

PERFIL PROTEICO EM BOVINOS NELORE SUBMETIDOS E NÃO SUBMETIDOS À ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DURANTE O ABATE

Ana Cristina Salvadori Martins¹; Leonardo Augusto Velloso²; Victória Rizzato Paschoal¹; Júlio César de Carvalho Balieiro¹

¹ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP.

² Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - FZEA/USP

e-mail: anacristinasalvadori@usp.br

Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o perfil proteico de carcaças bovinas submetidas e não submetidas à eletroestimulação (EE) em dois momentos do *post mortem* em bovino 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 foram divididos em dois grupos, sendo as meia-carcaças direitas estimuladas por corrente elétrica (EE) e as meia-carcaças esquerdas não estimuladas eletricamente (NE). Aproximadamente 30 minutos *post-mortem*, uma amostra de tecido (T0) foi retirada do *Longissimus dorsi* (LD) na região da 12^a costela e congelada em nitrogênio líquido. As amostras de tecido muscular foram transferidas para um ultrafreezer e armazenadas a -80°C para posterior avaliação do perfil proteico. Biópsias adicionais e bifes foram retirados após 24 horas para avaliação de maciez (MAC) e perdas de água por cocção (PAC). Os bifes foram embalados individualmente a vácuo em filme plástico de alta barreira (BB3; Cryovac) e mantidos em câmara fria a 2-4°C para maturação por 24 horas, sete e 14 dias até as análises de maciez. Dos 24 animais, foram retiradas amostras ao acaso e divididas em quatro grupos: (i) seis amostras das meia-carcaças não eletro-estimuladas (NE) imediatamente após o abate (0H); (ii) seis amostras das mesmas meia-carcaças não eletro-estimuladas (NE) com 24 horas *post mortem* (24H); (iii) seis amostras das meia-carcaças eletro estimuladas (EE) imediatamente após o abate (0H); e, (iv): seis amostras das mesmas meia-carcaças eletro estimuladas (EE) 24 horas após o abate. Para

a determinação das perdas de água por cocção (PAC) e da maciez (MAC), foi utilizada a metodologia proposta pela AMSA (1995).

Para obtenção do perfil proteico, as amostras de carne bovina foram descongeladas em temperatura ambiente, em seguida foram cortadas e homogeneizadas. Foi retirada uma alíquota de um grama da amostra que foi homogeneizada em Tampão de extração (Lamestch et al., 2003) por 60 segundos, a 16000 rpm, com auxílio de homogeneizador Turrtec (modelo TE-102; marca Tecnal). As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 4°C por 20 min. a 25.000xg em centrífuga e a concentração de proteínas foi determinada. Para as análises de eletroforese em gel unidirecional (1-DE), as amostras foram diluídas em Eppendorf e misturadas em agitador de vórtice (VORTEX). Em seguida foram acrescidos 5µL de tampão 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-Sinapse Biotecnologia*) também foi carregado em cada gel. Os géis foram corridos em tampão de corrida SDS proposto por Laemmli (1970), com voltagem constante de 60V por 30 min e em seguida 100V por 2 horas. Foram corados pelo procedimento de coloração *Coomassie*, e mantidos em uma solução fixadora por 10 minutos, seguida de solução corante por 60 minutos e, posteriormente mantidos em solução descorante por mais 60 minutos. Por fim, foram mantidos em água MilliQ *overnight*, para no dia seguinte serem escaneados. As imagens dos géis foram digitalizadas no *ImageScanner* (mod. *PowerLook 1120*; marca *Amersham Biosciences*). Para análise dos géis foi utilizado o programa *ImageQuant TL*, versão 10.0 (*Cytiva Life Sciences*).

As análises de abundância de peptídeos foram avaliadas por um modelo linear misto, considerando Tratamentos, Tempo de Maturação e interação Tratamento x Tempo. Efeitos aleatórios de animal e resíduo também foram considerados. Correlações momento-produto de Pearson foram usadas para avaliar a abundância em relação à maciez e perdas de água por cocção. As análises foram realizadas com o 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, sendo a primeira coluna destinada ao marcador de peso molecular (em kDa) e as demais, da esquerda para a direita relacionadas à quatro colunas com amostras das meia-carcaças eletro estimuladas (EE) e quatro colunas com de meia-carcaças não estimuladas (NE).

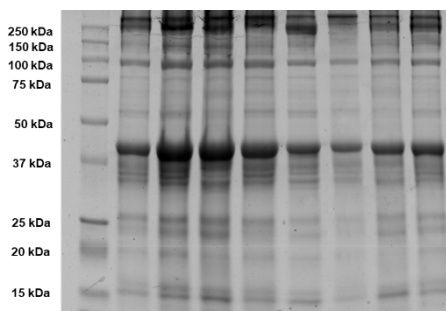


Figura 1: Exemplo de gel 1-DE com pesos moleculares e quatro amostras EE e quatro amostras NE respectivamente

Após as análises de imagens, foram detectadas 17 bandas presentes em todos os géis avaliados. As 17 bandas identificadas foram submetidas a análises de variância considerando os efeitos fixos descritos.

Foram observados resultados significativos ($P < 0,05$) e marginalmente significativos ($P < 0,10$) somente para os efeitos principais de Tratamento e Tempo. Não foram observados efeitos significativos para a Interação Tratamento x Tempo para nenhuma banda avaliada ($P > 0,05$). Isso indica que não há dependência entre os fatores Tratamento (EE ou NE) e Tempo *post mortem* (0 ou 24 horas). Com relação ao efeito principal de Tratamentos

(EE ou NE), as bandas 3 e 16 apresentaram efeito marginalmente significativo ($P < 0,10$) enquanto que para a banda 15, verificou-se efeito significativo ($P < 0,05$). Esse comportamento pode ter ocorrido devido à ruptura física de miofibrilas, levando a fragmentação de proteínas miofibrilares, possibilitando a migração de peptídeos para as bandas mais leves. Com relação ao efeito principal de Tempo (0 ou 24 horas), verificou-se efeitos significativos ($P < 0,05$) para as bandas 6 e 15 e efeito marginalmente significativo ($P < 0,10$) para a banda 7. Esse fato pode ser devido ao efeito da proteólise que ocorreu após as 24 horas *post mortem*, durante a estabilização do *rigor mortis*. A degradação proteolítica que ocorre imediatamente após o *rigor mortis* e, durante o processo de maturação, a degradação proteolítica é favorecida diversas enzimas como calpaínas, calpastatinas, capases, dentre outras, as quais têm ação sobre as proteínas miofibrilares, especialmente os filamentos intermediários.

Conclusões Parciais

Este trabalho demonstrou que não há dependência entre os fatores Tratamento (EE ou NE) e Tempo *post mortem* (0 ou 24 horas). Observou-se que os Tratamentos avaliados (EE ou NE) provocaram efeito significativo (ou marginalmente significativo) para as bandas 3, 15 e 16. O efeito da proteólise foi observado para as bandas 6, 7 e 15 com maiores porcentagens de volumes normalizados ocorrendo 24 horas *post mortem*, durante estabilização do *rigor mortis*. A identificação dos peptídeos presentes em cada uma das bandas citadas, via espectrometria de massas, pode trazer importantes informações sobre os efeitos da eletroestimulação e seus efeitos sobre a proteólise da carne.

Referências Bibliográficas

- 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.