

Efeito do grupo genético e suplementação com óleo no metaboloma da carne de bovinos

Luís Filipe Monteiro da Silva

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Zootécnica – Produção Animal

Orientadores: Professor Doutor Saulo da Luz e Silva
Professor Doutor Rui José Branquinho de Bessa

Júri:

Presidente: Doutor João Pedro Bengala Freire, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Rui José Branquinho de Bessa, Professor Associado da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, orientador;

Doutor André Martinho de Almeida, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

A realização desta dissertação só foi possível com a ajuda e colaboração de várias pessoas e entidades, às quais quero expressar o meu agradecimento.

Em primeiro, gostaria de agradecer à minha família, aos meus pais e irmã, por todo o apoio, esforço e sacrifícios que fizeram para me poder proporcionar toda a minha educação académica. Sem eles esta fase da minha vida não seria possível e, por isso estarei para sempre grato por tudo.

Aos meus amigos, colegas de curso e, especialmente, à minha namorada por todo o apoio e incentivo que me deram.

Ao Professor Doutor Saulo da Luz e Silva, da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, pelo acolhimento e pela orientação prestada ao longo de todo o trabalho.

Ao Professor Doutor Rui José Branquinho de Bessa, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, pela disponibilidade que teve para me ajudar, orientar e pelas suas críticas construtivas neste trabalho.

À Doutora Nara Cònsolo, da FZEA – USP, por toda a sua paciência, ajuda, disponibilidade e partilha de conhecimentos e opiniões críticas oferecidas no decorrer deste estudo.

À EMBRAPA - Instrumentação de São Carlos pela colaboração e por me ter proporcionado a possibilidade de realizar a parte laboratorial deste trabalho nas suas instalações, assim como a cedência de materiais e equipamentos necessários.

Aos colegas do Departamento de Zootecnia da FZEA – USP por toda a colaboração prestada.

Um grande obrigado a todos!

Resumo

Investigou-se a influência do grupo genético e da inclusão de óleo de soja na dieta, sobre o metaboloma da carne de bovinos. Trinta bovinos Nelore (*B. indicus*) e 30 bovinos Nelore x Angus (*B. indicus* x *B. taurus*) foram alimentados em confinamento durante 100 dias, com duas dietas: dieta controle, sem óleo de soja (DC) e uma dieta contendo 3,5% de óleo de soja (DO). Após o abate amostras do músculo *Longissimus* foram colhidas, deixadas a maturar por 72 horas e utilizadas para avaliação do metaboloma, através de análises de Ressonância Magnética Nuclear (NMR). Os dados foram analisados através de uma Análise de Componentes Principais (PCA). Foram identificados 42 metabólitos presentes em todas as amostras de carnes e conseguiu-se quantificar 29. Entre eles destacam-se o glicerol (130 μ molar), lactato (21,6 μ molar), ácido glucónico (11 μ molar) e a creatinina (10,3 μ molar) com maior concentração. Observou-se que não houve formação de grupos específicos em função do tratamento, sugerindo não haver diferenças no metaboloma das amostras de carne de bovinos devido à influência do grupo genético e da dieta.

Palavras-chave

Metaboloma; metabólito; carne de bovino; óleo de soja; ressonância magnética nuclear.

Abstract

The influence of the genetic group and supplementation with soybean oil on bovine meat metabolome was investigated. Thirty Nelore bulls (*B. indicus*) and 30 Nelore x Angus crossbreed bulls (*B. indicus* x *B. taurus*) were in confinement for 100 days, with two diets: control diet, without soybean oil (DC) and a diet containing 3,5% soybean oil (DO). After slaughter, samples of the *Longissimus* muscle were collected, matured for 72 hours and used for evaluation of the metabolomic profile, using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) analysis. Data were analysed through a Principal Component Analysis (PCA). A total of 42 metabolites were identified in all the meat samples and 29 were quantified. Among them, glycerol (130 µmol), lactate (21.6 µmol), gluconic acid (11 µmol) and creatinine (10, 3 µmol) had higher concentration. It was observed that there was no formation of specific groups depending on the treatment, suggesting that there were no differences in the metabolome of bovine meat samples due to the influence of the genetic group and the diet.

Keywords

Metabolome; metabolite; beef; soybean oil; nuclear magnetic resonance.

Índice

Agradecimentos	2
Resumo.....	3
Abstract.....	4
Índice de Tabelas.....	6
Índice de Figuras.....	7
Índice de Abreviaturas.....	8
1. Introdução	9
2. Enquadramento Teórico.....	10
2.1. Caracterização do sector	10
2.2. Diferenças entre subespécies	11
2.3. Suplementação com óleo.....	15
2.4. Conceito de Qualidade: Características importantes na carne	16
2.5. Metabolómica.....	18
2.6. Ressonância Magnética Nuclear (NMR).....	19
3. Material e Métodos.....	21
3.1. Animais	21
3.2. Abate	22
3.3. Preparação de amostras	22
3.4. Análise de Ressonância Magnética Nuclear	23
3.5. Análise de dados.....	23
4. Resultados e Discussão	24
5. Conclusões	38
6. Referências Bibliográficas	39

Índice de Tabelas

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

Tabela 2 – Lista de metabolitos encontrados na carne e a sua concentração (μ molar).

Índice de Figuras

Figura 1 – Exemplar da subespécie <i>Bos taurus indicus</i> da raça Nelore. Fonte (Revista Pecuária Brasil, 2015).	12
Figura 2 – Exemplar da subespécie <i>Bos taurus taurus</i> da raça Aberdeen Angus. Fonte: (Eurogene Ai Services, s.d.).....	12
Figura 3 – PCA dos metaboloma em função dos tratamentos. Pontos: verdes (Nelore e DC); pretos (cruzados e DC); vermelhos (Nelore e DO); azuis (cruzados e DO).	26
Figura 4 – <i>Loading plot</i> do modelo de PCA da carne, mostrando a variabilidade e distribuição dos metabolitos nos componentes principais.....	30
Figura 5 – PCA do metaboloma da carne de animais cruzados em função da dieta. Pontos: pretos (dieta controlo); azuis (dieta suplementada).	33
Figura 6 – PCA do metaboloma da carne de animais Nelore em função da dieta. Pontos: azuis (dieta controlo); pretos (dieta suplementada).	34
Figura 7 – Identificação dos metabolitos em função dos componentes principais, no grupo genético de animais cruzados.	36
Figura 8 – Identificação dos metabolitos em função dos componentes principais, no grupo genético de animais Nelore.	36
Figura 9 – Janela espectral das zonas de maior variabilidade do metaboloma nos componentes principais.....	37

Índice de Abreviaturas

ADP – Adenosina difosfato

AMP – Adenosina monofosfato

ATP – Adenosina trifosfato

CLA - Ácido linoleico conjugado

DC – Dieta de controlo

DO – Dieta suplementada com óleo de soja

FZEA – USP – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

GMD – Ganho médio diário

NADH – Forma reduzida do dinucleótido de nicotinamida e adenina

IMP – Inosina monofosfato

IMS – Ingestão de matéria seca

MS – Matéria seca

PC – Componente principal

PCA - Análise de componentes principais

NMR – Ressonância magnética nuclear

1. Introdução

A metabolômica é uma ferramenta útil na identificação e quantificação de metabolitos de vários tecidos e bio fluidos (Sundekilde et al., 2011; Osorio et al., 2012). Dessa forma, pode vir a desempenhar um papel importante na descoberta de bio-marcadores e vias metabólicas que resultam da resposta a fatores externos ao organismo.

Sabe-se que a nutrição e a genética são fatores que influenciam o desempenho produtivo dos animais. Tanto ao nível dos parâmetros do crescimento e desenvolvimento durante a vida produtiva, como posteriormente nas características das suas carcaças e da carne que produzem (D'Alessandro et al. , 2011). O confinamento dos animais e a utilização de dietas energéticas na fase final de vida dos bovinos é uma prática comum que possibilita melhorar a conformação muscular dos animais e a deposição de gordura de cobertura na carcaça, que terá um papel importante da qualidade da carne. A escolha da raça está dependente do meio ambiente em que acontece a produção e do tipo de produto que se quer produzir. É por isso que os produtores pecuários optam por utilizar determinados tipos de dietas e sistemas de alimentação, assim como umas raças em detrimentos de outras. O conhecimento destes aspetos técnicos é o que possibilita obter mais ou menos rendimentos e satisfazer as exigências do mercado.

Espera-se que a metabolômica auxilie na descoberta de como determinados processos ocorridos *ante-mortem* e *post-mortem* influenciam a composição da carne que consumimos. Especialmente os fatores que atuam sobre as características físico-químicas e organolépticas mais valorizadas da carne, nomeadamente a tenrura e o *flavour*.

Alguns estudos já foram realizados para tentar perceber como os tratamentos *post-mortem* podem influenciar o metaboloma da carne e correlacioná-los com as suas características (Zanardi et al., 2015; Kim et al., 2016; Graham et al., 2010). Contudo, muito pouca investigação foi feita no âmbito de tentar perceber como fatores *in vivo* têm a capacidade de diferenciar o metaboloma desse produto. Conhecendo-se apenas 2 trabalhos que analisaram separadamente como a raça e a dieta influenciam o metaboloma dos músculos, ao invés da carne (Ritota et al., 2012; Osorio et al., 2012).

Por essa razão e a partir do pressuposto de existirem diferenças no metaboloma da carne causadas por fatores como a alimentação e a genética, o objetivo deste trabalho é estudar, em simultâneo, o efeito do grupo genético e da suplementação com óleo no metaboloma da carne de bovinos.

2. Enquadramento Teórico

2.1. Caracterização do sector

A população mundial, no ano de 2015, era aproximadamente 7,3 mil milhões de pessoas (Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics [FAOSTAT], 2016), no entanto, as previsões sugerem que esse número irá aumentar até 2050, atingindo cerca de 9,1 mil milhões (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2009). Este aumento da concentração populacional trará alterações significativas no estilo de vida e no consumo alimentar, esperando-se uma maior procura por alimentos processados e prontos a comer, impulsionando a uma reestruturação e crescimento da cadeia alimentar e consequentemente um aumento da produção mundial de alimentos e da segurança alimentar para colmatar a procura do mercado. Os desafios que se esperam para o setor da carne de bovino são uma adequada resposta à procura, expansão da rede de distribuição, redução de preços e sustentabilidade do setor, juntamente com preocupações ambientais.

A carne de bovino é um dos principais tipos de carne consumida em todo o mundo. Dados referentes aos últimos anos de produção mostram um gradual aumento, tendo sido produzidas, em 2013, cerca de 64 milhões de toneladas, mais 1 milhão do que em 2012 e mais 7 milhões do que em 2003.

É, sobretudo, em regiões tropicais nos continentes americanos e asiático onde se registam as maiores produções e onde existe um grande potencial para o contínuo crescimento produtivo do sector. Nestas regiões, tropicais e subtropicais, encontra-se um conjunto de fatores que favorecem a produção pecuária de bovinos, nomeadamente, o espaço, o alimento animal de baixo custo, como as pastagens, e a disponibilidade de água. É por isso que a produção de carne nos países em desenvolvimento será 20% superior, em 2025, relativamente à registada atualmente, enquanto nos países desenvolvidos a produção será apenas 7% superior. Estima-se que a Argentina, o Brasil, a Índia e a China produzirão 2/3 da carne bovina para consumo humano, enquanto a Europa irá diminuir a sua produção principalmente devido à redução do seu rebanho e à baixa rentabilidade do sector como consequência do elevado custo da alimentação animal (OECD/FAO, 2016).

Em relação ao consumo da carne de bovino, este mostrou uma tendência crescente nos últimos anos, tendo sido consumidas 67.5 milhares de toneladas em todo o planeta, no ano de 2015 (Organization for Economic Co-operation and Development [OECD], 2016), esperando-se um contínuo aumento pela procura, particularmente em países em desenvolvimento, devido ao rápido crescimento populacional nestas regiões, estando

previsto um aumento de 6% em países desenvolvidos e 21% em países em desenvolvimento, em 2025 (OECD/FAO, 2016).

As estimativas do preço nominal da carne de bovino apontam para uma queda no seu valor que irá permanecer até 2020. Após este período, os custos com a alimentação animal irão aumentar, provocando um atraso no crescimento da produção e colocando pressão no aumento dos preços da carne, que só poderá ser combatido com a melhoria dos índices zootécnicos e da produtividade, através da alimentação e criação de raças mais produtivas (OECD/FAO, 2016).

2.2. Diferenças entre subespécies

Na bovinicultura para produção de carne são utilizados animais da espécie *Bos taurus* que se dividem em duas subespécies distintas: - *Bos taurus taurus* (*B. taurus*), gado taurino de origem europeia; - *Bos taurus indicus* (*B. indicus*), gado zebuino de origem asiática.

Dentro da subespécie *B. taurus*, existem 2 grupos de raças que se diferenciam entre si em características morfológicas, de produção e relacionadas com a carcaça e a qualidade da carne, devido à sua origem. São os bovinos pertencentes ao grupo de raças britânicas (Aberdeen Angus, Hereford, Shorthorn, etc.) originárias das Ilhas Britânicas, e o grupo de bovinos de raças continentais (Charolês, Limousine, Piemontês, entre outras) provenientes do continente europeu.

As raças britânicas, comparativamente às raças continentais, caracterizam-se por terem menor tamanho quando chegam à idade de maturidade e são mais precoces entrando na puberdade mais cedo. A consequência desta precocidade demonstrada é a maior quantidade de gordura intramuscular e de cobertura depositada até à idade de abate. Estes animais têm menor potencial de crescimento, gerando carcaças mais leves e com menor área de lombo. As fêmeas desta raça destacam-se pelas suas boas capacidades maternas ao nível da produção de leite, da fertilidade e da facilidade de partos (Cundiff et al., 1993). Por sua vez, as raças continentais, relativamente às britânicas, têm uma maior taxa de crescimento, originando animais de maior porte e estatura muscular com pesos vivos mais elevados. Isso também se reflete no maior tamanho à maturidade, apesar de alcançarem a puberdade mais tardiamente. Produzem carcaças e carnes mais magras, com menor grau de acabamento e de gordura intramuscular, mas com maiores pesos e melhores rendimentos dos cortes, como a área de lombo. As fêmeas concebem bezerros com maior peso e por conseguinte evidenciam mais dificuldades no parto (Cundiff et al., 1993).

Entre as subespécies *B. indicus* e *B. taurus* existem diferenças anatômicas, que são possíveis de evidenciar através da observação. Os zebuínos (Figura 1), em comparação aos taurinos (Figura 2), apresentam orelhas descaídas, uma barbela maior e uma protuberância na região posterior do pescoço, designada cupim (Magee et al., 2014).

Estas diferenças morfológicas resultam da evolução e da adaptação destes animais ao meio ambiente das regiões tropicais, permitindo-lhes sobreviver e reproduzir em climas quentes e húmidos característicos das regiões tropicais e subtropicais, conferindo-lhes melhor tolerância ao calor em comparação aos taurinos. Juntamente com as adaptações anatômicas, também existem adaptações fisiológicas ao nível do metabolismo, que lhes permite produzir menos calor e dissipá-lo mais eficazmente através de um vasto sistema de irrigação de glândulas sudoríparas que possibilitam aumentar as perdas de calor por evaporação, ao mesmo tempo que a sua pele fina auxilia a condensação (Cunningham & Syrstad, 1987).

Para além destes mecanismos parecem possuir um certo tipo de resistência a ecto e endoparasitas e às doenças que estes transmitem. Revelam também menores necessidades de água e exigências nutricionais devido ao menor tamanho corporal e taxa metabólica, e um sistema digestivo melhor adaptado a ambientes de baixa disponibilidade alimentar (Cunningham & Syrstad, 1987; Magee et al., 2014).



Figura 1 – Exemplar da subespécie *Bos taurus indicus* da raça Nelore. Fonte (Revista Pecuária Brasil, 2015).



Figura 2 – Exemplar da subespécie *Bos taurus taurus* da raça Aberdeen Angus. Fonte: (Eurogene Ai Services, s.d.).

Além de diferenças morfológicas e fisiológicas, na literatura encontram-se diversos trabalhos que abordam as diferenças de parâmetros zootécnicos entre *B. indicus* e *B. taurus*, assim como das características das suas carnes. Numa investigação sobre a influência da percentagem de sangue *B. indicus* nas características da carne e da sua palatabilidade, Crouse et al. (1989) concluíram que, de um modo geral, aumentado a influência de *B. indicus* (raça Brahman e Sahiwal) no cruzamento com *B. taurus* (raça

Hereford e Angus), as carcaças resultantes apresentavam menor peso e quantidade de gordura intramuscular na carne, e a força de corte aumentava, fazendo decrescer a tenrura.

Num estudo semelhante Elzo et al. (2012) estudaram as características de carcaça e a palatibilidade da carne entre *B. indicus* (raça Brahman) e *B. taurus* (raça Angus) e do cruzamento entre estes, podendo concluir que os *B. indicus* tiveram maior rendimento carcaça, menor gordura intramuscular, menor área de lombo, menor tenrura da carne, maior quantidade de tecido conjuntivo e menor suculência do que os *B. taurus*. Relativamente aos animais cruzados, a sua heterose possibilitou aumentar o peso de carcaça quente, o rendimento de carcaça, a área de lombo e a quantidade de gordura interna. Já Whipple et al. (1990) avaliaram os atributos que afetavam a tenrura do músculo *Longissimus* em gado *B. taurus* (raça Hereford e Angus) e *B. indicus* (raça Sahiwal) não observando efeitos causados pelo cruzamento nas características de carcaças, taxas de declínio de pH e temperatura. Embora, tenham chegado à conclusão que a carne de animais *B. taurus* obtiveram menores valores para a força de corte e melhores resultados sensoriais para a tenrura, do que carnes de animais cruzados (*B. indicus* x *B. taurus*).

Na mesma base de investigação, Highfill et al. (2012) compararam a tenrura de 10 músculos de fêmeas cruzadas *B. indicus* x *B. taurus* (Brahman-Sahiwal x Hereford ou Angus) e fêmeas *B. taurus* (Hereford x Angus), concluindo que os animais cruzados possuíam carcaças com menor peso, menor área de lombo, menos gordura de cobertura e menor quantidade de lípidos intramusculares. E a carne de 7 de 10 músculos de *B. taurus* teve menor força de corte do que *B. indicus*. Maggioni et al. (2010) compararam as características e a composição química da carne de animais puros *B. indicus* (raça Nelore) e cruzados *B. indicus* x *B. taurus* (Nelore x Europeu) e descreveram as diversas diferenças encontradas. Entre elas, destacam-se a performance produtiva dos animais vivos e também as características das carcaças.

No geral, os cruzados (Nelore x Europeu) apresentaram maior peso vivo inicial e final, que está muito relacionado com o maior ganho médio diário (GMD) também demonstrado. Além disso, o peso de carcaça quente, a conformação, o comprimento da carcaça e espessura de gordura de cobertura nestes animais também revelou ser superior aos puros (Nelore). Por outro lado, os *B. indicus* tiveram maior comprimento das pernas e maior percentagem de osso.

Relativamente à qualidade da carne, os atributos da textura e gordura intramuscular obtiveram melhores resultados nos cruzados. Mas por outro lado, os bovinos de raça pura tiveram carnes com melhores índices de cor, maior quantidade de proteína bruta e ácido esteárico (18:0). Apesar das diferenças encontradas, muitas características como, a percentagem de humidade, cinzas, lípidos totais, colesterol total, ácidos gordos saturados, ácidos gordos monoinsaturados, ácidos gordos polinsaturados, ácido linoleico (omega-6),

ácido alfa-linolénico (omega-3), rácio polinsaturados/saturados e rácio omega-6/omega-3 mostraram similaridade entre os grupos genéticos.

De um modo geral, em relação aos atributos sensoriais e propriedades físico-químicas da carne parece não haver discordância entre os vários estudos publicados, que indicam que as carnes provenientes de animais taurinos puros (*B. taurus*) e cruzados (*B. indicus* x *B. taurus*) apresentam valores de força de corte inferiores e maior quantidade de gordura intramuscular, comparativamente às raças zebus puras (*B. indicus*). O que resulta numa carne de maior tenrura e suculência. Esta menor tenrura encontrada na subespécie *B. indicus* está relacionada com diversos fatores como o grau de deposição de gordura intramuscular (Wheeler et al., 1994), grau de deposição de gordura de cobertura, quantidade de tecido conjuntivo muscular e diferenças na proporção de enzimas proteolíticas - calpaínas e calpastatinas.

A quantidade de gordura no interior do músculo tem uma relação diretamente proporcional com a perceção da tenrura da carne durante a mastigação. Isto deve-se ao facto da gordura aumentar a suculência e o efeito estimulante da mastigação (Marshall, 1994). A ausência ou existência reduzida de gordura de cobertura pode prejudicar a tenrura da carne durante o processo de arrefecimento das carcaças. Este fenómeno deve-se ao encurtamento dos sarcómeros pelo frio, que acontece quando os músculos não possuem uma camada de gordura protetora que evite a contração das fibras musculares devido à ação do frio, resultando numa carne com menor tenrura (Marshall, 1994).

A influência do tecido conjuntivo muscular na tenrura da carne, aparentemente está mais relacionado com a idade dos seres vivos do que com a raça ou subespécie. Como referido por Rodrigues et al. (2002), os animais *B. taurus* de origem britânica são mais precoces do que os *B. indicus*, ou seja, atingem a idade de abate mais cedo, o que leva a um desenvolvimento menos pronunciado do tecido conjuntivo e das suas ligações cruzadas, que causam a menor tenrura da carne.

Relativamente às enzimas proteolíticas, estas têm uma ação fundamental durante a proteólise *post-mortem* das miofibrilas, o que revela ser o maior agente influenciador das divergências de tenrura encontradas na carne de bovinos zebus e taurinos. Isto deve-se ao facto dos *B. indicus* terem maior atividade das calpastatinas (Bressan et al., 2011a citando Shackelford et al., 1991) que inibem a ação proteolítica das calpaínas (Bressan et al., 2011a citando Koochmaraie et al., 2002).

Sabendo de todas estas premissas, e com o intuito de exportar a carne bovina para a Europa, os produtores das regiões tropicais e subtropicais, optam por recorrer aos programas de cruzamento entre as subespécies *B. indicus* e *B. taurus*, utilizando especialmente as raças taurinas com origens britânicas, com o intuito de melhorarem os índices produtivos dos seus rebanhos e a qualidade da carne, beneficiando da ação da

heterose. Os animais resultantes destes cruzamentos possuem a rusticidade e a resistência ao clima tropical e aos insetos derivada dos *B. indicus* e melhores características físico-químicas da carne, maior peso das carcaças, maior quantidade de gordura intramuscular e de cobertura e maior área de lombo proporcionados pelo sangue dos *B. taurus* (Highfill et al., 2012).

Há estudos que apontam que raças com diferentes padrões de crescimento e composição corporal apresentam diferenças no metabolismo proteico, lipídico e balanço energético (Clarke et al., 1996; Cameron et al., 1994) e como consequência apresentam mudanças no metaboloma da carne (Ritota et al., 2012; Straadt et al., 2014). Dessa forma, o melhor conhecimento das bases metabólicas responsáveis pelas características de interesse econômico, possibilitariam melhorias substanciais no processo de produção e qualidade do produto final, a carne (D'Alessandro et al., 2011). Ainda a partir do conhecimento do metaboloma, seria possível identificar os metabolitos responsáveis pelas características de interesse e utilizá-los como marcadores aumentando o potencial, a precisão e a rapidez da seleção genética assistida, tanto para características de crescimento como para qualidade da carne (Clarke et al., 2009).

A partir do pressuposto de existirem diferenças no metaboloma entre raças, investigou-se, neste trabalho, o efeito que o grupo genético tem no metaboloma da carne destas duas subespécies bovinas.

2.3. Suplementação com óleo

A nutrição a par com o melhoramento genético são os principais fatores responsáveis pelo progresso alcançado na produção animal. A evolução e a melhoria dos parâmetros zootécnicos têm sido conseguidas através de diversos estudos que se interessam pelos efeitos que certos alimentos e formas de administrá-los têm no desempenho e crescimento dos animais e na carne que estes produzem.

No caso da bovinicultura para produção de carne, um dos aspetos mais influenciadores das características da carcaça e propriedades físico-químicas da carne é o tipo de dieta proporcionada aos animais no período antecedente ao abate, designado acabamento ou engorda. Esta prática é recomendada porque proporciona o aumento do rendimento e do peso das peças de carcaça (Prado et al., 2015), do peso vivo final e do peso de carcaça quente, além de garantir maior espessura de gordura subcutânea e gordura intramuscular (Rotta et al., 2009). Adicionalmente, o acabamento dos animais em parques de engorda com dietas à base de cereais, em vez de pastagem, parece influenciar

a percentagem de lípidos totais na carne (Rotta et al., 2009), assim como a deposição de gordura intramuscular e o perfil de ácidos gordos, nomeadamente de ácidos gordos saturados e polinsaturados (Bressan et al., 2011b).

Durante este período nutricional os bovinos são confinados em parques de engorda e alimentados com dietas suplementadas com concentrados energéticos à base de cereais e/ou óleos. De acordo com Rosa et al. (2013) citando Palmquist & Mattos (2006), o uso de lípidos nas dietas de ruminantes fornece ácidos gordos essenciais para o metabolismo, aumentam a capacidade de absorção de vitaminas lipossolúveis e aumentam a eficiência alimentar contribuindo para o aumento de deposição de gordura de cobertura das carcaças. Adicionalmente, a incorporação de óleos insaturados nas dietas de bovinos em confinamento parece aumentar a percentagem de ácidos gordos polinsaturados em hambúrgueres produzidos a partir da carne e gordura desses animais (Cabral, 2016). Além disso, este autor refere ainda que a utilização de óleos vegetais nas dietas também aumenta a oxidação lipídica dos hambúrgueres em relação a dietas sem inclusão de óleos vegetais.

Podemos assim perceber que a prática de engorda de bovinos assentada numa dieta suplementar com inclusão de óleo é importante por variados motivos. Permite melhorar a conformação e aumentar o peso das carcaças, tal como dos cortes de carne que têm maior valor comercial. Proporciona uma melhor deposição lipídica de cobertura, essencial na proteção das carcaças durante o período de refrigeração, evitando prejuízos na qualidade da carne, ao nível da tenrura devido ao encurtamento dos sarcómeros pelo frio. E parece possibilitar também alterações ao nível do perfil de ácidos gordos na carne.

Nesse sentido, no nosso estudo foi utilizado óleo de soja como suplemento alimentar durante o período de acabamento para investigar qual o efeito que este alimento causava no metaboloma da carne dos animais.

2.4. Conceito de Qualidade: Características importantes na carne

A definição de qualidade é um conceito subjetivo, que varia consoante a mente e a perceção de cada pessoa, não se estabelecendo como um conceito estático. Este varia dependentemente do tempo, do local, entre outros parâmetros. A qualidade de um produto pode ter, segundo Grunert (2005) duas dimensões: qualidade objetiva, associada às características físicas e químicas de um produto e qualidade subjetiva, percecionada pelos consumidores.

Relativamente à carne e aos seus derivados, estes devem fazer parte da dieta humana numa forma equilibrada, pois contribuem beneficemente com vários nutrientes

essenciais para a nossa saúde, como é o caso de proteínas de grande qualidade, aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas com elevada bio disponibilidade, como o caso do ferro e da vitamina B12, lípidos e ácidos gordos e pequenas quantidades de hidratos de carbono que são essenciais para o crescimento e manutenção de um organismo saudável. Além disso, na sua composição encontramos uma grande quantidade de água que também é indispensável para a nutrição humana (Heinz & Hautzinger, 2007).

Em relação à qualidade da carne de bovino, os atributos mais apreciados pelos consumidores são a tenrura, suculência, sabor, cor e gordura intramuscular (Fontes et al., 2011; Elzo et al., 2012; Crouse et al., 1989; Marshall, 1994). A obtenção dessas características na carne é o grande foco para o qual produtores e indústrias trabalham com o intuito de satisfazer as expectativas dos consumidores. No entanto, esse objetivo torna-se difícil uma vez que estas propriedades são influenciadas por aspetos relacionados com o pré e pós-morte dos animais. Parâmetros *ante-mortem* como o manejo, a alimentação, a genética, a idade, o sexo (Rotta et al., 2009), o transporte e o período na abegoaria (Costa, 2013) são altamente influenciadores no metabolismo muscular e lipídico dos animais e que mais tarde têm uma contribuição muito importante no produto final. Quanto às reações bioquímicas que ocorrem *post-mortem* podem ser afetadas consoante as condições de refrigeração das carcaças (Aroeira et al., 2016), atividade proteolítica das enzimas, pH, reservas de glicose nos músculos, contaminação microbiana, período de maturação da carne, gordura de cobertura das carcaças, entre outras.

De facto, não foi encontrado na literatura uma conformidade para afirmar quais os fatores *in vivo* que afetam mais a composição físico-química da carne. Tendo autores afirmando que é o grupo genético (Maggioni et al., 2010), enquanto outros defendem que é a dieta que causa maior impacto diferenciador nas características da carne bovina (Bressan et al., 2011b).

Nesse sentido, ao longo do tempo tem-se investigado diferentes sistemas de nutrição e programas de melhoramento genético das raças bovinas. O objetivo destes estudos é aumentar os rendimentos das carcaças, produzir carne com melhores características sensoriais e adaptar os animais às diferentes condições ambientais e sistemas de produção de todo o planeta, inclusive às doenças e parasitas desses locais. Desta forma, pretende-se aumentar a oferta e a disponibilidade do produto no mercado, além de melhorar a sua qualidade nutricional para satisfazer as necessidades do ser humano.

2.5. Metabolómica

A metabolómica é a ciência que estuda o metaboloma, i.e., o conjunto de metabolitos presentes nos fluidos e tecidos dos seres vivos. Por sua vez, os metabolitos são pequenas moléculas que resultam do metabolismo celular, ou seja, são o produto final das transformações químicas da atividade dos genes e das proteínas no metabolismo, e podem ser desde péptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis, alcaloides, minerais e todos os compostos químicos que são sintetizados ou transformados por um organismo (Wishart, 2008).

A metabolómica tem sido utilizada com o objetivo de providenciar, em apenas uma análise, uma descrição global dos metabolitos presentes nos tecidos, num determinado momento, dando a conhecer o estado fisiológico do organismo e o seu funcionamento celular. A comparação dos níveis de metabolitos sobre diferentes condições biológicas pode revelar informações úteis para uma vasta área científica, como por exemplo, para o crescimento animal e qualidade da carne.

Desta forma, a metabolómica é uma ferramenta de grande utilidade para o estudo do metabolismo, fisiologia dos organismos e alterações *post-mortem* dos seus tecidos. Possui grande potencial no desenvolvimento de bio-marcadores associados a características importantes na produção animal e qualidade da carne. Os níveis de metabolitos presentes nos fluidos e tecidos são influenciados por diversos fatores, como a dieta, manejo, genótipo, agentes ambientais, fatores que ocorrem pós abate, etc. Por isso, o estudo e a avaliação de perfis metabolômicos da carne podem ter um papel preponderante para compreender como determinados fatores influenciam as características do crescimento e da qualidade da carne (Brennan, 2014; Kim et al., 2016; Patti et al., 2012).

Apesar de ser uma área científica ainda em expansão e desenvolvimento, já existem alguns estudos que comprovam a sua aplicabilidade em diferentes vertentes, como a medicina, farmacologia, agronomia e ciência dos alimentos (Lee et al., 2011; Weljie et al., 2006). Esta abordagem metodológica também foi já aplicada ao estudo da qualidade da carne e permitiu caracterizar o metaboloma (Ramanathan et al., 2015) e quantificar inúmeros metabolitos como substratos glicolíticos, aminoácidos e lípidos (Graham et al., 2010), determinar componentes voláteis relacionados com os atributos sensoriais (Lee et al., 2011), comparar a qualidade da carne entre raças de suínos com alta e baixa capacidade de deposição de gordura (D'Alessandro et al., 2011), entre outros.

Para estudar o metaboloma recorre-se a 2 tipos de análises, que são classificadas como análises alvo ou análises não-alvo. As primeiras focam-se num grupo específico de metabolitos alvo, identificando-os e quantificando-os, sendo importantes para aceder ao comportamento de um grupo específico numa amostra sobre determinadas condições.

Relativamente ao segundo tipo de análises, estas focam-se na deteção do maior grupo de metabolitos quanto possível, para posteriormente identificar e quantificar os metabolitos “chave” (Cevallos-Cevallos et al., 2009).

A identificação global do metaboloma em amostras biológicas, pode ser feita através da Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (NMR) e da Espectrometria de Massa. Ambas as técnicas têm potencial para identificar a grande maioria dos metabolitos presentes – análises não-alvo - ou na identificação de metabolitos predefinidos – análises alvo.

2.6. Ressonância Magnética Nuclear (NMR)

No nosso caso de estudo utilizou-se a NMR, porque esta mostrou ser uma técnica viável na determinação do metaboloma de produtos cárneos, uma vez que a preparação das amostras é relativamente simples e analisa de forma rápida e precisa os metabolitos das amostras (Brescia et al., 2002; Ritota et al., 2012), o que permite reduzir custos e tempo nas análises (Graham et al., 2010). Esta técnica possibilita ainda a deteção de um vasto número de metabolitos, especialmente de amostras de carne de diferentes espécies (Castejón et al., 2015).

Além de ser muito prática para analisar um vasto grupo de amostras, a NMR não é destrutiva, o que permite preservar a integridade das amostras, possibilitando a reutilização das mesmas em análises posteriores. A sua desvantagem é ser menos sensível, do que a espectrometria de massa, na identificação de metabolitos com pouca abundância (Brennan 2014).

A NMR vem sendo utilizada para o estudo metabolómico de diferentes campos de pesquisa. Desde o estabelecimento de diferenças entre duas espécies distintas de mexilhões e determinação da sua proveniência (Rochfort et al., 2013), passando pela exploração da relação entre o metaboloma do leite e das suas propriedades tecnológicas (Sundekilde et al., 2011), como também no estabelecimento de relações entre os metabolitos presentes na urina de bovinos e sistemas alimentares (Osorio et al., 2012).

Relativamente à abordagem mais focada na carne, existem trabalhos que investigaram o metaboloma de carnes de bovinos sujeitos a tratamentos de irradiação (Zanardi et al., 2015), também já foram feitas análises ao exsudado da carne (Castejón et al., 2015), e caracterizaram-se diferenças ocorridas no metaboloma durante diferentes períodos de maturação (Graham et al., 2010; Kim et al., 2016). Outras investigações diferenciaram o metaboloma de 2 músculos entre 3 raças de bovinos e uma de bubalino

(Ritota et al., 2012), assim como de suínos de grupos genéticos diferentes (Straadt et al., 2014).

Apesar de já existirem alguns estudos de análise do metaboloma através da NMR, não foi encontrado nenhum trabalho na literatura que aborde a influência causada pelo grupo genético e pela suplementação com óleo no metaboloma da carne de bovinos. Por isso, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de estudar o efeito do grupo genético e da suplementação com óleo de soja no metaboloma da carne de bovinos, através da espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear e da Análise de Componentes Principais.

3. Material e Métodos

3.1. Animais

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, FZEA-USP. Os animais foram alojados nas instalações de confinamento do Departamento de Zootecnia da FZEA-USP, localizado em Pirassununga – São Paulo. Os ensaios laboratoriais foram realizados nas instalações da Embrapa Instrumentação, São Carlos – São Paulo.

Foram recolhidas amostras do músculo *Longissimus* de 60 novilhos com peso de carcaça a variar entre 270 a 300 kg. A amostragem foi realizada com o intuito de representar a variedade dos genótipos e das condições de acabamento tipicamente observadas no Brasil. O estudo foi composto por dados originados a partir de um arranjo fatorial 2x2 de tratamentos, com 2 grupos genéticos e 2 dietas incluindo animais dos grupos genéticos *B. indicus* (Nelore, n = 30) e *B. indicus* x *B. taurus* (½ Nelore e ½ Aberdeen Angus, n = 30). Estes foram classificados de acordo com a dieta utilizada no seu acabamento, dieta de controlo (DC) ou dieta suplementada com 3,5% de óleo de soja (DO). Tanto na DC (n = 30, dos quais 15 eram *B. indicus* e 15 eram *B. indicus* x *B. taurus*) como na DO (n = 30, dos quais 15 eram *B. indicus* e 15 eram *B. indicus* x *B. taurus*) os animais foram alimentados *ad libitum*, segundo a dieta demonstrada na Tabela 1, durante um período de confinamento de 100 dias para ambos os grupos, com 21 dias de período de adaptação.

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

	Controlo	Óleo de Soja
Ingredientes (% MS)		
Bagaço de cana	5,0	5,0
Silagem de milho	10,0	10,0
Milho grão moído	58,0	54,5
Polpa de citrinos	16,0	16,0
Óleo de soja	0,0	3,5
Bagaço de soja	9,0	9,0
Ureia	1,2	1,2
Mistura mineral ¹	0,8	0,8
Nutrientes² (%)		
Proteína Bruta	15,07	14,73
Extrato Etéreo	3,11	6,45
Proteína Degradável no Rúmen	10,06	9,89
Nutrientes Digestíveis Totais	78,92	82,28
Cálcio	0,48	0,48
Fósforo	0,37	0,36

¹ A mistura mineral contém (por kg): cálcio (min/máx), 200-250 g; fósforo, 20 g; zinco, 2000 mg; cobre, 450 mg; manganês, 800 mg; magnésio, 15 g; iodo, 45 mg; enxofre, 32 g; cobalto, 27 mg; sódio, 80 g; selênio, 18 mg; vitamina A, 60000 UI; vitamina D3, 45000 UI; vitamina E, 400 UI; monensina sódica, 1500 mg. ² As dietas foram formuladas para suprir ou exceder as exigências nutricionais de novilhos em acabamento (NRC, 2000).

3.2. Abate

No final do período de confinamento, os animais foram pesados e embarcados para o matadouro comercial, onde permaneceram na abegoaria cerca de 12 horas em jejum sólido para posteriormente serem abatidos. Os animais sofreram insensibilização por pistola pneumática, seguida pela sangria. As carcaças foram colocadas durante 24 horas numa câmara frigorífica a cerca de 0-2°C. Depois deste período de *post-mortem*, foram retiradas da meia carcaça esquerda de cada animal, entre a 12^a e 13^a costela, uma amostra do *Longissimus* (bifes de 2,5 cm de espessura), que foi etiquetada e embalada individualmente a vácuo de acordo com o número do animal e maturadas por 72 horas, com temperatura entre 0-4°C, para posterior extração dos metabolitos.

3.3. Preparação de amostras

Procedeu-se à extração dos metabolitos polares das amostras de carne usando metanol, clorofórmio e água, como descrito no trabalho de Beckonert et al. (2007).

Cortou-se as amostras de tecido muscular de forma a obter a mesma massa para todas elas, colocando-se 1 g de cada uma num tubo de ensaio, onde foi adicionado nitrogénio líquido e, de seguida, triturou-se e transferiu-se para tubos de centrifugação tipo Falcon® de 50 ml. Em cada tubo adicionou-se 4 ml de metanol e 0,85 ml de água. Sucessivamente colocou-se no agitador tipo Vortex e adicionou-se 2 ml de clorofórmio e agitou-se novamente. Para finalizar, adicionou-se mais 2 ml de clorofórmio e 2 ml de água aos tubos e agitou-se outra vez. Transferiu-se os tubos com as amostras para o gelo durante 15 minutos. Depois deste tempo as amostras foram colocadas na centrífuga durante 15 minutos e centrifugados a 1,000g e temperatura de 4°C. Durante a centrifugação as amostras separaram-se em duas fases, uma superior onde se encontrava o metanol e a água, que continha os metabolitos polares, e uma fase inferior com o clorofórmio, que tinha os componentes apolares, ambas as fases estavam separadas por proteínas e detritos celulares.

Extraiu-se, através de uma micro pipeta, ambas as fases separadamente para tubos de centrifugação tipo Falcon®, identificou-se e armazenou-se a -80°C. Liofilizou-se as amostras para remoção dos reagentes, ficando apenas os metabolitos polares.

3.4. Análise de Ressonância Magnética Nuclear

O metaboloma das amostras de carne foi determinado através de RMN (Bruker Corporation, Ettlingen, Alemanha) de 600 MHz para frequência de hidrogénio, nas instalações da Embrapa Instrumentação, São Carlos, SP. Neste procedimento suspendeu-se a extração do tecido polar em 580 µl de tampão da RMN (100 mM fosfato de sódio tampão, pH 7.4, em D₂O (óxido de deutério) contendo 0.1-0.5 mM TSP (ácido 3-trimetilsililpropiónico) e procedeu-se à agitação de cada tubo. Posteriormente, transferiu-se 550 µl de amostra preparada para os tubos de 5 mm de RMN e colocou-se esses tubos no aparelho a 600 MHz, onde se obteve os espectros.

3.5. Análise de dados

Cada animal foi considerado uma unidade experimental para todas as variáveis analisadas e os dados foram considerados como tendo sido originados a partir de um arranjo fatorial de tratamentos, com 2 grupos genéticos e 2 sistemas de acabamento.

As imagens do espectro de RMN foram processadas através do *software* AMIX (Bruker; São Paulo, SP, Brasil) para a obtenção da Análise de Componentes Principais (PCA) com o objetivo de estudar os efeitos do sistema de acabamento, grupo genético e a sua interação, sobre as variáveis resposta avaliadas, i.e., o metaboloma de ambos os grupos genéticos e de sistemas de acabamento diferentes. Como a interação estudada mostrou não haver formação grupos específicos, foi retirada do modelo e os dados reanalisados com um novo modelo incluindo apenas os principais efeitos do grupo genético e da dieta sobre o metaboloma.

A identificação de alguns metabolitos procedeu-se recorrendo ao *software* Chenomx NMR Suite 7.5 (Chenomx, Edmonton, Alberta, Canadá).

4. Resultados e Discussão

A Tabela 2 mostra a lista de metabolitos que foram detetados na carne de bovino e as respectivas concentrações. A análise para deteção dos metabolitos foi realizada a 10 amostras de carne aleatórias. O valor da concentração de cada metabolito apresentado na tabela resulta da média da concentração, desse mesmo metabolito, nas 10 amostras de carne analisadas.

Tabela 2 – Lista de metabolitos encontrados na carne e a sua concentração (μmolar).

Metabolitos	Concentração (μmolar)	Metabolitos	Concentração (μmolar)
Niacinamida (Vitamina B3)	0,1	Carnitina	1,4
ATP	0,1	Frutose	1,9
Glucose -1- fosfato	0,1	Glutamina	2,3
Glutationa	0,1	Glucose -6- fosfato	2,4
Riboflavina (Vitamina B12)	0,1	Creatinina	10,3
Valina	0,1	Ácido Glucónico	11
Inosina	0,2	Lactato	21,6
Hipoxantina/ Adenina	0,2	Glicerol	130
Ribose	0,2	2-Metilglutarato	n. q.
Inosina	0,3	Acetato	n. q.
sn-Glicero -3- fosfocolina	0,3	Carnosina	n. q.
Succinato	0,3	Etilenoglicol	n. q.
Anserina	0,5	Glicina	n. q.
Acetilcarnitina	0,5	Glucose	n. q.
Treonina	0,5	Ácido Glicurónico	n. q.
ADP	0,6	Glutamato	n. q.
Metil-nicotinamida	0,6	Isoleucina	n. q.
Glutationa	0,7	Leucina	n. q.
Malonato	0,7	Metil-malonato	n. q.
Alanina	0,9	NADH	n. q.
IMP	0,9	N – óxido de trimetilamina	n. q.

NADH – Forma reduzida de dinucleótido de nicotinamida e adenina.

n. q. – Não quantificado.

Podemos reparar que alguns metabolitos foram detetados e quantificados, enquanto outros apenas foram detetados, não tendo sido possível quantificar a sua concentração por se encontrar em níveis muito baixos.

De forma geral, e após uma análise detalhada a todos os metabolitos detetados, pode dizer-se que houve uma grande diversidade de compostos encontrados nas amostras de carne. Desde vitaminas, purinas, aminoácidos essenciais e não essenciais, antioxidantes naturais, sacarídeos, péptidos, nucleótidos, etc. Alguns deles vale a pena abordar devido à sua relevância nos produtos cárneos relativamente a vários aspetos, nomeadamente

características organolépticas e à concentração encontrada. Outros são apenas metabolitos provenientes de metabolismos secundários e terciários do organismo que não merecem um maior destaque porque crê-se que não tenham influência nas características da qualidade da carne. Além disso já foram encontrados em outros estudos sobre o metaboloma da carne de bovino (Graham et al., 2010; Jung et al. 2010; Zanardi et al., 2015), da carne suína (Straadt et al., 2014) e do leite bovino (Melzer et al., 2013).

Nota-se que os metabolitos presentes em maior quantidade foram o glicerol (130 μ molar), lactato (21,6 μ molar), ácido glucónico (11 μ molar) e creatinina (10,3 μ molar). O glicerol é um composto dos triglicerídeos e dos fosfolípidos, que se origina a partir da lipólise. É libertado na corrente sanguínea juntamente com ácidos gordos quando o organismo utiliza as reservas lipídicas como fonte de energia. Além disso este também pode ser convertido em glicose pelo fígado e, posteriormente, fornecer energia às células (Goldansaz et al., 2017). A sua presença na carne sugere que os animais no momento do abate estivessem a hidrolisar reservas lipídicas ou, por outro lado, a lipólise tenha ocorrido na carne, ao nível enzimático, durante o período de transformação do músculo em carne ou durante a maturação. Outros autores também encontraram este metabolito em estudos sobre a carne de bovino (Jung et al., 2010; Zanardi et al., 2015) e de suíno (Straadt et al., 2014).

A deteção do lactato nas nossas amostras não é surpreendente, uma vez que já havia sido detetado noutros trabalhos (Graham et al., 2010; Zanardi et al., 2015; Jung et al., 2010). Como explicam Graham et al. (2010) no seu estudo, o lactato aparece na carne porque após a morte, as células musculares tentam manter a homeostase mas devido à supressão de oxigénio, estas passam a produzir energia a partir do metabolismo anaeróbio, resultando na formação de ácido láctico. Em situações normais este seria conduzido até ao fígado e seria resintetizado, mas com a cessação da circulação sanguínea acumula-se nos músculos causando a diminuição do pH. Daí ser encontrado no metaboloma da carne neste e noutros estudos.

Relativamente ao ácido glucónico, a interpretação que podemos fazer, sobre a sua presença nas amostras de carne, é muito superficial. Não foram encontradas informações que abordassem as funções deste metabolito no organismo nem na carne. Contudo, especula-se que derive de metabolismos secundários, pouco relevantes no metabolismo proteico e lipídico que acontece nos músculos e que possam influenciar as características da carne. Apesar de tudo, também foi encontrado por Melzer et al. (2013) no seu trabalho sobre leite bovino, embora estes autores não tenham especificado quaisquer detalhes sobre este composto.

A creatinina, por sua vez, é um composto constituinte do tecido muscular e daí a sua presença acentuada na carne. Além deste, existem outros constituintes muito presentes em tecidos musculares que também foram detetados, tais como a alanina, carnitina e glutamina (aminoácidos não essenciais), a carnosina (dipéptido), a isoleucina e leucina (aminoácidos essenciais) envolvidos em processos metabólicos proteicos, lipídicos e energéticos (Goldansaz et al., 2017).

Pode-se ainda reparar que foi detetado ATP, ADP, ribose, várias formas de glucose e frutose. Todos eles têm funções importantes em mecanismos energéticos. E é de salientar que após o *rigor mortis* e alguns dias de maturação da carne, ainda sejam encontrados este tipo de constituintes na carne. Embora também já tivessem sido encontrados por outros autores (Graham et al., 2010; Ritota et al., 2012). Relativamente à frutose destaca-se o facto desta poder influenciar o *flavour* da carne devido ao seu sabor doce e aroma frutado que emite.

A IMP (inosina monofosfato) tal como relatado por Straadt et al. (2014) foi encontrada em maior quantidade numa raça cruzada de suínos que mostrou ter um metabolismo *post-mortem* menos acelerado e menor suscetibilidade ao *stress*, indicando que este metabolito pode estar correlacionado com animais mais tolerantes ao *stress* e consequentemente que produzam carne de melhor qualidade.

Na Figura 3, temos a PCA dos metabolomas das amostras de carne de bovino em função dos tratamentos. Cada ponto colorido corresponde a um metaboloma com o respetivo tratamento, conforme enunciado na legenda da figura. Os componentes principais 1 e 2 representam a variância quantitativa e qualitativa, respetivamente.

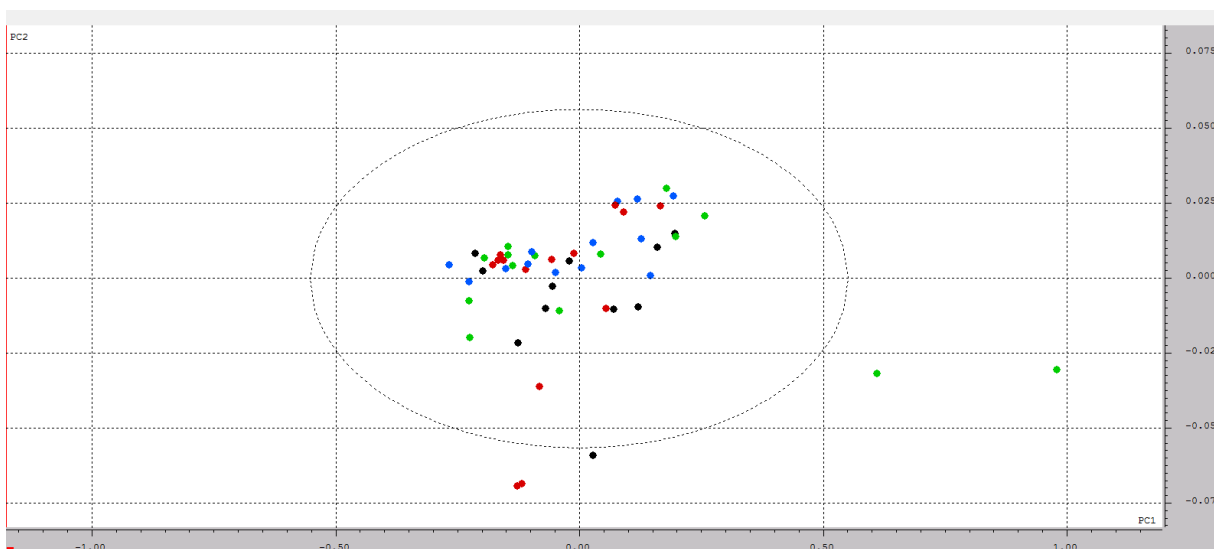


Figura 3 – PCA dos metaboloma em função dos tratamentos. Pontos: verdes (Nelore e DC); pretos (cruzados e DC); vermelhos (Nelore e DO); azuis (cruzados e DO).

Nota-se que não houve formação de grupos específicos em função do tratamento, estando todas as variáveis distribuídas de forma aleatória e relativamente perto da zona de variabilidade nula. O que sugere não haver diferenças no metaboloma das amostras de carne, causadas pela ação dos tratamentos. E por isso, neste caso de estudo, nem o grupo genético nem a suplementação com óleo de soja na dieta tiveram efeito diferenciador no metaboloma da carne de bovinos.

Embora neste trabalho não se tenha encontrado efeitos dos tratamentos no metaboloma da carne, outros autores (D'Alessandro et al., 2011) conseguiram diferenciar através de análises proteômicas e metabolômicas, ao músculo *Longissimus lumborum*, duas raças distintas de suínos. Não querendo comparar estes 2 trabalhos devido à discrepância entre os procedimentos e tratamentos, pensa-se que D'Alessandro et al. (2011) conseguiram encontrar diferenças entre os grupos de animais estudados, porque o material biológico que analisaram foi músculo recolhido 24 horas após o abate, enquanto no presente trabalho analisou-se carne com 72 horas de maturação.

Crê-se que o facto de, no presente estudo, ter-se analisado carne maturada possa ter influenciado o metaboloma. Isto porque durante o processo de maturação ocorrem uma série de processos bioquímicos que alteram a integridade da carne. Assim, caso os tratamentos tenham causado algum efeito nos músculos *in vivo*, estes eventuais efeitos podem ter sido apaziguados durante o processo de maturação.

Ritota et al. (2012) também conseguiram caracterizar tecidos de 3 raças bovinas e uma 1 raça bubalina. Neste caso conseguiram obter melhores capacidades discriminativas entre o Bufalo e a Chianina, do que entre os outros grupos. Esta maior discriminação registada pode ser explicada pelo seu maior afastamento taxonómico, uma vez que os Búfalos correspondem ao género *Bubalus* e a Chianina pertence ao género *Bos*.

Assim, no presente trabalho, também seria espetável encontrar distinções entre os metabolomas da carne das duas subespécies bovinas examinadas. Para além dos importantes efeitos da maturação, outra explicação para a ausência de efeitos dos tratamentos encontrada entre os grupos genéticos em estudo poderá estar relacionada com a utilização de animais cruzados (*B. indicus* x *B. taurus*) e não de animais oriundos de uma raça pura (*B. taurus*). Sabe-se que a proveniência destes F1 é ½ sangue Nelore e ½ sangue Aberdeen Angus. Nesse caso, não estamos a avaliar 2 grupos genéticos completamente distintos, uma vez que 50% dos genes destes animais é equivalente ao outro grupo em estudo (*B. indicus*). Por essa razão, supõem-se que a variação encontrada entre os metabolomas da carne destes animais não tenha diferenciado.

Além disso, estes dados vão ao encontro do que foi relatado por Gama et al. (2013), observando-se um comportamento da descendência híbrida, resultante do cruzamento entre

Nelore e Aberdeen Angus, mais próximo da raça Nelore no que toca à atividade estimada da Δ^9 desaturase. Sugerindo a existência de alguns *loci* e o efeito da dominância genética em algumas enzimas envolvidas na síntese e no metabolismo dos ácidos gordos.

O efeito que a heterose produz nos seres vivos depende do ambiente onde ocorre a produção. Por essa razão é frequente os híbridos demonstrarem melhores desempenhos produtivos em meios desfavoráveis às raças puras, o que nos indica a contribuição que a heterose tem na adaptabilidade dos animais ao meio (Barlow, 1981 citado por Gama et al., 2013). Neste estudo, o vigor híbrido oferecido pelo *B. indicus* proporcionou aos cruzados a adaptação fisiológica necessária para enfrentarem as condições adversas do ambiente tropical, desfavorecedor aos *B. taurus*.

Por outro lado, já foi demonstrado (Maggioni et al., 2010), que animais que provêm de cruzamentos *B. indicus* x *B. taurus* (Nelore x Europeu) têm melhores desempenhos, tanto ao nível da carcaça como das características da qualidade da carne, em relação a animais *B. indicus* (Nelore), que se supõe ser devido à heterose. Tal não foi possível concluir neste estudo, a partir dos dados que se obteve. Os resultados do estudo de Prado et al. (2003) vão de encontro aos nossos, na medida em que também não se encontraram efeitos nem do grupo genético nem da dieta ao nível da composição de ácidos gordos da carne *B. indicus* (raça desconhecida) e *B. indicus* x *B. taurus* (raças desconhecidas). Isto supõe que a alimentação e a genética possam influenciar mais os índices produtivos dos animais *in vivo* do que a composição das suas carnes. Remetendo-nos para a ideia de que o metaboloma da carne possa ser mais suscetível aos fatores *post-mortem* do que aos fatores *ante-mortem*, como o grupo genético e a dieta.

Noutro trabalho (Osorio et al., 2012) investigou-se o uso da metabolómica para diferenciar o sistema de produção de carne bovina através de análises à urina e aos músculos. Estes animais foram produzidos segundo 4 sistemas alimentares diferentes: pastagem; confinamento + concentrado energético; silagem + pastagem; silagem + pastagem + concentrado. Tendo-se conseguido mostrar a existência de uma diferenciação entre os metabolomas de animais produzidos com distintos sistemas alimentares. Embora as evidências tenham sido mais fortes nas amostras de urina do que nos músculos. E o metaboloma do tecido muscular, tenha mostrado uma diferenciação superior na comparação entre a pastagem e o concentrado.

No estudo de Osorio et al. (2012), estudaram-se dietas muito distintas. No presente ensaio as dietas estudadas eram ambas concentrado de acabamento, diferindo apenas na inclusão de 3,5% de óleo de soja. Este facto poderá explicar a ausência de efeito da dieta nos metabolomas das carnes dos nossos animais. Ou seja, a adição de 3,5% de óleo de soja pode não ter sido suficiente para influenciar o metaboloma da carne. Possivelmente, a comparação entre o sistema de pastoreio e o sistema de confinamento com alimento

concentrado energético teria mostrado maior variabilidade no metaboloma da carne, tal como no trabalho de Osorio et al. (2012) e explicado por Bessa et al. (2015).

Em conformidade com esta teoria está o estudo de Ito et al. (2010), onde os autores dizem que o óleo de soja, juntamente com grãos de linhaça, não altera o desempenho produtivo, a ingestão de matéria seca (IMS), nem as características de carcaça, quando aplicados numa quantidade de extrato etéreo até 7%. Já Rosa et al. (2013) no seu estudo, afirmam que a adição de óleo de soja ou de linhaça na dieta não provocou alterações na IMS, de proteína bruta nem de fibra solúvel em detergente neutro, em comparação com as dietas de controlo, mas por outro lado a suplementação mostrou-se benéfica no GMD e eficiência alimentar, promovendo um melhor peso ao abate e rendimento de carcaça dos animais.

O estudo das características da qualidade da carne dos animais provenientes do presente ensaio foi destinado a outra dissertação e conduzido por outro estudante de pós-graduação (Antonelo, dados ainda não publicados). Contudo, o metaboloma da carne poderá estar relacionado com características da qualidade da carne e refletir os processos bioquímicos de transformação do músculo em carne.

O pH da carne às 24 horas é utilizado como importante indicador da qualidade da carne e de monitorização dos processos *post-mortem* de transformação do músculo em carne, pelo que os valores obtidos nos foram cedidos para facilitar a interpretação do resultado dos metaboloma da carne. De facto, à semelhança do observado para o metaboloma, o pH às 24 horas apresentou um valor médio \pm erro padrão de $5,7 \pm 0,08$ não variando ($P = 0,54$) nem com o grupo genético nem com a dieta. Contrariando assim outros estudos que reportam que a raça Nelore é mais temperamental e, conseqüentemente, produzem geralmente carnes com valores de pH mais elevado do que a raça Aberdeen Angus (Silveira et al., 2006).

Apesar de não ter sido encontrado efeito dos tratamentos, pode-se realçar a existência de 5 potenciais *outliers* (Figura 3), associados a amostras que se encontram localizadas fora da região de similaridade entre tratamentos. Correspondendo a 2 amostras de carne de animais Nelore suplementados com óleo (identificado a vermelho na Figura 3), 1 amostra de carne de cruzado acabado com óleo (identificado a preto na Figura 3) e 2 amostras de carne de animais Nelore acabados sem óleo (identificado a verde na Figura 3). Destaca-se a predominância de amostras de carne da raça Nelore que se apresentam no universo dos possíveis *outliers*, contudo não é possível retirar conclusões desse facto.

Embora na Figura 3 se tenha verificado a ausência de efeitos dos tratamentos sobre os metabolomas das amostras de carne, realizou-se uma análise para descobrir a influencia de cada variável – metabolitos – nos componentes principais (Figura 4).

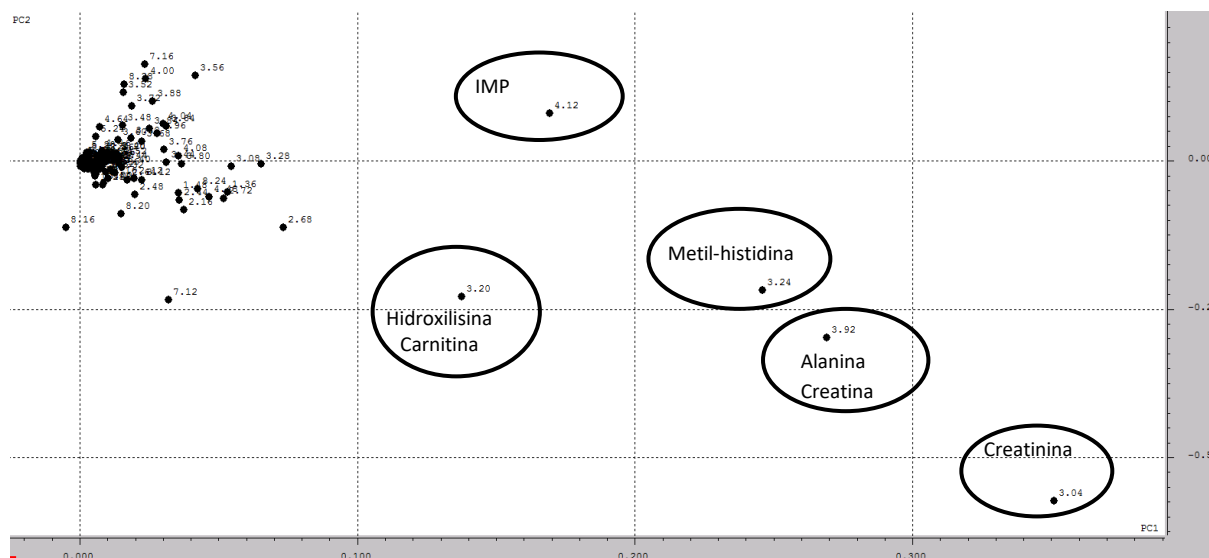


Figura 4 – Loading plot do modelo de PCA da carne, mostrando a variabilidade e distribuição dos metabolitos nos componentes principais.

Pode observar-se, pela Figura 4, os metabolitos que mais contribuíam para a variabilidade dos metabolomas. Do lado direito da figura encontra-se um grupo de metabolitos que se afastaram da zona de variabilidade nula para uma zona de maior variabilidade. Indicando que a IMP, a hidroxilisina e carnitina, a alanina e creatina, a metil-histidina e a creatinina foram os metabolitos que mais contribuíram para a variabilidade entre os metabolomas. Alguns pontos, aparecem com um ou mais metabolitos porque os seus picos no espectro de NMR aparecem sobrepostos, não permitindo uma correta distinção e identificação.

Estudou-se pormenorizadamente os metabolitos destacados para se poder compreender quais as funções que cada um desempenha no organismo e na carne:

- A creatina está presente no organismo maioritariamente na forma de fosfocreatina, atuando como uma fonte de energia para a contração muscular. Esta entra no processo de regeneração de adenosina trifosfato (ATP), transferindo o seu fosfato à molécula de adenosina difosfato (ADP) possibilitando assim a síntese de ATP nos músculos. A suplementação alimentar de suínos com creatina monoidrato, mostrou um melhoramento do aumento de peso dos mesmos (Young et al., 2007);
- A creatinina é um composto derivado do catabolismo da creatina muscular, a sua taxa de síntese e concentração no plasma é influenciada pelo nível de

massa muscular e atividade fisiológica de cada organismo. Assim sendo, animais mais atléticos e/ou de maior massa muscular apresentam uma concentração plasmática superior. A sua excreção na urina também está correlacionada com o peso vivo e com a quantidade de massa muscular (Costa e Silva et al., 2012; Forbes & Bruining, 1976; Van Niekerk et al., 1963);

- A IMP resulta da desaminação da adenosina monofosfato (AMP), que ocorre após um período de contrações musculares de alta intensidade. Como demonstrado por Sahlin et al. (1989) a IMP encontra-se em baixas concentrações nos músculos humanos em períodos de repouso e de exercício de baixa intensidade, aumentando a sua concentração após exercícios intensos sob a utilização de energia anaeróbia, tendo por isso uma correlação positiva com o lactato e negativa com a fosfocreatina. Já foi referido em alguns trabalhos (Aliani & Farmer, 2005; Durnford & Shahidi, 1998; Tiikk et al., 2006) como um fator importante da palatibilidade da carne por ter um gosto saboroso e agradável, embora também tenha sido mostrado por Piao et al. (2015) que esta não se correlaciona com as características sensoriais.
- A hidroxilisina é um aminoácido que resulta da hidroxilação da lisina e é fulcral na biossíntese de colagénio, fazendo parte da constituição deste. Por sua vez, o colagénio é uma proteína estrutural do tecido conjuntivo, conhecida pela sua baixa solubilidade devido às suas ligações intermoleculares cruzadas que tendem a aumentar com a idade do ser vivo. Devido a isso, a carne dos animais mais jovens, com menos ligações cruzadas faz com que este composto seja mais solúvel, resultando numa carne mais tenra do que a de animais mais velhos, que possuem um número maior de ligações cruzadas e consequentemente colagénio menos solúvel (Tatum, 2011).
- A carnitina é um nutriente sintetizado a partir dos aminoácidos, lisina e metionina, e encontra-se nas células do tecido esquelético, onde desempenha duas funções: transporte de ácidos gordos de cadeia longa até à mitocôndria, onde posteriormente são oxidados conduzindo à produção de energia na forma de ATP; e ajuda a controlar a produção excessiva de acetilcoenzima A, originando acetilcarnitina. Desta forma, a carnitina desempenha um papel importante na produção de energia celular (Shimada et al., 2004). Um estudo sobre a suplementação de carnitina sugere que esta não afecta a performance de crescimento de ruminantes quando alimentados com uma dieta típica (Hill et al., 1994), mas em contrário outro estudo aponta

que a suplementação pode trazer benefícios eficientes no ganho de peso de vitelos alimentados com uma dieta concentrada em proteína bruta de frangos (Bunting et al., 2002).

- A metil-histidina é um aminoácido que se encontra na constituição da actina e da miosina, formando-se no decorrer do catabolismo destas proteínas miofibrilares do tecido muscular. Este é eliminado diretamente do organismo, pela urina, sem sofrer qualquer tipo de reutilização. Por essa razão e, segundo Harris e Milne (1981), pode ser utilizado como um indicador de degradação proteica muscular em bovinos. Além disso, os mesmos autores confirmaram que a taxa de excreção deste metabolito, na urina de bovinos machos, está correlacionada com o peso vivo. Heiderich (2014) também mostrou que a taxa de excreção da metil-histidina é inferior em animais com mais idade, provando que a taxa de degradação e renovação proteica do tecido muscular são afetadas pela maturidade do animal e pelo teor de proteína bruta na dieta.
- A alanina é um aminoácido não essencial que resulta da conversão do piruvato ou da degradação do ADN e da carnosina e anserina. Encontra-se em grande concentração nos músculos e funciona como uma fonte principal de energia nos mesmos. É por isso que está presente em níveis muito elevados nos produtos cárneos. Este colabora na conversão de glucose em energia e eliminação de toxinas em excesso no fígado. A sua contribuição é essencial na preservação dos níveis de azoto e glucose no organismo, que acontecem através do Ciclo da Alanina. Neste processo, aminoácidos em excesso são transportados até uma molécula recetora, o piruvato (produzida na glicólise), transformando-se em alanina e encaminhada até ao fígado. Este extrai azoto da alanina e converte-lo em piruvato novamente, que pode ser utilizado para produzir glucose. O azoto em excesso é transformado em ureia e excretado na urina. Este ciclo proporciona ao organismo uma fonte de energia para o metabolismo celular, assegurando um constante fornecimento de piruvato para a síntese de glucose e aminoácidos. A alanina desempenha por estas razões um papel importante no equilíbrio glicolítico do organismo, tanto em situações de hiperglicemia e hipoglicemia. Além disso, tem uma atuação preponderante na reprodução e imunidade dos linfócitos (Goldansaz et al., 2017)

Realizou-se também uma análise de PCA separando o grupo genético, para testar se dentro da mesma base genética de animais, os metabolomas variavam em função da dieta (Figura 5 e 6).

Na Figura 5, tem-se o PCA referente aos metabolomas das amostras de carne dos animais cruzados em função da dieta. Nota-se uma pequena aglomeração entre os metabolomas de animais alimentados com a mesma dieta, e ao mesmo tempo, um afastamento entre os metabolomas de animais com dietas diferentes. Isto sugere que neste grupo genético, a suplementação com óleo possa ter provocado uma ligeira tendência diferenciadora entre os metabolomas. Verifica-se ainda um grande afastamento, da zona de variabilidade nula, de cinco pontos (círculos vermelhos) pertencentes aos metabolomas da dieta com óleo.

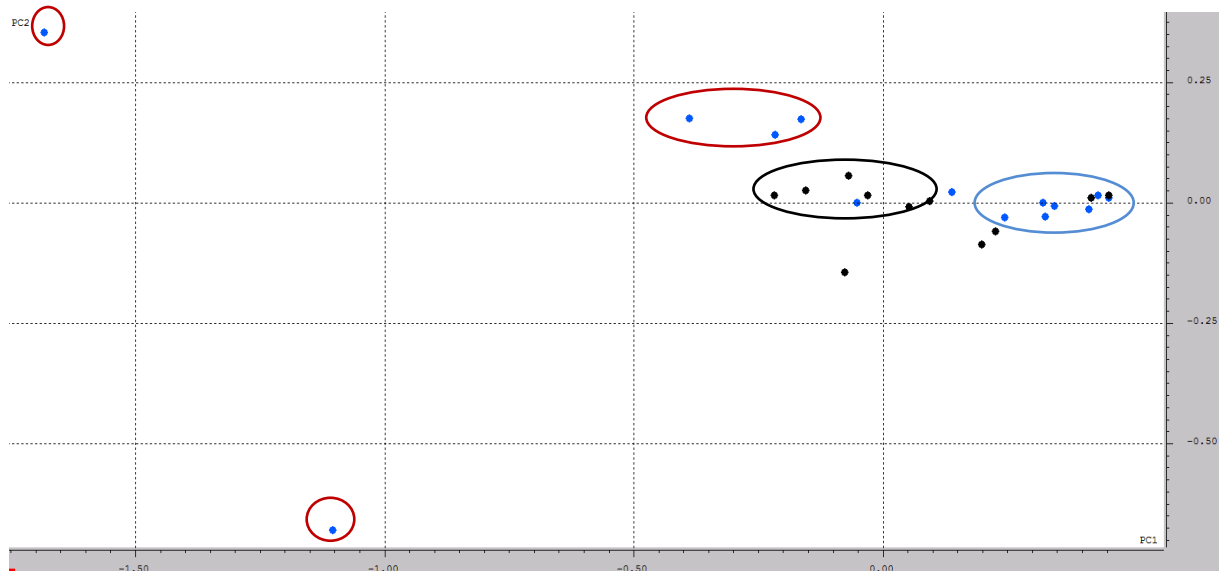


Figura 5 – PCA do metaboloma da carne de animais cruzados em função da dieta. Pontos: pretos (dieta controle); azuis (dieta suplementada).

Relativamente à Figura 6, tem-se o PCA dos metabolomas das amostras de carne de animais Nelore em função dos 2 sistemas alimentares. Ao contrário da figura anterior, referente aos animais cruzados, neste caso verifica-se uma distribuição aleatória dos pontos, sem qualquer tipo de tendência. Pressupondo-se que a suplementação com óleo de soja na dieta, não exerce nenhum efeito no metaboloma da carne dos animais Nelore.

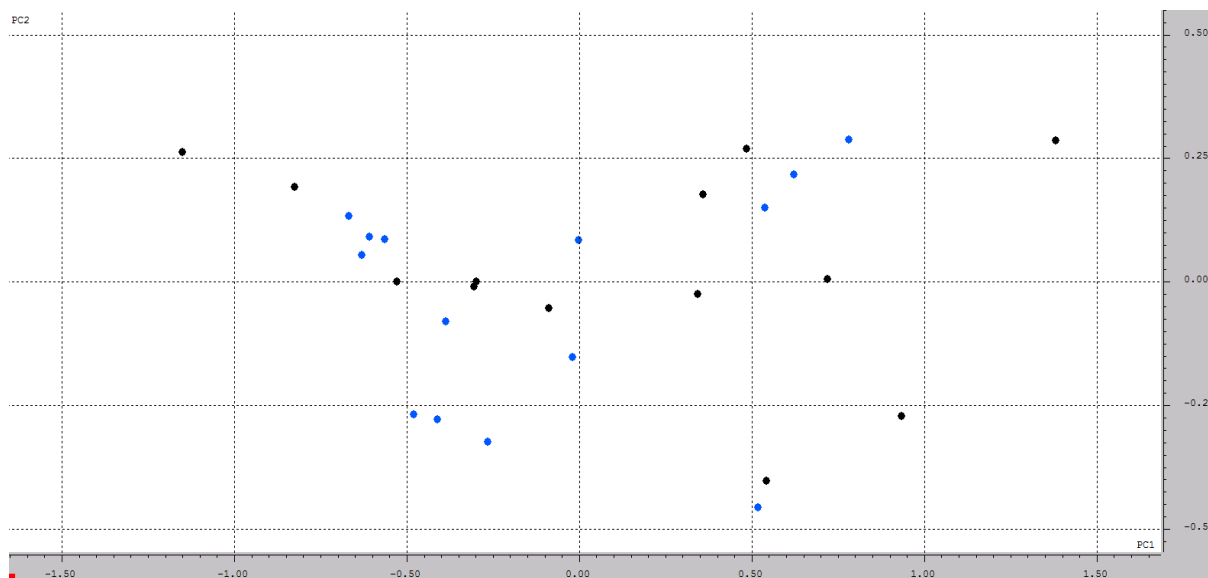


Figura 6 – PCA do metaboloma da carne de animais Nelore em função da dieta. Pontos: azuis (dieta controle); pretos (dieta suplementada).

O tipo de sistema de acabamento é o que mais influencia a deposição de gordura de cobertura nas carcaças de bovinos, assim como a concentração de ácidos gordos saturados e polinsaturados (Bressan et al., 2011b). Além disso, os *B. taurus* da raça Aberdeen Angus são animais precoces com maior predisposição para produzirem carnes mais tenras e com maiores teores de gordura intramuscular, do que raças zebus. Quando utilizados em cruzamentos com *B. indicus*, da raça Nelore, originam carnes com maiores quantidades de gordura (Maggioni et al., 2010). No presente ensaio, os dados analíticos da gordura intramuscular foram em média 1,9% (Antonelo, dados ainda não publicados), não tendo diferindo significativamente entre os grupos genéticos nem nas dietas. Apesar disso, esperava-se que a adição da fonte lipídica na dieta de acabamento promove-se maior diferenciação nos metabolomas da carne nos bovinos cruzados do que dos bovinos Nelore puros. Embora os dados da PCA não sejam plenamente conclusivos, constatou-se que houve uma ligeira tendência aglomerante e diferenciadora entre os metabolomas dos animais cruzados, causada pela adição do óleo de soja comparativamente à DC, que não existiu nos metabolomas dos animais Nelore.

Existem vários estudos que foram feitos com o interesse de perceber de que forma é que a suplementação lipídica pode ou não afetar as características de desenvolvimento dos animais e a produção da carne. Alguns autores notaram que a inclusão de óleo de soja, a determinadas concentrações, influenciava o desempenho produtivo (peso final, GMD, IMS) dos animais e, conseqüentemente, o rendimento de carcaça, a gordura intramuscular e a composição de carcaça (Grisworld et al., 2003; Engle et al., 2000; Aharoni et al., 2005).

Além disso, Engle et al. (2000), reportaram que os novilhos alimentados com uma dieta com óleo originaram maior concentração plasmática de colesterol.

A administração de uma fonte lipídica influencia a composição de ácidos gordos da carcaça, tanto ao nível dos músculos, como do tecido adiposo e, conseqüentemente, da carne, se bem que esse efeito é fortemente modulado pelo tipo de dieta base (Bessa et al., 2015). Estas influências foram evidenciadas por Aharoni et al. (2005), onde a suplementação de dietas ricas em forragem, com óleo de soja, originou um aumento no conteúdo de ácido vacénico (18:1 *trans*-11) e ácido linoleico conjugado (CLA) tanto na gordura intramuscular como subcutânea. Estes autores também mostram que os ácidos gordos saturados totais foram inferiores, os ácidos gordos polinsaturados totais e os ácidos gordos totais *trans* foram superiores na dieta com suplementação do que na dieta de controlo.

Outro trabalho (Grisworld et al., 2003) também demonstrou que a adição de óleo de soja a dietas de confinamento alterou o perfil lipídico dos tecidos musculares, nomeadamente com o aumento do teor de ácido linoleico e da tendência crescente de ácido linolénico, sem grande efeito no CLA.

No caso de carnes cruas e cozinhadas, de bovinos acabados com uma dieta suplementada com óleo de soja, estas apresentaram maior teor total CLA do que outros regimes alimentares (Lorezen et al., 2007). Estes autores explicam que isto poderá dever-se ao facto do óleo de soja conter grandes quantidades de ácido linoleico, que pode ser convertido em CLA através da bio hidrogenação ruminal.

Os efeitos da suplementação lipídica no metabolismo têm inúmeros resultados, tal como observámos. Estes variam consoante vários fatores, tais como, a concentração e fonte lipídica usada, o tipo de animal e estado fisiológico, a forma de suplementação, outros componentes da dieta como o tipo de forragem, etc. Embora Osorio et al. (2012) tenham conseguido identificar o sistema alimentar de bovinos através do metaboloma dos músculos, as provas reunidas neste trabalho são inconclusivas. Apesar de uma pequena diferenciação causada pelo tipo de dieta tenha sido evidenciada nos animais cruzados, no outro grupo genético não foram encontradas provas de divergência causadas pelo regime alimentar, devido à dispersão dos pontos.

Neste caso, também se quis averiguar quais os metabolitos que mais influenciavam a variabilidade dos metabolomas dentro de cada grupo genético. As Figuras 7 e 8 mostram a distribuição e a influencia dos metabolitos nos componentes principais. A figura 6, está relacionada com o metaboloma dos cruzados e a figura 7, com o metaboloma dos Nelore.

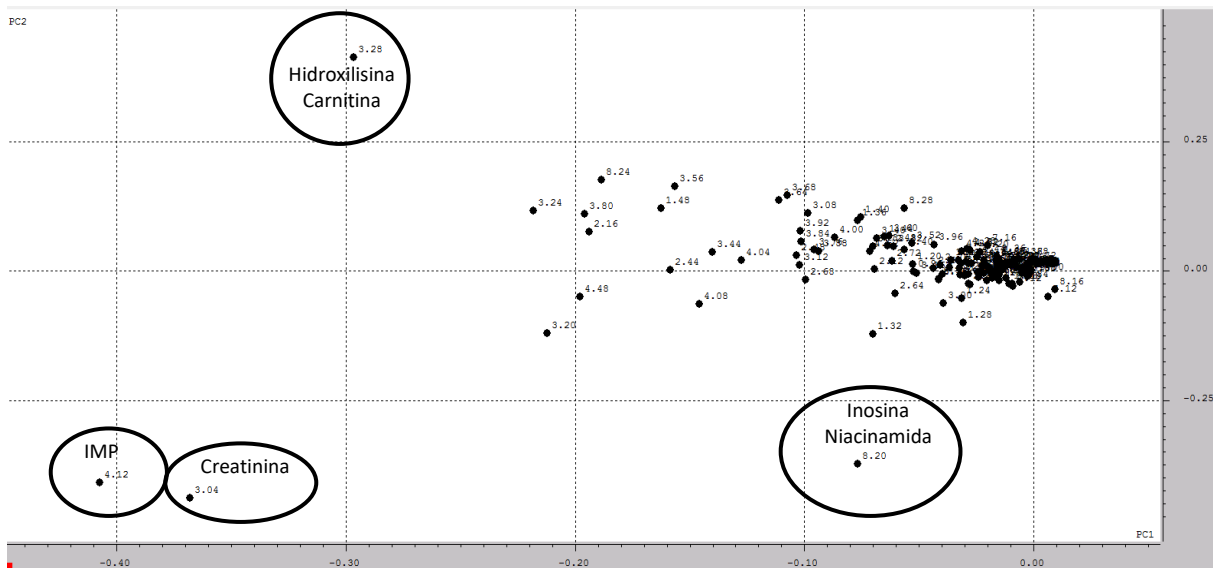


Figura 7 – Identificação dos metabolitos em função dos componentes principais, no grupo genético de animais cruzados.

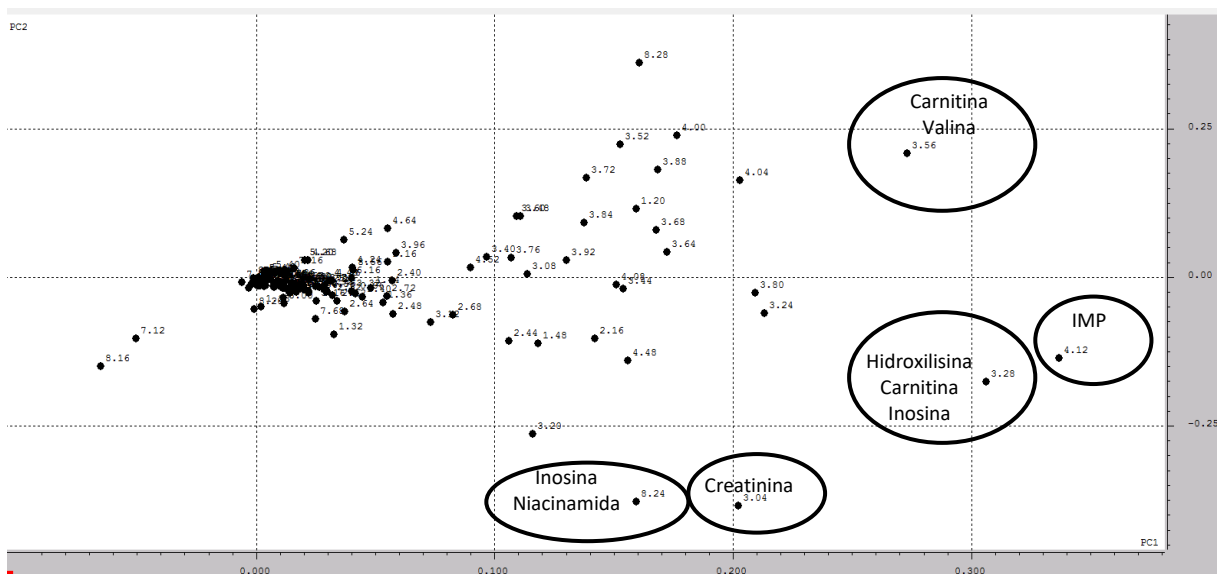


Figura 8 – Identificação dos metabolitos em função dos componentes principais, no grupo genético de animais Nelore.

Em ambas as figuras, observou-se uma série de compostos que se afastaram da região de menor variabilidade para uma região de maior variabilidade. Identificou-se essas moléculas e comparou-se.

Chegou-se à conclusão que, os metabolitos que apresentaram maior variabilidade nos 2 grupos genéticos foram os mesmos, à exceção da valina nos Nelore. Ou seja, apesar da inclusão do óleo ter provocado uma ligeira influencia no metaboloma dos cruzados, a variação dos metabolitos entre os 2 grupos não foi significativamente diferente. Levando a

crer que não há diferenças entre os metabolomas da carne entre os 2 grupos genéticos, ao contrário do reportado por Ritota et al. (2012) em bovinos e por Straadt et al. (2014) em suínos.

Relativamente à valina, pelo que se sabe, é um aminoácido essencial. Este, juntamente com a leucina e isoleucina, pertencem ao grupo de aminoácidos de cadeia ramificada e são importantes no organismo animal porque estão envolvidos com o *stress*, energia e metabolismo muscular. Apesar das suas similaridades estruturais, estes três aminoácidos possuem diferentes vias metabólicas, estando a valina apenas na via dos hidratos de carbono, a leucina exclusivamente na dos lípidos e a isoleucina em ambas (Goldansaz et al., 2017).

Na Figura 9, está representada a janela espectral delimitada às áreas de maior variabilidade do metaboloma nos componentes principais. Onde o CP1 representa a variação quantitativa, ou seja, a variação em função da intensidade e da concentração dos metabolitos. E o CP2 corresponde à variação qualitativa, i.e., variação em função do tipo de metabolitos. A região espectral apresentada com a cor verde, é relativa à variação conjunta, tanto qualitativa como quantitativa.

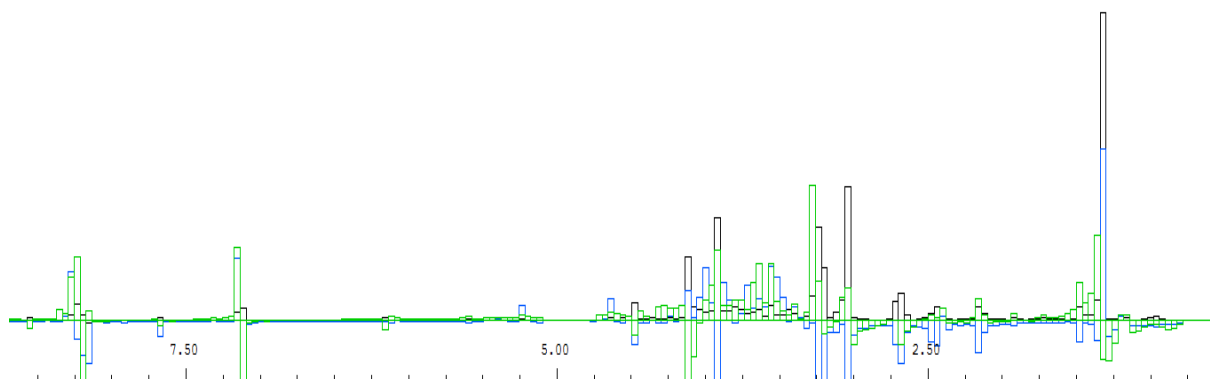


Figura 9 – Janela espectral das zonas de maior variabilidade do metaboloma nos componentes principais.

Esta figura serve apenas para mostrar que a variabilidade do CP1 e do CP2 foi muito pequena, justificando a ausência de efeitos dos tratamentos já vistos na PCA da Figura 1.

O que nos leva a concluir que o metaboloma, de uma forma geral, difere em apenas alguns pontos não apresentando grandes diferenças.

5. Conclusões

No geral, o presente trabalho demonstrou que é possível obter e estudar o metaboloma da carne de bovinos através de NMR.

Concluiu-se, através da observação das figuras de PCA, que não houve efeito nem do grupo genético nem da suplementação com óleo de soja nos metabolomas das amostras de carne. Pensa-se que isso possa ter sido causado por, pelo menos, 3 situações: análise a carne matura; utilização de animais geneticamente pouco distintos; e similaridade entre as dietas. Crê-se também que as alterações bioquímicas ocorridas *post-mortem* tenham sido as principais responsáveis pela ausência de efeitos.

Apesar disso, a associação da NMR com a PCA, mostrou ser uma ferramenta muito útil e importante neste estudo. Sugerindo que, no futuro, estas técnicas possam abrir novas linhas de investigação orientadas para a descoberta de bio-marcadores que contribuam para melhorar as características físico-químicas e organolépticas da carne.

6. Referências Bibliográficas

- Aharoni, Y., Orlov, A., Brosh, A., Granit, R., & Kanner, J. (2005). Effects of soybean oil supplementation of high forage fattening diet on fatty acid profiles in lipid depots of fattening bull calves, and their levels of blood vitamin E. *Animal Feed Science and Technology*, v. 119, 191-202;
- Aliani, M., & Farmer, L. J. (2005). Precursors of chicken flavor: II. Identification of key flavor precursors using sensory methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, 6455-6462;
- Antonelo, D. S. (dados ainda não publicados). *Efeitos da densidade energética sobre o desempenho, características de carcaça e qualidade da carne de bovinos B. indicus e B. indicus x B. taurus*. Dissertação de Doutorado em Ciências. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
- Aroeira, C. N., Torres Filho, R. A., Fontes, P. R., Gomide, L. A., Ramos, A. L., Ladeira, M. M., & Ramos, E. M. (2016). Freezing, thawing and aging effects on beef tenderness from *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Meat Science*, v.116, 118–125;
- Barlow, R. (1981). Experimental evidence for interactions between heterosis and environment in animals. *Animal Breeding*, v.49, 715–737;
- Beckonert, O., Keun, H. C., Ebbels, T. M., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J. C., & Nicholson, J. K. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nature Protocols*, v.2, n. 11, 2692-2703, 2697;
- Bessa, R. J., Alves, S. P., & Santos-Silva, J. (2015). Constraints and potentials for the nutritional modulation of the fatty acid composition of ruminant meat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.117, 1325–1344;
- Brennan, L. (2014). NMR-based metabolomics: From sample preparation to applications in nutrition research. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v.83, 42 – 49.
- Brescia, M. A., Jambrenghi, A. C., Di Martino, V., Sacco, D., Giannico, F., Vonghia, G., & Sacco, A. (2002). High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

- studies on meat components: potentialities and prospects. *Italian Journal of Animal Science*, v.1, 151-158.
- Bressan, M. C., Rodrigues, E. C., Rossato, L. V., Ramos, E. M., & Gama, L. T. (2011)a. Physicochemical properties of meat from *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, n.6, 1250-1259.
- Bressan, M. C., Rossato, L. V., Rodrigues, E. C., Alves, S. P., Bessa, R. J., Ramos, E. M., & Gama, L. T. (2011)b. Genotype x environment interactions for fatty acid profiles in *Bos indicus* and *Bos taurus* finished on pasture or grain. *Journal of Animal Science*, v.89, 221–232.
- Bunting, L. D., Yavuz, M., Fernandez, J. M., & Solaiman, S. G. (2002). Growth and metabolic responses of Holstein calves fed broiler litter-based diets supplemented with l-carnitine. *Animal Feed Science and Technology*, v.98, 61-71.
- Cabral, A. R. (2016). *Perfil lipídico de hambúrgueres produzidos a partir de carne de bovinos alimentados com fontes de óleo na dieta*. Dissertação de Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
- Cameron, N. D., Curran, M. K., & Kerr, J. C. (1994). Selection for components of efficient lean growth rate in pigs 3. Responses to selection with a restricted feeding regime. *Animal Production*, v.59, 271 – 279.
- Castejón, D., García-Segura, J. M., Escudero, R., Herrera, A., & Cambero, M. I. (2015). Metabolomics of meat exudate: Its potential to evaluate beef meat conservation and aging. *Analytica Chimica Acta*, v. 901, 1 -11.
- Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., & Rodrick, G. E. (2009). Metabolomic analysis in food science: review. *Trends in Food Science & Technology*, v.20, 557 - 566.
- Clarke, A. M., Drennan, M. J., McGee, M., Kenny, D. A., Evans, R. D., & Berry, D. P. (2009). Live animal measurements, carcass composition and plasma hormone and metabolite concentrations in male progeny of sires differing in genetic merit for beef production. *Animal*, 3:7, 933-945.
- Clarke, J. N., Binnie, D. B., Dobbie, J. L., Jones, K. R., & Mowat, C. M. (1996). Repeatabilities of blood plasma metabolites and their associations with leanness in

- genotypes showing a wide divergence in carcass composition. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, v.56, 180-183.
- Costa e Silva, L. F., Valadares Filho, S. C., Chizzotti, M. L., Rotta, P. P., Prados, L. F., Valadares, R. F., Braga, J. M. (2012). Creatinine excretion and relationship with body weight of Nellore cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.41, n.º3, 807-810.
- Costa, J. N. (2013). *Impacto do transporte e do tempo na abegoaria no pH das carcaças de vitela, em condições comerciais*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Crouse, J. D., Cundiff, L. V., Koch, R. M., Koohmaraie, M., & Seideman, S. C. (1989). Comparisons of *Bos indicus* and *Bos taurus* Inheritance for Carcass Beef Characteristics. *Journal of Animal Science*, v.67, 2661-2668.
- Cundiff, L. V., Szabo, F., Gregory, K. E., Koch, R. M., Dikeman, M. E., & Crouse, J. D. (1993). Breed comparisons in the Germplasm Evaluation Program at MARC. *Apresentada em " Beef Improvement Federation 25th Anniversary Conference" .* Asheville, North Carolina, USA.
- Cunningham, E. P., & Syrstad, O. (1987). Types and Breeds of Tropical and Temperate Cattle. In *Crossbreeding bos indicus and bos taurus for milk production in the tropics*. FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Obtido de <http://www.fao.org/docrep/009/t0095e/T0095E00.htm#TOC>
- D'Alessandro, A., Marrocco, C., Zolla, V., D'Andrea, M., & Zolla, L. (2011). Meat quality of the longissimus lumborum muscle of Casertana and Large White pigs: Metabolomics and proteomics intertwined. *Journal of Proteomics*, v.75, 610-627.
- Durnford, E., & Shahidi, F. (1998). Flavour of fish meat. In: *Flavour of Meat, Meat Products and Seafoods*, 2nd ed. *Blackie Academic and Professional*, 131-158.
- Elzo, M. A., Johnson, D. D., Wasdin, J. G., & Driver, J. D. (2012). Carcass and meat palatability breed differences and heterosis effects in an Angus–Brahman multibreed population. *Meat Science*, v. 90, 87–92.
- Engle, T. E., Spears, J. W., Fellner, V., & Odle, J. (2000). Effects of soybean oil and dietary copper on ruminal and tissue lipid metabolism in finishing steers. *Journal of Animal Science*, v.78, 2713-2721.

- Eurogene Ai Services (s.d.). *Belack Duke | Beef | Ai Services by Eurogene, Ireland's fastest growing AI Company*. Obtido em 7 de Junho de 2017, de <http://www.eurogeneaiservices.com/Beef/Belack-Duke>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2009). *How to Feed the World in 2050*. Obtido em 20 de Outubro de 2016, de Food and Agriculture Organization of the United Nations: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
- Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics (2016). *Compare data*. Obtido de FAOSTAT: <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>
- Fontes, M. A., Pinto, A. S., & Lemos, J. P. (2011). Qualidade na carne de bovino: atributos e percepção. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.110, (577-580) 21-29.
- Forbes, G. B., & Bruining, G. J. (1976). Urinary creatinine excretion and lean body mass. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.29, 1359-1366.
- Gama, L. T., Bressan, M. C., Rodrigues, E. C., Rossato, L. V., Moreira, O. C., Alves, S. P., & Bessa, R. B. (2013). Heterosis for meat quality and fatty acid profiles in crosses among *Bos indicus* and *Bos taurus* finished on pasture or grain. *Meat Science*, v.93, 98-104.
- Goldansaz, S. A., Guo, A. C., Sajed, T., Steele, M. A., Plastow, G. S., & Wishart, D. S. (2017). Livestock metabolomics and the livestock metabolome: A systematic review. *PLoS ONE* 12(5). Obtido em 19 de Junho de 2017, de <http://lmdb.ca/metabolites/LMDB00055>.
- Graham, S. F., Kennedy, T., Chevallier, O., Gordon, A., Farmer, L., Elliott, C., & Moss, B. (2010). The application of NMR to study changes in polar metabolite concentrations in beef longissimus dorsi stored for different periods post mortem. *Metabolomics*, v.6, 395 – 404.
- Grisworld, K. E., Apgar, R. A., Robinson, R. A., Jacobson, B. N., Johnson, D., & Woody, H. D. (2003). Effectiveness of Short-Term Feeding Strategies for Altering Conjugated Linoleic Acid Content of Beef. *Journal of Animal Science*, v.81 (7), 1862-1871.
- Grunert, K. G. (2005). Food quality and safety: consumer perception and demand. *European Review of Agricultural Economics*, v.32 , 369-391.

- Harris, C. I., & Milne, G. (1981). The urinary excretion of N-methyl histidine by cattle: validation as an Index of muscle protein breakdown. *British Journal of Nutrition*, v.45, 411-422.
- Heiderich, D. (2014). *Efeito do Estágio Fisiológico sobre a Taxa de Turnover Proteico e as Exigências de Protéina para Manutenção de Bovinos Nelore*. Dissertação de Mestrado em Zootecnia. Universidade Federal de Lavras.
- Heinz, G., & Hautzinger, P. (2007). Meat, Fat and Other edible carcass parts. In *Meat Processing Technology for Small -to Medium -Scale Producers*. FAO - Food and Agriculture Organization of United Nations. Obtido em 6 de Dezembro de 2016, de <http://www.fao.org/docrep/010/ai407e/AI407E00.htm#Contents>
- Highfill, C. M., Esquivel-Font, O., Dikeman, M. E., & Kropf, D. H. (2012). Tenderness profiles of ten muscles from F1 Bos indicus x Bos taurus and Bos taurus cattle cooked as steaks and roasts. *Meat Science*, v.90, 881-886.
- Hill, G. M., Newton, S. A., & Blum, S. A. (1994). Carnitine in growing steer diets: digestibility and feedlot performance. *Journal of Animal Science*, v.72, 187.
- Ito, R. H., Ducatti, T., Prado, J. M., Prado, I. M., Rotta, P. P., Valero, M. V., Silva, R. R. (2010). Soybean oil and linseed grains on performance and carcass characteristics of crossbred bulls finished in feedlot. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v.31, 259-268.
- Jung, Y., Lee, J., Kwon, J., Lee, K. S., Ryu, D. H., & Hwang, G. S. (2010). Discrimination of the Geographical Origin of Beef by 1H NMR-Based Metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, 10458–10466.
- Kim, Y. H., Kemp, R., & Samuelsson, L. M. (2016). Effects of dry-aging on meat quality attributes and metabolite profiles of beef loins. *Meat Science*, v.111, 168–176.
- Koohmaraie, M., Kent, M. P., & Shackelford, S. D. (2002). Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? *Meat Science*, v.62, 345-352.
- Lee, S. M., Kwon, G. Y., Kim, K., & Kim, Y. (2011). Metabolomic approach for determination of key volatile compounds related to beef flavor in glutathione-Maillard reaction products. *Analytica Chimica Acta*, v.703, 204-211.

- Lorezen, C. L., Golden, J. W., Martz, F. A., Grun, I. U., Ellersieck, M. R., Gerrish, J. R., & Moore, K. C. (2007). Conjugated linoleic acid content of beef differs by feeding regime and muscle. *Meat Science*, v.75, 159-167.
- Magee, D. A., MacHugh, D. E., & Edwards, C. J. (2014). Interrogation of modern and ancient genomes reveals the complex domestic history of cattle. *Animal Frontiers*, v.4, 7-22.
- Maggioni, D., Marques, J. A., Rotta, P. P., & Perotto, D. (2010). Animal performance and meat quality of crossbred young bulls. *Livestock Science*, 176–182.
- Marshall, D. M. (1994). Breed Differences and Genetic Parameters for Body Composition Traits in Beef Cattle. *Journal of Animal Science*, v.72, 2745-2755.
- Melzer, N., Wittenburg, D., Hartwig, S., Jakubowski, S., Kesting, U., Willmitzer, L., Repsilber, D. (2013). Investigating associations between milk metabolite profiles and milk traits of Holstein cows. *Journal Dairy Science*, v.96, 1521–1534.
- NRC, N. R. (2000). *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. Seventh Revised Edition.
- Organization for Economic Co-operation and Development (2016). *Meat consumption*. Obtido em 18 de Novembro de 2016, de OECD Data: <https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm>
- OECD/FAO. (2016). Meat. In *OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025* (pp. 1-12). Paris: OECD Publishing.
- Osorio, M. T., Moloney, A. P., Brennan, L., & Monahan, F. J. (2012). Authentication of beef production systems using a metabolomic-based approach. *Animal*, v.6, 167 - 172.
- Palmquist, D. L. & Mattos, W. R. (2006). Metabolismo de lipídeos. In T. T. Berchielli, A. V. Pires, & S. G. Oliveira, *Nutrição de ruminantes* (pp. 287-310). Jaboticabal: Funep.
- Patti, G. J., Yanes, O., & Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature Reviews - Molecular Cell Biology*, v.13, 263-269.
- Piao, M. Y., Jo, C., Kim, H. J., Lee, H. J., Kim, H. J., Ko, J., & Baik, M. (2015). Comparison of Carcass and Sensory Traits and Free Amino Acid Contents among Quality Grades in Loin and Rump of Korean Cattle Steer. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 28, nº.11, 1629-1640.
- Prado, I. N., Moreira, F. B., Matsushita, M., & Souza, N. E. (2003). Longissimus dorsi Fatty Acids Composition of Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus Crossbred Steers

- Finished in Pasture. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.46, nº 4, 601-608.
- Prado, I. N., Passetti, R. A., Rivaroli, D. C., Ornaghi, M. G., Souza, K. A., Carvalho, C. B., Moletta, J. L. (2015). Carcass composition and cuts of bulls and steers fed with three concentrate levels in the diets. *Asian Australasian Journal of Animal Science*, v.28, 1309-1316.
- Ramanathan, R., Madden, R., Mafi, G. G., VanOverbeke, D. L., & Dillwith, J. W. (2015). Comparison of extraction procedures to characterize beef Longissimus metabolomic profile. *Meat Science*, v.101, 161-162.
- Revista Pecuária Brasileira (2015). *CRI contrata novos touros Nelore para reforçar sua bateria de corte - Revista Pecuária Brasil*. Obtido em 7 de Junho de 2017, de <http://www.revistapecuariabrasil.com.br/noticia/108-cri-contrata-novos-touros-nelore-para-reforar-sua-bateria-de-corte>;
- Ritota, M., Casciani, L., Sebastiana, F., & Valentini, M. (2012). HRMAS-NMR spectroscopy and multivariate analysis meat characterisation. *Meat Science*, v.92, 754-761.
- Rochfort, S. J., Ezernieks, V., Maher, A. D., Ingram, B. A., & Olsen, L. (2013). Mussel metabolomics — Species discrimination and provenance determination. *Food Research International*, v.54, 1302–1312.
- Rodrigues, H. D., Kinder, J. E., & Fitzpatrick, L. A. (2002). Estradiol Regulation of Luteinizing Hormone Secretion in Heifers of Two Breed Types That Reach Puberty at Different Ages. *Biology of Reproduction*, v.66, 603-609.
- Rosa, B. L., Sampaio, A. M., Henrique, W., Oliveira, E. A., Pivaro, T. M., Andrade, A. T., & Fernandes, A. M. (2013). Performance and carcass characteristics of Nelore young bulls fed different sources of oils, protected or not from rumen degradation. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.42, 109-116.
- Rotta, P. P., Prado, R. M., Prado, I. N., Valero, M. V., Visenatiner, J. V., & Silva, R. R. (2009). The effects of genetic groups, nutrition, finishing systems and gender of Brazilian cattle on carcass characteristics and beef composition and appearance: a review. *Asian Australasian Journal of Animal Science*, v.22, 1718–1734.
- Sahlin, K., Broberg, S., & Ren, J. M. (1989). Formation of inosine monophosphate (IMP) in human skeletal muscle during incremental dynamic exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*, v.136 (2), 193-198.

- Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., & Miller, M. F. (1991). An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. *Journal of Animal Science*, v.69, 171-177.
- Shimada, K., Sakuma, Y., Wakamatsu, J., Fukushima, M., Sekikawa, M., Kuchida, K., & Mikami, M. (2004). Species and muscle differences in L-carnitine levels in skeletal muscles based on a new simple assay. *Meat Science*, v.68, 357-362.
- Silveira, I. D., Fischer, V., & Soares, G. J. (2006). Relação entre o genótipo e o temperamento de novilhos em pastejo e seu efeito na qualidade da carne. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.2 , 519-526.
- Straadt, I. K., Aaslyng, M. D., & Bertrama, H. C. (2014). An NMR-based metabolomics study of pork from different crossbreeds and relation to sensory perception. *Meat Science*, v.96, 719-728.
- Sundekilde, U. K., Frederiksen, P. D., Clausen, M. R., Larsen, L. B., & Bertram, H. C. (2011). Relationship between the Metabolite Profile and Technological Properties of Bovine Milk from Two Dairy Breeds Elucidated by NMR-Based Metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, 7360 - 7367.
- Tatum, J. D. (2011). Animal age, physiological maturity, and associated effects on beef tenderness. Cattlemen's Beef Board and National Cattlemen's Beef Association. Obtido de http://www.beefresearch.org/CMDocs/BeefResearch/PE_White_%20Papers/Animal_Age.pdf
- Tiikk, M., Tikk, K., Tørngren, M. A., Meinret, L., Aaslyng, M. D., Karlsson, A. H., & Andersen, H. J. (2006). Development of Inosine Monophosphate and Its Degradation Products during Aging of Pork of Different Qualities in Relation to Basic Taste and Retronasal Flavor Perception of the Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, 7769-7777.
- Van Niekerk, B. D., Reid, J. T., & Bensadoun, A. (1963). Urinary creatinine as an index of body composition. *Journal of Nutrition*, v.79, 463-473.
- Weljie, M., Newton, J., Mercier, P., Carlson, E., & Slupsky, C. M. (2006). Targeted Profiling: Quantitative Analysis of ¹HNMR Metabolomics Data. *Analytical Chemistry*, v.78, 4430-4442.

- Wheeler, T. L., Cundiff, L. V., & Koch, R. M. (1994). Effect of Marbling Degree on Beef Palatability in *Bos taurus* and *Bos indicus* Cattle. *Journal of Animal Science*, v.72, 3145-3151.
- Whipple, G., Koohmaraie, M., Dikeman, M. E., Crouse, J. D., Hunt, M. C., & Klemm, R. D. (1990). Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, v.68 (9), 2716–2728.
- Wishart, D. S. (2008). Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology*, v.19, 482 - 493.
- Young, J. F., Bertram, H. C., Theil, P. K., Petersen, A. G., Poulsen, K. A., Rasmussen, M., Oksbjerg, N. (2007). In vitro and in vivo studies of creatine monohydrate supplementation to Duroc and Landrace pigs. *Meat Science*, v.76, 342–351.
- Zanardi, E., Caligiani, A., Palla, L., Mariani, M., Ghidini, S., Di Ciccio, P. A., . . . Ianieri, A. (2015). Metabolic profiling by ¹H NMR of ground beef irradiated at different irradiation doses. *Meat Science*, v.103, 83-89.