

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VICTÓRIA RIZZATO PASCHOAL

Perfil físico-químico e proteômico da carne de bovinos Nelore submetidos e não submetidos à estimulação elétrica durante o processo de abate

Pirassununga

2024

VICTÓRIA RIZZATO PASCHOAL

Perfil físico-químico e proteômico da carne de bovinos Nelore submetidos e não submetidos à estimulação elétrica durante o processo de abate

--- Versão corrigida ---

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Nutrição e Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro

Pirassununga

2024

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação

Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo
Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

paschoal, victoria rizzato
perfil físico-químico e proteômico da carne de bovinos valores
submetidos e não submetidos à estimulação elétrica durante o
processo de abate / victoria rizzato paschoal ; orientador júlio
césar de carvalho nalleiro .-- pirassununga, 2023.
79 f. : il.

dissertação (mestrado - programa de pós-graduação em nutrição e
produção animal - departamento de nutrição e produção animal) -
faculdade de medicina veterinária e zootecnia, universidade de são
paulo, .

1. bovino de corte. 2. ciência da carne. 3. estimulação
elétrica. 4. eletroforese bidimensional. 5. proteínas. I. título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

São Paulo, 27th November 2023

CERTIFIED

We certify that the proposal entitled: *"PHYSICOCHEMICAL AND PROTEOMIC PROFILE OF NELLORE CATTLE BEEF SUBJECTED AND NOT SUBJECTED TO ELECTRICAL STIMULATION DURING THE SLAUGHTER PROCESS"*, protocol number CEUAX 5453260923 (ID 002739), under the responsibility Júlio Cesar De Carvalho Balieiro, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day November 01, 2023.

Certificamos que a proposta intitulada: *"PERFIL FÍSICO-QUÍMICO E PROTEÔMICO DA CARNE DE BOVINOS NELORE SUBMETIDOS E NÃO SUBMETIDOS À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DURANTE O PROCESSO DE ABATE"*, protocolado sob o CEUAX nº 5453260923, sob a responsabilidade de Júlio Cesar De Carvalho Balieiro, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 01 de novembro de 2023.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Eduardo e Fernanda, por serem meu verdadeiro alicerce.
Obrigada por tudo! Vocês são absolutamente tudo para mim!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me sustentado até aqui e conduzido durante todo este período.

Aos meus pais, Eduardo e Fernanda, por estarem ao meu lado e serem donos dos melhores conselhos. Os abraços de vocês curam.

Ao meu namorado, Gabriel, pela paciência e companheirismo. Espero que você saiba o quanto é importante para mim.

À minha família, pelos momentos de descontração, vocês são meu refúgio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Júlio Balieiro, por ter me concedido a oportunidade de realizar este projeto de mestrado. Meu muito obrigada pelos ensinamentos, parceria e confiança desde os nossos tempos de UF.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos Auxílios à Pesquisa (Processos: N. 2017/26.667-2 e N. 2018/26.378-3).

Ao prof. Dr. Saulo da Luz e Silva, pela parceria na coleta de nossas amostras e compartilhamento das análises físico-químicas.

Ao Dr. Daniel Antonelo, por ter dado o *start* no meu treinamento na proteômica e compartilhado seus conhecimentos acerca do assunto comigo.

À Dra. Mirele Poleti, que nunca me negou ajuda e orientação durante todas as análises. Obrigada por ter compartilhado seus conhecimentos e tempo comigo, Mi. Me salvou incontáveis vezes.

À prof. Dra. Carmen Castillo, por ter aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse aprender novas técnicas. Meu muito obrigada a todos os integrantes do Laboratório de Ciência da Carne – ESALQ/USP.

Aos meus amigos Léo, Dani, Lets e Madu, vocês fizeram da minha vida em Pirassununga muito melhor. Obrigada por todas as risadas, cafezinhos e por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas, que a ESALQ me deu, Ili e Cecy, nos unimos em momentos difíceis e nos fortalecemos juntas, obrigada por todo carinho, sempre estarei aqui torcendo pelo sucesso de vocês.

A todas as pessoas que em algum momento me acompanharam durante essa trajetória.

A todos vocês os meus mais sinceros agradecimentos!

EPIGRAFE

The Road not taken

(by Robert Frost)

*Two roads diverged in a yellow wood,
And sorry I could not travel both
And be one traveler, long I stood
And looked down one as far as I could
To where it bent in the undergrowth;*

*Then took the other, as just as fair,
And having perhaps the better claim,
Because it was grassy and wanted wear;
Though as for that the passing there
Had worn them really about the same,*

*And both that morning equally lay
In leaves no step had trodden black.
Oh, I kept the first for another day!
Yet knowing how way leads on to way,
I doubted if I should ever come back.*

*I shall be telling this with a sigh
Somewhere ages and ages hence:
Two roads diverged in a wood, and I—
I took the one less traveled by,
And that has made all the difference.*

“E sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus. ”

Romanos 8:28

RESUMO

PASCHOAL, V. R. **Perfil físico-químico e proteômico da carne de bovinos Nelore submetidos e não submetidos à estimulação elétrica durante o processo de abate.** 2024. 79f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2024.

A estimulação elétrica (EE) é uma ferramenta amplamente utilizada na busca por aprimorar características qualitativas da carne, como cor e maciez, no início do *post mortem*. Entretanto, existem divergências de opiniões a respeito dos verdadeiros efeitos da técnica sobre o produto final. Com isso, o objetivo geral deste estudo foi avaliar algumas características relacionadas à qualidade da carne e as diferenças no perfil proteico de carcaças bovinas submetidas e não submetidas à estimulação elétrica em bovinos da raça Nelore. Para isso, foram avaliadas, carcaças de 24 bovinos da raça Nelore “*bos indicus*”, machos não castrados, com até 30 meses de idade. No processo de abate as carcaças foram serradas ao meio (sentido longitudinal), as meias-carcaças categorizaram dois tratamentos, sendo estes: (i) 24 meias-carcaças (lado direito) foram estimuladas por corrente elétrica, denominadas Grupo EE e; (ii) 24 meias-carcaças (lado esquerdo) não foram eletroestimuladas, compondo a porção controle do experimento, sendo denominadas Grupo NE. Todas as 48 meias-carcaças tiveram pH e temperatura aferidos imediatamente após o abate (T0) e no decorrer do resfriamento, horas três (T3), seis (T6), 12 (T12) e 24 (T24) *post-mortem*. Além disso, amostras biológicas foram coletadas do músculo *Longissimus thoracis* (LT), para análises de perfil proteico por meio da proteômica, aos 30 minutos e 24 horas *post mortem*. Às 24 horas *post mortem* foram retiradas amostras do músculo LT, das quais foram realizadas análises de maciez, cor e perdas por cocção durante o período de maturação, portanto, 24 horas, sete e 14 dias *post-mortem*. De maneira geral, as carnes provindas do grupo EE apresentaram resultados favoráveis quando comparas às do grupo NE. O declínio do pH aconteceu em curva mais acentuada em carnes EE, atingindo janela ideal às seis horas *post mortem*, enquanto carnes NE após 12 horas *post mortem*. Para a característica de cor, o tratamento apresentou mudanças significativas, como valores maiores de L* e de croma ($p < 0,05$), e para maciez, os valores de força de cisalhamento de carnes EE foram significativamente menores ($p < 0,01$), portanto a técnica promoveu carnes mais macias. Após análise proteômica, foram encontrados 194 *spots*, dos quais foram identificadas 14 proteínas diferencialmente abundantes, sendo 10 mais abundantes no grupo EE e 4 no grupo NE,

aos 30 minutos *post mortem*. As proteínas encontradas pertencem a diversas vias metabólicas, as mais abundantes neste período foram proteínas estruturais (como a MYLPP e TNNT3) relacionadas ao mecanismo de contração muscular, além de enzimas relacionadas ao metabolismo energético (CKM, ALDOA e GAPDH) e uma *heat shock protein* (HSPB1). Às 24 horas *post mortem*, foram encontrados 248 *spots*, dos quais foram identificadas dez proteínas diferencialmente abundantes, sendo três mais abundantes no grupo EE e sete no grupo NE. As proteínas encontradas pertencem a diversas vias metabólicas, enzimas metabólicas como LDH, GAPDH, GPI e α -GP, as quais são sobretudo relacionadas a morte celular.

Palavras-chave: Bovino de corte. Ciência da carne. Estimulação elétrica. Eletroforese bidimensional. Proteínas.

ABSTRACT

PASCHOAL, V. R. **Physicochemical and proteomic profile of Nelore cattle beef subjected and not subjected to electrical stimulation during slaughter process.** 2024. 79f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2024.

Electrical stimulation (EE) is a tool widely used in the search to improve qualitative characteristics of meat, such as color and tenderness, at the beginning of post-mortem. However, there are divergences of opinions regarding the true effects of the technique on the final product. Therefore, the aim of this study was to evaluate some characteristics related to meat quality and differences in the protein profile of bovine carcasses subjected and not subjected to electrical stimulation in Nelore cattle. For this, carcasses of 24 Nelore “bos indicus” cattle, uncastrated males, up to 30 months old were evaluated. In the slaughter process, the carcasses were sawn in half (longitudinal direction), the half-carcasses were categorized into two treatments, these being: (i) 24 half-carcasses (right side) were stimulated by electric current, called Group EE and; (ii) 24 half-carcasses (left side) were not electrically stimulated, making up the control portion of the experiment, being called Group NE. All 48 half-carcasses had pH and temperature measured immediately after slaughter (T0) and during cooling, hours three (T3), six (T6), 12 (T12) and 24 (T24) post-mortem. In addition, biological samples were collected from the Longissimus thoracis (LT) muscle, for protein profile analysis through proteomics, at 30 minutes and 24 hours post-mortem. At 24 hours post-mortem, samples were taken from the LT muscle, from which analyzes of tenderness, color and cooking losses were carried out during the maturation period, therefore, zero, seven and 14 days post-mortem. In general, meat from the EE group showed favorable results when compared to the NE group. The decline in pH occurred in a steeper curve in EE meat, reaching the ideal window at six hours post-mortem, while NE meat after 12 hours post-mortem. For the color characteristic, the treatment showed significant changes, such as higher L* and chroma values ($p < 0.05$), and for tenderness, the shear force values of EE meat were significantly lower ($p < 0.01$), therefore the technique promoted more tender meat. After proteomic analysis, 194 spots were found, of which 14 differentially abundant proteins were identified, 10 being more abundant in the EE group and 4 in the NE group, at 30 minutes post-mortem. The proteins found belong to several metabolic pathways; the most abundant ones during this period were structural proteins (such as MYLPF and TNNT3)

related to the mechanism of muscle contraction, as well as enzymes related to energy metabolism (CKM, ALDOA, and GAPDH), and a heat shock protein (HSPB1). At 24 hours post-mortem, 248 spots were found, of which ten differentially abundant proteins were identified, three being more abundant in the EE group and seven in the NE group. The proteins found belong to various metabolic pathways, metabolic enzymes such as LDH, GAPDH, GPI, and α -G, which are primarily related to cell death.

Keywords: Beef cattle. Meat Science. Electrical Stimulation. Two-dimensional gel electrophoresis. Proteins.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Regressões splines dos valores de pH em função do tempo de monitoramento das meias-carcaças submetidas a estimulação elétrica (EE, destacado em vermelho) e as pertencentes ao grupo não estimulado (NE considerado controle (CON), destacado em azul). 39
- Figura 2.** Imagem de cilindros de carne coletados do músculo *Longissimus thoracis* às 6 horas post-mortem. Amostra “A” foi coletada de carcaça pertencente ao grupo controle (NE) e “B” a carcaça submetida à estimulação elétrica (grupo EE). 45
- Figura 3.** Géis referência de eletroforese bi-dimensional (2-DE): 12,5% (m/v) e gradiente de pH 3-10. Em destaque estão spots de proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* com 30 minutos horas post mortem. 52
- Figura 4.** Rede de interação proteína-proteína atuantes nos *pathways Cori Cycle* e *Gluconeogenesis III* encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica aos 30 minutos *post mortem*. 59
- Figura 5.** Rede de interação proteína-proteína no *pathway VEGFA-VGFR2 Signaling* encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica aos 30 minutos *post mortem*. 59
- Figura 6.** Rede de interação proteína-proteína nos *pathways MAP Kinase Signaling* e *Death Receptor Signaling* encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica aos 30 minutos *post mortem*. 60
- Figura 7.** Géis referência de eletroforese bi-dimensional (2-DE) com destaque das proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* com 24 horas *post mortem*. 61
- Figura 8.** Rede de interação proteína-proteína no *pathway Glycosaminoglycan Metabolism* encontrada no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidas (EE) e não submetidas (NE) à estimulação elétrica às 24 horas *post mortem*. 67
- Figura 9.** Rede de interação proteína-proteína no *pathway HIF1A and PPARG Regulation of Glycolysis* encontrada no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidas (EE) e não submetidas (NE) à estimulação elétrica às 24 horas *post mortem*. 68
- Figura 10.** Rede de interação proteína-proteína no *pathway L-citrulline Metabolism* encontrada no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidas (EE) e não submetidas (NE) à estimulação elétrica às 24 horas *post mortem*. 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. As estimativas de médias, erros-padrão e valores de P observados para os valores de pH ao longo dos tempos de monitoramento, dentro de cada tratamento avaliado (EE versus NE).	41
Tabela 2. Estimativas de médias, erros-padrão e valores de P observados para os valores de cor L*, a*, b*, croma e ângulo Hue em carcaças estimuladas eletricamente (EE) e não estimuladas eletricamente (NE) - Continua.....	43
Tabela 3. Estimativas de médias, erros-padrão e valores de P observados para as percentagens de perdas de água por cocção e os valores maciez objetiva em carcaças estimuladas eletricamente (EE) e não estimuladas eletricamente (NE)	48
Tabela 4. Média (MED), erro padrão (EP), p-valor e fold change (EE/NE) +-dos spots referentes às 14 proteínas diferencialmente abundantes à nível de significância (P<0,05).	51
Tabela 5. Genes correspondentes, acessos <i>Uniprot</i> , massa molecular (kDa), peptídeos correspondentes, peptídeos únicos e porcentagem de cobertura dos peptídeos, das proteínas diferencialmente abundantes (P<0,05) encontradas no músculo bovino <i>Longissimus thoracis</i> em carcaças submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica aos 30 minutos <i>post mortem</i>	53
Tabela 6. Anotação das proteínas diferencialmente abundantes (P<0,05) e únicas encontradas no músculo bovino <i>Longissimus thoracis</i> em amostras submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica aos 30 minutos <i>post mortem</i>	54
Tabela 7. Identificação dos 13 genes responsáveis pela codificação das proteínas diferencialmente abundantes encontradas no músculo bovino <i>Longissimus thoracis</i> em carcaças submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica aos 30 minutos <i>post mortem</i>	55
Tabela 8. Escores de significância (expresso em -log2 do valor-P), principais categorias e identificação associada de acordo com a Ontologia Gênica (GO), número de genes diferencialmente expressos (total de genes) associados aos DAP com efeito significativo de amostras coletadas aos 30 minutos <i>post mortem</i>	56
Tabela 9. Escores de significância (expresso em -log2 do valor-P) nome e número de genes diferencialmente expressos (total de genes) associados aos cinco principais pathways identificados para o efeito de tratamento.....	57

Tabela 10. Média (MED), erro padrão (EP), P-valor e fold change (EE/NE) dos spots referentes às dez proteínas diferencialmente abundantes à nível de significância ($p < 0,05$).	61
Tabela 11. Genes correspondentes, acessos <i>Uniprot</i> , massa molecular (kDa), peptídeos correspondentes, peptídeos únicos e porcentagem de cobertura dos peptídeos, das proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) encontradas no músculo bovino <i>Longissimus thoracis</i> com 24 horas <i>post mortem</i>	63
Tabela 12. Anotação das proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) e únicas encontradas no músculo bovino <i>Longissimus thoracis</i> em amostras submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica com 24 horas <i>post mortem</i>	64
Tabela 13. Identificação dos oito genes responsáveis pela codificação das proteínas diferencialmente abundantes encontradas no músculo <i>Longissimus thoracis</i> com 24 horas <i>post mortem</i>	64
Tabela 14. Escores de significância (expresso em $-\log_2$ do valor-P), principais categorias e identificação associada de acordo com a Ontologia Gênica (GO), número de genes diferencialmente expressos (total de genes) associados aos DEG com efeito principal significativo de amostras coletadas às 24 horas <i>post mortem</i>	65
Tabela 15. Escores de significância (expresso em $-\log_2$ do valor-P), nome e número de genes diferencialmente expressos (total de genes) associados aos cinco principais pathways identificados para o efeito de tratamento.	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. A CADEIA DE CARNE BOVINA NO BRASIL.....	20
2.2. CARACTERÍSTICAS OBJETIVAS FÍSICO-QUÍMICAS SENSORIAIS DA CARNE.....	21
2.2.1. Cor da carne.....	22
2.2.2. Maciez.....	23
2.2.3. pH.....	24
2.3. EFEITOS DA ELETROESTIMULAÇÃO NA QUALIDADE DA CARNE.....	26
2.4. PROTEÔMICA APLICADA À CIÊNCIA DA CARNE	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVO GERAL.....	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. ANIMAIS, TRATAMENTOS E LOCAL DE COLETAS	31
4.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS OBJETIVAS RELACIONADAS À ATRIBUTOS SENSORIAIS.....	32
4.2.1. pH e Temperatura	32
4.2.2. Avaliação instrumental de cor.....	32
4.2.3. Maciez objetiva (Força de Cisalhamento) e Perdas de Água por Cocção (PAC)	33
4.3. ANÁLISES PROTEÔMICAS.....	33
4.3.1. Extração de proteínas das amostras de carne.....	33
4.3.2. Quantificação de proteínas	34
4.3.3. Eletroforese Bidimensional (2DE).....	34
4.3.4. Análise de Imagens	35
4.3.5. Digestão dos spots “in gel” e Espectrometria de massas.....	36
4.3.6. Bioinformática	37
4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

5.1. PERFIL FÍSICO-QUÍMICO DE CARNES PROVINDAS DE CARÇAÇAS SUBMETIDAS E NÃO SUBMETIDAS A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NO PROCESSO DE ABATE	39
5.1.1. Declínio do pH.....	39
5.1.2. Cor	42
5.1.3. Maciez e Perdas por Cocção	47
5.2. PERFIL PROTEÔMICO DE CARÇAÇAS ELETROESTIMULADAS (EE) E NÃO ELETROESTIMULADAS (NE)	51
5.2.1. Perfil proteômico com 30 minutos post mortem.....	51
5.2.2. Perfil proteômico com 24 horas post mortem	60
6. CONCLUSÃO.....	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

1. INTRODUÇÃO

O Brasil atualmente ocupa lugar de destaque dentro da cadeia de produção de proteínas de origem animal. Particularmente em relação à bovinos de corte, é o segundo maior produtor, maior exportador e terceiro maior consumidor de carne bovina do mundo (ABIEC, 2023). Com o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, estimado em 215 milhões de cabeças, sabe-se que o rebanho nacional é composto majoritariamente por indivíduos da subespécie *Bos taurus indicus*, sendo a raça Nelore, a de maior representação no abate nacional. Apesar da posição de destaque ocupada pelo Brasil na cadeia da carne, a falta de padronização do produto oferecido é tida como um dos principais problemas na carne aqui produzida. As dificuldades na implementação de um sistema de tipificação de carcaças nacional, bem como, a introdução de novas tecnologias nos diferentes segmentos da bovinocultura de corte, resulta em produtos com padronização questionável e, muitas vezes, com variações excessivas em indicadores relacionados à qualidade.

Dentre as tecnologias disponíveis para a melhoria de características relacionadas à qualidade de carne, a estimulação elétrica (EE) vem recebendo especial atenção por parte da indústria frigorífica. A utilização da corrente elétrica na carcaça induz a ocorrência de contrações musculares, acelerando os processos bioquímicos e físicos do *post mortem* e, com isso, antecipando o estabelecimento do *rigor mortis* (CHRYSTALL *et al.*, 1980; PAREDI *et al.*, 2012). Apesar de ser uma atraente estratégia, os impactos da utilização desta tecnologia permanecem ainda merecendo atenção especial por parte dos Pesquisadores. Há estudos avaliando características indicadoras da qualidade da carne em carcaças estimuladas e não estimuladas eletricamente no Brasil, porém não ao nível molecular. Neste contexto, a caracterização das alterações ocorridas no perfil proteico atribuídas a estimulação elétrica permanecem desconhecidas, bem como, as possíveis relações do perfil proteico com as variáveis indicadoras da qualidade da carne. Estes aspectos assumem importância significativa para a caracterização das implicações do uso da estimulação elétrica na cadeia da carne em bovinos de corte.

Diante do exposto, este projeto se propôs a caracterizar variáveis objetivas indicadoras de qualidade da carne, particularmente pH, cor (L^* , a^* , b^* , h^* , C^*), força de cisalhamento e perdas de água por cocção em carcaças bovinas submetidas e não submetidas a EE. Além disso, objetivou-se caracterizar o perfil proteico e explorar as diferenças entre tratamentos (NE x EE) ao identificar proteínas diferencialmente

abundantes (DAP, *differentially abundant proteins*), imediatamente após o abate (30 minutos) e 24 horas *post mortem*. Para isso, foram realizados estudos de associação entre as DAP com características objetivas indicadoras de qualidade de carne, visando identificar quais proteínas melhor predisseram tais características nas primeiras 24 horas *post mortem*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A CADEIA DE CARNE BOVINA NO BRASIL

O Brasil ocupa posições de destaque frente à cadeia de carne mundial, sendo o segundo maior produtor, maior exportador e terceiro maior consumidor de carne bovina do mundo (ABIEC, 2023b). Apesar dos obstáculos gerados pela pandemia causada pelo vírus Covid-19 no ano de 2020, a cadeia se fortaleceu e permaneceu em crescente desenvolvimento, atingindo recorde no volume de carne bovina exportada em 2022, com 2,26 milhões de toneladas vendidas superando em 22,6% as exportações de 2021, o que por fim, garantiu ao Brasil crescimento de 40,8% em seu faturamento (ABIEC, 2023a).

O principal destino da carne brasileira permanece sendo o mercado asiático, sobretudo o chinês, que respondeu por 54,7% do volume de carne exportada pelo Brasil em 2022 (ABIEC, 2023a). Com o quinto maior território do planeta, o Brasil possui cerca de 162,53 milhões de hectares voltados para a pecuária (ABIEC, 2020). Dono do maior rebanho comercial de bovinos do mundo, estimado em 202 milhões de cabeças, composto majoritariamente (80%) por indivíduos da subespécie *Bos taurus indicus*, o Nelore tem maior representação, somando-se produtos de cruzamentos com raças da subespécie *Bos taurus taurus* (CARVALHO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2017; ABIEC, 2023c). Os demais 20%, englobam raças puramente taurinas, que melhor se adaptaram à região sul do país, como Aberdeen Angus, Red Angus, Hereford, Simental, dentre outras.

O cruzamento de raças zebuínas e taurinas é uma estratégia utilizada por pecuaristas com intuito de melhorar os índices de produtividade zootécnicos de seus rebanhos, explorando a heterose a qual tem importantes impactos na qualidade do produto final (LAGE *et al.*, 2012). A heterose gerada pelo cruzamento de raças diferentes traz consigo características desejáveis de ambas as subespécies, caracterizando o fenômeno de complementaridade e originando animais com desempenho produtivo superior, mais resistentes, relativamente mais precoces e com característica de qualidade de carne superior quando comparados a seus progenitores.

Apesar da posição de destaque ocupada pelo Brasil na cadeia da carne, a falta de padronização do produto oferecido é tida como um dos principais problemas na cadeia da carne. A dificuldade na implementação de um sistema de tipificação de carcaças nacional, bem como a introdução de novas tecnologias nos diferentes segmentos da bovinocultura de corte, resulta ainda em produtos com padronização questionável e, muitas vezes, com

variações excessivas em indicadores de qualidade da carne. Este fato coloca o País em risco frente à competitividade existente no comércio mundial de carne bovina.

A busca por avanços tecnológicos nos diversos setores que segmentam a cadeia da carne tem o intuito de atender a demanda crescente dos mercados externo e interno, oferecendo um alimento padronizado, seguro e de qualidade, de forma que assegure a competitividade da carne brasileira, gerando maior lucratividade da atividade para o País.

2.2. CARACTERÍSTICAS OBJETIVAS FÍSICO-QUÍMICAS SENSORIAIS DA CARNE

Em função de seu alto teor proteico, a carne é referência de um alimento completo e de qualidade, sendo a principal fonte de aminoácidos essenciais (leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, histidina) para o corpo humano (GÓRSKA-WARSEWICZ *et al.*, 2018). Com destaque para a carne vermelha, a maior provedora de proteínas de alto valor biológico e nutrientes essenciais, alguns destes com maior biodisponibilidade do que em qualquer outro alimento (WYNESS, 2016; GÓRSKA-WARSEWICZ *et al.*, 2018). Logo, um alimento tão importante deve ser entendido profundamente, conhecer as variáveis que determinam a qualidade da carne é uma estratégia importante para a cadeia como um todo, pois um produto final de alta qualidade será mais valorizado por seus consumidores (LYFORD *et al.*, 2010).

A determinação da qualidade da carne é bastante complexa, consumidores a definem através de suas concepções sobre o que é desejável diante de uma gama de parâmetros: visuais, sensoriais, de segurança, saúde e sustentabilidade (BECKER 2000; WARNER *et al.*, 2010). Atributos de apelo visual englobam desde cor e textura da carne, distribuição e cor da gordura, até quantidade de exsudado presente na embalagem (GLITSCH, 2000; WARNER *et al.*, 2010). Por sua vez, atributos de apelo sensorial se baseiam na palatabilidade do alimento, definida através de um conjunto de características, como maciez, suculência, sabor e odor (GLITSCH, 2000; WARNER *et al.*, 2010).

A variação dos atributos que definem a qualidade da carne é dependente tanto de fatores intrínsecos aos animais, como genética, sexo e idade, como de fatores extrínsecos, como manejo e nutrição, até os relacionados ao processamento no pós-abate (WARNER *et al.*, 2010; LISTRAT *et al.*, 2016; TOMASEVIC *et al.*, 2021). Particularmente associados aos fatores pós-abate, o monitoramento das medidas de pH e temperatura durante o resfriamento das carcaças é de suma importância, uma janela adequada de

declínio pH/temperatura durante o resfriamento garantem a definição adequada de parâmetros visuais e sensoriais do produto final (THOMPSON, 2002; ZHANG *et al.*, 2018). Além disso, a utilização de ferramentas tecnológicas durante o processamento está diretamente associada a redução de perdas e melhoria das características organolépticas (LISTRAT *et al.*, 2016).

2.2.1. Cor da carne

Considerada um atributo de apelo visual, diretamente associada ao frescor da carne apresentada, a cor é a primeira característica a ser experimentada pelo consumidor (MANCINI & HUNT, 2005). Dessa forma, se torna responsável pela valorização ou depreciação do produto ofertado, uma vez que dita, de forma direta, a sua compra ou não (MANCINI & HUNT, 2005; SUMAN & JOSEPH, 2013, TOMASEVIC, I., 2021).

A definição de cor na carne é associada com atividade de proteínas musculares, tipo de fibra muscular (KLONT, BROCKS & EIKELENBOOM, 1998; GAGAOUA *et al.*, 2020), proteínas sarcoplasmáticas e glicolíticas (NAIR *et al.*, 2018; GAGAOUA *et al.*, 2020), oxidação e estrutura miofibrilar (GAGAOUA, TERLOUW & PICARD, 2017; GAGAOUA *et al.*, 2020). Sendo, principalmente, determinada pela concentração de dois pigmentos, os quais são compostos puramente por proteínas. Em maiores proporções, a mioglobina e, em menores, cerca de 10%, a hemoglobina (MANCINI & HUNT, 2005; SUMAN & JOSEPH, 2013).

A mioglobina é uma proteína sarcoplasmática responsável pelo transporte e armazenamento de oxigênio nos músculos esqueléticos e cardíaco, fator que possibilita e sustenta a realização das funções fisiológicas de cada tecido no animal vivo (RAMANATHAN, SUMAN & FAUSTMAN, 2020). Na carne, propriamente dita, esse pigmento é o principal responsável pela definição da cor vermelha (SUMAN & JOSEPH, 2013). Sua estrutura química permite que ela assuma formas estruturais diferentes, destas, quatro são as principais responsáveis pelas mudanças de cor da carne (MANCINI & HUNT, 2005).

A hemoglobina, por sua vez, é um pigmento sanguíneo responsável pelo transporte de oxigênio através da corrente sanguínea. Apesar de a sangria remover quase totalmente o sangue do animal abatido, uma pequena parte fica retida dentro de artérias e veias dos grandes músculos (SUMAN & JOSEPH, 2013). Dessa forma, pigmentos como a hemoglobina e o citocromo C atuam na definição da cor da carne de bovinos, mesmo

que em menores proporções, porém são mais notáveis em carnes de outras espécies animais como aves, peixes e animais de caça (SUMAN & JOSEPH, 2013).

O ciclo da carne ainda fresca é dinâmico e reversível, onde a mioglobina estará presente em uma de suas quatro formas químicas: oximioglobina, desoximioglobina, carboximioglobina ou metamioglobina (MANCINI & HUNT, 2005; SUMAN & JOSEPH, 2013). Cada uma dessas variações é reflexo do estado de oxigenação ou oxidação da mioglobina na superfície do músculo evidenciado, ou seja, veriam de acordo com as concentrações de oxigênio (SUMAN & JOSEPH, 2013), portanto, fator altamente influenciado pela atmosfera a qual a carne está submetida, bem como suas condições de embalagem (TOMASEVIC, I., 2021).

Em bovinos recém-abatidos observa-se a coloração da carne vermelho púrpura, por conta da mioglobina. Ao entrar em contato com o ar, a mioglobina reage com o oxigênio e, o resultado desse processo de oxigenação, potencializa o surgimento da oximioglobina, pigmento responsável pela coloração vermelho brilhante ansiada pelos consumidores. Porém, uma baixa concentrações de oxigênio, baixo pH ou aumento de temperatura, podem reverter o processo, ocasionando a desoxigenação. Essa desoxigenação da oximioglobina resulta em um pigmento instável, denominado metamioglobina, que por sua vez promove uma coloração marrom, indesejável por parte dos consumidores (RAMANATHAN, SUMAN & FAUSTMAN, 2020).

Diversos fatores endógenos contribuem para a definição e mudanças na coloração da carne, dentre estes destacam-se o declínio do pH, grupo muscular, oxidação lipídica e atividade mitocondrial (MANCINI & HUNT, 2005; SUMAN & JOSEPH, 2013; RAMANATHAN, SUMAN & FAUSTMAN, 2020). Entretanto, a variação na pigmentação da mioglobina é inerente ao músculo, sendo influenciada, também, por fatores exógenos, tais como a espécie animal, idade, sistema de criação do animal, nutrição, higiene e manejo (TOMASEVIC, I., 2021).

2.2.2. Maciez

Diretamente relacionada à satisfação dos consumidores, a maciez é um dos mais importantes atributos para definir a qualidade da carne. Essa característica organoléptica é determinante para a palatabilidade, assumindo posição de destaque ao ser apontada como fator definitivo de segunda compra (LISTRAT *et al.*, 2016). Maiores oportunidades para alcance de mercado específicos e fidelizados têm sido alcançados, como

consequência de *marketing* estratégico, que engloba a cadeia de carne bovina como um todo (MULLINS *et al.*, 2016). Estes esforços têm buscado garantir melhorias na maciez e outros atributos qualitativos, a partir do conceito “*from farm to fork*”.

Diversos fatores influenciam a maciez. Didaticamente pode-se dividi-los em: (a) fatores relacionados ao *ante mortem*, os quais compreendem características como genética, idade, sexo, condição (castrado ou inteiro), nutrição, manejo, entre outros (DELGADO & SORIA., 2006); (b) fatores relacionados ao *post mortem*, como resfriamento da carcaça, tempo de maturação, técnicas como a estimulação elétrica, dentre outros (NASSU *et al.*, 2013).

Os processos bioquímicos envolvidos no pós-abate, correspondem a conversão do músculo em carne, a qual se trata de um conjunto de eventos físicos e químicos, que podem ser separados em três etapas. A primeira etapa é o *pre-rigor mortis*, onde o aporte de oxigênio cessa, mas o músculo permanece excitável, em decorrência da produção de energia proveniente das reservas de glicogênio; a segunda etapa é o *rigor mortis*, onde componentes altamente energéticos, como o ATP e a fosfocreatina são exauridos, com isso actina e miosina se ligam irreversivelmente, ocasionando a rigidez máxima do músculo; por fim, a terceira etapa corresponde ao *post mortem*, onde enzimas proteolíticas iniciam suas atividades, quebrando proteínas estruturais (MATARNEH, SCHEFFLER & GERRARD, 2023). Com isso, há muito tempo se determinou a importância da degradação das proteínas miofibrilares (DAVEY & GILBERT, 1969), de forma que, a essência do processo de amaciamento da carne é o desenvolvimento da proteólise das mesmas, através de complexos enzimáticos, que atuam durante *post mortem* e, subsequente, maturação (WARNER *et al.*; 2022).

Pelo exposto, observa-se que estudos avaliando a abundância do perfil proteico no período do *post mortem*, bem como, durante o processo de maturação são prioritários para auxiliar na compreensão dos complexos mecanismos envolvidos na transformação do músculo em carne, sob o ponto de vista bioquímico e molecular.

2.2.3. pH

Em virtude da ausência de oxigênio após a morte do animal, as reservas de glicogênio são esgotadas na tentativa de gerar energia para a sobrevivência das células. Com isso, a glicólise *post mortem* vai produzindo mais ácido lático ocasionando a queda do pH, o qual, em condições ideais, compreenderá janela de valores entre 6,9 e 7,2, no

momento do abate, a 5,8 e 5,5 estabilizando-se 24 horas post mortem (HOPKINS *et al.*, 2014).

A queda inadequada do pH pode provocar mudanças significativas no perfil de qualidade da carne, desencadeando perdas econômicas consideráveis (ADZITEY & NURUL, 2011). A título de exemplo, quando o animal passa por níveis de estresse crônico (prolongado), a queda do pH é incompleta, dado as reservas escassas de glicogênio, portanto o valor do pH final se estabelece superior a 5,8, conferindo ao músculo aspecto mais fibroso e mais escuro, por conta da maior ação enzimática com gasto de oxigênio e da menor refração da luz. Neste cenário, tem-se como resultado carnes classificadas como DFD (do inglês: *dark, firm and dry*), indesejada por vendedores devido a vida útil mais curta (PONNAMPALAM *et al.*, 2017) e depreciada por consumidor em consequência de sua aparência incomum. Assim, a carne DFD é uma das principais preocupações acerca da qualidade da carne bovina (ADZITEY & NURUL, 2011).

A influência da temperatura associada a curva de declínio do pH tem efeito direto sobre o processo de amaciamento, na ocorrência de valores baixos de pH em alta temperatura acontece a desnaturação de proteínas contráteis, as quais estão mais estáveis no momento do *rigor mortis* (OFFER, 1991; HOPKINS *et al.*, 2014). Uma maior autólise de calpaínas associadas às condições descritas, podem explicar a baixa efetividade das enzimas no processo de tenderização, resultando em valores de força de cisalhamento maiores (HOPKINS *et al.*, 2014).

Com o intuito de examinar as consequências de um declínio rápido do pH sob condições de temperatura muscular elevada, Hopkins e colaboradores (2014) utilizaram a eletroestimulação de carcaças para simular diferentes curvas de pH, contrastando o grupo controle com o que recebeu tratamento feito a média voltagem, sobre características de qualidade da carne. O experimento demonstrou que a curva de pH é mais acentuada em carnes eletroestimuladas, o que resulta na antecipação do *rigor mortis* a temperaturas mais altas (média de 7°C de diferença entre tratamentos, no pH 6), entretanto não houve diferença sobre o estabelecimento do pH final. Além disso, o rápido declínio do pH demonstrou efeitos positivos sobre cor da carne, que evidenciou valores mais desejáveis de a^* , quanto a análise de perdas de água, só foi apontada influência do valor do pH final e, por fim, para maciez, carnes eletroestimuladas já entraram na maturação com valores mais baixos de força de cisalhamento, não apresentando grandes mudanças durante os 14 dias seguintes.

Diante do que foi exposto, fica evidente que a queda do pH é um dos eventos mais importantes para a obtenção de uma carne de qualidade, com impacto direto sobre características como maciez, cor e retenção de água.

2.3. EFEITOS DA ELETROESTIMULAÇÃO NA QUALIDADE DA CARNE

A estimulação elétrica (EE) é uma técnica que vem sendo amplamente utilizada no abate de animais, e consiste na passagem de corrente elétrica pela carcaça do animal em algum momento da linha de abate, geralmente, logo após o abate com a carcaça ainda quente (CHRYSTALL *et al.*, 1980). Essa corrente elétrica pode variar em voltagem, amperagem, frequência, período de aplicação, tipos de corrente, ciclos de pulso e formas de administração. De forma geral, é classificada como estimulação de baixa, média ou alta voltagem. A EE de baixa voltagem (com pico de até 100V), possui eficiência limitada, uma vez que a contração muscular é induzida apenas por estímulo no sistema nervoso central (SIMMONS *et al.*, 2008). Já EE de média (pico de até 300V) e alta voltagem (picos superiores a 300V), além do estímulo no sistema nervoso central, há também estimulação elétrica direta nos músculos de toda carcaça, ocasionando contrações que podem levar a ruptura das fibras musculares.

A técnica foi proposta em meados de 1749, quando Benjamin Franklin notou que ao aplicar corrente elétrica em uma carcaça de peru, pouco depois de seu abate, a carne demonstrava certo amaciamento (LAWRIE & LEDWARD, 2006; ADEYENI & SAZILI, 2014). Entretanto, estudos reportando devidamente o sucesso da técnica datam do início dos anos 50 (SAMS, 1999; ADEYENI & SAZILI, 2014), onde, mais especificamente em 1951, Harsham e Deatherage buscaram uma patente para a utilização de EE com o intuito de amaciamento de carnes (TROY, 2006), alegando que tal tecnologia tinha como seus principais efeitos o favorecimento da glicólise no *post mortem*, bem como a redução imediata do pH.

Apesar de ser uma técnica relativamente antiga, seu uso comercial se deu apenas no início dos anos 70, onde foi demonstrado que a EE diminuía efeitos negativos ocasionados durante o resfriamento, prevenindo o encurtamento das fibras e por fim, intensificando o amaciamento da carne (JUAREZ *et al.*, 2012). Desde então, pesquisas vêm sendo largamente realizadas com o intuito de desmistificar os efeitos da EE e seus impactos em atributos relacionados a qualidade da carne, como cor (TAYLOR &

MARTOCCIA, 1995; MCKENNA *et al.*, 2003; CETIN & TOPCU, 2009; NAZLI *et al.*, 2010) e maciez (GEESINK *et al.*, 2001; JI *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2022).

No entanto, a contribuição da estimulação elétrica e seus impactos em características que circundam uma carne de qualidade têm sido alvo de debates por conta dos diferentes pontos de vista de pesquisadores da área (HWANG *et al.*, 2003). Alguns cientistas reportaram efeitos positivos (MCKENNA *et al.*, 2003; CETIN & TOPCU, 2009; NAZLI *et al.*, 2010), outros não surtir efeito (KIM *et al.*, 2013), enquanto alguns apontaram, até mesmo, efeitos negativos (HECTOR *et al.*, 1992; SIMMONS *et al.*, 2008).

De acordo com Aberle *et al.* (2001), o consequente amaciamento da carne devido ao estímulo elétrico é atribuído, principalmente, a três fatores: (i) a prevenção do encurtamento pelo frio, resultado da aceleração da glicólise que por sua vez precipita *rigor mortis*, estabelecendo-o antes que a carcaça esfrie; (ii) por acelerar a proteólise, em virtude da liberação de cálcio; (iii) pelas rupturas físicas da fibra muscular, ocasionadas pelas contrações musculares. Segundo Eikelenboom (1993), dentre os resultados obtidos pelo uso de EE associados a características de qualidade da carne, além da maciez, verifica-se outras melhorias como, a coloração da carne, em virtude da oxigenação da mioglobina, potencializada pelo aumento da pressão de oxigênio muscular, e uma menor capacidade de retenção de água, em razão da desnaturação proteica.

2.4. PROTEÔMICA APLICADA À CIÊNCIA DA CARNE

Capazes de desempenhar diversas funções, desde componentes da estrutura celular até moduladores da expressão gênica, as proteínas são macromoléculas fundamentais para o funcionamento celular. Proteoma é o termo designado para o conjunto de proteínas codificadas pelo genoma em determinado momento (WILKINS *et al.*, 1996). Influenciado por diversos fatores relacionados à síntese e degradação proteica, o proteoma está em constante mudança (HOLLUNG *et al.*, 2007). Nesse sentido, a proteômica é considerada a ligação molecular entre o genoma e as características qualitativas da carne, fenotipicamente expressas sob diferentes condições ambientais (HOLLUNG *et al.*, 2007).

A conversão do músculo em carne é resultado de diversos processos bioquímicos que influenciam a qualidade do produto final (PAREDI *et al.*, 2012; MATARNETH, SCHEFFLER & GERRARD, 2022). O estudo dessas transformações que ocorrem no proteoma pode auxiliar no esclarecimento de mecanismos bioquímicos e moleculares

importantes que ocorrem durante o *post mortem* (BENDIXEN, 2005; HOLLUNG *et al.*, 2007; GAGAOUA & PICARD, 2022). Por outro lado, estudos de associação de características relacionadas à qualidade da carne com o perfil proteico permitem a detecção de importantes vias metabólicas e bioquímicas envolvidas para expressão destes fenótipos (GAGAOUA & PICARD, 2022).

Nosso grupo de pesquisa e outros pesquisadores têm buscado identificar proteínas diferencialmente abundantes, a partir de fenótipos contrastantes, para características indicadoras da qualidade da carne (PICARD *et al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2014; POLETI *et al.*, 2018; ROSA *et al.*, 2018; BOUDON *et al.*, 2020, POLETI *et al.*, 2020; GAGAOUA *et al.*, 2021). Em um estudo conduzido com a raça *Norwegian Red*, Jia *et al.* (2009) relatou que quando expressada em abundância, a proteína PRDX6 (peroxiredoxin-6) pode funcionar como um indicador de indivíduos com carnes mais macias podendo ser, um potencial biomarcador para maciez. Além disso, estudos desenvolvidos com suínos apontaram que variações na abundância de peroxirredoxinas, como a PRDX2, podem estar relacionadas com maciez, cor e capacidade de retenção de água (HWANG *et al.*, 2005; SAYD *et al.*, 2006).

Em estudo do nosso grupo de pesquisa, Carvalho *et al.* (2014), apontaram as *heat shock protein* (HSPs) HSP27 e HSP70, como potenciais biomarcadores para maciez em bovinos Nelore. HSPs são proteínas chaperonas, que podem interagir com outras proteínas, auxiliando na formação, dobramento e transporte de membrana. O aumento da síntese de HSPs no organismo é diretamente associado à intensidade do estresse sofrido, porquanto está atrelada à função de defesa. Inibidoras da apoptose celular, ao atrasar o processo de maturação da carne, as HSPs teriam influência negativa na degradação das proteínas miofibrilares (OUALI *et al.*, 2006). Portanto, a abundância de HSPs estaria associada a uma carne menos macia devido a sua correlação inversamente proporcional com maciez. Rodrigues *et al.* (2017), em experimento com bovinos das raças Nelore e Angus, demonstraram que a partir de abordagem proteômica é possível constatar diferenças na qualidade da carne entre bovinos de raças diferentes. Estes autores verificaram a ação de proteínas envolvidas em processos como contração e organização celular, e das HSPs. Nesse mesmo estudo, a proteína proibitina foi indicada como possível biomarcador para marmoreio. Jia *et al.* (2007), analisaram o perfil proteômico do músculo *Longissimus thoracis* de animais da raça *Norwegian Red* e identificaram diferenças nas concentrações de proteínas das amostras em diferentes períodos de maturação (1, 2, 3, 6, 10 e 24 horas post mortem). Estes autores observaram diferenças significativas na

abundância de proteínas conforme o passar das primeiras horas do *post mortem*, bem como, identificaram diferentes vias bioquímicas associadas à essas proteínas. A maioria das proteínas identificadas estava envolvida no processo de defesa da célula, como a DJ-1 e tiveram aumento até 10 horas post mortem. A DJ-1, por exemplo, age como uma chaperona protegendo as células contra estresse oxidativo e morte celular.

A identificação de mudanças nos perfis proteicos em diferentes períodos no decorrer da maturação exemplifica a importância de uma abordagem proteômica em pesquisas voltadas para qualidade da carne. A combinação bem-sucedida entre proteômica e ciência da carne, somada aos avanços de técnicas como a eletroforese bidimensional para separação de proteínas, espectrometria de massas e bioinformática, permite análises profundas e acuradas sobre fatores celulares ligados à qualidade da carne, e conseqüentemente podem possibilitar a identificação novos genes para inclusão nos programas de melhoramento genético de bovinos de corte. Esta estratégia permitiria a inclusão de novos marcadores a painéis comerciais possibilitando à seleção de animais com carne de qualidade superior.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- O objetivo geral desse estudo foi avaliar algumas características relacionadas à qualidade da carne e as diferenças no perfil proteico de carcaças bovinas submetidas e não submetidas à eletroestimulação (EE) em diferentes momentos do post mortem em bovino da raça Nelore.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as variáveis objetivas indicadoras de qualidade da carne, particularmente pH, L*, a*, b*, maciez objetiva determinada por texturômetro, perdas de água (cocção-PAC) em carcaças bovinas submetidas e não submetidas à eletroestimulação (EE);

- Caracterizar o perfil proteico de carcaças bovinas submetidas e não submetidas à eletroestimulação (EE) imediatamente após o abate (30 minutos) e 24 horas *post mortem*;
- Identificar proteínas diferencialmente abundantes (DAP, *differentially abundant proteins*) em carcaças bovinas submetidas e não submetidas à eletroestimulação (EE) imediatamente após o abate (30 minutos) e 24 horas *post mortem*;
- Realizar estudos de associação entre as proteínas diferencialmente abundantes (DAP) com características objetivas indicadoras da qualidade de carne (pH, L*, a*, b* e maciez objetiva), visando identificar proteínas que melhor predizem às características objetivas indicadoras de qualidade da carne nas primeiras 24 horas *post mortem*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados no presente estudo seguiram os padrões éticos de pesquisa, estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP (protocolo nº 5453260923).

4.1. ANIMAIS, TRATAMENTOS E LOCAL DE COLETAS

Foram avaliadas carcaças de 24 bovinos da raça Nelore *Bos taurus indicus*, machos não castrados, com até 30 meses de idade. Os animais foram recriados a pasto e terminados em confinamento e, por fim, abatidos em abatedouro escola localizado no Campus USP “Fernando Costa” da Universidade de São Paulo, em Pirassununga, SP. As operações de abate foram executadas de acordo com procedimentos humanitários, conforme exigido pela legislação brasileira (Brasil, 2017). Os animais foram submetidos a insensibilização mecânica (método percussivo com pistola pneumática) e imediatamente realizada a sangria por meio da secção dos grandes vasos do pescoço. Em seguida, foi realizada a esfolagem e, por fim, a evisceração. As carcaças destes animais foram serradas ao meio (sentido longitudinal), categorizando dois tratamentos, sendo estes: (i) as 24 meias carcaças direitas foram estimuladas por corrente elétrica, denominadas Grupo EE e; (ii) 24 meias carcaças esquerdas não foram estimuladas eletricamente, compondo a porção controle do experimento, sendo denominadas Grupo NE. O procedimento de estimulação elétrica ocorreu antes da lavagem e, posteriormente, as carcaças foram resfriadas em câmara fria, a 4°C, por 24 horas.

Para a eletroestimulação das carcaças, em até 30 minutos após a sangria, foi utilizado um eletroestimulador (Modelo UFX7 NR-12; Fluxo Equipamentos Eletrônicos Ltda.; Chapecó, Santa Catarina, Brasil), ajustado para aplicação de corrente elétrica com onda do tipo quadrada alternada (CA) de 15 Hertz (Hz) e voltagem de 300 volts (V). Foram posicionados dois eletrodos, um colocado na região do tendão de Aquiles e o outro no músculo Trapézio, de modo que a corrente elétrica percorresse toda a carcaça. O período de aplicação se dividiu em seis ciclos, cada um com 10 segundos de pulso elétrico seguido por 3 segundos de descanso, totalizando 78 segundos de aplicação em cada carcaça.

Todas as 48 meias carcaças tiveram pH e temperatura aferidos imediatamente após o abate (zero hora – T0) e no decorrer do resfriamento, horas: três (T3), 12 (T12) e 24 (T24) *post mortem*. Amostras biológicas do músculo *Longissimus Thoracis* (LT) foram coletadas, para posteriores análises de perfil proteico por meio da proteômica nos momentos zero hora (T0), e 24 (T24) horas *post mortem*. Com 24 horas *post mortem* foram coletadas amostras do músculo LT para realização de análises físico-químicas. Os bifos obtidos pelo porcionamento dessas peças foram embalados à vácuo em embalagens plásticas termoencolhíveis, armazenados à 2°C em câmara de refrigeração ventilada com ausência de luz, e avaliados ao longo do tempo de maturação (24 horas, sete e 14 dias *post mortem*).

4.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS OBJETIVAS RELACIONADAS À ATRIBUTOS SENSORIAIS

4.2.1. pH e Temperatura

Para determinação de pH e temperatura das carcaças foram utilizados: um medidor digital portátil de pH com sonda de penetração (marca *Hanna Instruments*, mod. HI99163; São Paulo, Brasil) e, um termômetro digital do tipo espeto (marca *Incoterm*, 6030.08.1.00; Multi-thermometer; São Paulo, Brasil). As medições aconteceram durante as coletas no abatedouro nos tempos T0, T3, T12 e T24 horas *post mortem*. Somente animais com pH final entre 5,5 e 5,8 (normais) foram contemplados no estudo, para fins de estabelecimento das equações do pH em função do tempo de resfriamento e do pH em função da temperatura da câmara fria.

4.2.2. Avaliação instrumental de cor

A avaliação instrumental de cor foi realizada de acordo com o sistema CIELab (CIE, 1986), com auxílio de espectrofotômetro portátil (marca *Konica Minolta Brasil*, modelo CM2500d), com iluminante padrão A, ângulo de observação de 10° e abertura do obturador de 30mm. As coordenadas CIE, L* (luminosidade), a* (intensidade de vermelho) e b* (intensidade de amarelo), valores de croma (C*) e ângulo de tonalidade-*hue* (h*) de cada amostra foram obtidas a partir da média de três posições adjacentes em

cada bife, sem presença de tecido conjuntivo, após um período de oxigenação de 30 minutos à 4°C, para estabilização (*blooming*). Os parâmetros foram calibrados em porcelana branca com $Y = 93,7$, $x=0,3160$ e $y = 0,3323$, com área de medição de 8mm de diâmetro.

4.2.3. Maciez objetiva (Força de Cisalhamento) e Perdas de Água por Cocção (PAC)

Para obtenção da Força de Cisalhamento (FC), foi utilizada a metodologia proposta pela *American Meat Science Association* (AMSA, 2015). A FC foi estabelecida a partir de bifés assados em forno elétrico convencional, previamente aquecido à 170°C e com ajuste de temperatura programado para manter esta temperatura durante a cocção. Brevemente, cada bife foi pesado na balança, antes da cocção, e colocado no conjunto bandeja de alumínio e grelha. A medição da temperatura interna dos bifés foi realizada com auxílio de termopar metálico, da marca TEXTO, inserido na região central do bife. Ao atingirem a temperatura interna de 71°C, os bifés foram retirados do forno e novamente pesados, com o intuito de avaliar as perdas de água por cocção (PAC). Em seguida, foram retirados de seis a oito cilindros de 1,27 cm de diâmetro cada, no sentido paralelo a fibra, de cada bife para a determinação da FC média em sentido perpendicular à fibra, usando sonda de 1,016 milímetros (*Warner Bratzler Texture Analyzer*).

4.3. ANÁLISES PROTEÔMICAS

4.3.1. Extração de proteínas das amostras de carne

Foram utilizadas seis amostras de cada tratamento EE e NE, escolhidas ao acaso e destinadas a análises proteômicas. As amostras de LT previamente congeladas em nitrogênio líquido foram alocadas em freezer à -80°C, a preparação das mesmas seguiu metodologia proposta por Lametsch et al. (2003) e Bouley, Chambon e Picard (2004).

O tecido muscular congelado (0,5g) foi macerado e homogeneizado em tampão de lise contendo 8M de ureia, 2M de tiourea, 1% DTT, 2% CHAPS e 1% inibidor de protease, com auxílio de homogeneizador Turratec (marca *Tecnal*, modelo TE-102). Os extratos brutos foram vigorosamente agitados por 30 minutos à 4°C e, em seguida, centrifugados a 10.000 x g por 30 min a 4°C em centrífuga (marca *Beckmann*; mod. J2-

21). O sobrenadante foi armazenado em freezer à -80°C e, posteriormente, utilizado para determinação da concentração de proteína total através do método de Bradford.

4.3.2. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada através do método de Bradford, utilizando o kit *Bradford Protein Assay* (5000203). Para estabelecimento da curva de calibração foi utilizada a proteína albumina do soro bovino (BSA) como padrão.

4.3.3. Eletroforese Bidimensional (2DE)

Foram organizadas alíquotas de extrato cárneo de cada amostra contendo $400\mu\text{g}$ de proteínas, estas foram misturadas com o tampão de reidratação “*Destreak*” (7 M Uréia, 2 M Tiouréia, 2% CHAPS, 0,002% azul de bromofenol – *Amersham Bioscience*) incorporado com 0,5% de tampão de IPG pH 3-10. O volume final obtido de $250\mu\text{l}$ da solução proteica foi utilizado para uma reidratação passiva das tiras de IPG (strip) de 13 cm com faixa de pH de 3-10 NL (*Amersham Biosciences*) à temperatura ambiente por 14 horas no *Immobiline Drystrip Reswelling Tray* (*GE Healthcare*).

Após a reidratação, as strips foram colocadas no aparelho *Ettan IPGphor* (*GE Healthcare*) para a focalização isoeletrica das proteínas (primeira dimensão) a temperatura ambiente e por, em média, 5 horas e 30 minutos. Foi estabelecido no programa corrente de $50\mu\text{A}$ por tira e diferentes perfis de voltagem, sendo quatro fases, exemplificadas a seguir: 500V por 500Vh, gradiente 1000 V por 800Vh, gradiente 8000V por 11300Vh e a fase final 8000V por 7000Vh. O produto total de tempo x voltagem aplicada foi de 18000V/h para cada *strip*. Ao final da focalização isoeletrica as strips foram congeladas em freezer à -20°C , até o momento da próxima corrida eletroforética (segunda dimensão).

As tiras focalizadas foram submetidas ao tampão de equilíbrio I (6M uréia, 75Mm Tris-HCL pH 8.8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol, 1% DTT) por 15 minutos sob agitação leve, em seguida, mais 15 minutos em tampão de equilíbrio II (6M uréia, 75Mm Tris-HCL pH 8.8, 29,3% glicerol, 2% SDS, 0,002% azul de bromofenol, 5% Iodoacetamida).

Após o processo de equilíbrio, as strips juntamente com o marcador de peso molecular, o qual foi aplicado em pequenos retângulos de papel filtro, foram sobrepostos

ao gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%) (18 x 16 x 0.15 cm). Fixados sobre o gel com o auxílio de uma solução selante de agarose (25mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS, 0,5% agarose e 0,002% azul de bromofenol).

O tampão de corrida utilizado foi feito a partir da diluição do tampão 10xTris/Glycine/SDS (Bio-Rad) para 1x.

A proteínas foram separadas na segunda dimensão utilizando uma cuba eletroforética SE 600 Ruby (*GE Healthcare*), com a seguinte programação de corrida: primeira fase com duração de 30 minutos contabilizando 15mA/gel, 50 volts por gel; Em seguida a segunda fase, com duração média de 3 horas contabilizando 50mA/gel, 300 volts por gel. Com o auxílio de um banho-maria termostático circulador (*MultiTemp 3, GE Healthcare*) foi possível manter a corrida à 4°C.

Terminada a corrida responsável pela segunda dimensão, os géis eram retirados de suas placas e colocados em solução fixadora (, composta por 50% metanol e 7% ácido acético diluídos em água destilada), por 10 minutos em mesa agitadora. Em seguida, eram imersos em solução corante, (resultado da mistura de 40% metanol, 7% de ácido acético e 0,025% de *Coomassie Blue G-250* diluídos em água destilada), por cerca de 1 hora em mesa agitadora. Prontamente eram colocados em solução descorante, (também composta por 40% de metanol e 7% de ácido acético diluídos em água destilada), por mais 1 hora em mesa agitadora. Após o banho em cada solução, os géis eram colocados em cerca de 150 mL de água destilada, posicionados em mesa agitadora onde permaneciam overnight.

No dia seguinte, os géis foram escaneados no *Image Scanner III (GE Healthcare)* utilizando o *Software LabScan*, tendo suas imagens armazenadas para posterior análise. Após a leitura, cada gel foi mantido em solução de Ácido Acético 5% em geladeira doméstica.

4.3.4. Análise de Imagens

A detecção e quantificação dos spots foi realizada por meio do *software Image Master 2D Platinum (GE Healthcare)*. Contamos com seis géis para cada tratamento e tempo, possibilitando repetições suficientes para garantir maior confiança na detecção dos spots. Dessa forma, para cada amostra e um spot, foi calculada a média de no mínimo três valores. A quantidade de proteína de cada spot foi expressa como volume, ou seja, quantificando a intensidade de pixel presente dentro de cada spot.

A diferença na quantidade de proteína de cada spot foi baseada no volume relativo (% volume), valor este que permanece constante independente de outras variações.

Após a detecção automática dos spots, todos os géis passaram por validação manual, onde foram reconhecidos spots verdadeiros. Em seguida, foram realizadas análises de comparação, portanto o “Match” entre os géis, de forma a assegurar que um spot presente em um gel encontrasse o seu correspondente no outro gel confrontado. Primeiramente, para medida de comparação, foram sobrepostas imagens de géis correspondentes ao mesmo tratamento (EE ou NE) e, posteriormente, as imagens de tratamentos diferentes (EE x NE). Prontamente, as comparações passaram por validação manual.

4.3.5. Digestão dos spots “in gel” e Espectrometria de massas (MS/MS)

Os *spots* detectados como diferencialmente expressos nas análises estatísticas (n=31), à nível de significância de 5% ($p < 0,05$), foram retirados do gel, picotados em segmentos de aproximadamente 1 mm e colocados dentro de microtubos de 1,5 mL, contendo 1 mL de solução de 0,1% de ácido fórmico. Posteriormente, foram enviados para a digestão e análise de espectrometria de massas, ambas realizadas pela empresa *Baume Analytik LTDA*.

Primeiramente, os *spots* selecionados foram submetidos a digestão in gel segundo metodologia descrita por Shevchenko *et al.* (2006). Peptídeos trópticos foram liofilizados e ressuspendidos em ácido fórmico 0,1%, sonicados, e transferidos para microtubos de máxima recuperação MS. Cerca de 8 μ l da solução de peptídeos foi injetada em uma coluna *ACQUITY M-Class Symmetry C18 Trap* (100 \approx , 5 μ m, 180 μ m x 20 mm, Waters, Milford, MA, EUA) por 10 minutos a uma taxa de fluxo 8 μ l/min e separada em uma coluna *ACQUITY UPLC M-Class HSS T3* (100 \approx , 1.8 μ m, 75 μ m X 250 mm, Waters, Milford, MA, EUA). Um gradiente de 3-40% do solvente B (acetonitrila em ácido fórmico 0,1%) foi utilizado por 14 minutos antes de subir para uma concentração de 85% do solvente B durante 5 minutos e reequilibrar por 8 minutos a uma taxa de fluxo constante de 0,4 μ l/min. Os espectros de massa foram adquiridos com HDMS_e em espectrômetro de massas Synapt G2-Si em modo de resolução com rampa de energia de colisão de 25-55 eV. O Glu-Fibrinopeptídeo B humano foi utilizado como *spray lockmass*, amostrado a cada 30 segundos (785,8426 Da/e). Os arquivos brutos foram

importados para o *ProteinLynx Global Server 3.0.2* (Waters, Milford, MA, EUA). As identificações das proteínas foram obtidas em comparação com o banco de dados de *Bos indicus* não revisado do *Uniprot* (download em 06/2023; 32.283 hits). Parâmetros de pesquisa no banco de dados foram: mínimo de três fragmentos por proteína, uma massa proteica máxima de 600 kDa, até uma clivagem perdida, carbamidometilação de cisteína como uma modificação fixa e oxidação de metionina como uma modificação variável, e uma taxa de descoberta falsa de 4% foi permitida.

4.3.6. Bioinformática

A anotação dos genes associados às proteínas diferencialmente abundantes (DAPs, do inglês *differentially abundant peptides*) foi feita com a ferramenta online *BioMart do Ensembl*, disponível em <http://www.ensembl.org/biomart>. As análises de enriquecimento funcional dos genes associados às DAPs foi realizada pela ferramenta online *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) v. 6.8 (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009) e *GeneAnalytics*TM (BEN-ARI FUCHS et al., 2016) para identificação de vias metabólicas enriquecidas e termos do *Gene Ontology*. As DAPs para todas as análises realizadas foram submetidos ao programa de bioinformática *String* 10.0 (disponível on-line: <http://string-db.org/>) para gerar redes de interação proteína-proteína a partir das DAPs identificadas no estudo. A pontuação mínima de interação necessária foi definida como 0,700 (alta confiança). Além disso, análises de Vias Metabólicas foram realizadas por meio da Enciclopédia Kioto de Genes e Genomas (KEGG) foi obtida via *String* 10.0.

4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as avaliações dos valores pH em função do tempo e dos valores pH em função da temperatura, foi adotado o procedimento de regressões transformadas. Por essa estratégia, os modelos lineares são ajustados com transformações *spline*, dentre outras transformações não lineares das variáveis. As curvas são ajustadas por meio de um gráfico de dispersão, sendo uma para cada nível da variável dependente em questão (EE ou NE). As transformações produzidas pelo algoritmo de regressão múltipla utilizando transformações *spline* são semelhantes às transformações produzidas pelo método de regressão suave ACE proposto por BREIMAN & FRIEDMAN (1985). No entanto,

regressões suaves ACE não otimizam a função de perda (DE LEEUW, 1986), enquanto as regressões transformadas minimizam a função de perda pelo critério de erro quadrático médio. O conceito de regressões transformadas são extensão do modelo linear geral comum, porém fornecendo transformações ótimas de variáveis que são derivadas iterativamente. A técnica faz iterações até a convergência, alternando duas etapas principais: obtenção de estimativas de mínimos quadrados dos parâmetros do modelo, dado um ponto atual dos dados e obtenção de estimativas de mínimos quadrados dos parâmetros, dado o conjunto de todos os parâmetros do modelo. Essa estratégia é chamada de método de mínimos quadrados alternados (YOUNG, 1981).

Para avaliação das características físico-químicas da carne relacionadas à cor, maciez e PAC, considerou-se um modelo linear misto geral que contemplou os efeitos fixos de Tratamentos (EE versus NE), Tempo de Maturação (24 horas, 7 dias versus 14 dias *post mortem*), interação Tratamento x Tempo, além dos efeitos aleatórios de animal e resíduo. Nestas análises foi adotada a estrutura de medidas repetidas nas mesmas unidades experimentais (meias carcaças dos mesmos animais, avaliadas em diferentes tempos). As estruturas de covariância entre as medidas repetidas foram avaliadas pelo critério de informação de Akaike, AIC (AKAIKE, 1973). As pressuposições dos modelos de análise variância (normalidade e homogeneidade dos resíduos) foram realizadas simultaneamente por meio de análises de resíduos condicionais *Studentizados*. Em caso de Teste F significativo ($P < 0,05$) ou marginalmente significativo ($P < 0,10$), o próprio Teste F foi considerado discriminatório ou, quando avaliando o fator Tempo ou, no caso de Interação significativa, para desdobramento dos tempos dentro de cada tratamento, foi adotado o Teste de Tukey como procedimento para comparação de médias.

As análises proteômicas foram avaliadas dentro de cada tempo de maturação (0 ou 24 horas). Esta estratégia foi adotada visando a prospecção do maior número de peptídeos diferencialmente abundantes (DAP, do inglês *differentially abundant peptides*) dentro de cada tempo de avaliação. Desta forma, as percentagens de volumes normalizados foram avaliadas considerando-se um modelo linear misto geral que contemplou os efeitos fixos de Tratamentos (EE versus NE), além dos efeitos aleatórios de animal e resíduo. Nestas análises também foram adotadas a estrutura de medidas repetidas nas mesmas unidades experimentais (meias carcaças dos mesmos animais, avaliadas com e sem estimulação elétrica). As estruturas de covariância entre as medidas repetidas foram avaliadas pelo critério de informação de Akaike, AIC (AKAIKE, 1973). O Teste F significativo foi considerado discriminatório.

Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PERFIL FÍSICO-QUÍMICO DE CARNES PROVINDAS DE CARÇAÇAS SUBMETIDAS E NÃO SUBMETIDAS A ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA NO PROCESSO DE ABATE

5.1.1. Declínio do pH

O declínio de pH em função do tempo *post mortem* (tempo de monitoramento) das meias-carcaças submetidas a estimulação elétrica (EE) e das pertencentes ao grupo não estimulado (NE) são apresentados na Figura 1. Nas primeiras 24 horas *post mortem*, ambos os tratamentos (EE e NE) demonstraram um padrão de declínio ao longo do período analisado e, por sua vez, atingiram a faixa de pH considerada ideal. Entretanto, observa-se claramente que o padrão de declínio foi distinto entre os tratamentos avaliados.

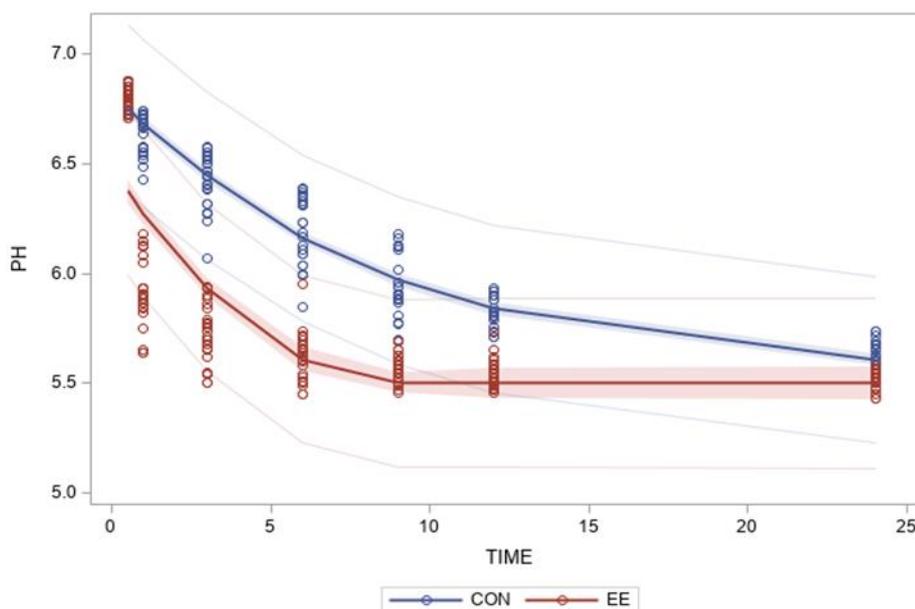


Figura 1. Regressões splines dos valores de pH em função do tempo de monitoramento das meias-carcaças submetidas a estimulação elétrica (EE, destacado em vermelho) e as pertencentes ao grupo não estimulado (NE considerado controle (CON), destacado em azul).

A análise de variância dos valores de pH, apontaram efeitos significativos para a fonte de variação Tratamento x Tempo ($P < 0,01$). As estimativas de médias, erros-padrão e valores de P observados para os valores de pH ao longo dos tempos de monitoramento, dentro de cada tratamento, encontram-se na Tabela 1. Conforme demonstrado na Figura 1 e evidenciado pela Tabela 1, diferenças significativas foram verificadas nas magnitudes de respostas do pH, para todos os momentos avaliados, entre os tratamentos NE e EE. Destaca-se que as diferenças dos valores médios de pH do tratamento NE em relação aos do tratamento EE, foram aparentes já na primeira hora post mortem ($\Delta_{1hs\ p.m.} = 0,73$), mantendo-se ao longo seis primeiras horas post mortem ($\Delta_{6hsp.m} = 0,58$), momento o qual, as meias-carcaças EE começam a atingir valores próximos do pH ideal (5,7). A partir das nove horas post mortem a diferença entre tratamentos começa a diminuir ($\Delta_{9hsp.m} = 0,37$), ficando cada vez menor até as 24 horas post mortem, ($\Delta_{24hsp.m.} = 0,11$). Observa-se também que meia-carcaças NE entram em janela ideal de pH após 12 horas *post mortem*.

Tabela 1. As estimativas de médias, erros-padrão e valores de P observados para os valores de pH ao longo dos tempos de monitoramento, dentro de cada tratamento avaliado (EE versus NE).

Tempo, em h	NE		EE		Ef. Princ. Tempo		Pr > F		
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Trat	Tempo	Trat xTempo
1	6,58	0,02 A; a	5,85	0,02 A; b	6,22	0,02			
3	6,37	0,02 B; a	5,67	0,02 B; b	6,02	0,02			
6	6,15	0,02 C; a	5,57	0,02 C; b	5,86	0,02	<,0001	<,0001	<,0001
9	5,89	0,02 D; a	5,52	0,02 C, D; b	5,71	0,02			
12	5,76	0,02 E; a	5,49	0,02 C, D; b	5,62	0,02			
24	5,56	0,02 F; a	5,45	0,02 D; b	5,51	0,02			
Ef. Princ. Trat.	6,05	0,01	5,59	0,01					

Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P < 0,01$); Médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo Teste F ($P < 0,01$).

A estimulação elétrica de carcaças foi proposta para acelerar a via glicolítica no *post mortem*, resultando na queda do pH, via esgotamento rápido das reservas de glicogênio muscular (HWANG *et al.*, 2001; HWANG *et al.*, 2003; SIMMONS *et al.*, 2008). Como evidenciado pela Figura 1 e pela Tabela 1, o declínio do pH, das carcaças submetidas à EE, de fato, ocorreu de maneira mais rápida, alcançando valores ideais com seis horas *post mortem* antes, quando comparado às meia-carcaças NE.

Em experimento que objetivou comparar os efeitos de diferentes voltagens (alta e baixa), demonstrou que o rápido declínio do pH após aplicação de estimulação elétrica, aos 40 minutos *post mortem*, acontece independentemente da voltagem utilizada, portanto carcaças do grupo controle (não estimuladas) apresentaram curvas de declínio de pH mais lenta dentre todos os grupos formados (Hwang *et al.*, 2001). Porquanto outro estudo relatou que apenas EE de alta voltagem teve efeito interativo sobre a queda do pH, contudo, tal efeito só foi observado em amostras do músculo *Longissimus lumborum*, sugerindo que o efeito da técnica é dependente de características intrínsecas ao músculo, como localização anatômica e metabolismo (DJIMSA *et al.*, 2022).

Conforme destacado anteriormente, a queda do pH é um dos eventos mais importantes para a definição de uma carne de qualidade, exercendo impacto direto sobre características determinantes como cor e maciez, as quais serão discutidas adiante.

5.1.2. Cor

As estimativas de médias, erros-padrão e valores de *p* observados para os parâmetros de cor L*, a*, b*, croma e ângulo *Hue* em carcaças estimuladas eletricamente (EE) e não estimuladas eletricamente (NE) são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Estimativas de médias, erros-padrão e valores de P observados para os valores de cor L*, a*, b*, croma e ângulo Hue em carcaças estimuladas eletricamente (EE) e não estimuladas eletricamente (NE) - Continua.

Tempo	NE		EE		Ef. Princ. Tempo		Pr > F		
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Tratamento	Tempo	Trat.xTempo
<i>Valores de L*</i>									
1	42,37	0,39	43,65	0,39	43,01	0,27	C		
7	44,85	0,39	45,56	0,39	45,21	0,27	B	0,0141	<,0001
14	46,58	0,39	47,11	0,39	46,84	0,27	A		0,6034
Ef. Princ. Trat.	44,60	0,22 b	45,44	0,22 a					
<i>Valores de a*</i>									
1	22,11	0,31	22,70	0,31	22,40	0,22	B		
7	24,25	0,31	24,60	0,31	24,42	0,22	A	0,5642	<,0001
14	25,17	0,31	24,67	0,31	24,92	0,22	A		0,1934
Ef. Princ. Trat.	23,84	0,18	23,99	0,18					
<i>Valores de b*</i>									
1	15,07	0,29	15,27	0,29	15,17	0,21	C		
7	17,67	0,29	17,76	0,29	17,71	0,21	B	0,9968	<,0001
14	18,61	0,29	18,32	0,29	18,46	0,21	A		0,6831
Ef. Princ. Trat.	17,12	0,17	17,12	0,17					

Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P<0,01); Médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo Teste F (P<0,01).

Tabela 2. Estimativas de médias, erros-padrão e valores de P observados para os valores de cor L*, a*, b*, croma e ângulo *Hue* em carcaças estimuladas eletricamente (EE) e não estimuladas eletricamente (NE) - Continuação.

Tempo	NE		EE		Ef. Princ. Tempo		Pr > F		
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Tratamento	Tempo	Trat.xTempo
<i>Valores de Croma</i>									
1	26,77	0,40	27,37	0,40	27,07	0,28	B		
7	30,01	0,40	30,34	0,40	30,17	0,28	A	0,0141	<,0001
14	31,31	0,40	30,74	0,40	31,02	0,28	A		0,6034
Ef. Princ. Trat.	29,36	0,23	b	29,48	0,23	a			
<i>Valores de ângulo Hue</i>									
1	34,24	0,30	33,85	0,30	34,04	0,21	B		
7	36,03	0,30	35,83	0,30	35,93	0,21	A	0,5296	<,0001
14	36,48	0,30	36,59	0,30	36,53	0,21	A		0,7014
Ef. Princ. Trat.	35,58	0,17		35,42	0,17				

Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P<0,01); Médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo Teste F (P<0,01).

As variáveis que determinam os valores cor da carne no padrão CIE (L^* , a^* , b^*), bem como, os valores associados ao croma e ao ângulo *Hue* comportaram-se dentro dos limiares médios estabelecido por Muchenje e colaboradores (2009), porém com ligeiras particularidades dentro dos tratamentos avaliados. De maneira geral, efeitos principais de Tratamentos significativos foram observados ($P < 0,05$), com meias-carcaças estimuladas eletricamente (EE) apresentando carnes com maiores valores de L^* e croma. Também foram evidenciados efeitos principais para Tempo de maturação significativos ($P < 0,01$), indicando alterações nos valores de cor L^* , a^* , b^* , croma e ângulo *Hue* conforme o processo de maturação foi sendo desencadeado.

Em estudo avaliando o estabelecimento da cor da carne, foi apontado que diferenças mais aparentes, relacionadas à estimulação elétrica de carcaças, foram perceptíveis somente até 20 horas *post-mortem* e, ao atingir 48 horas, essas diferenças tenderam a desaparecer (LAWRIE E LEDWARD, 2006). Este fato pode ter acontecido, em virtude de o pH final já estar tendendo à estabilidade nas amostras de ambos os tratamentos e, desta forma, o padrão de oxidação da mioglobina seguirá o mesmo curso. Neste trabalho, foi observado que o estabelecimento da cor desejável acontece mais rapidamente em carcaças EE já nas primeiras horas do *post-mortem*, como demonstrado na Figura 2.

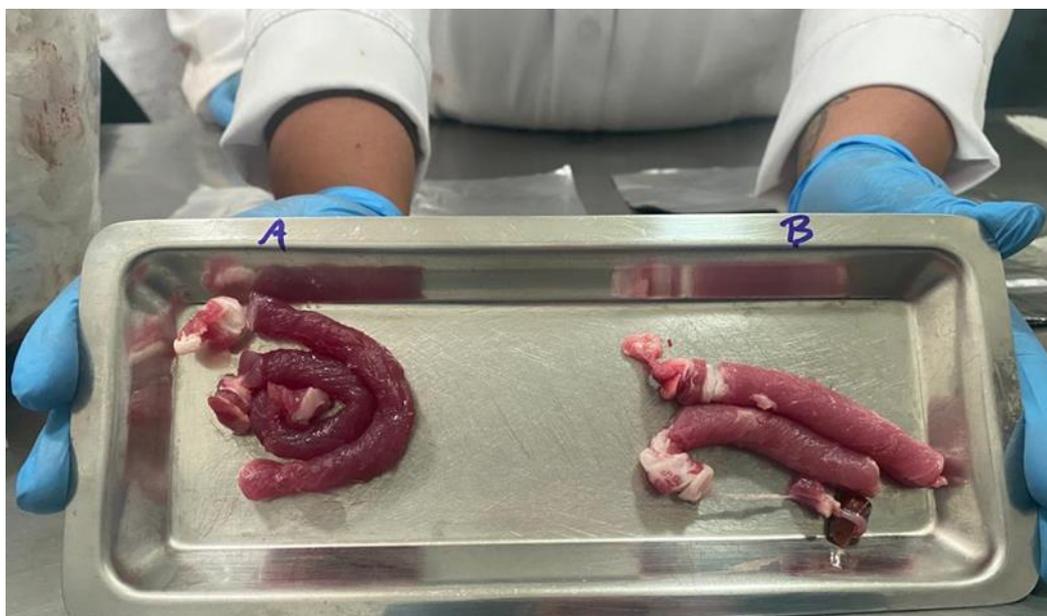


Figura 2. Imagem de cilindros de carne coletados do músculo Longissimus thoracis às 6 horas *post-mortem*. Amostra “A” foi coletada de carcaça pertencente ao grupo controle (NE) e “B” a carcaça submetida à estimulação elétrica (grupo EE).

Lawrie e Ledward (2006) constataram que a queda acentuada de pH, causada pela eletroestimulação, leva proteínas miofibrilares a atingirem seu ponto isoelétrico mais rapidamente, causando a abertura de suas estruturas e, com isso, desencadeando a oxidação da mioglobina e acarretando estabilização da cor de forma mais rápida.

A definição da cor da carne tem relação à ação do oxigênio na mioglobina, portanto, com mudanças associadas à eventos proteolíticos (SUMAN & JOSEPH, 2013). As alterações bioquímicas envolvidas no efeito favorável observado em carnes EE na redução da incidência de carnes DFD ainda não foram completamente elucidadas. Entretanto, a tecnologia da EE vem sendo amplamente utilizada pela Indústria Frigorífica como uma ferramenta de aceleração da queda de pH para faixas consideradas ideais e, conseqüentemente, reduzindo a ocorrência de carnes DFD. Um estudo realizado em duas plantas frigoríficas norte-americanas, apontou que carnes não eletroestimuladas (NE) receberam 34% de classificação DFD, enquanto as eletroestimuladas (EE) receberam valor duas vezes menor (17%) de condenação (DJIMSA *et al.*, 2022).

Valores de croma (c^*), são empregados para exemplificar os níveis de saturação e, no presente estudo, comportaram-se um pouco acima do limiar médio proposto (MUCHENJE *et al.*, 2009). Além disso, apresentaram diferenças significativas apenas para o efeito de tempo de maturação. Os valores de ângulo hue (H^*), correspondente a ângulo de inclinação – variando de 0° a 360° – também variaram significativamente apenas com o efeito de tempo de maturação.

Zhao e colaboradores (2022) avaliaram os efeitos de três tratamentos (explorando dois níveis de cada um), sendo: tempo de banho (ST), tratamento eletrolítico (ET) e estimulação elétrica (ES), sobre a qualidade da carne de bovinos da raça Qinchuan. Os pesquisadores observaram que a interação entre ST e ET provocou mudanças significativas nos valores de L^* e b^* , enquanto ES não apresentou efeito sobre a cor da carne, essa falta pode estar associada a voltagem utilizada, uma vez que outros experimentos já relataram que a ES de baixa voltagem não surtiu grandes efeitos sobre características de qualidade (ADEYEMI & SAZILI, 2014).

Por sua vez, quando aplicada EE de alta voltagem, Nazli *et al.* (2010) observaram que o estabelecimento da cor demonstrou diferenças significativas entre tratamentos, especialmente sobre o parâmetro a^* , sendo carnes EE mais atrativas. Em outro estudo, realizado em carne de caprinos, Cetin e Topeu (2009) apontaram diferenças significativas para o parâmetro L^* no sétimo dia *post mortem* de carnes submetidas a EE.

Um experimento realizado em duas plantas frigoríficas no Estados Unidos, avaliou os efeitos de tamanho de carcaça, condições de resfriamento e diferentes voltagens de eletroestimulação sobre características de qualidade da carne em três grupos musculares com diferentes taxas glicolíticas (DJIMSA *et al.*, 2022). Sobre o aspecto de cor a EE demonstrou efeito positivo, sobretudo sobre o parâmetro a^* , onde 82% das carnes provindas do lado estimulado foram classificadas como atrativas, sendo de cor vermelho cereja, contra os 66% que receberam a mesma classificação no grupo controle.

Com base no que foi encontrado no presente estudo e na literatura consultada, pode-se concluir que os efeitos da eletroestimulação sobre a característica de cor da carne são sutis, bem como dependentes da voltagem aplicada. De qualquer forma, vale ressaltar que o sucesso da técnica pode ser dependente de diversos fatores, como temperatura durante o resfriamento, anatomia muscular e até o peso da carcaça (DJIMSA *et al.*, 2022).

5.1.3. Maciez e Perdas por Cocção

As estimativas de médias, erros-padrão e valores de P observados para as percentagens de perdas de água por cocção e valores maciez objetiva em carcaças estimuladas eletricamente (EE) e não estimuladas eletricamente (NE) são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Estimativas de médias, erros-padrão e valores de P observados para as percentagens de perdas de água por cocção e os valores maciez objetiva em carcaças estimuladas eletricamente (EE) e não estimuladas eletricamente (NE)

Tempo	NE		EE		Ef, Princ, Tempo		Pr > F		
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Trat	Tempo	TratxTempo
<i>Perdas de Água por Cocção (em %)</i>									
1	28,88	1,23	30,03	1,23	29,45	0,87			
7	30,20	1,23	29,50	1,23	29,85	0,87	0,1791	0,6281	0,2048
14	26,80	1,23	30,55	1,23	28,68	0,87			
Ef. Princ. Trat.	28,63	0,71	30,03	0,71					
<i>Maciez objetiva (em N)</i>									
1	89,88	2,47	A; a	63,18	2,47	A; b	76,53	1,74	
7	67,48	2,47	B; a	48,65	2,47	B; b	58,06	1,74	<,0001
14	53,25	2,47	C; a	41,72	2,47	B; b	47,49	1,74	0,0135
Ef. Princ. Trat.	70,20	1,42		51,18	1,42				

Médias em uma mesma coluna e seguidas por uma mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P<0,01); Médias em uma mesma linha e seguidas por uma mesma letra minúscula não diferem entre si pelo Teste F (P<0,01).

Conforme observado na Tabela 3, não foram verificados efeitos significativos associados às perdas de águas por cocção, indicando os tratamentos não influenciaram nas perdas de água.

Por outro lado, pela mesma tabela verifica-se que, para maciez avaliada de forma objetiva, foram observados efeitos significativos da fonte de variação Interação Tratamento x Tempo de Maturação. O resultado dos desdobramentos da Interação, visando estudar o comportamento dos tratamentos dentro de cada tempo de maturação, é extremamente relevante, pois demonstra de maneira inequívoca que as meia-carcaças EE apresentam menores valores de maciez para todos os tempos de maturação, quando comparadas às meia-carcaças do grupo controle (NE). Este efeito favorável foi identificado já a partir da maturação sanitária, com sete dias *post mortem*, com diferenças nos valores de maciez do grupo EE em relação ao grupo NE de 29,7%. Nos demais períodos de maturação, esse efeito da EE praticamente foi mantido, assumindo diferenças de 27,9% e 21,7% nos tempos de maturação sete e 14 dias *post mortem*, respectivamente. Outro fato importante que também deve ser destacado é que as médias observadas de maciez no grupo NE aos 14 dias *post mortem* foram superiores às médias observadas de maciez avaliadas com sete dias *post mortem*. Trata-se de ponto importante para indústria frigorífica, merecendo maiores atenções em estudos futuros, visando calibrar esse efeito favorável da EE.

O resultado dos desdobramentos da Interação, visando estudar o comportamento dos tempos de maturação dentro de cada tratamento avaliado (NE e EE) é mais uma contribuição importante deste trabalho, merecendo destaque. O efeito de tempos de maturação dentro de cada tratamento, demonstraram diferenças dos padrões de proteólise das meia-carcaças NE em relação às meia-carcaças EE. As diferenças de maciez entre um período posterior e o anterior ao longo da maturação, expressos como percentagem, permitem a avaliar a eficiência da ação proteolítica. Neste caso, avaliado as diferenças médias do dia sete em relação ao dia um *post mortem*, bem como, a diferença média do dia 14 em relação ao sete e um *post mortem*, verifica-se as eficiências proteolíticas dentro de cada período de maturação, o tratamento NE, foram de 24,9% e 21,01%, respectivamente. Já para o tratamento EE, as eficiências proteolíticas dentro de cada período de maturação foram 23% e 14,2%. Apesar dos valores no primeiro dia de maturação já iniciarem com magnitudes distintas, estes achados evidenciam que vias metabólicas importantes, envolvidas no processo proteolítico, foram suficientemente alteradas a ponto de serem captadas nas análises de maciez.

Em estudo desenvolvido com bovinos de raça chinesa cruzada, Ji e colaboradores (2021) testaram os efeitos da eletroestimulação e maturação antecipada em resfriamento extra frio (*superchilled storage*). As meias-carcaças (lado esquerdo) foram eletroestimuladas com voltagem média (300V) e, posteriormente, encaminhadas para câmara extra fria (1°C até 24 horas *post mortem*), enquanto o lado direito foi mantido como grupo controle. Com isso, os pesquisadores identificaram que carnes provindas da meia-carcaça EE demonstraram valores de força de cisalhamento consideravelmente menores do que as do grupo controle, mais precisamente 17,6% menores. Além disso, apontaram a EE como ferramenta para acelerar a tenderização em carne armazenadas em resfriamento extra frio.

No experimento de Zhao e colaboradores (2022) foi apontado que carnes eletroestimuladas apresentaram valores de força de cisalhamento menores do que as que não foram submetidas a técnica, portanto, se destacaram como mais macias. Os pesquisadores associaram o resultado com a aceleração dos processos de degradação e desnaturação proteica, aprimorados pela ação de proteases (Ferguson *et al.*, 2000), como relatado por Balan *et al.* (2019) e Yang *et al.* (2019), que por sua vez ressaltaram tais efeitos sobre a desmina e troponina T, respectivamente. Outros estudos também captaram a intensificação da proteólise a partir da utilização da EE que, por sua vez, foi associada a liberação de cálcio (Ca²⁺) no organismo enquanto a temperatura interna da carcaça ainda estava elevada (Hwang *et al.*, 2003).

Uma vez que a estimulação elétrica altera a relação pH/temperatura no *post-mortem* é condizente esperar mudanças no padrão de proteólise também (Hwang *et al.*, 2003). Entretanto, não existe um consenso entre pesquisadores em relação aos efeitos da técnica sobre as taxas de proteólise, portanto, em busca de elucidar algumas dessas dúvidas, o perfil proteômico de ambos os tratamentos em dois momentos diferentes do *post mortem* (30 minutos e 24 horas pós abate) serão discutidos no próximo capítulo.

De maneira geral, alguns pesquisadores avaliam o efeito da EE sobre a maciez ao analisarem a sua capacidade de evitar o fenômeno de encurtamento pelo frio (do inglês: *cold shortening*) (CROSS, 1979; BOUTON *et al.*, 1980; SIMMONS *et al.*, 2008). Enquanto outros, pela possibilidade de ser resultado das rápidas alterações, resultado da combinação da temperatura alta (*in vivo*) com o pH baixo (PEARCE *et al.*, 2006; PEARCE *et al.*, 2010; DJIMSA *et al.*, 2022).

5.2. PERFIL PROTEÔMICO DE CARÇAÇAS ELETROESTIMULADAS (EE) E NÃO ELETROESTIMULADAS (NE)

5.2.1. Perfil proteômico com 30 minutos post mortem

A separação das proteínas de todas as amostras foi realizada por eletroforese bidimensional (2-DE), de forma a identificá-las com base em seus pesos moleculares (PM) e ponto isoelétrico (pI). Os *spots* foram identificados automaticamente pelo *software ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare)*.

Nas amostras coletadas às zero horas *post mortem* (T0), foram detectados 261 *spots*. Destes, 194 *spots* se mantiveram após checagem de distribuição, por se mostrarem presentes em pelo menos três amostras biológicas. Portanto, os *spots* presentes em pelo menos três amostras biológicas foram submetidos à análise de abundância diferencial e, a partir disso, identificamos 14 proteínas diferencialmente expressas à nível de significância $P < 0,05$ (Tabela 4).

Tabela 4. Média (MED), erro padrão (EP), p-valor e fold change (EE/NE) +-dos spots referentes às 14 proteínas diferencialmente abundantes à nível de significância ($P < 0,05$).

SPOT	NE		EE		P-value	Fold change
	MED	EP	MED	EP		
20	0,070	0,019 B	0,144	0,017 A	0,043	2,044
24	0,079	0,010 B	0,130	0,010 A	0,014	1,635
32	0,700	0,071 B	1,019	0,071 A	0,024	1,456
37	0,158	0,014 B	0,273	0,014 A	0,002	1,734
38	0,828	0,128 B	1,390	0,128 A	0,027	1,678
44	0,241	0,040 B	0,389	0,040 A	0,048	1,615
51	0,214	0,041 B	0,375	0,041 A	0,039	1,752
53	0,104	0,016 B	0,187	0,016 A	0,015	1,799
54	0,225	0,061 B	0,456	0,061 A	0,044	2,028
72	1,586	0,120 A	0,924	0,131 B	0,020	0,582
81	0,115	0,015 B	0,213	0,015 A	0,005	1,851
94	2,576	0,233 A	1,516	0,233 B	0,023	0,589
95	1,512	0,136 A	0,841	0,136 B	0,017	0,556
214	0,598	0,057 A	0,328	0,057 B	0,020	0,549

NE – Amostras providas de carcaças não submetidas a estimulação elétrica; EE – amostras providas de carcaças submetidas a estimulação elétrica.

Médias em uma mesma linha seguidas por letras maiúsculas diferentes, demonstram diferença significativa, ao nível de significância 5%, pelo teste *t* de Student.

Destas 14 proteínas diferencialmente expressas (Figura 3), com base no *fold change*, 10 foram classificadas como mais abundantes nas amostras EE (*upregulated*), enquanto quatro foram classificadas como menos abundantes nas amostras EE (*downregulated*), ou seja, mais abundantes no grupo controle (NE). Além disso, foram encontradas quatro proteínas que só se apresentavam em amostras EE, e uma proteína que só se expressou em amostras do grupo NE.

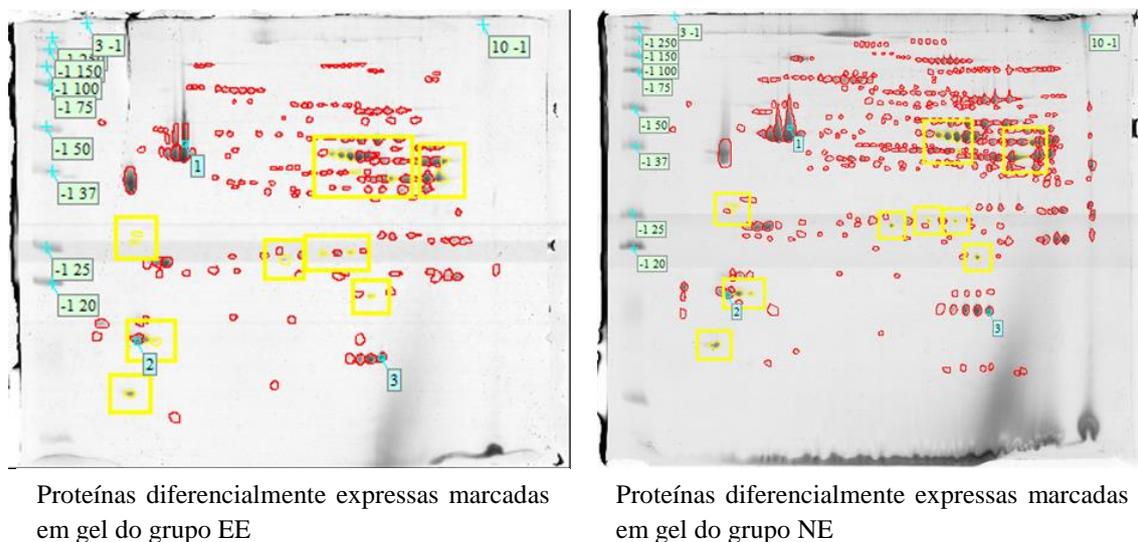


Figura 3. Géis referência de eletroforese bi-dimensional (2-DE): 12,5% (m/v) e gradiente de pH 3-10. Em destaque estão spots de proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* com 30 minutos horas post mortem.

Os 14 *spots* diferencialmente abundantes, bem como, os quatro *spots* detectados somente nas amostras EE e um *spot* que se expressou somente nas amostras do grupo NE, foram submetidos a análise de Espectrometria de Massas visando a identificação dos peptídeos presentes em cada um dos *spots* (Tabela 5). A anotação das proteínas diferencialmente abundantes e únicas encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* em amostras submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica aos 30 minutos *post mortem*, são apresentados na Tabela 6.

Tabela 5. Genes correspondentes, acessos *Uniprot*, massa molecular (kDa), peptídeos correspondentes, peptídeos únicos e porcentagem de cobertura dos peptídeos, das proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica aos 30 minutos *post mortem*.

SPOT	Tratamento	Gene	Acesso <i>Uniprot</i>	Massa molecular (kDa)	Peptídeos únicos	Peptídeos cobertos (%)
20	0h	YWHAE	A0A6P5DGG5	29,35	15	61,57
24	0h	YWHAZ	A0A6P5CUI6	27,92	6	21,63
32	0h	KRT10	A0A6P5DID6	62,56	9	13,49
37	0h	MYLPF	A0A6P5DXE1	19,13	11	34,71
38	0h	MYLPF	A0A6P5DXE1	19,13	16	60,00
44	0h	CRYAB	A0A6P5D0D3	20,04	13	54,86
51	0h	HSPB1	A0A6P5E062	22,48	8	42,29
53	0h	TPI1	A0A6P5BSD8	30,80	12	39,86
54	0h	SREK1	A0A6P5DMX0	60,05	4	3,11
72	0h	GAPDH	A0A6P5BSF2	36,10	20	53,75
81	0h	TNNT3	A0A6P5BJ71	32,28	8	18,64
94	0h	CKM	A0A6P5DBL6	43,22	29	50,13
95	0h	CKM	A0A6P5DBL6	43,22	23	40,68
214	0h	CKM	A0A6P5DBL6	43,22	18	41,47
242	EE 0h	GAPDH	A0A6P5BSF2	36,10	16	42,94
244	EE 0h	ALDOA	A0A6P5DY27	39,95	23	60,44
245	EE 0h	SH3BGRL3	A0A6P5BYB7	19,75	10	56,91
247	EE 0h	GAPDH	A0A6P5BSF2	36,10	4	18,02
254	NE 0h	CKM	A0A6P5DBL6	43,22	8	20,21

Tabela 6. Anotação das proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) e únicas encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* em amostras submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica aos 30 minutos *post mortem*.

Gene	Acesso Uniprot	Descrição da proteína
YWHAE	A0A6P5DGG5	14-3-3 protein epsilon isoform X1
YWHAZ	A0A6P5CUI6	14-3-3 protein zeta/delta
KRT10	A0A6P5DID6	Keratin_ type I cytoskeletal 10
MYLPF	A0A6P5DXE1	Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform
MYLPF	A0A6P5DXE1	Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform
CRYAB	A0A6P5D0D3	Alpha-crystallin B chain
HSPB1	A0A6P5E062	Heat shock protein beta-1
TPI1	A0A6P5BSD8	Triosephosphate isomerase
SREK1	A0A6P5DMX0	Splicing regulatory glutamine/lysine-rich protein 1 isoform X4
GAPDH	A0A6P5BSF2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
TNNT3	A0A6P5BJ71	Troponin T_ fast skeletal muscle
CKM	A0A6P5DBL6	creatine kinase
CKM	A0A6P5DBL6	creatine kinase
CKM	A0A6P5DBL6	creatine kinase
GAPDH	A0A6P5BSF2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
ALDOA	A0A6P5DY27	Fructose-bisphosphate aldolase
SH3BGRL3	A0A6P5BYB7	SH3 domain-binding glutamic acid-rich protein-like isoform X2
GAPDH	A0A6P5BSF2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
CKM	A0A6P5DBL6	creatine kinase

Como observado, foram identificados 13 genes responsáveis pela codificação das proteínas diferencialmente abundantes, encontradas no músculo *Longissimus thoracis* aos 30 minutos *post mortem*, devidamente descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Identificação dos 13 genes responsáveis pela codificação das proteínas diferencialmente abundantes encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica aos 30 minutos post mortem.

Gene	Descrição do gene
ALDOA	<i>aldolase, fructose-bisphosphate A</i>
CKM	<i>creatine kinase, M-type</i>
CRYAB	<i>crystallin alpha B</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HSPB1	<i>heat shock protein family B (small) member 1</i>
KRT10	<i>keratin 10</i>
MYL11	<i>myosin light chain 11</i>
SH3BGR3	<i>SH3 domain binding glutamate rich protein like 3</i>
SREK1	<i>splicing regulatory glutamic acid and lysine rich protein 1</i>
TNNT3	<i>troponin T3, fast skeletal type</i>
TPI1	<i>triosephosphate isomerase 1</i>
YWHAE	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon</i>
YWHAZ	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta</i>

A partir da ontologia gênica (GO) e posterior enriquecimento funcional foi possível relacionar as proteínas identificadas de acordo com processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares. Desta forma, os resultados mais significativos obtidos na análise de enriquecimento funcional, a partir dos 13 genes identificados e que apresentaram expressão diferenciada entre os grupos de tratamento (NE e EE), são encontrados na Tabela 8.

Tabela 8. Escores de significância (expresso em $-\log_2$ do valor-P), principais categorias e identificação associada de acordo com a Ontologia Gênica (GO), número de genes diferencialmente expressos (total de genes) associados aos DAP com efeito significativo de amostras coletadas aos 30 minutos *post mortem*.

Escore	Categoria/Nome Associado à Ontologia Gênica	Número de genes (Total de genes)
Componente Celular		
22,6	<i>Cytosol</i>	12 (5.492)
15,08	<i>Contractile Fiber</i>	2 (15)
13,85	<i>M Band</i>	2 (23)
13,61	<i>I Band</i>	2 (25)
8,84	<i>Z Disc</i>	2 (133)
Processo Biológico		
19,44	<i>Glycolytic Process</i>	3 (42)
10,35	<i>Muscle Contraction</i>	2 (78)
11,01	<i>Glucose Metabolic Process</i>	2 (62)
8,68	<i>Negative Regulation of Apoptotic Process</i>	3 (531)
Função Molecular		
13,5	<i>Protein Refolding</i>	2 (26)
13,85	<i>Potein Sequestering Activity</i>	2 (23)
12,91	<i>Identical Protein Binding</i>	6 (1721)
10,87	<i>Cytoskeletal Protein Binding</i>	2 (65)
10,87	<i>Ubiquitin Protein Ligase Binding</i>	3 (313)
10,79	<i>Cadherin Binding</i>	3 (319)

Com isso, foram acessadas as principais fontes de dados disponíveis (*KEGG*, *Reactome*, *QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis*, *NCBI BioSystem Database*, dentre outros), que possibilitaram o agrupamento de *pathways* com base na similaridade entre os genes identificados como diferencialmente expressos. Os cinco principais *pathways* para os 13 genes identificados e que apresentaram expressão diferenciada significativa para efeitos de tratamento são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Escores de significância (expresso em $-\log_2$ do valor-P) nome e número de genes diferencialmente expressos (total de genes) associados aos cinco principais pathways identificados para o efeito de tratamento.

Escore	Identificação do <i>pathway</i>	Número de genes (Total de genes)
23,35	<i>Cori Cycle</i>	3 (16)
20,11	<i>Glucogenesis III</i>	3 (36)
19,87	<i>VEGFA-VEGFR2 Signaling</i>	4 (154)
15,19	<i>MAP Kinase Signaling</i>	3 (113)
14,97	<i>Death receptor Signaling Pathway</i>	3 (119)

O *pathway Cori Cycle* foi o que apresentou maior significância ($FDR=9,35E-0,8$) nas análises de enriquecimento. Os genes TPI1 (*triosephosphate isomerase 1*), GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e ALDOA (*aldolase, fructose-bisphosphate A*) foram relacionados aos 16 genes envolvidos nessa via metabólica (Figura 4). O *pathway Glucogenesis III* é um *sub-pathway* do *super pathway* da gliconeogênese e foi o segundo mais significativo ($FDR=8,83E-0,7$). Nesta rota, os genes HSB1 (*heat shock protein family B (small) member 1*), YWHAE (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon*) e YWHAZ (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta*) foram relacionados com outros 36 genes envolvidos (Figura 4).

No ciclo de Cori, a glicose é metabolizada em piruvato e então, em lactato no músculo. Por sua vez, este lactato é liberado na corrente sanguínea e carregado até o fígado onde, a partir de sua reoxidação, será reconvertido a piruvato e utilizado para a gliconeogênese, que resultará na formação de glicose, a qual será liberada na corrente sanguínea e voltará para o músculo (TORNHEIM, 2018). O lactato é um substrato gliconeogênico, uma vez que além de garantir a molécula de piruvato, a cadeia de reação lactato desidrogenase, libera quantidade equivalente de NADH, suficientes para a gliconeogênese (TORNHEIM, 2018).

O *pathway VEGFA-VEGFR2 Signaling*, apresentou os genes ALDOA (*aldolase, fructose-bisphosphate A*), GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) SH3BGRL3 (*SH3 domain binding glutamate rich protein like 3*) e YWHAE (*tyrosine 3-*

monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon), os quais foram relacionados com outros 154 genes envolvidos nesse *pathway* (Figura 5).

A rota *VEGFA-VEGFR2 Signaling* está diretamente relacionada a angiogênese, portanto, a formação de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. O VEGFA é uma citocina multifuncional que atua por meio de receptores, neste caso, o VEGFR2, sendo a principal rota de ativação da angiogênese, através da proliferação, sobrevivência e migração de células endoteliais, e do aumento da permeabilidade vascular (LOHELA *et al.*, 2009). A ligação estabelecida entre VEGFA e VEGFR2 induz a dimerização e autofosforilação do receptor, que por sua vez leva ao recrutamento de moléculas sinalizadoras *downstream* (LOHELA *et al.*, 2009).

Tanto no *pathway MAP Kinase Signaling* quanto no *pathway Death Receptor Signaling* foi evidenciada a presença dos seguintes genes: HSB1 (*heat shock protein family B- small- member 1*), YWHAE (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon*) e YWHAZ (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta*), sendo relacionados a outros 113 genes presentes na rota *MAP Kinase Signaling* (Figura 6) e a 119 outros genes na rota *Death Receptor Signaling* (Figura 6). Ambas as rotas são acionadas a partir de estímulos externos, diretamente ligados a respostas imunológicas a algum fator estressante, estão associadas a morte celular, sendo assim, as ligações proteína-proteína de tais domínios culminam na rota de apoptose.

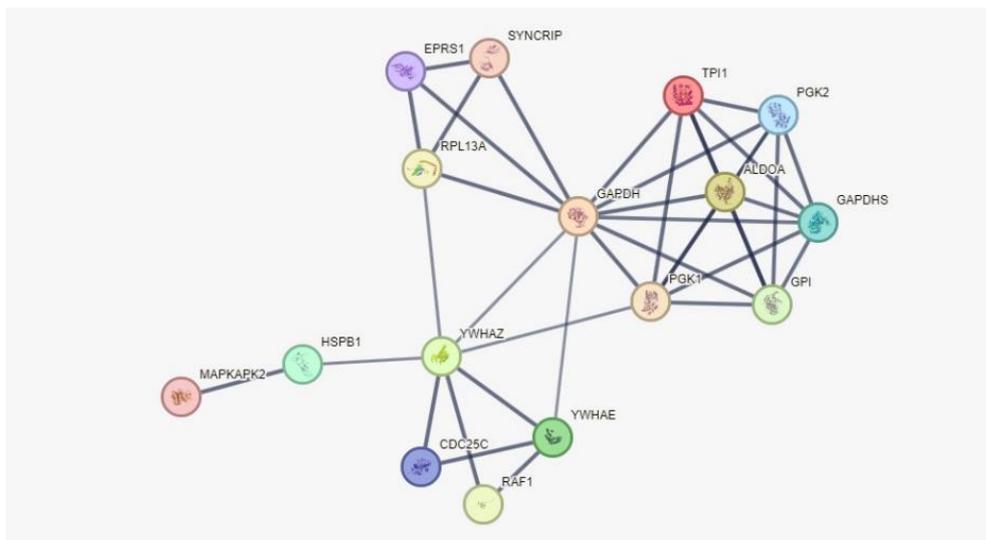


Figura 4. Rede de interação proteína-proteína atuantes nos *pathways* *Cori Cycle* e *Gluconeogenesis III* encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica aos 30 minutos *post mortem*.

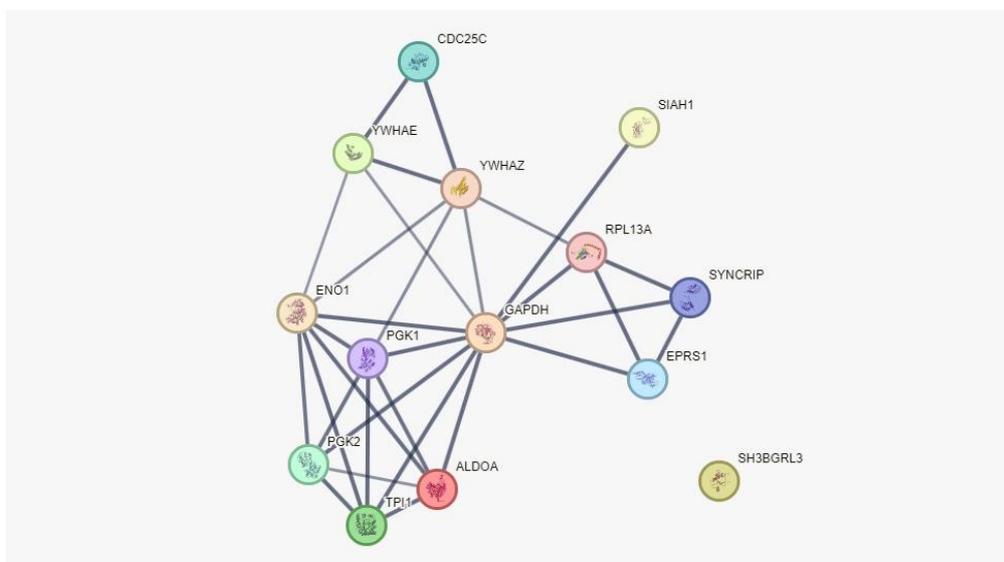


Figura 5. Rede de interação proteína-proteína no *pathway* *VEGFA-VGFR2 Signaling* encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica aos 30 minutos *post mortem*.

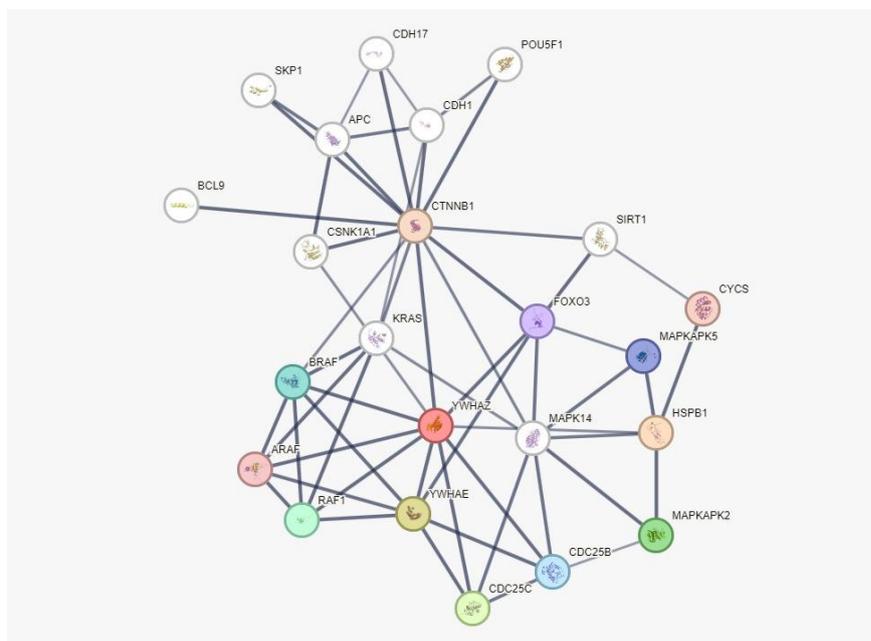


Figura 6. Rede de interação proteína-proteína nos *pathways* *MAP Kinase Signaling* e *Death Receptor Signaling* encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica aos 30 minutos *post mortem*.

5.2.2. Perfil proteômico com 24 horas post mortem

Nas amostras coletadas às 24 horas post mortem (T24), foram detectados 332 spots. Destes, 248 foram mantidos após checagem de distribuição, por se mostrarem presentes em pelo menos três amostras biológicas. Portanto, tais spots foram submetidos à análise de abundância diferencial. Foram identificadas dez proteínas diferencialmente expressas à nível de significância $P < 0,05$ (Tabela 10).

Tabela 10. Média (MED), erro padrão (EP), P-valor e fold change (EE/NE) dos spots referentes às dez proteínas diferencialmente abundantes à nível de significância ($p < 0,05$).

SPOT	NE			EE			p-value	Fold change
	MED	EP		MED	EP			
48	0,130	0,014	A	0,0724	0,0142	B	0,044	0,56
57	1,704	0,115	A	1,1717	0,1256	B	0,035	0,69
61	1,612	0,153	A	0,3607	0,1534	B	0,010	0,22
100	0,296	0,121	B	1,5145	0,1105	A	0,001	5,11
103	1,465	0,221	A	0,4112	0,2421	B	0,032	0,28
122	0,365	0,095	B	0,8513	0,0948	A	0,015	2,33
142	0,129	0,023	A	0,0394	0,0207	B	0,042	0,30
178	0,138	0,047	B	0,3151	0,0474	A	0,045	2,28
195	0,333	0,040	A	0,1658	0,0400	B	0,031	0,50
220	0,860	0,144	A	0,2465	0,1435	B	0,029	0,29

NE – Amostras providas de carcaças não submetidas a estimulação elétrica; EE – amostras providas de carcaças submetidas a estimulação elétrica.

Médias na mesma linha seguidas por letras maiúsculas diferentes entre si, demonstram diferença significativa, ao nível de significância 5%, pelo teste de médias (*t de Student*).

Destas dez proteínas diferencialmente expressas (Figura 7), três foram classificadas como mais abundantes nas amostras EE (*upregulated*), enquanto sete foram classificadas como menos abundantes nas amostras EE (*downregulated*), ou seja, mais abundantes no grupo controle (NE). Além disso, foi encontrada uma proteína que só se expressou em amostras do grupo EE e outra que só se expressou em amostras do grupo NE.

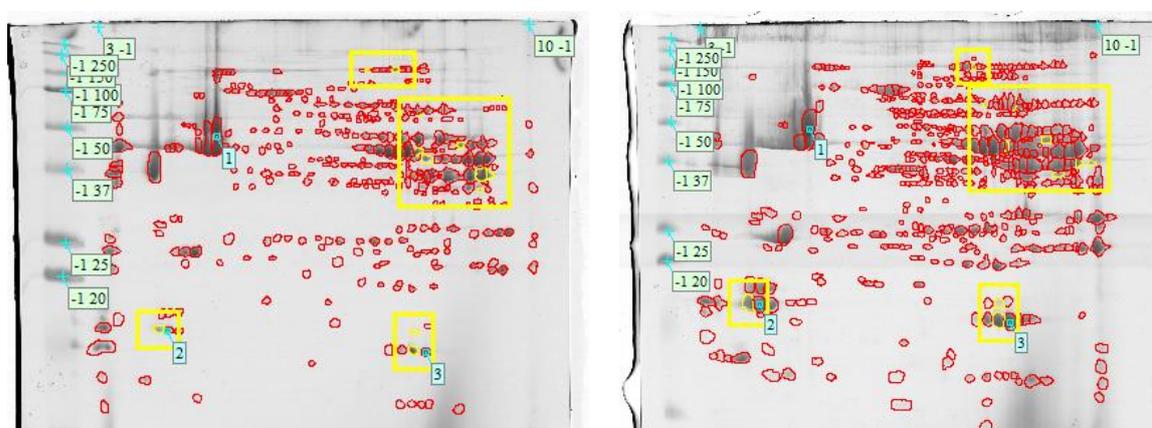


Figura 7. Géis referência de eletroforese bi-dimensional (2-DE) com destaque das proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* com 24 horas *post mortem*.

Os dez *spots* diferencialmente abundantes foram submetidos a análise Espectrometria de Massas visando a identificação dos peptídeos presentes em cada um deles. Os resultados podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11. Genes correspondentes, acessos *Uniprot*, massa molecular (kDa), peptídeos correspondentes, peptídeos únicos e porcentagem de cobertura dos peptídeos, das proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* com 24 horas *post mortem*.

SPOT	Tratamento	Gene	Acesso <i>Uniprot</i>	Massa molecular (kDa)	Peptídeos únicos	Peptídeos cobertos (%)
61	24h	MYLPF	A0A6P5DXE1	19,13	13	51,18
57	24h	MB	A0A6P5BUC2	17,08	13	64,94
48	24h	MB	A0A6P5BUC2	17,08	6	37,66
220	24h	MB	A0A6P5BUC2	17,08	7	42,86
100	24h	GAPDH	A0A6P5BSF2	36,10	13	38,74
103	24h	LDH	A0A6P5B0W1	36,94	7	25,6
195	24h	PGK2	A0A6P5DRH3	45,15	12	28,78
122	24h	PGK2	A0A6P5DRH3	45,15	5	16,55
325	NE 24h	CKM	A0A6P5DBL6	43,22	9	25,46
178	24h	α -GP	A0A6P5BBE6	97,52	23	20,43
142	24h	GPI	A0A6P5DB13	63,08	6	15,08
318	EE 24h	α -GP	A0A6P5BBE6	97,52	21	23,52

Tabela 12. Anotação das proteínas diferencialmente abundantes ($P < 0,05$) e únicas encontradas no músculo bovino *Longissimus thoracis* em amostras submetidos (EE) e não submetidos (NE) à estimulação elétrica com com 24 horas *post mortem*.

Gene	Acesso <i>Uniprot</i>	Descrição da proteína
MYLPF	A0A6P5DXE1	Myosin regulatory light chain 2_ skeletal muscle isoform
MB	A0A6P5BUC2	Myoglobin
GAPDH	A0A6P5BSF2	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
LDH	A0A6P5B0W1	L-lactate dehydrogenase
PGK2	A0A6P5DRH3	Phosphoglycerate kinase
CKM	A0A6P5DBL6	creatine kinase
α -GP	A0A6P5BBE6	Alpha-1_4 glucan phosphorylase
GPI	A0A6P5DB13	Glucose-6-phosphate isomerase

Como observado, foram identificados oito genes responsáveis pela codificação das proteínas diferencialmente abundantes, encontradas no músculo *Longissimus thoracis* às 24 horas *post mortem*, devidamente descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Identificação dos oito genes responsáveis pela codificação das proteínas diferencialmente abundantes encontradas no músculo *Longissimus thoracis* com 24 horas *post mortem*.

Gene	Descrição do gene
CKM	<i>creatine kinase, M-type</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GPI	<i>glucose-6-phosphate isomerase</i>
LDH	<i>lactate dehydrogenase A</i>
MB	<i>myoglobin</i>
MYL11	<i>myosin light chain 11</i>
PGK2	<i>phosphoglycerate kinase 2</i>
α -GP	<i>glycogen phosphorylase, muscle associated</i>

A partir da ontologia gênica (GO) e posterior enriquecimento funcional foi possível relacionar as proteínas identificadas de acordo com processos biológicos, componentes celular e funções moleculares. Desta forma, os resultados mais significativos obtidos na análise de GO, a partir dos oito genes identificados associados aos peptídeos com abundância diferenciada entre os grupos de tratamento (NE e EE), são encontrados na tabela 14.

Tabela 14. Escores de significância (expresso em $-\log_2$ do valor-P), principais categorias e identificação associada de acordo com a Ontologia Gênica (GO), número de genes diferencialmente expressos (total de genes) associados aos DEG com efeito principal significativo de amostras coletadas às 24 horas *post mortem*.

Escore	Categoria/Nome Associado à Ontologia Gênica	Número de genes (Total de genes)
Componente Celular		
17,31	<i>Cytosol</i>	8 (5492)
16,27	<i>Extracellular Exosome</i>	6 (2216)
9,69	<i>Cytoplasm</i>	7 (7312)
7,68	<i>Muscle Myosin Complex</i>	1 (15)
5,79	<i>Myosin Complex</i>	1 (56)
Processo Biológico		
30,66	<i>Glycolytic Process</i>	4 (42)
13,09	<i>Gluconeogenesis</i>	2 (50)
11,59	<i>Hydrogen Peroxide Mediated Signaling Pathway</i>	1 (1)
10,59	<i>Actin-myosin Sliding</i>	1 (2)
9,27	<i>Phosphocreatine Biosynthetic Process</i>	1 (5)
Função Molecular		
11,91	<i>Catalytic Activity</i>	3 (419)
10,59	<i>Glucose-6-phosphate Iomerase Activity</i>	1 (2)
10,59	<i>Phosphoglycerate Kinase Activity</i>	1 (2)
10,59	<i>Peptidyl-cysteine S-nitrosylase Activity</i>	1 (2)
10,00	<i>Glycogen Phosphorylase Activity</i>	1 (3)

Com isso, foram acessadas as principais fontes de dados disponíveis (*KEGG*, *Reactome*, *QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis*, *NCBI BioSystem Database*, dentre outros), que possibilitaram o agrupamento de *pathways* com base na similaridade entre os genes identificados como diferencialmente expressos. Os cinco principais *pathways* para os oito genes identificados e que apresentaram expressão diferenciada significativa para efeitos de tratamento são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Escores de significância (expresso em $-\log_2$ do valor-P), nome e número de genes diferencialmente expressos (total de genes) associados aos cinco principais *pathways* identificados para o efeito de tratamento.

Escore	Identificação do <i>pathway</i>	Número de genes (Total de genes)
35,87	<i>Cori Cycle</i>	4 (17)
22,45	<i>Glucogenesis III</i>	3 (36)
19,40	Glycosaminoglycan Metabolism	4 (298)

18,37	<i>HIF1A and PPARG Regulation of Glycolysis</i>	2 (8)
13,59	<i>L-citrulline Metabolism</i>	2 (42)

Os dois *pathways* identificados como mais significativos com 24 horas *post mortem* foram os mesmos detectados com 30 minutos *post mortem*. O *pathway* *Cori Cycle* (Figura 4) foi o que apresentou maior significância (FDR=1,59E-11) nas análises de enriquecimento, porquanto os genes PGK2 (*phosphoglycerate kinase 2*), GPI (*glucose-6-phosphate isomerase*), LDH (*lactate dehydrogenase A*) e GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) foram relacionados a outros 17 genes envolvidos neste *pathway* (Figura 8). O *pathway* *Gluconeogenesis III* (Figura 4), teve os genes PGK2, GPI e GAPDH associados a outros 36 genes envolvidos nessa rota. Conforme já relatado anteriormente, tanto o ciclo de Cori quanto a gliconeogênese são vias metabólicas utilizadas pelo organismo na busca por gerar energia suficiente em momentos de estresse, quando o glicogênio exógeno não é suficiente para suprir a demanda energética celular. Dessa forma, a partir de subprodutos do metabolismo muscular, como o lactato e a alanina, é possível produzir mais glicose e, assim, mais energia para manter a economia celular em funcionamento.

O *pathway* *Glycosaminoglycan Metabolism* (Figura 8) teve os genes PGK2, GPI, GAPDH e α -GP (*glycogen phosphorylase, muscle associated*) relacionados com outros 298 genes envolvidos nesse *pathway*. Glicosaminoglicanos (GAGs) são polissacarídeos localizados principalmente na matriz extracelular e nas membranas celulares, cuja função, além de participantes de vias de sinalização, está relacionada com a lubrificação de articulações (ESKO *et al.*, 2009). Esta via metabólica está associada ao processo de envelhecimento, o conteúdo de ácido hialurônico presente no tecido conectivo vai diminuindo a medida que o de sulfato de condroitina aumenta, isto de maneira simultânea com a queda da quantidade de água presente no espaço extracelular (ALTMAN E GERBER, 1983).

Já o *pathway* *HIF1A and PPARG Regulation of Glycolysis* (Figura 9), como o nome já sugere, faz parte do superpathway da glicólise, onde os genes LDH e GAPDH foram relacionados com outros oito genes. Na via metabólica em questão, HIF1A e PPARG são mediadores cruciais para o próprio funcionamento e para o anabolismo de lipídeos onde, sob estresse patológico, o HIF1A ativa genes glicolíticos e o PPARG, cujo produto ativa a absorção de ácidos graxos e a biossíntese de genes glicolipídeos. Tais

alterações culminam em um fluxo glicolítico mais intenso, bem como na conversão glicose-lipídeo através das vias glicerol-3-fosfato, apoptose e disfunção contrátil (KRISHNAN *et al.*, 2009).

Por fim, o *pathway L-citrulline Metabolism* (Figura 10), teve os genes CKM (*creatine kinase, M-type*) e MB (*myoglobin*) relacionados com outros 42 genes nas análises de enriquecimento. A citrulina é sintetizada nos enterócitos, a partir da arginina e da glutamina. Ao entrar em outros tecidos, como rins e endotélio vascular, a citrulina pode ser convertida a arginina e óxido nítrico, a partir daí a arginina se fará disponível para utilização. Por sua vez, o óxido nítrico ativa a enzima guanilil ciclase no músculo liso, ocasionando o aumento da concentração intracelular de guanosina monofosfato cíclico, causando vasodilatação (KAORE & KAORE, 2014). Além disso, a citrulina, provinda da ornitina e carbamilsfosfato, é um importante componente do ciclo da ureia no fígado (ENDO *et al.*, 2004).

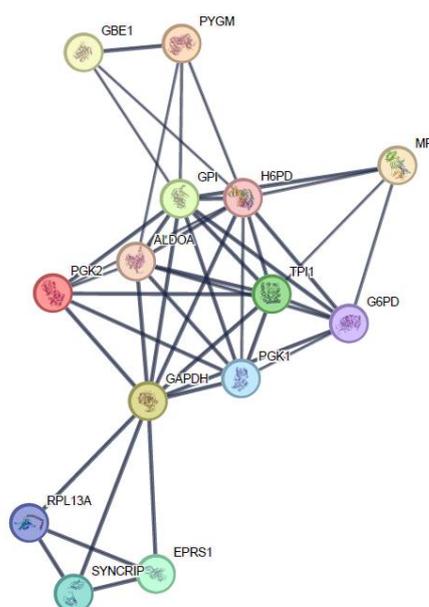


Figura 8. Rede de interação proteína-proteína no *pathway Glycosaminoglycan Metabolism* encontrada no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidas (EE) e não submetidas (NE) à estimulação elétrica às 24 horas *post mortem*.

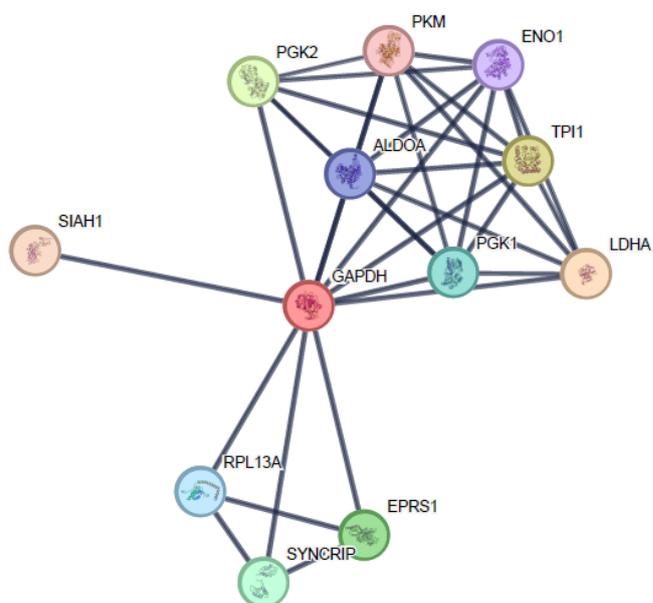


Figura 9. Rede de interação proteína-proteína no *pathway HIF1A and PPARG Regulation of Glycolysis* encontrada no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidas (EE) e não submetidas (NE) à estimulação elétrica às 24 horas *post mortem*.

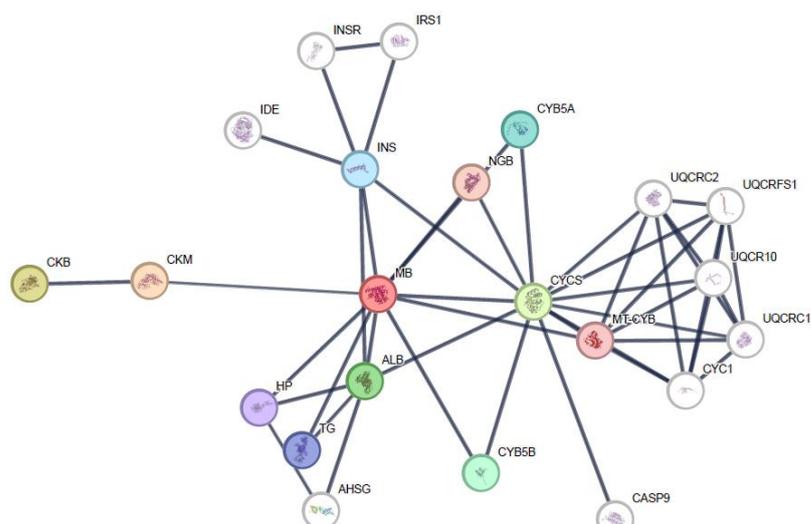


Figura 10. Rede de interação proteína-proteína no *pathway L-citrulline Metabolism* encontrada no músculo bovino *Longissimus thoracis* em carcaças submetidas (EE) e não submetidas (NE) à estimulação elétrica às 24 horas *post mortem*.

É bem estabelecido que a eletroestimulação causa o rápido esgotamento de ATP, creatina fosfato e das reservas de glicogênio contidas no músculo no post mortem (SIMMON et al., 2008). Dessa forma, a alta concentração de proteínas glicolíticas no início do post mortem, como as encontradas no presente estudo, é justificada. A enzima glicolítica GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) é responsável por catalisar a reação de conversão do gliceraldeído-3-fosfato e NAD⁺ para 1,3-bifosfoglicerato e NADH (KIM & DANG, 2005). Em estudo conduzido afim caracterizar o proteoma do músculo *Longissimus lumborum* de carnes com diferentes padrões de estabilidade de cor, enzimas glicolíticas foram apontadas como mais abundantes no grupo de carnes de cor estável (CANTO et al., 2015).

Quanto aos efeitos sobre a maciez, diversos processos bioquímicos são atribuídos à definição de tal característica organoléptica, principalmente relacionadas a mudanças no perfil de proteínas miofibrilares, processos estes como a dissociação parcial da actomiosina, despolarização dos filamentos de F-actina, clivagem dos filamentos de miosina, desorganização das bandas Z e do complexo troponina e tropomiosina (D’ALESSANDRO et al., 2012). Em estudo conduzido com a raça italiana Maremmana, foi observado que o grupo de carnes classificadas como macias, expressou alta concentração de enzimas glicolíticas, as quais estavam sob maior acúmulo de ácido lático, quando comparadas ao grupo de carnes duras (D’ALESSANDRO et al., 2012).

Tendo isso em mente, mudanças observadas na estrutura muscular, destacadas pela presença de proteínas envolvidas na regulação do complexo actina-tropomiosina (TNNT3, TNNT1, MYL1) ou proteínas com relação indireta a funções estruturais (CRYAB, HSB1) já foram previamente demonstradas como mais abundantes (*upregulated*) em carnes macias (D’ALESSANDRO et al., 2012). As análises de enriquecimento conduzidas no presente estudo, confirmaram a presença de proteínas destes grupos (no caso, CKM, CRYAB, HSB1, MYL11, TNNT3, TPI1, YWHAE e YWHAZ) como *upregulated* no grupo EE, confirmando maior maciez observada já nos primeiros momentos do post mortem.

Entretanto, Kim e colaboradores (2013), visando determinar os efeitos da EE de baixa voltagem sobre o processo de amaciamento, diagnosticaram que a mesma não influenciou a proteólise e maciez, mas sim alterou a predominância de proteínas metabólicas em sua forma solúvel no músculo, como GAPDH, ALDOA, PGK1 e PKM. Essa divergência de resultados pode ter sido produto da voltagem utilizada, uma vez que o presente estudo avaliou os efeitos da EE de média voltagem.

Em decorrência da falta de oxigênio e nutrientes, durante o *post mortem*, as células chegarão a apoptose (OUALI et al., 2013). Em decorrência da morte das células musculares, ocorre a desintegração do disco-Z e, portanto, rompimento das fibras musculares ocasionadas por ação enzimática (KEMP et al., 2010). Tendo isso em mente, foi constatado que a identificação de um alto número de proteínas estruturais sustenta os níveis de alteração e enfraquecimento de proteínas miofibrilares durante a proteólise e consequente amaciamento (HOPKINS & GEESINK, 2009). Dessa forma, os níveis de fragmentação miofibrilar ocasionados pela eletroestimulação nas primeiras horas do *post mortem*, embasados pelas proteínas encontradas e subsequente análise de maciez realizada no presente estudo, demonstram amaciamento antecipado de carnes do grupo EE.

Gagaoua e equipe (2021) identificaram 124 biomarcadores proteicos para maciez, baseado em 28 estudos proteômicos, os quais foram categorizados em 6 classes (metabolismo energético; transporte, sinalização e apoptose; contráteis e proteínas associadas; chaperonas e *heat shock proteins*; estresse oxidativo e proteólise). Destes, foram encontrados 16, sendo 10 aos 30 minutos (YWHAE, MYLPLF, CRYAB, HSPB1, TPI1, GAPDH, TNNT3, CKM, ALDOA, SH3BG) e 6 às 24 horas (MYPLF, MB, GAPDH, LDH, CKM, GPI).

A abundância de proteínas musculares pode variar sob efeito de diversos fatores, como: propriedades musculares, diferenças anatômicas ou de metabolismo entre os músculos que compõem a carcaça (PICARD *et al.*, 2018), mudanças no início do *post mortem*, que podem resultar em diferenças dentro do mesmo músculo, logo, dependendo do período avaliado (ZHANG *et al.*, 2020) ou, até mesmo, durante o processo de tenderização da carne, enquanto este acontece em fase dependente do declínio do pH (GAGAOUA *et al.*, 2021). Dessa forma, com base nos resultados do presente estudo, podemos afirmar que eletroestimulação de carcaças de média voltagem pode ser uma boa alternativa para melhorias em aspectos de qualidade da carne, como cor e maciez, já nas primeiras horas do *post mortem*.

6. CONCLUSÃO

A eletroestimulação de carcaças tem se consagrado como ferramenta amplamente difundida na busca por melhorar aspectos de qualidade da carne, como cor e maciez. Os resultados do presente estudo, indicaram que o emprego da eletroestimulação de média voltagem no processo de abate pode culminar em ganhos satisfatórios, auxiliando na

queda acentuada do pH e na antecipação de fenômenos proteolíticos no *post mortem*, proporcionando carnes com melhores indicadores de qualidade, portanto com cor atrativa e mais macias. Dessa forma, a utilização da eletroestimulação pela indústria pode contribuir para a produção de carnes de melhor qualidade, favorecendo a padronização do produto brasileiro frente ao mercado mundial que cresce em exigências.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC). **Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil**, 2020. Disponível em <<http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2020/>>.

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC). **Beef Report: Capítulo 1 – Exportações de carne bovina**, 2023a. Disponível em <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-01/#dfliip-df_5327/1/>.

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC). **Beef Report: Capítulo 3 – A pecuária mundial**, 2023b. Disponível em <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-03/#dfliip-df_5402/1/>.

Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC). **Beef Report: Capítulo 4 – A pecuária do Brasil**, 2023c. Disponível em <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023-capitulo-04/#dfliip-df_5424/1/>.

ABERLE, Elton D. et al. Principles of meat science, 4th edn. Kendall. 2001.

ADEYEMI, Kazeem Dauda; SAZILI, Awis Qurni. Efficacy of carcass electrical stimulation in meat quality enhancement: A review. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 27, n. 3, p. 447, 2014.

ADZITEY, Frederick; NURUL, Huda. Pale soft exudative (PSE) and dark firm dry (DFD) meats: causes and measures to reduce these incidences-a mini review. 2011.

AKAIKE, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: **Proceedings of the Second International Symposium on Information Theory**. Budapest: Akademiai Kiado, p.: 267–281, 1973.

ALTMAN, Kurt I.; GERBER, George B. The effect of ionizing radiations on connective tissue. In: **Advances in radiation biology**. Elsevier, p. 237-304, 1983.

AMSA. **Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness measurements of meat**. 2nd ed. American Meat Science Association, Champaign, Illinois, 2015.

BALAN, Prabhu et al. Effects of electrical stimulation and pre-rigor conditioning temperature on aging potential of hot-boned beef *M. longissimus lumborum*. **Animal Science Journal**, v. 90, n. 8, p. 1050-1059, 2019.

BECKER, Tilman. Consumer perception of fresh meat quality: a framework for analysis. **British Food Journal**, v. 102, n. 3, p. 158-176, 2000.

BEN-ARI FUCHS, Shani et al. GeneAnalytics: an integrative gene set analysis tool for next generation sequencing, RNAseq and microarray data. **Omic: a journal of integrative biology**, v. 20, n. 3, p. 139-151, 2016.

BENDIXEN, Emøke. The use of proteomics in meat science. **Meat science**, v. 71, n. 1, p. 138-149, 2005.

BOUDON, Sabrina et al. Label free shotgun proteomics for the identification of protein biomarkers for beef tenderness in muscle and plasma of heifers. **Journal of proteomics**, v. 217, p. 103685, 2020.

BOULEY, Julien; CHAMBON, Christophe; PICARD, Brigitte. Mapping of bovine skeletal muscle proteins using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 4, n. 6, p. 1811-1824, 2004.

BOUTON, P. E. et al. Electrical stimulation of beef sides. **Meat science**, v. 4, n. 2, p. 145-155, 1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – **RIISPOA** aprovado pelo Decreto nº 9.013. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 mar. 2017.

BREIMAN, Leo; FRIEDMAN, Jerome H. Estimating optimal transformations for multiple regression and correlation. **Journal of the American statistical Association**, v. 80, n. 391, p. 580-598, 1985.

CANTO, Anna CVCS et al. Differential abundance of sarcoplasmic proteome explains animal effect on beef Longissimus lumborum color stability. **Meat science**, v. 102, p. 90-98, 2015.

CARVALHO, Minos Esperândio et al. Heat shock and structural proteins associated with meat tenderness in Nellore beef cattle, a Bos indicus breed. **Meat science**, v. 96, n. 3, p. 1318-1324, 2014.

CETIN, Omer; TOPCU, Tuna. Effects of electrical stimulation on meat quality in goat carcasses. **J Food Agric Environ**, v. 7, n. 3&4, p. 101-105, 2009.

CHRYSTALL, Brian B.; DEVINE, Carrick E.; DAVEY, C. Lester. Studies in electrical stimulation: Post-mortem decline in nervous response in lambs. **Meat Science**, v. 4, n. 1, p. 69-76, 1980.

CROSS, H. R. Effects of electrical stimulation on meat tissue and muscle properties-a review. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 2, p. 509-514, 1979.

DAVEY, Colin Lester; GILBERT, Kevin V. Studies in meat tenderness. 7. Changes in the fine structure of meat during aging. **Journal of Food Science**, v. 34, n. 1, p. 69-74, 1969.

D'ALESSANDRO, Angelo et al. Love me tender: An Omics window on the bovine meat tenderness network. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4360-4380, 2012.

DE LEEUW, Jan. Regression with optimal scaling of the dependent variable. In: **Proceedings of the International summer school on problems of model choice and parameter estimation in Regression Analysis**, 7th, Proceedings Humboldt University of Leiden, Report n. 84, p. 99-111, 1986.

DELGADO, Eduardo Francisquine; SORIA, R. F. Princípios e fundamentos dos métodos de predição da maciez em carne bovina. **Qualidade da carne**, 2006.

DJIMSA, Blanchefort A. et al. The Impact of Carcass Size, Chilling Conditions, and Electrical Stimulation on Beef Postmortem Temperature and pH Decline. **Meat and Muscle Biology**, v. 6, n. 1, 2022.

EIKELENBOOM, G. Effects of various processing methods on the quality of beef and pork. In: **International Congress of Meat Science and Technology**. Calgary: Alberta, 1993. p. 95-106.

ENDO, Fumio et al. Clinical manifestations of inborn errors of the urea cycle and related metabolic disorders during childhood. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 6, p. 1605S-1609S, 2004.

ESKO, Jeffrey D.; KIMATA, Koji; LINDAHL, Ulf. Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. **Essentials of Glycobiology**. 2nd edition, 2009.

FERGUSON, Drewe M. et al. Effect of electrical stimulation on protease activity and tenderness of M. longissimus from cattle with different proportions of Bos indicus content. **Meat Science**, v. 55, n. 3, p. 265-272, 2000.

GAGAOUA, Mohammed; TERLOUW, EM Claudia; PICARD, Brigitte. The study of protein biomarkers to understand the biochemical processes underlying beef color development in young bulls. **Meat science**, v. 134, p. 18-27, 2017.

GAGAOUA, Mohammed et al. Proteomic biomarkers of beef colour. **Trends in Food Science & Technology**, v. 101, p. 234-252, 2020.

GAGAOUA, Mohammed et al. Molecular signatures of beef tenderness: Underlying mechanisms based on integromics of protein biomarkers from multi-platform proteomics studies. **Meat science**, v. 172, p. 108311, 2021.

GAGAOUA, Mohammed; PICARD, Brigitte. Proteomics to explain and predict meat quality. In: **New Aspects of Meat Quality**. Woodhead Publishing, p. 393-431, 2022.

GEESINK, G. H. et al. Effects of stress and high voltage electrical stimulation on tenderness of lamb m. longissimus. **Meat Science**, v. 57, n. 3, p. 265-271, 2001.

GLITSCH, Kristina. Consumer perceptions of fresh meat quality: cross-national comparison. **British Food Journal**, v. 102, n. 3, p. 177-194, 2000.

- GÓRSKA-WARSEWICZ, Hanna et al. Food products as sources of protein and amino acids—The case of Poland. **Nutrients**, v. 10, n. 12, p. 1977, 2018.
- HECTOR, D. A. et al. Relationship between myosin denaturation and the colour of low-voltage-electrically-stimulated beef. **Meat science**, v. 31, n. 3, p. 299-307, 1992.
- HOLLUNG, Kristin et al. Application of proteomics to understand the molecular mechanisms behind meat quality. **Meat Science**, v. 77, n. 1, p. 97-104, 2007.
- HOPKINS, D. L.; GEESINK, G. H. Protein degradation post mortem and tenderisation. **Applied muscle biology and meat science**, p. 149-173, 2009.
- HOPKINS, D. L. et al. The effect of pH decline rate on the meat and eating quality of beef carcasses. **Animal Production Science**, v. 54, n. 4, p. 407-413, 2014.
- HUANG, Da Wei; SHERMAN, Brad T.; LEMPICKI, Richard A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009.
- HWANG, I. H.; THOMPSON, J. M. The effect of time and type of electrical stimulation on the calpain system and meat tenderness in beef longissimus dorsi muscle. **Meat science**, v. 58, n. 2, p. 135-144, 2001.
- HWANG, I. H.; DEVINE, C. E.; HOPKINS, D. L. The biochemical and physical effects of electrical stimulation on beef and sheep meat tenderness. **Meat science**, v. 65, n. 2, p. 677-691, 2003.
- HWANG, I. H. et al. Assessment of postmortem proteolysis by gel-based proteome analysis and its relationship to meat quality traits in pig longissimus. **Meat Science**, v. 69, n. 1, p. 79-91, 2005.
- Ji, Xianqiu et al. Effect of medium voltage electrical stimulation and prior ageing on beef shear force during superchilled storage. **Meat Science**, v. 172, p. 108320, 2021.
- JIA, Xiaohong et al. Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the early postmortem storage period. **Journal of proteome research**, v. 6, n. 7, p. 2720-2731, 2007.
- JIA, X. et al. Peroxiredoxin-6—A potential protein marker for meat tenderness in bovine longissimus thoracis muscle. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 7, p. 2391-2399, 2009.
- JUÁREZ, M. et al. Beef texture and juiciness. **Handbook of meat and meat processing**, v. 9, p. 177-206, 2012.
- KAORE, Shilpa N.; KAORE, Navinchandra M. Citrulline: Pharmacological perspectives and role as a biomarker in diseases and toxicities. In: **Biomarkers in toxicology**. Academic Press, p. 883-905, 2014.
- KEMP, Caroline M. et al. Tenderness—An enzymatic view. **Meat science**, v. 84, n. 2, p. 248-256, 2010.

KIM, Jung-whan; DANG, Chi V. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. **Trends in biochemical sciences**, v. 30, n. 3, p. 142-150, 2005.

KIM, Y. H. B. et al. Effect of low voltage electrical stimulation on protein and quality changes in bovine muscles during postmortem aging. **Meat science**, v. 94, n. 3, p. 289-296, 2013.

KLONT, R. E.; BROCKS, L.; EIKELENBOOM, G. Muscle fibre type and meat quality. **Meat science**, v. 49, p. S219-S229, 1998.

KRISHNAN, Jaya et al. Activation of a HIF1 α -PPAR γ axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. **Cell metabolism**, v. 9, n. 6, p. 512-524, 2009.

LAGE, J. F. et al. Influence of genetic type and level of concentrate in the finishing diet on carcass and meat quality traits in beef heifers. **Meat Science**, v. 90, n. 3, p. 770-774, 2012.

LAMETSCH, René et al. Postmortem proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 6992-6997, 2003.

LAWRIE, R. A.; LEDWARD, D. A. The storage and preservation of meat. I. Temperature control. **Lawrie's Meat Science**. 7th ed. Boca Raton New York Washington, DC: CRC, p. 192-202, 2006.

LISTRAT, Anne et al. How muscle structure and composition influence meat and flesh quality. **The Scientific World Journal**, v. 2016, 2016.

LOHELA, Marja et al. VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 2, p. 154-165, 2009.

LYFORD, Conrad P. et al. Is willingness to pay (WTP) for beef quality grades affected by consumer demographics and meat consumption preferences?. **Australasian Agribusiness Review**, v. 18, n. 1673-2016-136845, p. 1-17, 2010.

MATARNEH, Sulaiman K.; SCHEFFLER, Tracy L.; GERRARD, David E. The conversion of muscle to meat. In: **Lawrie's meat science**. Woodhead Publishing, p. 159-194, 2023.

MCKENNA, D. R.; MADDOCK, D.; SAVELL, J. W. Water-holding and color characteristics of beef from electrically stimulated carcasses. **Journal of Muscle Foods**, v. 14, n. 1, p. 33-49, 2003.

MUCHENJE, V. et al. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A review. **Food chemistry**, v. 112, n. 2, p. 279-289, 2009.

MULLINS, C. R. et al. Bos indicus cattle possess greater basal concentrations of HSP27, alpha B-crystallin, and HSP70 in skeletal muscle in vivo compared with Bos taurus cattle. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 1, p. 424-429, 2016.

- MANCINI, R. A.; HUNT, MCy. Current research in meat color. **Meat science**, v. 71, n. 1, p. 100-121, 2005.
- NAIR, Mahesh N. et al. Changes in the sarcoplasmic proteome of beef muscles with differential color stability during postmortem aging. **Meat and Muscle Biology**, v. 2, n. 1, 2018.
- NASSU, Renata Tiekio et al. Qualidade e perfil sensorial descritivo da carne maturada proveniente de animais cruzados. **Atas de Saúde Ambiental-ASA (ISSN 2357-7614)**, v. 1, n. 1, p. 13-25, 2013.
- NAZLI, B. et al. Effects of high voltage electrical stimulation on meat quality of beef carcasses. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 3, p. 556-560, 2010.
- OFFER, Gerald. Modelling of the formation of pale, soft and exudative meat: Effects of chilling regime and rate and extent of glycolysis. **Meat Science**, v. 30, n. 2, p. 157-184, 1991.
- OUALI, Ahmed et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. **Meat science**, v. 74, n. 1, p. 44-58, 2006.
- OUALI, Ahmed et al. Biomarkers of meat tenderness: present knowledge and perspectives in regards to our current understanding of the mechanisms involved. **Meat science**, v. 95, n. 4, p. 854-870, 2013.
- PAREDI, Gianluca et al. "Muscle to meat" molecular events and technological transformations: The proteomics insight. **Journal of proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4275-4289, 2012.
- PEARCE, K. L. et al. Quantifying the rate of pH and temperature decline in lamb carcasses using medium voltage electrical stimulation in an Australian abattoir. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 46, n. 7, p. 869-874, 2006.
- PEARCE, K. L. et al. Case studies demonstrating the benefits on pH and temperature decline of optimising medium-voltage electrical stimulation of lamb carcasses. **Animal Production Science**, v. 50, n. 12, p. 1107-1114, 2010.
- PICARD, Brigitte et al. Skeletal muscle proteomics in livestock production. **Briefings in functional genomics**, v. 9, n. 3, p. 259-278, 2010.
- PICARD, Brigitte et al. Beef tenderness and intramuscular fat proteomic biomarkers: muscle type effect. **PeerJ**, v. 6, p. e4891, 2018.
- POLETI, Mirele Daiana et al. Label-free quantitative proteomic analysis reveals muscle contraction and metabolism proteins linked to ultimate pH in bovine skeletal muscle. **Meat science**, v. 145, p. 209-219, 2018.
- POLETI, Mirele D. et al. Proteome alterations associated with the oleic acid and cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content in bovine skeletal muscle. **Journal of proteomics**, v. 222, p. 103792, 2020.

PONNAMPALAM, Eric N. et al. Causes and contributing factors to “dark cutting” meat: Current trends and future directions: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 3, p. 400-430, 2017.

RAMANATHAN, Ranjith; SUMAN, Surendranath P.; FAUSTMAN, Cameron. Biomolecular interactions governing fresh meat color in post-mortem skeletal muscle: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 46, p. 12779-12787, 2020.

RODRIGUES, Rafael Torres de Souza et al. Differences in beef quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nellore (*Bos taurus indicus*) cattle through a proteomic and phosphoproteomic approach. **PloS one**, v. 12, n. 1, p. e0170294, 2017.

ROSA, Alessandra F. et al. Proteome changes of beef in Nellore cattle with different genotypes for tenderness. **Meat science**, v. 138, p. 1-9, 2018.

SAMS, A. L. A. N. Commercial implementation of postmortem electrical stimulation. **Poultry science**, v. 78, n. 2, p. 290-294, 1999.

SAYD, Thierry et al. Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: implications on meat color development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2732-2737, 2006.

SHEVCHENKO, Andrej et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2006.

SIMMONS, N. J. et al. Reassessing the principles of electrical stimulation. **Meat Science**, v. 80, n. 1, p. 110-122, 2008.

SUMAN, Surendranath P.; JOSEPH, Poulson. Myoglobin chemistry and meat color. **Annual review of food science and technology**, v. 4, p. 79-99, 2013.

TAYLOR, A. A.; MARTOCCIA, L. The effect of low voltage and high voltage electrical stimulation on pork quality. **Meat Science**, v. 39, n. 3, p. 319-326, 1995.

THOMPSON, John. Managing meat tenderness. **Meat Science**, v. 62, n. 3, p. 295-308, 2002.

TOMASEVIC, Igor et al. Recent advances in meat color research. **Current Opinion in Food Science**, v. 41, p. 81-87, 2021.

TORNHEIM, Keith. Glucose metabolism and hormonal regulation. **Encyclopedia of Endocrine Diseases**, v. 1, p. 87-94, 2018.

TROY, Declan J. Hot-boning of meat: A new perspective. **Food Science and Technology – New York – Marcel Dekker**, v. 158, p. 73, 2006.

WARNER, R. D. et al. Genetic and environmental effects on meat quality. **Meat science**, v. 86, n. 1, p. 171-183, 2010.

WARNER, Robyn D. et al. Meat tenderness: Advances in biology, biochemistry, molecular mechanisms and new technologies. **Meat Science**, v. 185, p. 108657, 2022.

WILKINS, Marc R. et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. **Bio/technology**, v. 14, n. 1, p. 61-65, 1996.

WYNESS, Laura. The role of red meat in the diet: nutrition and health benefits. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 75, n. 3, p. 227-232, 2016.

YANG, Jieun; DASHDORJ, Dashmaa; HWANG, Inho. Volatile Flavor Components as a Function of Electrical Stimulation and Chiller Aging for m. longissimus and biceps femoris of Hanwoo Beef. **Food science of animal resources**, v. 39, n. 3, p. 474, 2019.

YOUNG, Forrest W. Quantitative analysis of qualitative data. **Psychometrika**, v. 46, p. 357-388, 1981.

ZHANG, Yi-min et al. Characterisation of pH decline and meat color development of beef carcasses during the early postmortem period in a Chinese beef cattle abattoir. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 17, n. 7, p. 1691-1695, 2018.

ZHANG, Xue et al. Early postmortem proteome changes in normal and woody broiler breast muscles. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 68, n. 39, p. 11000-11010, 2020.

ZHAO, Gaiming et al. The effect of shower time, electrolyte treatment, and electrical stimulation on meat quality of cattle longissimus thoracis muscle in cold weather. **Meat Science**, v. 184, p. 108664, 2022.