

PERFIL PROTEICO ASSOCIADO À COR DA CARNE DE BOVINOS NELORE SUBMETIDOS E NÃO SUBMETIDOS À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DURANTE O ABATE

Leonardo Augusto Velloso¹; Victória Rizzato Paschoal²; Júlio César de Carvalho Balieiro²

¹Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – FZEA/USP

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP

leo.velloso@usp.br

Objetivos

O objetivo geral do trabalho foi avaliar variáveis relacionadas à cor da carne e as diferenças no perfil proteico de carcaças bovinas submetidas e não submetidas à eletroestimulação (EE) em dois momentos do *post mortem* em bovinos da raça Nelore.

Métodos e Procedimentos

Foram avaliados neste estudo, carcaças de 24 bovinos da raça Nelore, machos não castrados, com até 35 meses de idade. Estes 24 animais foram divididos em dois grupos, sendo as meia-carcaças direitas estimuladas por corrente elétrica (EE) e as meia-carcaças esquerdas não estimuladas eletricamente (NE). Para avaliação do perfil proteico, foi retirada uma amostra de tecido do *Longissimus dorsi* (LD) aproximadamente 30 minutos *post mortem* (T0), na região da 12^a costela. As amostras foram então congeladas em nitrogênio líquido. Uma nova biopsia foi coletada com 24 horas *post mortem*. As amostras de tecido muscular foram transferidas para um ultrafreezer e armazenadas a -80°C para posteriores análises. Dos 24 animais, foram selecionados 6 ao acaso e suas amostras foram divididas em quatro grupos: (i): seis amostras não eletroestimuladas (NE) imediatamente após o abate (T0); (ii): seis amostras (NE) com 24 horas *post mortem* (T24); (iii): seis amostras eletroestimuladas (EE) imediatamente após o

abate (T0); e, (iv): seis amostras eletroestimuladas (EE) 24 horas *post mortem*.

Às 24h *post mortem* foram, também, retirados bifes de 2,5 cm de espessura para avaliação de cor pelas coordenadas CIE L*, a*, b*, que foram obtidas em três posições adjacentes do bife sem presença de tecido conjuntivo após tempo de oxigenação (*bloom time*) de 30 minutos.

Para obtenção do perfil proteico, as amostras ainda congeladas foram cortadas e homogeneizadas. Meia grama foi retirada e homogeneizada com tampão de lise, com auxílio de homogeneizador Turrtec. As amostras foram agitadas por 30 min a 4°C, e posteriormente centrifugadas 10000 x g por 30 min a 4°C em centrífuga. O sobrenadante foi armazenado para posterior determinação de proteína total pelo método de Bradford.

Para as análises de eletroforese em gel unidirecional (1-DE), as amostras foram diluídas em Eppendorf e misturadas em agitador de vórtice. Em seguida foi acrescido 5µL de tampão Laemmli e aquecidas por 5 min a 95°C. A amostra foi então aplicada em um poço de um gel de poliacrilamida 10%. Um marcador de peso molecular SDS-PAGE (*Page Ruler Prestained Protein Ladder*) também foi carregado em cada gel. Os géis foram corridos em tampão de corrida SDS, com voltagem constante de 60V por 30 min e em seguida

100V por 2 horas. Os géis foram corados pelo procedimento de coloração *Coomassie*. Os géis foram escaneados no dia seguinte, tendo suas imagens digitalizadas no *ImageScanner*. Para análise de imagem dos géis foi utilizado o programa *ImageQuant TL*, versão 10.0.

As análises para os volumes das abundâncias de peptídeos normalizados de cada banda foram avaliadas por meio correlações momento-produto de *Pearson* para avaliar o padrão de abundância de cada banda identificada em relação coordenadas CIE L^* , a^* , b^* das amostras. Todas as análises foram realizadas com auxílio do procedimento CORR do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.4 (*SAS Institute Inc.*, Cary, NC, EUA).

Resultados

A Figura 1 demonstra um dos géis utilizados nas análises de imagens, com a primeira coluna sendo destinada ao marcador de peso molecular (em kDa) e as restantes a amostras EE e NE.

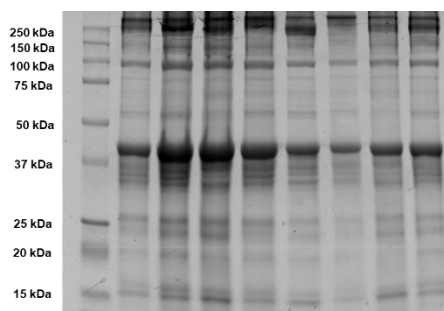


Figura 1: Exemplo de gel 1-DE com pesos moleculares e quatro amostras EE e quatro amostras NE respectivamente.

Após as análises de imagens, foram detectadas 17 bandas presentes em todos os géis avaliados. Com o objetivo de prospectar mais bandas para análises de identificação de peptídeos, via espectrometria de massa (MS/MS), foram realizadas análises de correlação Momento-Produto de *Pearson* entre as percentagens de volumes normalizados (em %) em cada banda identificada e os valores de cor (L^* , a^* e b^*), ao longo dos diferentes

períodos de maturação da carne (1 e 14 dias *post mortem*).

Primeiramente para o parâmetro L^* , observa-se no 14º dia *post mortem*, correlação de alta magnitude nas carcaças EE nas bandas 4 e 5, sendo o L^* associado com o aumento de brilho da carne.

Para o parâmetro a^* , no 14º dia *post mortem*, observa-se correlação de magnitude elevada na banda 14 dos EE e na banda 13 nos NE. O valor de a^* está atrelado à tonalidade vermelha da carne, sendo importante característica da primeira avaliação por parte dos consumidores. Já para o parâmetro b^* , no dia 14 *post mortem*, observa-se correlações negativas e de média-alta intensidade na banda 8 EE e na banda 6 NE. O valor de b^* é relacionado com tonalidade de amarelo e pode sugerir possível descoloração da cor desejável ao consumidor, que seria o vermelho intenso.

Conclusões

Este trabalho demonstrou que há relação entre os Tratamento (EE ou NE) e as características relacionadas à cor da carne, avaliadas instrumentalmente. Estimativas de correlações de média-alta intensidades, negativas e positivas, foram capturadas para todos os valores de cor observados, porém, em diferentes momentos do *post mortem*. Maiores estudos são necessários visando a eleição das bandas a serem encaminhadas para as análises de espectrometria de massa, visando a identificação dos peptídeos presentes dentro de cada banda diferencialmente abundante e das bandas que foram correlacionadas com os valores de cor, principalmente a^* .

Referências

- LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v.15, n. 227. P.: 680-685, 1970.
- LAMETSCH, R.; KARLSSON, A.; ROSENVOLD, K.; ANDERSEN, H. J.; ROEPSTORFF, P.; BENDIXEN, E. *Postmortem* proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p.6992-6997, 2003.

PROTEIN PROFILE ASSOCIATED WITH MEAT COLOR OF NELORE SUBJECTED AND NOT SUBJECTED TO ELECTRICAL STIMULATION DURING SLAUGHTER

Leonardo Augusto Velloso¹; Victória Rizzato Paschoal²; Júlio César de
Carvalho Balieiro²

¹Faculty of Animal Science and Food Engineering FZEA/USP

²Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science – FMVZ/USP

Leo.velloso@usp.br

Objectives

The general objective of the work was to evaluate variables related to meat color and differences in the protein profile of bovine carcasses submitted and not submitted to electrical stimulation (EE) in two *postmortem* times in Nelore cattle.

Materials and Methods

In this study, carcasses of 24 Nelore cattle, unneutered males, up to 35 months of age were evaluated. These 24 animals were divided into two groups, with the right half-carcasses being stimulated by electrical current (EE) and the left half-carcasses not being electrically stimulated (NE). For the evaluation of the protein profile, a sample of *Longissimus dorsi* (LD) tissue was taken approximately 30 minutes *postmortem* (T0) in the 12th rib area. The samples were then frozen in liquid nitrogen. A new biopsy was collected at 24 hours *postmortem*. The muscle tissue samples were transferred to an ultrafreezer and stored at -80°C for posterior evaluation. Of the 24 initial animals, 6 were selected at random and their samples were divided into four groups: (i) six unstimulated (NE) samples, immediately after slaughter (T0); (ii) six (NE) samples, 24 hours *postmortem* (T24); (iii) six electrically stimulated (EE) samples, immediately after slaughter (T0); e (iv) six (EE) samples, 24 hours *postmortem*. At 24 hours *postmortem*, 2,5 cm wide steaks were taken from the same area, for color

evaluation using CIE L*, a*, b* coordinates, which were taken in 3 adjacent positions without the presence of connective tissue in the steak, after an oxygenation period (*bloom time*) of 30 minutes.

To obtain the protein profile, the still frozen samples were cut and homogenized. Half a gram was then homogenized with lysis buffer, with the help of a Turrattec homogenizer. The samples were then agitated for 30 minutes at 4°C, and posteriorly centrifuged at 10000 x g for 30 minutes at 4°C in a centrifuge. The supernatant was then collected and stored for posterior total protein determination using the Bradford Method.

For the electrophoresis in unidirectional gel (1-DE) evaluation, the samples were diluted in an Eppendorf and mixed in a vortex shaker. Then they were added 5 µL of Laemmli buffer and heated at 95°C for 5 minutes. The sample was then applied to a pit in a 10% polyacrylamide gel. A molecular weight marker SDS-PAGE (*Page Ruler Prestained Protein Ladder*) was also applied to each gel. The gels were then runned in SDS run buffer, with a constant voltage of 60 V for 30 minutes and then 100 V for 2 hours. The gels were colored by the *Coomassie* coloring procedure. The gels were scanned in the following day, by digitalizing in the ImageScanner. For the image evaluation, the ImageQuant version 10.0 program was used.

The analyses for peptide normalized volume abundance of each band were evaluated using Pearson moment-product correlations to

evaluate the abundance pattern of each identified band in relation to the CIE L*, a*, b* coordinates of the samples. All analyses were performed using the CORR procedure of the *Statistical Analysis System*, version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Results

Figure 1 demonstrates one of the gels used in the image analyses, with the first column being used for the molecular weight marker (in kDa) and the others for EE and NE samples.

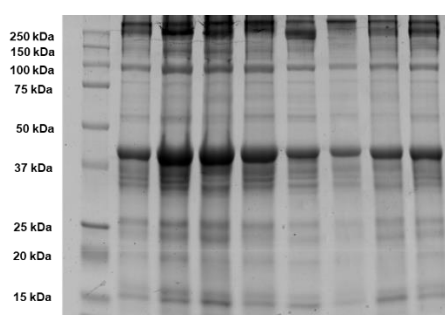


Figure 1: Example of 1-DE gel with molecular weights and four EE samples and four NE samples respectively.

After the image analyses, 17 bands were detected in all gels evaluated. With the aim of prospecting more bands for peptide identification analyses, via mass spectrometry (MS/MS), Pearson moment-product correlation analyses were carried out between the percentages of normalized volumes (in %) in each identified band, and the color values (L*, a* and b*), throughout the different periods of meat maturation (1- and 14-days *postmortem*).

Firstly, for the L* parameter, it is observed that in the 14th day *postmortem*, there is a high magnitude correlation in the EE carcasses in bands 4 and 5. The L* parameter is associated with the increase in meat luminosity.

For the a* parameter, in the 14th day *postmortem*, it is observed a high magnitude correlation in EE in band 14 and in NE in band 13. The a* value is associated with red color, being very important in meat consumer acceptance.

Lastly, for the b* parameter, it is observed that in the 14th day *postmortem*, there is a negative and medium-high correlation in band 8 of the EE and in band 6 of the NE. The b* value is related to the yellow tone and could indicate an

unwanted color for the customer, being the intense red more desirable.

Conclusions

This work demonstrated that there is a relationship between Treatment (EE or NE) and characteristics related to meat color, assessed instrumentally. Estimates of medium-high intensity correlations, negative and positive, were captured for all color values observed, however, at different moments of the *postmortem*. Further studies are needed to select the bands to be sent for mass spectrometry analyses, aiming to identify the peptides present within each differentially abundant band and the bands that were correlated with the color values, mainly a*.

References

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v.15, n. 227. P.: 680-685, 1970.

LAMETSCH, R.; KARLSSON, A.; ROSENVOLD, K.; ANDERSEN, H. J.; ROEPSTORFF, P.; BENDIXEN, E. *Postmortem* proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p.6992-6997, 2003.