18) por 60 segundos a uma velocidade de 28.000 rpm. Já, a extração CS, ocorreu em tampão Tris 50 mM, pH 7,4 contendo EDTA nas mesmas condições empregadas para LDH.

A atividade da LDH foi avaliada em espectrofotômetro (DU-800, Beckman) a 340 nm e 25°C, pela oxidação do NADH em NAD e acompanhada por 3 minutos (BERGMEYER; BERNT, 1974). Utilizou-se uma mistura de ensaio contendo tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4, ácido pirúvico 1 mM e NADH 0,1 mM. A atividade específica foi expressa em μmol de NADH consumido por minuto por mg de proteína, sendo que o conteúdo de proteína foi calculado com base na curva de calibração de albumina (0,002 a 0,02 mg/mL) (BRADFORD, 1976).

A atividade da CS foi avaliada espectrofototicamente (DU – 800 Beckman) a 412 nm e 25°C, pelo consumo de DTNB acompanhado por 3 minutos de acordo com Alp et al. (1976). Foi utilizado meio de ensaio contendo tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,1, acetil-CoA 0,1mM e Triton X-100 0,05%. A reação foi iniciada pela adição ácido oxálico 0,5 mM. A atividade específica foi expressa em nmol de citrato sintase consumido por minuto por mg de proteína, sendo conteúdo de proteínas determinado com base na curva de calibração de albumina (0,002 a 0,02 mg/mL) (BRADFORD, 1976).

A atividade da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo - Tetrazólio Redutase (NADH-TR) foi realizada no Laboratório de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu em que o preparo das amostras e ensaio foram realizados de acordo com Ryan et al. (1992). A técnica consiste em incubar a amostra muscular em solução que contem a enzima NADH e NBT (Nitro blue tetrazolium) para formar o complexo NADH-TR. Para isso, as amostras da Porção Origem e Porção Inserção do músculo *Biceps femoris* previamente envoltos com talco foram cortados em criostato (marca Leica, modelo CM1850) em espessura aproximada de 10 μc . Os cortes obtidos foram colocados em laminas histológicas e submetidos ao teste de hematoxilina e eosina (HE), em que mediante o corante eosina verifica a qualidade do corte e integridade das estruturas em microscópio óptico. A seguir, os cortes foram encubados no meio Tampão Tris HCl 0,2 M, pH 7,4 contendo NADH 2 mg/mL, NBT 2,5 mg/mL durante 40 minutos a 37°C. As laminas foram lavadas com água destilada, desidratadas por 3 vezes com álcool a 70, 80, 95 e 100% por intervalos de 30

segundos. Após desidratação, lavou-se por três vezes as lamínas com Xilol 100% e fez-se a fixação com uso de “Permunt”, As imagens foram captadas em microscópio (marca Leica, modelo DM750) e analisadas com auxílio do programa Image J.

6.8. Perfil de ácidos graxos

Os ácidos graxos presentes nas amostras foram quantificados no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL/CTC) de acordo com Hartman e Lago (1973) e AOCS (1998). Resumidamente, efetuou-se a extração dos ácidos graxos com hexano na proporção 2:9 (p/v) sob homogeneização por 1 minuto, adicionou-se solução de KCl 0,72%, centrifugou por 5 min. a 4000 rpm e removeu a fase hexânica contendo os lipídios. Para efetuar a análise no cromatógrafo é necessário a esterificação dos ácidos graxos, assim, primeiro, efetuou a completa evaporação do hexano por meio de nitrogênio gasoso e submeteu o resíduo lipídico à saponificação (esterificação) com NaOH 20%. Por fim, removeu os lipídios não esterificados e 1µL da amostra contendo lipídios esterificados foi injeto no cromatógrafo gasoso (HP modelo GC 6890) com detector de FID e coluna capilar BPX-70 (70% cyanopropyl polysilphenylene-siloxane) com dimensões 60m x 0,32mm x 0,25µm. O tempo de corrida foi de 40 min. Os cálculos foram realizados com base no conteúdo total de lipídios da amostra (fase hexânica). Para determinar a concentração de cada ácido graxo foi utilizada a seguinte equação:

$$C_{ag} = \frac{\%A_{ag} \times L \times FC}{100}$$

Em que,

C_{ag} = Concentração em g/100 do ácido graxo na amostra

$\%A_{ag}$ = % de área do pico do ácido graxo

L = Teor de lipídios da amostra em g/100g

FC = Fator de conversão de gordura para ácidos graxos

Gorduras saturadas = $\frac{1}{2} C_{ag \text{ saturados}}$

Gorduras monoinsaturadas = $\frac{1}{2} C_{ag \text{ monoinsaturados}}$

Gorduras poliinsaturadas = $\frac{1}{2} C_{ag \text{ poliinsaturados}}$

Gorduras insaturadas = $\frac{1}{2} C_{ag \text{ mono} + \text{poliinsaturados}}$

Gorduras trans = $\frac{1}{2} C_{ag \text{ trans}}$

6.9. Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A oxidação lipídica dos bifes foi mensurada através da metodologia proposta por Vyncke (1970, 1975) com algumas modificações. Desta forma, homogeneizou-se 5 gramas da amostra em 15 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 7,5% contendo EDTA 0,1% e propilgalato 0,1%, por 30 segundos a 28.000 rpm em homogeneizador (marca IKA, modelo Turrax T18). O homogenato foi filtrado com papel filtro Whatman n.1. Em 3 mL do filtrado, adicionou-se 3 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,02 mol/L em tubo de ensaio de vidro com rosca. Após banho-maria (100°C e 40 minutos) os tubos foram colocados em gelo por 2 minutos a fim de cessar a reação. As absorbâncias foram medidas em 532nm e 600 nm em espectrofotômetro (marca Beckman Coulter, modelo DU800). A absorbância da amostra foi considerada como a diferença entre a absorbância a 532 nm e a absorbância a 600 nm, que corrige possível turbidez da amostra. Foram obtidas as médias das duplicatas. Os valores de TBARS foram calculados a partir de curva calibração de TEP, 1,1,3,3-tetraetoxipropano, 0,022 a 1,12 µg/mL, e expressos como mg de malondialdeído por kg de carne.

6.10. Determinação de carbonilas e grupos tióis

O conteúdo de carbonilas foi determinado segundo Mercier et al. (2004), com ligeiras modificações. Desta forma, 1 grama de amostra de músculo obtidos em cada tempo de maturação foi homogeneizado com 20 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0, por 60 segundos em homogeneizador (marca IKA, modelo Turrax T18) e posteriormente filtrado. Nesta etapa foram quantificadas as proteínas totais a 280 nm segundo Bradford (1976) com base na curva de calibração de albumina, antes de prosseguir o ensaio. O conteúdo de carbonilas foi avaliado com base na absorbância de 2,4-dinitrofenilidrazina (DNPH) a 370 nm, usando o coeficiente de absorvidade molar DNPH ($22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em nmol de DNPH por mg de proteína.

Para a determinação de tióis livres em proteínas dos músculos foi utilizado 5,5-Ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) de acordo com Ellman (1959). O método consiste em duas etapas: 1) Extração das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares em SDS 5% em Tris 0,1M e pH 8,0; 2) Determinação de tióis das amostras pela derivação com DTNB. Desta forma, 1 g de amostra da carne de cada tempo de maturação foi homogeneizada em tampão de extração (descrito acima) e analisados de acordo com Liu e Xiong (2000) com base na absorbância do DTNB a 412 nm. O conteúdo de tióis foi expresso como nmol de tiol por mg de proteína, tendo como base uma curva de calibração de albumina (BRADFORD, 1976).

6.11. Perdas de peso por cocção (PPC)

A determinação das perdas de peso por cocção dos bifes maturados foi obtida a partir do peso do bife antes (PI) e após (PF) a cocção de acordo com AMSA (1995). Os resultados foram expressos em porcentagem e a fórmula utilizada para obtenção dos resultados foi: porcentagem de PPC = $((PI - PF) \div PI) \times 100$.

6.12. Força de cisalhamento (FC)

A análise de força de cisalhamento, mensuração da maciez, foi realizada em amostras de bifes maturados ao longo dos 100 dias em tempos definidos. Foram retirados de cada bife cozido entre 6 e 8 cilindros com diâmetros de 1,25 cm no sentido paralelo às fibras. Por fim, os cilindros foram submetidos ao aparelho Warner Bratzler, que mediu a força (kgf) necessária para rasgar o cilindro. Os procedimentos para esta análise estão de acordo com as recomendações do AMSA (1995).

6.13. Análise estatística

Nos animais que foram coletados os músculos *Longissimus dorsi*, o desempenho animal, as características de carcaça, a composição de ácidos graxos, a atividade das enzimas antioxidantes e a concentração do peptídeo glutathiona foram analisados incluindo somente o efeito fixo de condição sexual no modelo, usando um delineamento inteiramente casualizado. Enquanto que, as características de oxidação e qualidade da carne na condição de vácuo ou aerobiose foram analisadas incluindo os efeitos fixos de condição sexual, tempo de maturação e suas interações no modelo, usando um delineamento inteiramente casualizado com um arranjo fatorial 2 (condição sexual) $\times$ 4-5 (tempo de maturação).

Nos animais que foram coletados os músculos *Biceps femoris*, a atividade das enzimas relacionadas ao metabolismo celular e a porcentagem de fibras oxidativas foram analisadas incluindo os efeitos fixos de condição sexual, porção do músculo e suas interações no modelo, usando um delineamento inteiramente casualizado com um arranjo fatorial 2 (condição sexual) $\times$ 2 (porção do músculo). Enquanto que, as características de oxidação e qualidade da carne foram analisadas incluindo condição sexual, tempo de confinamento, porção do músculo, tempo de maturação e suas interações no modelo, usando um delineamento inteiramente casualizado com um

arranjo fatorial 2 (condição sexual) $\times$ 2 (tempo de confinamento) $\times$ 2 (porção do músculo) $\times$ 4 (tempo de maturação).

Os dados foram analisados usando o procedimento MIXED do *Statistical Analysis System* (SAS, 2000; versão 9.2). Quando o efeito de tempo de maturação foi incluído no modelo, os dados foram analisados como medidas repetidas no tempo, onde diferentes estruturas de covariância foram testadas para cada variável e selecionadas com base no menor valor do *Bayesian Information Criteria (BIC)*. Interações significativas foram desdobradas para analisar diferenças dentro de cada fator. Quando efeitos significantes foram detectados para fatores com mais de 2 níveis, o teste de *Tukey-Kramer* foi aplicado para discriminar as médias. Efeitos foram considerados significativos quando a probabilidade do teste aplicado era menor ou igual à 5%. Todos os resultados foram apresentados como médias de quadrados mínimos acompanhados de seus respectivos erros padrões.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Estudos da oxidação proteica e lipídica em músculo *Longissimus dorsi*, obtidos de bovinos *Bos indicus* inteiros e castrados, sob duas condições de maturação: vácuo e aerobiose

7.1.1. Desempenho animal e características de carcaça

Dados relacionados às variáveis de desempenho animal e características de carcaça dos animais utilizados no experimento de carne em anaerobiose (vácuo) estão apresentados na Tabela 1. Para peso vivo final e peso de carcaça quente, um efeito para castração foi encontrado ($P < 0,05$), onde maiores ($P < 0,05$) valores foram observados para bovinos inteiros do que para bovinos castrados. Maiores pesos vivos e de carcaça para bovinos inteiros podem ter sido importantes para que nenhuma diferença de espessura de gordura fosse encontrada entre os animais castrados e inteiros. Um acabamento mais precoce para os animais castrados seria esperado já que a ausência

do hormônio testosterona antecipa o fim de depósito de músculo na carcaça, como também, antecipa o início da deposição de gordura.

Tabela 1. Desempenho animal e características de carcaça entre bovinos inteiros e castrados (n=12)

Variável	Condição sexual		<i>P</i>
	Inteiro	Castrado	
Peso vivo final (kg)	549,2 (7,14) ^a	492,6 (6,03) ^b	<0,01
Peso de carcaça quente (kg)	340,5 (5,58) ^a	300,4 (4,71) ^b	<0,01
Rendimento de carcaça quente (%)	62,0 (0,51)	61,0 (0,43)	0,16
Área de olho de lombo (cm ²)	83,6 (3,18)	80,6 (2,69)	0,48
Espessura de gordura (mm)	7,2 (1,08)	6,4 (0,91)	0,60

Médias de quadrados mínimos (erro padrão); ^{a,b}Médias seguidas por uma mesma letra entre as condições sexuais não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de *F*.

7.1.2. Efeito da castração sobre a qualidade e oxidação de carne

Entre as variáveis de qualidade de carne analisadas (Tabela 2), houve efeito de castração ($P < 0,05$) apenas sobre os valores de pH para os bifes tanto embalados a vácuo quanto envolvidos por filme plástico de policloreto de vinila (PVC), permeável ao oxigênio. Em ambas as condições de embalagem, os valores de pH nos bifes de bovinos inteiros foram maiores ($P < 0,05$) do que aqueles nos bifes de bovinos castrados. Bovinos inteiros seriam mais susceptíveis ao estresse pré-abate, o que pode resultar em maior taxa de glicólise e maior mobilização das reservas de glicogênio no tecido muscular. Desta forma, o teor de glicogênio diminuiria e a acidificação ocorreria mais lentamente nos músculos de bovinos inteiros após o abate, resultando em maiores valores de pH (BELTRÁN et al., 1997; MONIN, 1990).

Outras variáveis de qualidade de carne (L^* , a^* , b^* e metamioglobina), mensuradas nos bifes tanto embalados a vácuo quanto nos envolvidos por PVC, não foram significativamente afetadas ($P > 0,05$) pela castração (Tabela 2). Também, nenhuma diferença para o teor de mioglobina (BOCCARD et al., 1979; FIELD, 1970) e cor (PEINADO et al., 2012) em amostras de carne bovina foi anteriormente observada entre diferentes condições sexuais, castrados e inteiros. Todavia, existe

um trabalho relatando que os resultados de estudos de qualidade de carne entre bovinos inteiros e castrados são inconsistentes, por serem discrepantes na literatura (DESTEFANIS et al., 2003).

Tabela 2. Qualidade de carne e oxidação proteica e lipídica em bifes *Longissimus dorsi*, de bovinos inteiros e castrados, embalados a vácuo (n=20) ou em filme plástico de policloreto de vinila (PVC) permeável ao oxigênio (n=12)

Variável	Vácuo		P	PVC		P
	Inteiro	Castrado		Inteiro	Castrado	
Valor de pH	5,6 (0,04) ^a	5,5 (0,03) ^b	0,03	5,4 (0,03) ^a	5,3 (0,03) ^b	0,04
Valor de <i>L</i> *	36,5 (1,31)	36,8 (1,11)	0,83	32,8 (0,62)	33,6 (0,62)	0,42
Valor de <i>a</i> *	18,4 (0,62)	17,8 (0,52)	0,50	18,2 (0,57)	18,8 (0,57)	0,47
Valor de <i>b</i> *	20,2 (0,19)	20,2 (0,16)	1,00	13,0 (0,37)	13,5 (0,37)	0,30
Metamioglobina [€]	4,9 (0,69)	4,9 (0,65)	0,95	20,2 (0,56)	20,5 (0,58)	0,77
TBARS [£]	0,28 (0,037)	0,29 (0,032)	0,84	0,29 (0,040)	0,31 (0,040)	0,70
Grupos tióis [¥]	71,5 (2,05)	75,4 (1,87)	0,19	85,2 (3,27)	78,8 (3,27)	0,20
Grupos carbonilas ^ϕ	1,86 (0,083)	1,81 (0,068)	0,61	1,86 (0,105)	1,70 (0,105)	0,30

Médias de quadrados mínimos (erro padrão); [€] = porcentagem em relação ao conteúdo total de mioglobina; [£] = mg de MDA/kg de músculo; [¥] = nmol de cisteína/mg de proteína; ^ϕ = nmol de DNPH/mg de proteína. ^{a,b} Médias seguidas por uma mesma letra entre as condições sexuais dentro de uma mesma variável e condição de embalagem não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de *F*.

As variáveis de oxidação protéica e lipídica (grupos tióis, grupos carbonilas e TBARS), sob condições de vácuo e aerobiose, também não foram influenciadas ($P > 0,05$) pela castração dos animais (Tabela 2). Neste caso, um conjunto de fatores poderia ter colaborado para a falta de um estresse oxidativo que levaria a oxidação de carne. Além de nenhuma diferença ($P > 0,05$) em rendimento de carcaça quente, área de olho de lombo, espessura de gordura (Tabela 1) e composição de ácidos graxos (Tabela 3) entre bovinos castrados e inteiros, as boas condições de armazenamento durante a maturação e a raça usada neste trabalho, a qual deposita pouca gordura na carcaça, podem ajudar a explicar a ausência de diferenças em oxidação proteica e lipídica nas condições do estudo. Especificamente, os valores médios de TBARS, um importante indicador de oxidação lipídica, em carne maturada sob condições de vácuo ou aerobiose foi de 0,29 mg de

MDA/kg de carne, o que é considerado baixo. Um nível máximo de 1,0 mg de MDA/kg de carne foi definido para uma boa aceitação do consumidor (RIPPOLL et al., 2011).

Tabela 3. Composição de ácidos graxos (g/100 g de carne) em amostras de carne coletadas do músculo *Longissimus dorsi* a 48 horas *postmortem* em bovinos inteiros e castrados (n=6)

Ácido graxo (átomos de carbono:ligações duplas)	Condição sexual		<i>P</i>
	Inteiro	Castrado	
Mirístico, C14:0	0,11 (0,038)	0,13 (0,038)	0,68
Pentadecanóido, C15:0	0,01 (0,002)	0,01 (0,002)	0,38
Palmítico, C16:0	0,78 (0,236)	0,89 (0,236)	0,77
Esteárico, C18:0	0,38 (0,182)	0,46 (0,182)	0,77
Saturados	1,29 (0,453)	1,49 (0,453)	0,76
Miristoléico, C14:1	0,03 (0,006)	0,03 (0,006)	0,72
Palmitoléico, C16:1	0,11 (0,020)	0,12 (0,020)	0,74
Elaídico, C18:1	0,02 (0,017)	0,04 (0,017)	0,53
Trans-Vacênico, C18:1 t11	0,03 (0,011)	0,01 (0,011)	0,25
Oléico, C18:1	1,06 (0,294)	1,18 (0,294)	0,79
Vacênico, C18:1 n7	0,04 (0,006)	0,04 (0,006)	0,72
Eicosanóico, C20:0	0,003 (0,0033)	0,003 (0,0033)	1,00
Monoinsaturado	1,29 (0,333)	1,42 (0,333)	0,80
Linoeláídico, C18:2	0,000 (0,0024)	0,003 (0,0024)	0,37
Linoléico, C18:2	0,07 (0,016)	0,05 (0,016)	0,36
α -Linolênico, C18:3	0,003 (0,0033)	0,003 (0,0033)	1,00
Poliinsaturado	0,07 (0,017)	0,05 (0,017)	0,44
Ômega-3	0,003 (0,0033)	0,003 (0,0033)	1,00
Ômega-6	0,07 (0,017)	0,05 (0,017)	0,40
Trans	0,05 (0,016)	0,05 (0,016)	0,78
Não identificados	0,10 (0,0270)	0,10 (0,0270)	0,94

Médias de quadrados mínimos (erro padrão).

Além disso, nenhuma oxidação de carne pode ser também suportada pelos resultados das atividades de enzimas antioxidantes e teor de glutathione (Tabela 4). Nenhuma diferença ($P > 0,05$) foi observada para as atividades de enzimas antioxidantes e teor de glutathione entre bovinos inteiros e castrados. Tais resultados sugerem que a castração teve pouca influência sobre as atividades

daquelas enzimas. Não existem trabalhos comparando as atividades de enzimas antioxidantes em músculo de bovinos inteiros e castrados. Entretanto, existe um trabalho mostrando que a atividade de SOD em ratos castrados é menor do que em ratos inteiros (BARP et al., 2002). A falta de diferenças na atividade de enzimas antioxidantes entre as duas condições sexuais dos bovinos, deste trabalho, poderia ser explicada pelas diferenças em expressão gênica daquelas enzimas antioxidantes, que existem entre as espécies (MA, 2010). Neste trabalho, os valores para as atividades das enzimas CAT, SOD e GPx foram menores do que aqueles encontrados em outros trabalhos, que estudaram carne bovina (GHEISARI; MOTAMEDI, 2010; LARRAÍN et al., 2008; MAHECHA et al., 2011). Isto pode ter ocorrido devido às diferenças entre as raças, sistemas de criação, alimentações e idades dos animais usados nos trabalhos.

Tabela 4. Atividades de enzimas antioxidantes (U/g de carne) e teor de glutathiona ($\mu\text{mol/g}$ de carne) em amostras de carne coletadas de músculo *Longissimus dorsi* a 48 horas *postmortem* em bovinos inteiros e castrados (n=12)

Variável	Condição sexual		<i>P</i>
	Inteiro	Castrado	
Catalase	66,1 (5,19)	60,5 (4,39)	0,43
Superoxido dismutase	685,3 (93,37)	800,8 (78,91)	0,37
Glutathiona peroxidase	2,7 (0,18)	2,6 (0,15)	0,68
Glutathiona Total	120,1 (12,92)	144,1 (10,92)	0,19

Médias de quadrados mínimos (erro padrão).

7.1.3. Efeito do tempo de maturação sobre a qualidade de carne

Um efeito do tempo de maturação foi observado ($P < 0,05$) sobre todas as variáveis de qualidade de carne maturada quando os bifes foram embalados sob condições de vácuo, enquanto que para os bifes embalados em aerobiose observou-se efeitos somente ($P < 0,05$) sobre os valores de L^* e b^* (Tabela 5).

Os mais altos valores de pH foram detectados a 7 e 14 dias de maturação e os valores mais baixos foram observados a 1 e 21 dias de maturação em bifes embalados a vácuo para nível de

significância 5%. Uma queda de pH a 21 dias de maturação poderia ser justificada pelo crescimento de bactérias anaeróbias lácticas, que muitas vezes ocorre nestas condições. Provavelmente, os valores de pH em bifes maturados sob condições de aerobiose não foram alterados ($P > 0,05$) ao longo dos nove dias de maturação devido à estabilidade de pH na presença constante de oxigênio.

Tabela 5. Qualidade de carne avaliada ao longo do tempo de maturação em bifes *Longissimus dorsi*, embalados a vácuo (n=20) ou por filme plástico de policloreto de vinila (PVC) permeável ao oxigênio (n=12)

Tempo de maturação (dia)	Variável			
	Valor de pH	Valor de L^*	Valor de a^*	Valor de b^*
Vácuo				
1	5,4 (0,05) ^B	34,6 (1,00) ^B	16,9 (0,65) ^B	18,8 (0,40) ^B
7	5,7 (0,03) ^A	38,3 (1,00) ^A	21,0 (0,65) ^A	23,1 (0,40) ^A
14	5,6 (0,04) ^A	37,0 (1,00) ^A	17,0 (0,65) ^B	19,1 (0,40) ^B
21	5,4 (0,03) ^B	36,6 (1,00) ^{AB}	17,4 (0,65) ^B	19,6 (0,40) ^B
P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
PVC				
1	5,3 (0,06)	30,9 (0,62) ^B	18,7 (0,60)	14,2 (0,45) ^{AB}
3	5,2 (0,06)	32,9 (0,62) ^{AB}	19,0 (0,60)	12,7 (0,45) ^{BC}
5	5,4 (0,06)	34,1 (0,62) ^A	18,0 (0,60)	12,7 (0,45) ^{BC}
7	5,4 (0,06)	34,0 (0,62) ^A	18,3 (0,60)	11,9 (0,45) ^C
9	5,5 (0,06)	34,1 (0,62) ^A	18,4 (0,60)	14,7 (0,45) ^A
P	0,06	<0,01	0,65	<0,01

Médias de quadrados mínimos (erro padrão). ^{A,B,C} Médias seguidas por uma mesma letra entre os tempos de maturação dentro de uma mesma variável não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey-Kramer.

A luminosidade (L^*) de carne bovina foi alterada ($P < 0,05$) ao longo do tempo de maturação seja nos bifes embalados a vácuo ou em PVC. Uma carne mais clara (maiores valores de L^*) foi verificada ($P < 0,05$) a partir do dia 7 de maturação em bifes sob condições de vácuo e a partir do dia 5 de maturação em bifes sob condições de aerobiose. Os maiores valores de L^* foram então mantidos ($P > 0,05$) até o final da maturação em ambas as condições de embalagem. A migração da água do interior para a superfície do bife, provavelmente, elevou os valores de L^* sob

as condições de estudo. Mais ainda, o aumento dos valores de L^* pode ser um resultado das mudanças nas estruturas proteicas, o que levaria a uma maior refletância da luz (MAC DOUGALL, 1982). Bifes embalados a vácuo também tiveram os valores de L^* aumentados ao longo do tempo de maturação no trabalho de Franco et al. (2012). Resultado similar para valores de L^* foi observado por Lagerstedt et al. (2011), em que foram analisadas amostras de carne armazenadas por 5 dias sob refrigeração e condições de aerobiose. Diferentemente, King et al. (2011) observaram uma diminuição em valores de L^* de músculo *Longissimus thoracis* quando exposto ao oxigênio por 6 dias.

Os valores de a^* (vermelho) dos bifes embalados a vácuo foram mantidos estáveis ($P > 0,05$) ao longo dos 21 dias de maturação com uma exceção para o dia 7, o qual teve o valor mais alto ($P < 0,05$) em relação aos outros dias. No dia 7 de maturação, os valores de b^* (amarelo) daqueles bifes sob vácuo foram também maiores ($P < 0,05$) do que aqueles encontrados em outros dias. Concordando com estes resultados, Beriain et al. (2009) e Franco et al. (2012) também observaram um aumento em valores de b^* para bifes sob condições de vácuo no dia 7 de maturação. Quanto aos valores de a^* , os primeiros autores encontraram resultado similar ao apresentado no presente trabalho e os últimos autores encontraram valores constantes ao longo dos 21 dias de maturação. De forma geral, embalagem a vácuo tem mostrado ser eficiente para manter a coloração de carne bovina (FILGUEIRAS et al., 2010).

Em aerobiose, os bifes tiveram valores similares de a^* ($P > 0,05$) ao longo do tempo de maturação. Isto pode ser uma consequência da presença de oxigênio, o qual oxigenaria o pigmento mioglobina, conservando-o no estado reduzido do ferro e tornando a coloração da carne vermelho brilhante. Por outro lado, os valores de b^* no dia 9 de maturação foram maiores ($P < 0,05$) do que aqueles valores nos dias 3, 5 e 7 de maturação e foram semelhantes ($P > 0,05$) àqueles valores no dia 1 de maturação. Uma carne mais amarela no maior tempo de maturação poderia apontar para uma descoloração de carne. Tanto um menor tempo de vida de prateleira quanto uma menor

estabilidade de cor já foram observados em carne envolvida por PVC em relação a carne sob atmosfera modificada (LAGERSTEDT et al., 2011).

7.1.4. Efeito do tempo de maturação sobre a estabilidade oxidativa

7.1.4.1. Condição de vácuo

Os padrões de resposta das variáveis relacionadas à oxidação proteica e lipídica, as quais foram mensuradas em bifes tanto embalados a vácuo quanto nos envolvidos por PVC permeável ao oxigênio, estão ilustrados na Figura 3 (A e B). Embora nenhum efeito do tempo de maturação foi detectado ($P > 0,05$) para TBARS e grupos tióis, diferenças ($P < 0,05$) em grupos carbonilas e metamioglobina foram verificadas para bifes sob condições de vácuo (Fig. 3A).

O aumento do tempo de maturação não afetou ($P > 0,05$) os valores de TBARS, porque a falta de oxigênio nas embalagens a vácuo pode ter inibido a oxidação lipídica (HANSEN et al., 2012; STIKA et al., 2008). Outros trabalhos, também, não encontraram mudanças nos valores de TBARS em carne maturada por 21 dias em músculos *Longissimus dorsi* (FRANCO et al., 2012), como também, nos estudos realizados em músculos *Longissimus dorsi*, *Semimembranosus* e *Gluteus medius* maturados por 47 dias (YANG et al., 2002), sendo todos os músculos embalados a vácuo. Já, a falta de diferenças em grupos tióis para bifes embalados a vácuo ao longo do tempo de maturação sugere que os aminoácidos contendo grupos sulfídricos tal como cisteína podem não ter sido atacados por espécies oxidantes neste período (ELLMAN, 1959). Lund et al. (2007) também não observaram aumento de grupos tióis em músculo suíno *Longissimus dorsi* que foram embalados sem oxigênio (*skin packaging*) e maturados por 14 dias.

Figura 3. Oxidação de proteica e lipídica avaliada ao longo do tempo de maturação em bifes *Longissimus dorsi*, embalados a vácuo (A, n=20) e por filme plástico de policloreto de vinila (PVC) permeável ao oxigênio (B, n=12). ^{a,b,c,d}Médias seguidas por uma mesma letra entre os tempos de maturação dentro de uma variável não diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de *Tukey-Kramer*. Os dados apresentados são médias de quadrados mínimos e erro padrão.

Neste trabalho, os valores de TBARS ao longo do tempo de maturação também foram baixos, variando de 0,23 a 0,33 mg de MDA/kg de carne. Uma carne magra de bovinos Nelore usados neste estudo pode ter colaborado para os baixos valores de TBARS. Menor quantidade de gordura na carne poderia resultar em menor disponibilidade de ácidos graxos poliinsaturados, os quais são substratos para oxidação lipídica (FAUSTMAN et al., 2010; XIONG, 2000).

Os grupos carbonilas e metamioglobina (forma oxidada de mioglobina) são também frequentemente usados para mensurar a oxidação de proteínas. Os valores de grupos carbonilas

aumentaram ($P < 0,05$) no dia 7 de maturação e permaneceram constantes ($P > 0,05$) do dia 7 ao dia 21. Os grupos carbonílicos (aldeídos e cetonas) são formados nas cadeias laterais dos aminoácidos das proteínas, mais especificamente quando prolina, arginina, lisina e treonina são oxidados. Entretanto, outras reações bioquímicas podem também formar os grupos carbonilas (DALLE-DONNE et al., 2003). Lindahl et al. (2010) observaram um aumento de grupos carbonilas ao longo dos 15 dias de maturação em músculo *Longissimus dorsi* sob condições de vácuo. Outro trabalho recente mostrou que carne maturada sem oxigênio teve grupos carbonilas aumentados a partir do 8º dia de maturação (ZAKRYS-WALIWANDER et al., 2012). Por outro lado, a maturação do mesmo músculo (*L. dorsi*) por 15 dias (LAGERSTEDT et al., 2011a) ou por 28 dias (FILGUEIRAS et al., 2010) não resultou em mudanças de grupos carbonilas.

Outra informação relevante deste trabalho é que a oxidação proteica em carne embalada a vácuo pode ocorrer sem uma prévia oxidação lipídica. Ao longo do tempo de maturação, a oxidação protéica foi observada por meio do aumento do conteúdo de grupos carbonilas, mas nenhuma diferença em TBARS foi detectada (Fig. 3A). Existe um trabalho sugerindo que produtos secundários de oxidação lipídica poderiam ser usados como substratos para oxidação proteica, uma vez que uma correlação positiva foi encontrada entre oxidação lipídica e proteica (SOYER et al., 2010). Entretanto, isto não foi observado sob as condições estudadas neste trabalho.

A porcentagem de metamioglobina nos bifos embalados a vácuo foi também influenciada ($P < 0,05$) pelo tempo de maturação (Fig. 3A). Os valores de metamioglobina no dia 7 de maturação foram 7% maiores ($P < 0,05$) do que aqueles no dia 14 de maturação, mas não foram diferentes ($P > 0,05$) daqueles nos dias 1 e 21 de maturação. Um aumento nos valores de metamioglobina no dia 7 de maturação foi também acompanhado por um aumento nos valores de pH e L^* (Tabela 5) e grupos carbonilas (Fig. 3A). A explicação para estes resultados poderia estar relacionada ao aumento de grupos carbonilas no dia 7 de maturação (Fig. 3A). De acordo com Lagerstedt et al. (2011 a,b), a oxidação proteica pode causar um aumento nos valores de metamioglobina. Um

aumento nos valores de metamioglobina em músculo bovino *Longissimus dorsi* a partir do dia 5 de maturação também foi encontrado sob condição de vácuo (LAGERSTEDT et al., 2011 a,b).

A porcentagem de metamioglobina foi baixa ao longo dos 21 dias de maturação, variando de 2 a 7% (Fig. 3A). Uma porcentagem de metamioglobina maior do que 20% tem sido relacionada à uma menor aceitação de carne bovina pelos consumidores (HOOD; RIORDAN, 1973). É provável que a embalagem a vácuo tenha contribuído para que a carne tenha baixa porcentagem de metamioglobina (FILGUEIRAS et al., 2010), porque ela é uma grande barreira contra a entrada de oxigênio.

7.1.4.2. Condição de aerobiose

A Figura 3B mostra os resultados obtidos para a oxidação lipídica (TBARS) e proteica (grupos carbonilas, grupos tióis e metamioglobina) em bifes do músculo *Longissimus dorsi* sob condições de aerobiose ao longo do tempo de maturação. Os valores de TBARS foram semelhantes ($P > 0,05$) até o 5º dia de maturação, mas atingiram os valores máximos ($P < 0,05$) nos dias 7 e 9 de maturação. Presença de ácidos graxos insaturados na carne e oxigênio são os principais substratos para desencadear a oxidação lipídica ao longo do tempo de maturação (KRANNER et al., 1994). Além disso, o aparecimento de radicais livres oxigenados durante a maturação da carne pode resultar em uma diminuição do sistema de defesa antioxidante (RENERRE et al., 1996).

Nenhuma alteração ($P > 0,05$) de grupos tióis nos bifes envolvidos por PVC foi observada até o dia 5. Entretanto, houve um aumento ($P < 0,05$) de grupos tióis no dia 7 e uma diminuição ($P < 0,05$) no dia 9. Estes resultados sugerem que existe uma estabilidade oxidativa até o 5º dia, seguido pela exposição de grupos sulfidrílicos devido à proteólise no dia 7 e consequente oxidação destas sulfidrilas expostas sob condições de aerobiose no dia 9. O aumento destes grupos sulfidrílicos no dia 7 poderia ser um resultado da degradação de proteínas, o qual pode ter tornado disponível uma quantidade substancial de peptídeos com baixo peso molecular que contém grupos

tióis (EGELANDSDAL et al., 2010). Em condições de aerobiose, os grupos tióis livres são facilmente oxidados pelas espécies reativas ao oxigênio e suas reduções estão diretamente relacionadas com o aumento da oxidação proteica (XIONG, 2000).

Grupos carbonílicos aumentaram ($P < 0,05$) nos primeiros três dias de maturação quando os bifes estavam em aerobiose. Os valores foram constantes ($P > 0,05$) do dia 3 ao 7, mas eles reduziram ($P < 0,05$) no dia 9 em comparação com os dias 3, 5 e 7 (Fig. 3B). O aumento de grupos carbonilas no 3º dia aponta para o início da oxidação proteica, a qual foi estável até o 7º dia, quando os valores diminuíram ($P < 0,05$) novamente. Um aumento de grupos carbonilas com o tempo de maturação já foi observado em outros trabalhos (MARTINAUD et al., 1997; MERCIER et al., 2004). No dia 9 de maturação, verificou-se a diminuição de ambos os grupos carbonilas e tióis. Liu e Xiong (1996) relataram uma diminuição de grupos tióis em carne de frango, sem a formação de grupos carbonilas.

Por fim, a porcentagem de metamioglobina não foi alterada ($P > 0,05$) até o dia 3, mas diminuiu ($P < 0,05$) no dia 5 e aumentou ($P < 0,05$) aproximadamente 16 vezes até o dia 9 (Fig. 3B). Possivelmente, a formação de metamioglobina com tempo de maturação ocorreu por causa da maior disponibilidade de oxigênio (O'KEEFFE; HOOD, 1982). Alguns autores tem observado um aumento de metamioglobina em carne maturada por 5 dias sob condições de aerobiose (LAGERSTEDT et al., 2011a,b; SEYFERT et al., 2007). O mesmo padrão de resposta encontrado para metamioglobina foi também verificado para TBARS, em que os valores foram maiores nos dias 7 e 9 comparados aos valores encontrados nos dias 1, 3 e 5. As espécies reativas de oxigênio e os radicais livres gerados pela oxidação lipídica podem promover a oxidação de mioglobina (GREENE et al., 1971; RENERRE; LABADIE, 1993). Isso pode ser a explicação para a correlação positiva entre oxidação lipídica e conteúdo de metamioglobina, que foi anteriormente encontrada (HUTCHINS et al., 1967).

7.2. Estudos da oxidação lipídica e proteica e de qualidade de carne no músculo *B. femoris* maturado obtidos de bovinos *Bos Indicus* castrados e inteiros confinados

7.2.1 Atividade de enzimas do metabolismo celular nas diferentes porções do músculo *Biceps femoris*

Os valores obtidos para a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) nas diferentes porções do músculo *Biceps femoris* bovino são apresentados na Figura 4A. A porção Inserção (PI) do músculo apresentou maior ($P < 0,05$) atividade de LDH [$16,6 (0,50) \mu\text{mol/min/mg}$ de proteína] em comparação a porção Origem (PO) [$6,7 (0,50) \mu\text{mol/min/mg}$ de proteína]. Os valores estão expressos como média e desvio padrão. Maior atividade de LDH é característica em metabolismo glicolítico anaeróbio (fibras musculares brancas) e menor atividade é encontrada em metabolismo glicolítico aeróbio (fibras musculares vermelhas). Gotoh (2003) relata semelhantes resultados para o tipo de fibra muscular nas mesmas porções do músculo *Biceps femoris* (PO e PI). Estes autores relatam que as fibras musculares tipo I (vermelhas) são predominantes na porção origem (52,4 %) e fibras tipo IIB (brancas) são predominantes na porção inserção (41,8 %) do músculo de bovinos castrados da raça Japanese Black.

Figura 4. Atividade específica da enzima metabólica lactato desidrogenase (A) e citrato sintase (B) nas diferentes porções do músculo bovino *Biceps femoris* (n=12). ^{a,b}Médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre porções do músculo diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste *F*. Os dados apresentados são médias de quadrados mínimos e erro padrão.

Os resultados para atividade da citrato sintase (CS) são apresentados na Figura 4B. A porção do músculo PO [173,8 (7,24); n=12] apresentou maior ($P < 0,05$) atividade desta enzima em comparação a PI [149,8 (7,24); n=12]. Estes resultados corroboram com os encontrados para a atividade da LDH (Figura 4A) e demonstram que as técnicas utilizadas para investigação do metabolismo de fibras musculares foram promissoras. Músculos vermelhos, de metabolismo aeróbio apresentam maior atividade de CS e menor atividade de LDH. Desta forma, infere-se que a porção PO empregada neste trabalho é predominantemente vermelha e a PI, branca. Ainda, a castração dos animais pareceu não influenciar sobre a atividade da LDH e nem tão pouco da CS, de

forma que, castrados e inteiros tiveram resultados semelhantes ($P > 0,05$) para estas variáveis (dados não apresentados).

Nenhuma diferença ($P > 0,05$) para a porcentagem de fibras oxidativas nas diferentes porções do *Biceps femoris* foi observada, quando utilizado o método histoquímico NADH-TR para quantificá-las (Tabela 6).

Tabela 6. Porcentagem de fibra oxidativa nas diferentes porções do músculo bovino *Biceps femoris* de animais castrados e inteiros (n=12)

Porção do músculo	Condição Sexual		Média
	Inteiro	Castrado	
Origem	55,6 (3,74)	61,7 (3,24)	58,6 (2,47)
Inserção	56,4 (3,24)	59,1 (2,90)	57,8 (2,17)
Média	56,0 (2,47)	60,4 (2,17)	-

Médias de quadrados mínimos (erro padrão).

Embora diferenças tenham sido observadas para LDH e CS entre as porções do músculo (Figura 4), nenhuma diferença na porcentagem de fibras oxidativas foi detectada. Isto poderia ser atribuído à pouca sensibilidade da análise NADH-TR. Nesta técnica, células são coradas em azul escuro (metabolismo oxidativo) e registradas em fotos (Figura 5 A/B). Posteriormente, detecta-se e quantifica-se visualmente estas células, podendo nesta etapa ocorrer confusão pela dificuldade de diferenciá-las das células intermediárias (pouco escuras ou claras).

Figura 5. Cortes transversais das porções: inserção (A) e origem (B) do músculo *Biceps femoris* bovino submetidos à reação Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Tetrazólio Redutase (NADH-TR). a = metabolismo aeróbio e b = metabolismo anaeróbio .

7.2.2. Estudo de parâmetros relacionados à oxidação e qualidade de carne

7.2.2.1 Efeito de condição sexual

A condição sexual dos bovinos (castrado e inteiro) afetou ($P < 0,05$) as variáveis TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), L^* (luminosidade), PCC (perda de peso por cocção) e FC (força de cisalhamento) (Tabela 7). Músculos *Biceps femoris* de animais inteiros tiveram menor oxidação lipídica e maciez acompanhados de maior luminosidade e PPC em comparação aos castrados, com mais de 95% de confiabilidade. Estes dados sugerem que a castração dos animais pode ter levado a um aumento no conteúdo da gordura e dos ácidos graxos insaturados e consequentemente a carne destes foram mais susceptíveis a oxidação, reteve maior quantidade de água e por isso tiveram maior luminosidade, menor PCC e FC “mais macio” (FIELD , 1970). Maior conteúdo de água foi encontrado em músculos de suínos inteiros e magros (257 mg/g) em

comparação aos castrados e gordos (151 mg/g) (WOOD et al, 2003) . Por outro lado, Destefanis et al. (2003) avaliando o efeito da castração sobre a qualidade da carne de bovinos da raça Piemontese concluem que a castração afeta a composição química da carne, mas não melhora significativamente as outras características.

Tabela 7. Parâmetros de qualidade do músculo *Biceps femoris* de bovinos inteiros e castrados (n=40) avaliados pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), luminosidade (L^*), perda de peso por cocção (PPC) e força de cisalhamento (FC)

Variável	Condição sexual		<i>P</i>
	Inteiro	Castrado	
TBARS [£]	0,32 (0,009) ^b	0,35 (0,009) ^a	0,02
Valor de L^*	35,9 (0,28) ^a	34,8 (0,28) ^b	<0,01
PPC [€]	30,3 (0,41) ^a	28,5 (0,41) ^b	<0,01
FC [¥]	6,5 (0,11) ^a	6,1 (0,11) ^b	0,04

Médias de quadrados mínimos (erro padrão); £ = mg de malondialdeído por kg de carne; € = porcentagem; ¥ = kg.

^{a,b}Médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre condições sexuais na mesma variável diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste *F*.

7.2.2.2 Efeito de porção do músculo

As características metabólicas das porções PO e PI do *Biceps femoris* afetaram ($P = 0,03$) a oxidação proteica dos bifes deste músculo (Figura 6). A porção PO (vermelho, aeróbio) foi mais susceptível a oxidação proteica em comparação a PI (branco, anaeróbio). Maior oxidação protéica foi observada, após 6 meses de congelamento, em cochas de frango (metabolismo oxidativo) em comparação ao peito que é predominantemente anaeróbio (SOYER et al., 2010). Wood e seus colaboradores (2003) relatam que músculos com alta proporção de fibras vermelhas são mais susceptíveis a oxidação, por conterem maior conteúdo de ferro e fosfolipídios em comparação á aqueles que contem predominantemente fibras brancas em sua estrutura.

Figura 6. Oxidação protéica avaliada pelo grupos de tióis das diferentes porções (origem e inserção) do músculo bovino *Biceps femoris* (n=40). ^{a,b}Médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre porções do músculo diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste *F*. Os dados apresentados são médias de quadrados mínimos e erro padrão.

7.2.2.3. Efeito de tempo de confinamento

Os resultados obtidos para a porcentagem de perda de peso por cocção (PPC) de bifes do *Biceps femoris* são apresentadas na Figura 7. Maior ($P < 0,05$) PPC foram observadas para os bifes dos animais confinados por período mais extensos (129 dias) em comparação àqueles confinados por menor período (59 dias). Estes resultados sugerem que os animais confinados por maior tempo depositaram maior quantidade de gordura na carcaça e por isso perderam menos água no período que estas carcaças foram mantidas em câmara fria entre o abate e a desossa. Assim, a carne dos animais confinados perde mais água em comparação àquela dos animais não confinados.

Figura 7. Perdas de peso por cocção de bifes do músculo *Biceps femoris* de bovinos confinados (n=40) por diferentes períodos (dias). ^{a,b}Médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre tempos de confinamento diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste *F*. Os dados apresentados são médias de quadrados mínimos e erro padrão.

7.2.2.4. Interação de condição sexual e tempo de confinamento

Interação entre a condição sexual (castrado e inteiro) e o tempo de confinamento (59 e 129 dias) foi observada para tióis (Figura 8). Bife de animais castrados teve maior ($P<0,05$) oxidação protéica deduzida pelo menor valor de tióis em comparação aos animais inteiros no primeiro período de confinamento (59 dias). Entretanto, após 129 dias de confinamento não houve diferença significativa entre os valores de tióis da carne de animais castrados e inteiros para 5% de significância. Possivelmente a extensão do tempo de confinamento dos animais permitiu uma maior deposição de gordura, o que possibilitou um aumento na oxidação proteica da carne destes animais. Além de que, animais confinados, os quais se alimentam de elevado conteúdo de energia tem apresentado maior susceptibilidade a oxidação proteica em comparação aos que se alimentam apenas de gramíneas, em especial pela sua composição rica em antioxidantes (SANTÉ-

LHOUTELLIER et al., 2008). Tal efeito não foi observado, no presente estudo, entre castrados e inteiros quando confinados por maior tempo (129 dias). Provavelmente neste período ambos os grupos tiveram aumento de gordura e assim a susceptibilidade a oxidação da carne ficou mais próxima entre eles.

Figura 8. Interação de condição sexual (castrado e inteiro) e tempo de confinamento (dias) para grupos tióis (n=40). ^{a,b}Médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre condições sexuais no mesmo tempo de confinamento diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste *F*. ^{A,B}Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre tempos de confinamento na mesma condição sexual diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste *F*. Os dados apresentados são médias de quadrados mínimos e erro padrão.

7.2.2.5. Interação de condição sexual, tempo de confinamento e tempo de maturação (a vácuo)

Os valores obtidos para as variáveis pH e tióis ao longo dos 100 dias maturação a vácuo do músculo *Biceps femoris* de animais inteiros e castrados são apresentados na Figura 9(AB). Para a carne dos animais inteiros observou uma diminuição de tióis ao 30º dia de maturação em comparação ao 1º dia, e este valor permaneceu baixo até o 100º dia de maturação para 5% de

significância. Já a carne dos animais castrados apresentou similar queda ($P < 0,05$) ao 30º dia, entretanto, os valores aumentaram ($P < 0,05$) ao 60º dia e diminuíram ao 100º dia. Tempos prolongados de maturação da carne possibilita o processo de oxidação (XIONG, 2000), e isso parece mais relevante no grupo dos bovinos castrados.

Figura 9. Valores de pH (A) e conteúdo de grupos tióis (B) do músculo *Biceps femoris* de bovinos Nelore (n=40) em diferentes tempos de maturação (a vácuo). ^{a,b}Médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre tempos de maturação na mesma condição sexual diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de *Tukey-Kramer*. ^{A,B}Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre condições sexuais no mesmo tempo de maturação diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste *F*. Os dados apresentados são médias de quadrados mínimos e erro padrão.

Quando comparado às duas condições sexuais, castrado e inteiro, ao longo do tempo de confinamento observou-se que aos 30 e 100 dias, a carne dos animais castrados teve menores valores de tióis em comparação àquela dos inteiros para 5% de nível de significância. Isso sugere uma maior suscetibilidade à oxidação proteica para a carne dos animais castrados e possivelmente deve-se a uma maior deposição de gordura na carcaça como tem sido relatado neste trabalho anteriormente.

A variável pH aumentou ($P < 0,05$) no 30º dia de maturação dos bifes e se manteve estável até o 100º dia, tanto os músculos dos animais castrados quanto dos inteiros. Os valores de pH da carne foram semelhantes entre os castrados e inteiros ao longo de 60 dias de maturação, e, somente, no 100º dia o pH da carne dos castrados foi menor que dos inteiros, para nível de significância 5%. Nenhum estudo foi encontrado onde se compara o pH do músculo *Biceps femoris* de animais castrados e inteiros. Entretanto, alguns autores relatam, para outros músculos bovinos, maior valor de pH para carne de animais inteiros em comparação aos castrados (BELTRÁN ET AL., 1997; MONIN, 1990; FIELD, 1970).

7.2.2.6. Interação de porção do músculo e tempo de maturação (a vácuo)

Os valores obtidos para as variáveis espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, perda de peso por cocção e força de cisalhamento para as diferentes porções (PO e PI) do músculo bovino *Biceps femoris* ao longo do tempo de maturação são apresentados na Figura 10.

Semelhante comportamento foi observado para TBARS nas porções PO e PI do músculo até o 60º dia de maturação (Figura 10A). Os valores de TBARS aumentaram ($P < 0,05$) progressivamente, de forma que no dia 1 < dia 30 < dia 60. Somente no 100º dia de maturação dos bifes, os valores de TBARS diminuíram ($P < 0,05$) na porção PO e se manteve ($P > 0,05$) na porção PI. A oxidação lipídica muito possivelmente foi acelerada pela própria maturação dos bifes e ainda

uma diminuição dos valores de TBARS pode ser esperada em etapas finais do processo de oxidação (XIONG, 2000).

Figura 10. Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; A), perda de peso por cocção (PPC; B) e força de cisalhamento (FC; C) para as diferentes porções do músculo *Biceps femoris* de bovinos Nelore (n=40) ao longo do tempo de maturação. ^{a,b,c}Médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre tempos de maturação na mesma porção do músculo diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de *Tukey-Kramer*. ^{A,B}Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre porções do músculo no mesmo tempo de maturação diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste *F*. Os dados apresentados são médias de quadrados mínimos e erro padrão.

A porção PO foi mais susceptível a oxidação no 60º de maturação da carne em comparação a PI, apresentando maiores ($P < 0,05$) valores de TBARS. Como observado anteriormente à porção PO tem metabolismo aeróbio e, músculos com estas características são mais susceptíveis a oxidação lipídica (SOYER et al., 2010). Já nos demais tempos de maturação, os valores de TBARS foram semelhantes entre si para as porções PO e PI para 5% de nível de significância.

Na Figura 10B, observa que os valores de PPC foram semelhantes ao longo dos 100 dias de maturação dos bifes da porção PI e, entretanto, aumentaram a partir do 60º para PO, com 5% de nível de significância. Comparando as duas porções, observa que durante os 60 primeiros dias de maturação da carne os valores de PPC foram similares entre PI e PO, sem diferença significativa em 5% de significância. Somente no 100º foi verificado maior ($P < 0,05$) PPC para PO em comparação a PI. O aumento de PPC pode ser esperado em carnes maturadas pelo crescimento de microorganismos de putrefação.

Os valores de FC dos bifes das porções do músculo *Biceps femores* PO e PI ao longo do tempo de maturação são apresentados na Figura 10C. Em ambas as porções os valores de FC diminuíram ($P < 0,05$) no 30º em comparação ao 1º e foram ainda menores ($P < 0,05$) no 60º de maturação. Estes resultados podem ser suportados pelos processos de degradação e fragmentação de proteínas, desempenhado em especial pelas enzimas calpains (KOOHMARAIE, 1994). Ainda, a porção PO foi mais dura (menos macia) em comparação a PI nos dias 30 e 60 de maturação. Menor estabilidade oxidativa foi encontrada na porção PO (Figura 6) e umas das consequências da oxidação proteica têm sido a diminuição maciez em razão da formação de pontes dissulfídicas entre as proteínas (LUND et al., 2007; DELLES et al., 2011).

7.2.2.7. Interação de tempo de confinamento e tempo de maturação (a vácuo)

Uma interação entre tempo de confinamento e tempo de maturação á vácuo foi observada ($P < 0,01$) para as variáveis tióis, TBARS, metamioglobina, pH, L^* e FC no músculo bovino *Biceps femoris* (Tabela 8).

Tabela 8. Interação entre tempo de confinamento e tempo de maturação (1, 30, 60 e 100 dias) para parâmetros de qualidade do músculo *Biceps femoris* de bovinos Nelore (n=40): conteúdo de tióis, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), porcentagem de metamioglobina, pH, luminosidade (L^*) e força de cisalhamento (FC)

Tempo de confinamento (dia)	Tempo de maturação (dia)				<i>P</i>
	1	30	60	100	
Grupos de tióis (nmol de cisteína/mg de carne)					
59	81,3 (1,49) ^{aA}	62,9 (1,49) ^{bB}	85,5 (1,51) ^{aA}	80,0 (1,70) ^{aA}	<0,01
129	83,5 (1,49) ^{aA}	79,5 (1,49) ^{abA}	74,7 (1,49) ^{bB}	67,1 (1,52) ^{cB}	
TBARS (mg MDA/kg de carne)					
59	0,21 (0,017) ^{bA}	0,29 (0,017) ^{aA}	0,35 (0,017) ^{aB}	0,30 (0,019) ^{aB}	<0,01
129	0,22 (0,017) ^{cA}	0,33 (0,017) ^{bA}	0,50 (0,017) ^{aA}	0,48 (0,018) ^{aA}	
Metamioglobina (%)					
59	7,6 (1,34) ^{abA}	3,8 (0,84) ^{bB}	12,3 (0,88) ^{aA}	13,1 (1,42) ^{aA}	<0,01
129	8,2 (1,39) ^{bcA}	10,3 (0,83) ^{bA}	7,1 (0,88) ^{cB}	16,4 (1,29) ^{aA}	
Valor de pH					
59	4,98 (0,032) ^{cB}	5,50 (0,032) ^{aA}	5,33 (0,033) ^{bB}	5,31 (0,036) ^{bB}	<0,01
129	5,49 (0,032) ^{aA}	5,50 (0,032) ^{aA}	5,55 (0,032) ^{aA}	5,46 (0,032) ^{aA}	
Valor de <i>L</i> *					
59	36,8 (0,54) ^{bA}	37,4 (0,48) ^{abA}	38,7 (0,33) ^{aA}	36,0 (0,47) ^{bA}	<0,01
129	32,3 (0,54) ^{bB}	32,7 (0,48) ^{abB}	34,3 (0,33) ^{aB}	34,4 (0,43) ^{aB}	
Força de cisalhamento (kg)					
59	7,5 (0,22) ^{aA}	5,9 (0,22) ^{bcB}	5,2 (0,22) ^{cA}	6,4 (0,24) ^{bA}	<0,01
129	7,9 (0,22) ^{aA}	7,2 (0,22) ^{aA}	5,0 (0,22) ^{bA}	5,2 (0,22) ^{bB}	

Médias de quadrados mínimos (erro padrão). ^{a,b,c}Médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre tempos de maturação no mesmo tempo de confinamento diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey-Kramer. ^{A,B}Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre tempos de confinamento no mesmo tempo de maturação diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste *F*.

Nas carnes maturadas por 30 dias, menores ($P < 0,05$) valores de tióis foram observados na carne dos animais confinados por 59 dias em relação aos animais confinados por 129 dias. Avaliando a maturação da carne, observa que nos tempos mais estendidos de maturação (60 e 100

dias) os bifes dos animais confinados por 59 dias apresentaram maiores ($P < 0,05$) valores de tióis do que àqueles dos animais confinados por 129 dias. Isto demonstra que maiores períodos de confinamento colaboram para o desenvolvimento da oxidação proteica em carne bovina maturada por longo tempo. Field (1970) relata que a composição da carcaça também varia de acordo com a dieta do animal, e neste contexto dietas com alta energia oferecidas por longos períodos poderiam elevar os ácidos graxos insaturados nos músculos possibilitando o desencadeamento da oxidação proteica.

Valores de TBARS foram os menores ($P < 0,05$) nas carnes dos animais confinados por 59 dias quando comparados às dos animais confinados por 129 dias nos tempos de maturação de 60 e 100 dias, sugerindo que o confinamento dos animais contribui para o aumento da susceptibilidade oxidativa da carne. Nos animais confinados por 59 dias, os valores de tióis na carne aumentaram a partir do 30º de maturação e se mantiveram altos até o 100º de maturação, nível de significância 5%. Para os animais confinados por 129 dias, os valores de tióis foram menores ($P < 0,05$) na carne maturada por 1 dia, intermediários na carne maturada por 30 dias e maiores ($P < 0,05$) na carne maturada por 60 e 100 dias, os quais não diferiram ($P > 0,05$). Estes resultados sugerem que o tempo de maturação eleva a oxidação lipídica e que menor tempo de confinamento protegeria mais a carne da oxidação (XIONG, 2000; PROMEYRAT et al., 2011).

Um aumento na porcentagem de metamioglobina também foi observado ao longo dos 100 dias de maturação da carne de animais confinados por 59 e 129 dias em 5% de significância. Assim como no conteúdo de tióis, o pico da oxidação da carne dos animais confinados por maior período foi observada somente no 100º de maturação. Aumento de metamioglobina tem sido relacionado com oxidação proteica e lipídica (PARK; XIONG, 2007; FAUSTMAN et al., 2010) e ambos os processos levam ao desenvolvimento de “*off-flavor*” e descoloração de carnes vermelhas.

Animais confinados por 59 dias tiveram carnes com valores de pH menores ($P < 0,05$) quando maturadas por 1, 60 e 100 dias e comparado à carne dos animais confinados por 129 dias e

correspondentes tempos de maturação. Provavelmente, os animais confinados por maior tempo foram abatidos com uma maior reserva energética, o que por consequência permitiria menor queda de pH durante o *rigormortis*, resultando, portanto, em maior valor de pH da carne. Os valores de pH na carne destes animais foram semelhantes ($P > 0,05$) ao longo dos cem dias de maturação. Nenhum resultado de pH do músculo *Biceps femoris* em bovinos confinados por diferentes períodos tem sido relatado na literatura.

Em todos os tempos de maturação, a carne dos animais confinados por 59 dias foi mais clara (maiores valores de L^*) do que a carne dos animais confinados por 129 dias (menores valores de L^*) em 5% de significância. Os valores de L^* apresentaram o mesmo comportamento entre os tempos de maturação na carne dos animais confinados por 59 e 129 dias. A única exceção foi para a amostra de carne maturada por 100 dias dos animais confinados por 59 dias. Fatores como a menor PPC (Figura 7), o que poderia inferir a um maior “*drip loss*”, associado a um menor valor de pH da carne dos bovinos confinados por menor tempo seria, portanto, uma das prováveis explicações para a maior luminosidade da carne dos animais deste grupo.

Nos diferentes períodos de confinamento, uma diminuição ($P < 0,05$) dos valores de FC foi observada. Isto pode estar relacionado à proteólise natural de carnes em maturação. Quando comparado os dois períodos (59 e 129 dias de confinamento) verifica que ao 30º dia de maturação a carne dos animais confinados por maior tempo apresentou maiores valores de FC, o que indica uma menor maciez. Corroborando com estes resultados, a partir do 30º também foi observado maior teor de oxidação lipídica e proteica na carne dos animais confinados por 129 dias em comparação aos confinados por 59 dias. Alguns trabalhos mostram que carnes oxidadas têm a maciez comprometida (LUND et al., 2007; DELLES et al., 2011). Todavia os motivos da inversão destes resultados ao 100º dia de maturação podem ser resultantes do crescimento de bactérias anaeróbias.

8. CONCLUSÕES

8.1. Estudo da oxidação lipídica e proteica de músculos *L. dorsi*, obtidos de bovinos *Bos indicus* castrados e inteiros, sob duas condições de maturação: vácuo e aerobiose

A condição sexual não afetou o potencial oxidativo e qualidade dos bifes maturados a vácuo ou aerobiose, quando bovinos da raça Nelore foram estudados. A falta de diferenças em quantidade de gordura composição de ácidos graxos, atividades de enzimas antioxidantes e peptídeo antioxidante entre as carnes de bovinos castrados e inteiros daquela raça podem ter sido fundamental para que nenhum efeito de condição sexual existisse sobre a qualidade de carne bovina. Os bifes embalados a vácuo tem uma maior estabilidade oxidativa do que aqueles bifes envolvidos com PVC permeável ao oxigênio ao longo do tempo de maturação, uma vez que a oxidação levou aproximadamente duas vezes mais dias para começar em bifes embalados a vácuo do que em bifes envolvidos com PVC.

Devido ao fato do Brasil ser o maior exportador mundial de carne bovina e dos frigoríficos brasileiros frequentemente armazenarem carne bovina por longos períodos antes de atingir seu destino final, um futuro estudo avaliando bifes embalados a vácuo por um tempo maior de maturação seria provavelmente importante para encontrar diferenças sobre a estabilidade oxidativa e qualidade de carne entre bovinos castrados e inteiros.

8.2. Estudo da oxidação lipídica e proteica e de qualidade de carne em músculos *B. femoris* maturados, obtidos de bovinos *Bos indicus* castrados e inteiros confinados.

Diferentes metabolismo (aeróbio e anaeróbio) são encontrados nas porções PO e PI respectivamente, do músculo bovino *Biceps femoris*. Não obstante a segunda porção, PI, foi mais susceptível a oxidação proteica.

A castração dos animais aumentou a oxidação e diminuiu a luminosidade dos bifes do *Biceps femoris*, por outro lado melhorou a maciez e as perdas de peso por cocção.

Carnes de animais confinados por maior período (129 dias) têm as perdas de peso por cocção elevada. Ainda, o tempo de maturação á vácuo por período prolongado afetou o pH e oxidação proteica tanto para os bifes dos bovinos castrados como dos inteiros.

Por fim, existe uma interação entre porções do musculo e tempo de maturação foi observada para as variáveis força de cisalhamento, perda de peso por cocção e TBARS.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERLE, E.D. et al. **Principles of meat science**. 4 ed. Iowa: Kendall/Hunt publishing company, 2001, 354p.
- AGUIRREZÁBAL, M.M. et al. The effect of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. **Meat Science**, v. 54, p. 77-81, 2000.
- ALP, P.R., NEWSHOLME, E.A., ZAMMIT, V.A. Activities of cintrate synthase and NAD⁺ linked and NADP⁺ linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochemical Immunology**, v.154, p.689-700, 1976.
- AMSA**. American Meat Science Association. Research guidelines for cookery, sensory evaluation and instrumental tenderness of fresh meat. Chicago, IL, 1995.
- ARMENTEROS, M. et al. Analysis of protein carbonyls in meat products by using the DNPH-method, fluorescence spectroscopy and liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry (LC–ESI–MS). **Meat Science**, v. 83, p.104-112, 2009.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS**. Official methods of analysis. 15.ed. Washington: AOAC, 1995.
- BARP, J. et al. Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones. **Braslian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.1075-1081, 2002.
- BATIFOULIER, F. et al. Influence of vitamin E on lipid and protein oxidation induced by H₂O₂-activated MetMb in microsomal membranes from turkey muscle. **Meat Science**, v.61, p.389–395, 2002.
- BEERS, R. F.; SIZER, J. W. A spectrophotometric method of measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.133–140, 1952.
- BELTRÁN, J. A., JAIME, I., SANTOLARIA, P., SANUDO, C., ALBERTI, P., RONCALÉS, P. Effect of stress-induced high post-mortem pH on protease activity and tenderness of beef. **Meat Science**, v.45, p.201–207, 1997.
- BERIAIN, M. J., GOÑI, M. V, INDURAIN, G., SARRIÉS, M. V, INSAUSTI, K. Predicting Longissimus dorsi myoglobin oxidation in aged beef based on early post-mortem colour measurements on the carcass as a colour stability index. **Meat Science**, v.81, p.439–445, 2009.
- BERGMEYER, H.U.; BERNT, E. In *Methods of Enzymatic Analysis*; Bergmeyer, H.U., 2nd ed.; Academic Press: New York, NY, Volume II, 574-579, 1974.
- BERTRAM, H.N. et al. Does oxidation affect the water functionality of myofibrillar proteins? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.2342-2348, 2007.
- BOCCARD, R. L., NAUDE, R. T., CRONJE, D. E., SMIT, M. C., VENTER, H. J., ROSSOUW, E. J. The influence of age, sex and breed of cattle on their muscle characteristics. **Meat Science**, v.3, p.261–280, 1979.

BOSELLI, E. et al. Cholesterol photosensitised oxidation of beef meat under standard and modified atmosphere at retail conditions. **Meat Science**, v.81, p.224-229, 2009.

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**, v.72, p.248-254, 1976.

BURTON, G.W.; TRABER, M.G. Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. **Annual Review of Nutrition**, v.10, p.357-382, 1990.

BUTTERFIELD, D.A. et al. Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl- α -phenylnitron and Vitamin E. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 854, p. 448-462, 1998.

CHRISTENSEN, M.; HENCKEL, P.; PURSLOW, P. P. Effect of muscle type on the rate of post-mortem proteolysis in pigs. **Meat Science**, v.66, p.595-601, 2004.

DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., GIUSTARINI, D., MILZANI, A., COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v.329, p.23-38, 2003.

DEL CAMPO, M. et al. Effects of feeding strategies including different proportion of pasture and concentrate, on carcass and meat quality traits in Uruguayan steers. **Meat Science**, v.80, p.753-760, 2008.

DELLES, R.M., XIONG, Y.L., TRUE, A.D. Mild protein oxidation enhanced hydration and myofibril swelling capacity of fresh ground pork muscle packaged in high oxygen atmosphere. **Journal of Food Science**, v.76, p.760-767, 2011.

DESCALZO, A.M., SANCHO, A.M. A review of natural antioxidants and their effects on oxidative status, odor and quality of fresh beef produced in Argentina. **Meat Science**, v.79, p.423-436, 2008.

DESTEFANIS, G., BRUGIAPAGLIA, A., BARGE, M. T., LAZZARONI, C. Effect of castration on meat quality in Piemontese cattle. **Meat Science**, v.64, 215-218, 2003.

EGELANDSDAL, B. et al. Factors affecting solubilisation and oxidation of proteins during equine metmyoglobin-mediated lipid oxidation in extensively washed cod muscle. **Food Chemistry**, v.122, p.1102-1110, 2010.

ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.82, p.70-77, 1959.

ESTÉVEZ, M. et al. Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. **Meat Science**, v.80, p.1290-1296, 2008.

ESTÉVEZ, M.; VENTANAS, S.; CAVA, R. Effect of natural and synthetic antioxidants on protein oxidation and colour and texture changes in refrigerated stored porcine liver pâté. **Meat Science**, v.74, p.396-403, 2006.

EWING, J. F., JANERO, D. R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. **Analytical Biochemistry**, v.232, p.243-248, 1995.

- FARMER, L.J. **Meat flavour.** In **The chemistry of muscle-based foods**, Ledward, D. A.; Johnston, D. E.; Knight, M. K (eds.). Cambridge, Inglaterra: Royal Society of Chemistry, 1992. p.167-182.
- FAUSTMAN, C., SUN, Q., MANCINI, R., SUMAN, S. P. Myoglobin and lipid oxidation interactions: mechanistic bases and control. **Meat Science**, v.86, p.86–94, 2010.
- FIELD, R. A. Effect of castration on meat quality and quantity. **Journal of Animal Science**, v.32, p.849–858, 1970.
- FILGUERAS, R. S. et al. Colour, lipid and protein stability of Rhea americana meat during air- and vacuum-packaged storage: influence of muscle on oxidative processes. **Meat Science**, v.86, p.665–673, 2010.
- FRANCO, D. et al. Effects of calf diet, antioxidants, packaging type and storage time on beef steak storage. **Meat Science**, v.90, p.871–880, 2012.
- FRANCO, D. et al. Effect of finishing and ageing time on quality attributes of loin from the meat of Holstein–Fresian cull cows. **Meat Science**, v.83, p.484-491, 2009.
- GHEISARI, H. R., MOTAMEDI, H. Chloride salt type/ionic strength and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid oxidation in cattle, camel and chicken meat. **Meat Science**, v.86, p.377–383, 2010.
- GOTOH, T. Histochemical properties of skeletal muscles in Japanese cattle and their meat production ability. **Animal Science Journal**, v. 74, p. 339-354, 2003.
- GRAY, J.I.; PEARSON, A.M. **Rancidity and warmed-over flavor.** In:Restructured Meat and Poultry Products, Advances in Meat Research, Vol. 3, A.M. Pearson, A. M.; Dutson, T. R. (Eds.) 1987.Cap.6, p. 221-269.
- GREENE, B. E., HSIN, I. M., ZIPSER, M. W. Retardation of oxidative color changes in raw ground beef. **Journal of Food Science**, v.36, p.940–942, 1971.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 4ed, Oxford University Press, Oxford, UK, 2007.
- HANSEN, S., FRYLINCK, L., STRYDOM, P. E. The effect of vitamin D(3) supplementation on texture and oxidative stability of beef loins from steers treated with zilpaterol hydrochloride. **Meat Science**, v.90, p.145–151, 2012.
- HARRIS, S. E. et al. Antioxidant status affects color stability and tenderness of calcium chloride-injected beef. **Journal of Animal Science**, v.79, p.666-677, 2001.
- HARTMAN, L., LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, p.475–476, 1973.
- HÖGBERG, A. et al. Muscle lipids, vitamins E and A, and lipid oxidation as affected by diet and RN genotype in female and castrated male Hampshire crossbreed pigs. **Meat Science**, v.60, p.411-420, 2002.

- HOOD, D. E., RIORDAN, E. B. Discoloration in pre-packaged beef measurement by reflectance spectrophotometry and shopper discrimination. **Journal of Food Technology**, v.8, p.333–343, 1973.
- HUTCHINS, B. K., LIU, T. H. P., WATTS, B. M. Effects of additives and refrigeration on reducing activity, metmyoglobin and malonaldehyde of raw ground beef. **Journal of Food Science**, v.32, p.214–217, 1967.
- IGENE, J.O. et al. Role of triglycerides and phospholipids on development of rancidity in model meat systems during frozen storage. **Food Chemistry**, v.5, p.263-276, 1980.
- INSANI, E.M. et al. Oxidative stability and its relationship with natural antioxidants during refrigerated retail display of beef produced in Argentina. **Meat Science**, v.79, p.444-452, 2008.
- JIAO, Q. et al. Castration differentially alters basal and leucine-stimulated tissue protein synthesis in skeletal muscle and adipose tissue. **American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism**, v.297, p.1222-1232, 2009.
- JOHNS, A.M.; BIRKINSHAW, L.H.; LEDWARD, D.A. Catalysts of lipid oxidation in meat products. **Meat Science**, v.25, p.209-220, 1989.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10 ed. 2004, 488p.
- KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat Science**, v.36, p.169-189, 1994.
- KANNER, J.; GERMAN, J.B.; KINSELLA, J.E. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. **CRC Critical Review of Food Science and Nutrition**. v.25, p.317-364, 1987.
- KING, D. A, SHACKELFORD, S. D., RODRIGUEZ, A. B., WHEELER, T. L. Effect of time of measurement on the relationship between metmyoglobin reducing activity and oxygen consumption to instrumental measures of beef longissimus color stability. **Meat science**, v.87, p.26–32, 2011.
- KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Science**, v. 32, p. 93-104, 1994.
- KOOHMARAIE, M. et al. (1988). Acceleration of postmortem tenderization in ovine carcasses through activation of Ca²⁺-dependent proteases. **Journal of Food Science**. 53, 1638-1641.
- KRANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: Quality implications. **Meat Science**, v.36, p.169–189, 1994.
- KRZYWICKI, K. The determination of haem pigment in meat. **Meat Science**, v.7, p.29-36, 1982.
- LAGERSTEDT, Å., AHNSTROM, M. L., LUNDSTROM, K. Vacuum skin pack of beef - A consumer friendly alternative. **Meat Science**, v.88, p.391–396, 2011a.
- LAGERSTEDT, Å., LUNDSTROM, K., LINDAHL, G. Influence of vacuum or high-oxygen modified atmosphere packaging on quality of beef M. longissimus dorsi steaks after different ageing times. **Meat Science**, v.87, p.101–106, 2011b.

LARRAÍN, R. E., SCHAEFER, D. M., RICHARDS, M. P., REED, J. D. Finishing steers with diets based on corn, high-tannin sorghum or a mix of both: Color and lipid oxidation in beef. **Meat Science**, v.79, p.656–665, 2008.

LEVINE, R.L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. In: **Methods in Enzymology**. Cap. 37. Academic Press, 1994. 347-365.

LINGAHL, G. et al. Ageing of large cuts of beef loin in vacuum or high oxygen modified atmosphere - Effect on shear force, calpain activity, desmin degradation and protein oxidation. **Meat Science**, v.85, p.160–166, 2010.

LIU, G., Xiong, Y. L. Contribution of lipid and protein oxidation to rheological differences between chicken white and red muscle myofibrillar proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.779–784, 1996.

LIU, G.; XIONG, Y.L. Electrophoretic pattern, thermal denaturation, and in vitro digestibility of oxidized myosin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.624-630, 2000.

LUND, M.N. et al. High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. **Meat Science**, v.77, p.295-303, 2007.

MA, Q. Transcriptional responses to oxidative stress: Pathological and toxicological implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v.125, p.376–393, 2010.

MACDOUGALL, D. B. Changes on the colour and opacity of meat. **Food Chemistry**, v.9, p.75–88, 1982.

MADDOCK CARLIN, K.R. et al. Effect of oxidation, pH, and ionic strength on calpastatin inhibition of μ - and m-calpain. **Journal of Animal Science**, v.84, p.925-937, 2006.

MAHECHA, L. et al. Antioxidant enzyme activities and antioxidant capacity in longissimus muscle from bulls fed diets rich in polyunsaturated fatty acids. **Food Chemistry**, v.127, p.379–386, 2011.

MARTINAUD, A. et al. Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.2481-2487, 1997.

MERCIER, Y.; GATELLIER, P. RENERRE. ; M. Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows nished on pasture or mixed diet. **Meat Science**, v.66, p.467–473, 2004.

MIELNIK, M. B. et al. Antioxidant and other quality properties of reindeer muscle from two different Norwegian regions. **Meat Science**, v.89, p.526–532, 2011.

MONAHAN, F.J. **Oxidation of lipids in muscle foods: Fundamental and applied concerns**. In Antioxidants in muscle foods, Decker, E.A.; Faustman, C.; Lopez-Bote, C.J. (Eds.) Chichester: Wiley, 2000. Cap. 1, p. 3-23.

MONIN, C. Facteurs biologiques et qualités de la viande. In R. G. GUILHERMET; Y. GEAY (Eds.), Croissance des bovins et qualité de la viande (p. 177–196). Rennes: ENSA, 1990.

- MONTEIRO, A.C.G. et al. Fatty acid composition of intramuscular fat of bulls and steers. **Livestock Science**, v.99, p.13-19, 2006.
- MORITA, J.I. et al. (1987). Heat-induced gelation of myosin from leg and breast muscle of chicken. **Agricultural and biological chemistry**, v.51, p.2895.
- O'KEEFFE; HOOD, D.E. Biochemical factors influencing metmyoglobin formation on beef from muscles of differing colour stability. **Meat Science**, v.7, p.209-228, 1982.
- OKEUDO, N.J.; MOSS, B.W. Intramuscular lipid and fatty acid profile of sheep comprising four sex-types and seven slaughter weights produced following commercial procedure. **Meat Science**, v.76, p.195-200, 2007.
- OKUMURA, N. et al. Proteomic analysis of slow- and fast- twitch skeletal muscles. **Proteomics**, v.5, p.2896-2906, 2005.
- OLIVER, C.N. et al. Age-related changes in oxidized proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.5488-5491, 1987.
- OOIZUMI, T.; XIONG, Y.L. Hydroxyl radical oxidation destabilizes subfragment-1 but not the rod of myosin in chicken myofibrils. **Food Chemistry**, 106, 661–668, 2008.
- OSAWA, C.C.; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: Métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v.28, p.655-663, 2005.
- PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.70, p.158–169, 1967.
- PARK, D.; XIONG, L.Y. Oxidative modification of amino acids in porcine myofibrillar protein isolates exposed to three oxidizing systems. **Food Chemistry**, v.103, p.607-616, 2007.
- PARK, D.; XIONG, L.Y.; ANDERTON, A.L. Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle myofibrillar protein. **Food Chemistry**, v.101, p.1239–1246, 2006.
- PASTSART, U. et al. Effect of muscles and post-mortem rate of pH and temperature fall on antioxidant enzyme activities in beef. **Meat Science**, v.93, p. 681-686, 2013.
- PEINADO, J. et al. The effects of gender and castration of females on performance and carcass and meat quality of heavy pigs destined to the dry-cured industry. **Meat Science**, v.90, p.715–720, 2012.
- PROMEYRAT, A. et al. Early *post-mortem* sarcoplasmic proteome of porcine muscle related to protein oxidation. **Food Chemistry**, v.127, p.1097-1104, 2011.
- RAMÍREZ, R.; CAVA, R. The crossbreeding of different Duroc lines with the Iberian pig affects colour and oxidative stability of meat during storage. **Meat Science**, v.77, p.339–347, 2007.
- RENERRE, M., DUMONT, F., GATELLIER, P. Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. **Meat Science**, v.43, 111–121, 1996.

- RENERRE, M.; LABADIE, J. Fresh red meat packaging and meat quality: Review. **In Proceedings of 39th International Congress of Meat Science and Technology**1 (Vol. 25, p. 361–387), 1993.
- RHEE, K.S.; MYERS, C.E. Sensory properties and lipid oxidation in aerobically refrigerated cooked ground goat meat. **Meat Science**, v.66, p.189-194, 2003.
- RIPOLL, G., JOY, M., MUÑOZ, F. Use of dietary vitamin E and selenium (Se) to increase the shelf life of modified atmosphere packaged light lamb meat. **Meat Science**, v.87, p.88–93, 2011.
- RODRIGUES, V.C.; ANDRADE, I.F. Características físico-químicos da carne de bubalinos e de bovinos castrados e inteiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.1839-1849, 2004.
- ROWE, L.J. et al. Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality. **Journal of Animal Science**, v.82, p.785-793, 2004a.
- ROWE, L.J. et al. Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of μ -calpain. **Journal of Animal Science**, v.82, p.3254-3266, 2004b.
- RYAN, J.M., COBB, M.A., HERMANSON, J.W. Elbow extensor muscles of the horse: postural and dynamic implications. **Acta Anatomica**, v. 144, p.71-79, 1992.
- SANTÉ-LHOUTELLIER, V.; ENGEL, E.; GATELLIER, PH. Assessment of the influence of diet on lamb meat oxidation. **Food Chemistry**, v.109, p.573–579, 2008.
- SEYFERT, M. et al. Efficacy of lactic acid salts and sodium acetate on ground beef colour stability and metmyoglobin-reducing activity. **Meat Science**, v.75, p.134–142, 2007.
- SIES, H. **Oxidative stress: Introductory remarks**. Orlando, FL: Academic Press. In: Oxidative Stress, Sies, H. (ed.), p. 1-8, 1986.
- SOYER, A. et al. Effects of freezing temperature and duration of frozen storage on lipid and protein oxidation in chicken meat. **Food Chemistry**, v.120, p.1025-1030, 2010.
- STADMAN, E.R. Meat ion-catalysed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. **Free Radicals Biology and Medicine**, v.9, p.315-325, 1990.
- STADTMAN, E.R.; OLIER, C.N. Metal-catalyzed oxidation of protein: Mini-review. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.2005–2008, 1991.
- STIKA, J.F., SUMAN, S.P., XIONG, Y.L. Frozen storage stability of vacuum-packaged precooked restructured steaks manufactured from mature cow beef. **LWT - Food Science and Technology**, v.41, p.1535–1540, 2008.
- TANG, J.; FAUSTMAN, C.; HOAGLAND, T.A. Krzywicki Revisited: Equations for spectrophotometric determination of myoglobin redox forms in aqueous meat extratcts. **Journal of Food Science**, v.69, p.717-720, 2004.
- TEREVINTO, A. et al. Oxidative status, *in vitro* iro-induced lipid oxidation and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in rhea meat. **Meat Science**, v.84, p.706-710, 2010.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram 552 amounts of total and oxidized glutathione-applications to mammalian 554 blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, v.27, p.502-522, 1969.

VENTANAS, S. et al. Protein and lipid oxidation in Longissimus dorsi and dry cured loin from Iberian pigs as affected by crossbreeding and diet. **Meat Science**, v.72, p.647–655, 2006.

VILJANEN, K. et al. Inhibition of protein and lipid oxidation in liposomes by berry phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.7419–7424, 2004.

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.72, p.1084-1087, 1970.

VYNCKE, W. Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.). **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.77, p.239-240, 1975.

WARREN, H.E. et al. Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. II: Meat stability and flavour. **Meat Science**, v.78, p.270-278, 2008.

WARRISS, P. D. **Meat Science: an introductory text**. Cabi Publishing, Oxfordshire. 2000. p. 60.

WARRISS, P.D. The extraction of haem pigments from fresh meat. **Journal of Food Technology**, v.14, p.75-80, 1979.

WAYNER, D.D.M. et al. The relative contribution of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical- trapping antioxidant activity of human blood plasma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.924, p.408-419, 1987.

WEBB, E.C.; O'NEILL, H.A. The animal fat paradox and meat quality. **Meat Science**, v.80, p.28-36, 2008.

WOLF, S.P.; GARNER, A.; DEAN, R.T. Free radicals, lipids and protein degradation. **Trends Biochemistry Science**, v.11, p.27-31, 1986.

WOOD, J.D. et al. Effects of fatty acids on meat quality; a review. **Meat Science**, v.66, p.21-32, 2003.

XIA, X. et al. Physicochemical change and protein oxidation in porcine longissimus dorsi as influenced by different freeze–thaw cycles. **Meat Science**, v.83, p.239-245, 2009.

XIONG, Y.L. Myofibrillar from different muscle fiber types: Implications of biochemical and functiona properties in meat processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 34, p. 293-320, 1994.

XIONG, Y.L. Protein oxidation and implications for muscle food quality. In Decker, E.; Faustman C.; LOPEZ-BOTE, C. J. (Editores.). **Antioxidants in muscle foods** (p. 85-111). Chichester: Wiley, 2000.

XIONG, Y.L.; DECKER, E.A. Alterations of muscle protein functionality by oxidative and antioxidative processes. **Journal of Muscle Foods**, v.6, p.139-160, 2005.

XIONG, Y.L.; PARK, D.; OOIZUMI, T. Variation in the cross-linking pattern of porcine myofibrillar protein exposed to three oxidative environments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p.153-159, 2009.

YANG, A. et al. Lipid stability and meat colour of beef from pasture- and grain-fed cattle with or without vitamin E supplement. *Meat Science*, v.60, p.41–50, 2002.

ZAKRYS-WALIWANDER, P.I. et al. The effects of high oxygen modified atmosphere packaging on protein oxidation of bovine *M. longissimus dorsi* muscle during chilled storage. *Food Chemistry*, v.131, p.527–532, 2012.