



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

***Efecto del estrés agudo animal y la dieta sobre propiedades físico-químicas y sensoriales de carne bovina.***

---

**Tesista: Ing. Sebastián Abel Cunzolo**

**Directora: Dra. Pilar Teresa García**

**Codirector: Dr. Francisco Speroni**

**Año: 2019**

## **Dedicatoria**

A mi familia...

A mis viejos y hermanos, siempre dispuestos, incondicionales... no me alcanzan las palabras.

Por ultimo pero no menos importante, para mis amigos que han compartido conmigo los “idas y vueltas” en el plano personal durante esta larga carrera con los que compartí muchas actividades extras.

## **Agradecimientos**

Al culminar un trabajo tan arduo y lleno de dificultades como el desarrollo de una tesis doctoral es inevitable que te aborde un egocentrismo que te lleva a centralizar la mayor parte del mérito en los aportes propios. Sin embargo, el análisis objetivo te muestra inmediatamente que la magnitud de ese aporte hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a buen término. Por lo antes dicho, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para ser objetivo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

Agradezco profundamente a la Dra. Pilar García y al Dr. Francisco Speroni, por su apoyo y por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección.

Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. Darío Pighin por su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

Para mis compañeros del Área Bioquímica y Nutrición del ITA (todos) y en particular a Sergio, Luciana, Carolina, Paula, Silvina, Vanina, Juan y en especial a la Dra. Adriana Pazos quien nos guía y dirige desde su función de coordinadora,

sólo tengo palabras de agradecimiento, especialmente por aquellos momentos en los que pude ser como soy, ustedes saben.

Quiero agradecer a la Dra. Gabriela Grigioni y la Tec. Karina Moreno, por su participación y colaboración en los análisis físicos realizados.

Quiero extender un sincero agradecimiento a las Técnicas Vilma Calderon y Cecilia Barreto, por su paciencia, disponibilidad y generosidad a la hora de colaborar con los ensayos de laboratorio.

Agradezco de manera especial al Instituto Tecnología de Alimentos, al Centro de Investigaciones de Agroindustria y al INTA por permitir que esta tesis doctoral se desarrollará en el marco de un proyecto institucional, durante el cual tuve todo el soporte profesional y logístico para alcanzar los objetivos perseguidos.

También agradezco al departamento de Ciencias Biológicas de la facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por permitirme realizar y culminar mi carrera de doctorado.

## **Resumen**

La dieta y el estrés antes del sacrificio son factores clave que pueden afectar los procesos bioquímicos durante la conversión del músculo en carne. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos diferentes manejos de estrés (estrés reducido vs. convencional) antes del sacrificio en un matadero en novillos Angus y terminados en dos sistemas de alimentación contrastantes (sistemas en base a granos – TC - y en base a pastoreo – TP -), sobre el metabolismo muscular peri mortem y su relación con la calidad de la carne. Los resultados obtenidos mostraron que un mayor nivel de estrés previo al sacrificio incrementó los niveles sanguíneos de glucosa, lactato y proteínas; y disminuyó el enrojecimiento (parámetro  $a^*$ ) del tejido adiposo. Con respecto a la estrategia de alimentación, los animales alimentados con pasto mostraron un aumento del hematocrito y de la concentración de insulina, y una mayor disminución del pH muscular durante las primeras 3 h post mortem. A pesar de que el pH final (pH 24 h) del músculo *longissimus dorsi* (LD) no se modificó significativamente. La dureza de LD se vio significativamente afectada por un efecto de interacción de la dieta y el manejo. El menor nivel de estrés previo a la faena provocó una disminución ( $P < 0,05$ ) de la dureza en LD en los animales alimentados con granos. Los resultados mostraron un importante impacto del manejo peri faena y del sistema de alimentación en la calidad de la carne a través de mecanismos independientes del pH, esto nos demuestra la importancia del manejo reducido en estrés para salvaguardar la calidad del producto final.

## **Índice general**

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Contexto Internacional	2
1.2. Contexto Nacional	2
1.3. Bienestar Animal, relación con la Calidad de la Carne	4
1.4. Dietas y Sistemas de Producción, relación con la Calidad de la Carne	6
1.5. Maduración y Calidad de la Carne	8
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo General	13
2.2. Objetivos Específicos	14
3. MATERIALES y METODOS	15
3.1. Animales	15
3.2. Diseño del muestreo	17
3.2.1. Sangre	17
3.2.2. Tejido adiposo peri-renal	18
3.2.3. Músculo LD pre-rigor	18
3.2.4. Corte de carne fresca	18
3.3. Métodos	19
3.3.1. Análisis de marcadores bioquímicos de estrés	19
3.3.2. Niveles musculares de glucógeno	22
3.3.3. Análisis lipídico (en muestras de carne y suero sanguíneo)	23
3.3.4. Análisis de sustancias bio-activas	25
3.3.5. Determinación de aminoácidos libres	26
3.3.6. Análisis de parámetros de calidad de la carne	26
3.4. Análisis estadístico	31
4. RESULTADOS y DISCUSIÓN	33
4.1. Marcadores bioquímicos de estrés	33
4.2. Niveles musculares de glucógeno	38
4.3. Análisis lipídico	39
4.3.1. Perfil de ácidos grasos en suero sanguíneo	39
4.3.2. Perfil de ácidos grasos y contenido de grasa total en corte LD	42
4.3.3. Contenido de sustancias bioactivas	45
4.3.4. Contenido de aminoácidos libres	46
4.3.5. Parámetros de calidad de la carne	47
4.3.6. Color en el tejido adiposo	59
5. ANEXO: Modelo experimental de estrés agudo en rumiantes	63
5. CONCLUSIONES	75
7. BIBLIOGRAFIA	78

## Índice de tablas y figuras

### Tablas

Tabla 1. Medias y error estándar (EE) de los parámetros bioquímicos sanguíneos <i>peri-mortem</i>	34
Tabla 2. Medias y desvío estándar de los niveles de glucógeno muscular en <i>longissimus dorsi</i>	39
Tabla 3. Porcentaje (%) de ácidos grasos en suero sanguíneo	41
Tabla 4. Porcentaje (%) de ácidos grasos en carne y contenido de grasa intramuscular (EE%).	43
Tabla 5. Niveles de Anserina (A) y Carnosina (C) (mg / g) en <i>longissimus dorsi</i>	45
Tabla 6. Niveles de aminoácidos libre (mg / 100 g) en <i>longissimus dorsi</i>	47
Tabla 7a. Valores medios de pH 3 h, 6 h y 24 h post mortem en LD	49
Tabla 7b. Valores medios de temperatura tomados 3 h, 6 h y 24 h post mortem en LD	49
Tabla 8a. Valores medios del perfil de TPA y CRA % en LD	51
Tabla 8b. Valores medios de los parámetros espectrofotométricos en LD	53
Tabla 9. Valores medios de los parámetros espectrofotométricos de tejido adiposo peri renal	60
Tabla 10. Parámetros sanguíneos registrados en corderos	69
Tabla 11. Color instrumental de los músculos LD y PM y CRA del músculo LD de corderos	70
Tabla 12. Disminución de la temperatura y el pH en el músculo LD de corderos	71
Tabla 13. Parámetros de análisis de perfil de textura del músculo LD de corderos	73

### Figuras

Figura 1. Generación de las características organolépticas de la carne	9
Figura 2. Dendograma jerárquico de cluster de los ácidos grasos medidos a las carnes (LD)	44
Figura 3 a 6. Análisis SDS-PAGE de proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de LD	55-58
Figura 7. Espectro de reflectancia del tejido adiposo peri renal	61

## Lista de abreviaturas

AE: Animales sometidos a condiciones de estrés convencionales

AG: Ácido graso

AGMI: Ácidos grasos mono-insaturados

AGPI: Ácidos grasos poli-insaturados

AGS: Ácidos grasos saturados

AOAC: Association of Official Agricultural Chemists

BE: Animales sometidos a condiciones de estrés minimizadas

CGA: Carne proveniente de los animales del sistema de alimentación a corral y sometidos a condiciones de estrés tradicionales

CGB: Carne proveniente de los animales del sistema de alimentación a corral y sometidos a condiciones de estrés reducidas

CICCRA: Cámara de la Industria y el Comercio de Carnes y Derivados de la República Argentina

CK: Enzima Creatin-quinasa

CPA: Carne proveniente de los animales del sistema de alimentación en base a pastura y sometidos a condiciones de estrés tradicionales

CPB: Carne proveniente de los animales del sistema de alimentación en base a pastura y sometidos a condiciones de estrés reducidas

CRA: Capacidad de retención de agua

DMB: Desoximioglobina, forma reducida de la mioglobina

EE%: Extracto etéreo %

EGD: Espesor de grasa dorsal

Hto: Hematocrito

IPCVA: Instituto para la promoción de la carne vacuna argentina

LD/LD: Longissimus dorsi

MMB: Metamioglobina, forma oxidada de la mioglobina

n-3: Sumatoria de ácidos grasos poli-insaturados  $\omega$ -3

n-6: Sumatoria de ácidos grasos poli-insaturados  $\omega$ -6

OMB: Oximioglobina, forma oxigenada de la mioglobina



PI: Peso inicial de los animales

RT: Reflectancia total

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

TC: Sistema de alimentación a corral

TCA: Ácido tricloroacético

TP: Sistema de alimentación en base a pastura

TPA: Análisis del perfil de textura.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Contexto Internacional

La carne vacuna es la principal fuente de proteína animal en la dieta argentina. A diferencia de otros tipos de carnes, cuyo nivel de consumo aumenta o disminuye por diversos factores (precio, accesibilidad, salud, modas, etc.) el consumo *per cápita* de carne vacuna se mantiene elevado e independiente de dichos factores. Esto hace que Argentina, con un promedio de 58,4 kg *per cápita* en 2017, sea el segundo país mayor consumo de carne vacuna del mundo después de EEUU (120 Kg) y seguido por Uruguay y Brasil con 55 y 37 kg, respectivamente (estadísticas IPCVA 2017/18). Esta fuerte demanda del mercado local argentino por carne vacuna deja un pequeño saldo exportable. La producción de carne bovina a lo largo de del año 2017 alcanzó un volumen cercano a 2,83 millones de toneladas de res con hueso; un 6,1% más que las aproximadamente 2,66 millones de toneladas correspondientes al período enero – diciembre del año 2016. Los novillos y novillitos representaban el 45% de los bovinos faenados, y los terneros y terneras sumaban casi un 20%. El consumo interno para el 2017 representó 2,57 millones de toneladas, de las cuales solo el 4,72% fue exportado. Los principales países competidores del mercado exterior fueron EEUU, Brasil, India, China y la Unión Europea. Si bien Brasil también destina una alta proporción de su producción al consumo interno (79% en 2015) su mayor capacidad de producción le permite ser el principal exportador mundial con 1,9 millones de toneladas. En el extremo opuesto se encuentra Australia, que con una menor producción (2,1 millones de

toneladas) es el segundo exportador mundial con 1,3 millones de toneladas (66% de su producción) (CICCRA 2018).

## **1.2. Contexto Nacional**

En Argentina, la diferencia entre los precios relativos de los productos agrícolas con respecto a los ganaderos generó una gran expansión de la agricultura por sobre la ganadería. Esto llevó a que la ganadería se intensificara (igual producción en menor superficie) y a que fuera desplazada a regiones marginales de menor aptitud agrícola y, en general, más vulnerables ecológicamente. En los últimos años se han comenzado a encontrar evidencias de que, al menos por ahora, se ha alcanzado un límite en la expansión de la frontera ganadera en Argentina. Es decir que, a diferencia de lo que ocurrió en Brasil, la capacidad de Argentina de incrementar sus saldos exportables a través de un incremento de su nivel de producción es limitada en el corto y mediano plazo.

En Argentina, la fuerte demanda local y las dificultades para incrementar el stock ganadero limitan las posibilidades de exportar un mayor volumen de carne bovina en el corto y mediano plazo. Se plantea, entonces, la oportunidad de incrementar el valor de estas exportaciones fortaleciendo el prestigio de la carne argentina en el mercado internacional y, a través de ello, contribuir a la mejora de la competitividad y sustentabilidad del sector. Se espera entonces que Argentina incremente su participación en el mercado mundial de carnes, no por un incremento en los volúmenes de carne exportada sino por un incremento del valor de los volúmenes actualmente exportados. Este mayor valor se obtendría por la

diferenciación de su producción respecto a la del resto de sus competidores. La posibilidad de ofrecer un producto diferenciado le permitiría, a su vez, generar nuevos mercados.

Ante la situación de contexto planteada, la competitividad del sector dependerá de su habilidad para ofrecer un producto de alta calidad, de manera consistente y económica. La carne argentina, en especial la proveniente de los tradicionales sistemas pastoriles, es reconocida internacionalmente por su calidad. Inclusive, a través del tiempo, ha adquirido cierto grado de diferenciación en el mercado internacional. En consecuencia, para mejorar la competitividad y sustentabilidad del sector a los fines de incrementar el ingreso a distribuir entre los distintos integrantes de la cadena se debe trabajar en fortalecer y mejorar las características de calidad de la carne argentina, como así también reducir sus costos de producción y procesamiento.

La obtención de un producto diferenciado por sus propiedades funcionales deberá ser acompañada de un sistema de clasificación rápido y confiable, que permita garantizar al consumidor el nivel de calidad ofrecido y recompensar al productor-proveedor según la calidad obtenida. La determinación del pH y marmoleado del músculo *longissimus dorsi* son variables que se utilizan para predecir de forma relativamente rápida la calidad sensorial de la carne.

### 1.3. Bienestar Animal, Relación con la Calidad de la Carne

El estudio de los fenómenos *peri mortem* es uno de los principales temas relacionados con el desarrollo de la calidad de la carne. El pH muscular y la temperatura (T) interactúan durante el desarrollo de rigor influyendo en las características metabólicas y estructurales *post mortem* del músculo. Estos parámetros desempeñan un papel importante en la conversión *post mortem* del músculo en carne, como el acortamiento físico y la actividad de las enzimas proteolíticas (Dransfield, 1992; Hannula y Puolanne, 2004).

En función de la nutrición o la dieta animal, puede variar significativamente el nivel de glucógeno muscular previo al sacrificio y el metabolismo del músculo *post mortem* (Warner y col., 2010). En consecuencia, la velocidad y la extensión de la glucólisis pueden verse afectadas, cambiando a su vez, la tasa de disminución de curva de pH / T y/o el pH final (pH 24 h). Por otra parte, se ha propuesto que las dietas de alto contenido en energía y concentrado en el ganado podrían conducir a diversas modificaciones metabólicas relacionadas con la sensibilidad a la insulina, que afecta a la glucólisis *post mortem*. El impacto de estos factores en la calidad final de la carne aún no se conoce bien, especialmente cuando el pH final es inferior a 6,0 (Hersom y col., 2004; Gaughan y Mader, 2009).

El estrés animal *peri mortem* y sus consecuencias sobre la bioquímica del músculo *post mortem*, se evalúan generalmente mediante la evaluación de numerosos parámetros bioquímicos (Shaw y Tume, 1992; Cooper y col., 1995; Amtmann y col., 2006; López Olvera y col., 2006). En este sentido, los niveles de

cortisol, catecolaminas, hematocrito, glucosa, insulina y creatin-quinasa (CK) son algunos de los parámetros más importantes normalmente evaluados. Como las hormonas del estrés regulan la vasoconstricción periférica (Matteri y col., 2000), el nivel de exanguinación de los tejidos periféricos, observado mediante el color del tejido, representaría otra interesante manera de explorar la evaluación de los niveles de estrés *peri mortem*. Teniendo en cuenta la información citada anteriormente, es posible considerar que el impacto de diferentes acontecimientos estresantes *peri mortem* y su influencia en el desarrollo de la calidad de la carne puede ser relativo al estado metabólico asociado con las dietas de los animales de cada sistema de producción. Si bien los sistemas de producción intensivos pueden proporcionar elevados niveles de glucógeno muscular, constituyendo un factor protector, también pueden alterar el metabolismo muscular, hecho que podría conducir a un aumento del impacto del estrés agudo.

Por el contrario, si bien los sistemas de producción extensivos proporcionarían un menor almacenamiento de energía muscular, el metabolismo tisular no se vería alterado como en los sistemas intensivos. En la actualidad, la magnitud de sus impactos no es suficientemente clara, especialmente cuando se consideran diferencias inherentes a cada sistema de producción (es decir, edades diferentes al mismo grado de terminación, cambios metabólicos asociados con la edad, calidad del tejido adiposo, etc.).

Las nuevas estrategias deberán considerar su posible influencia sobre el deterioro de la carne expuesta a condiciones aeróbicas. En esto influirán los cambios que, las nuevas estrategias de producción y su interacción con estrés

generado al animal durante el manejo peri-faena, generen sobre las propiedades pro-oxidativas y anti-oxidantes de la carne. La magnitud de dichos efectos depende de varios factores, como el nivel nutricional, el temperamento animal y la extensión del período de maduración de la carne, por lo que es necesario evaluar esos elementos. El pH de la carne, normalmente utilizado como indicador del estrés peri-faena, no estaría relacionado con estos efectos, por lo que necesariamente deberán identificarse otros indicadores para su diagnóstico.

#### **1.4. Dietas y Sistemas de Producción, Relación con la Calidad de la Carne**

Los sistemas pastoriles puros permitirían obtener un producto que, por su composición de ácidos grasos y su contenido de antioxidantes, minerales y compuestos bio-activos, es considerado de elevado valor funcional. Sin embargo, su menor productividad respecto de sistemas mixtos más intensificados (suplementados con distintos niveles de grano o “*feedlot*”) los vuelve poco competitivos. Lamentablemente, estas propiedades funcionales de la carne disminuirían con las actuales alternativas de intensificación (García y col., 2008) Si bien se han propuesto estrategias para contrarrestar estos efectos negativos relacionados, se requieren más estudios que permitan ajustarlas frente a diferentes alternativas productivas.

El valor nutricional de la carne bovina es cuestionado por su contenido graso, especialmente a expensas de una elevada proporción de ácidos grasos saturados

(AGS). La Organización Mundial de la Salud recomienda reducir el consumo total de grasas, particularmente la de AGS, e incrementar la proporción de ácidos grasos poli-insaturados (AGPI) en la dieta, especialmente aquellos de la serie omega 3 (n-3). La composición de ácidos grasos de la carne bovina puede ser modificada a través del manejo nutricional del ganado, para así obtener una composición de la grasa más saludable. La proporción de AGPI y la relación n-6:n-3 en la carne dependerá de su proporción en la dieta del animal, del nivel y tipo de biohidrogenación que se genere en el rumen, del estado fisiológico del animal, del biotipo y de sus interacciones. La suplementación con AGPI en dietas a base de forrajes incrementaría el contenido del isómero cis-9, trans-11 del ácido linoleico conjugado en la carne, AG con propiedades anti-carcinogénicas y anti-aterogénicas.

Un incremento del contenido de AGPI de la carne, especialmente los n-3, aceleraría el deterioro de la misma durante su exposición en condiciones aeróbicas, reduciendo el período de exhibición en bandeja. Este efecto podría exacerbarse al extender el período de maduración como resultado de la interacción entre el mayor contenido de lípidos peroxidables y los cambios que ocurren en otros componentes del músculo durante la maduración. Cambios que estarían asociados al grado de estrés peri-faena del animal y que, en caso de poder determinar nivel de estrés peri-faena, podrían llegar a predecirse. El pH de la carne, normalmente utilizado como indicador del estrés peri-faena, no estaría relacionado con los efectos que el estrés genera sobre el proceso de maduración a través de cambios en el balance hormonal (Pighin y col. 2010). Por lo cual, es necesario identificar otros indicadores para su diagnóstico. Las magnitudes de los efectos del estrés peri-faena dependerán de

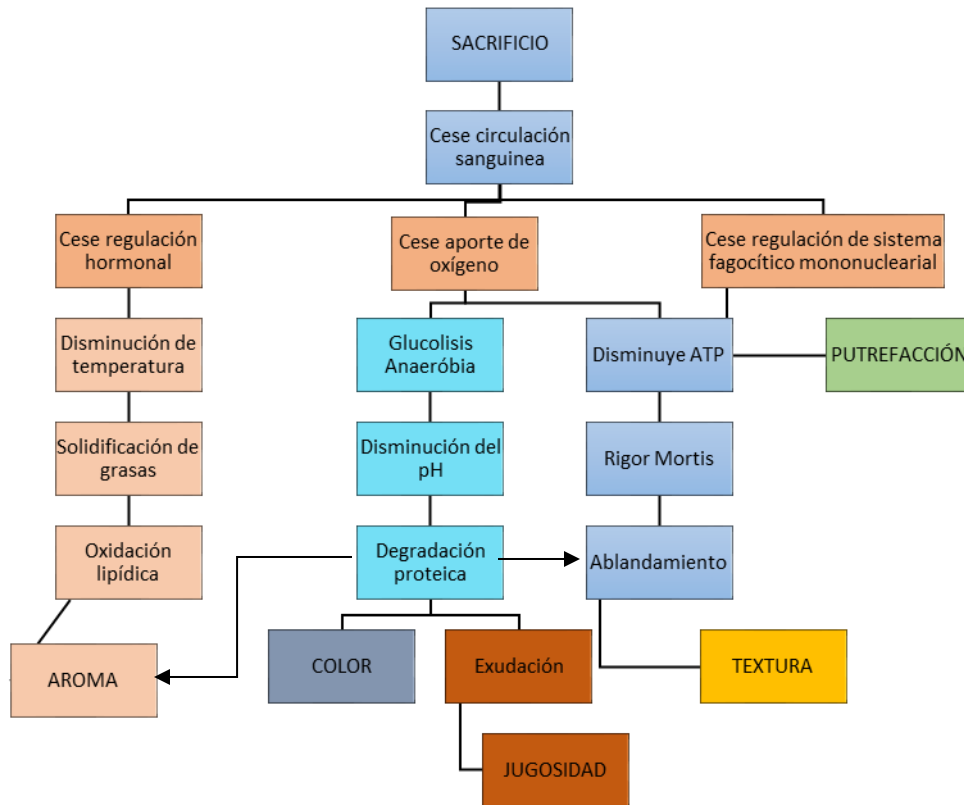


factores como el temperamento animal, el nivel nutricional y su interacción, que requieren ser evaluados.

El efecto que las interacciones entre sistema de terminación y edad a la faena poseen sobre distintas características de calidad de la carne han sido poco estudiadas y los resultados son inconsistentes. La suposición que las carnes de animales jóvenes/livianos son de mejor calidad podría relativizarse según las estrategias de alimentación y de manipulación del producto post-faena, particularmente las de maduración. La incorporación de estrategias de maduración mínimas permitiría mejorar la ternura y la aceptabilidad de cortes tradicionalmente menos tiernos. En cambio, la sobre-maduración podría producir pérdidas importantes de humedad, y generar olores, sabores y texturas desagradables. Estos aspectos deben ser necesariamente estudiados en un contexto local, es este caso, en el contexto argentino.

## **1.5. Maduración y Calidad de la Carne**

Se sabe que la maduración de la carne es un procedimiento que permite incrementar la ternura, sabor y aroma (*flavor*) y la aceptabilidad general de la misma (*Meat Technology Update*, 2010). Dichas características se desarrollan originalmente como reflejo de modificaciones bioquímicas que ocurren en el músculo esquelético luego del sacrificio *-post mortem-* (Figura 1).



**Figura 1:** Generación de las características organolépticas de la carne como reflejo de los cambios bioquímicos en el músculo luego del sacrificio. Adaptado de Ciencia de la Carne de Warris P. D. (2003).

El proceso de maduración es un proceso muy variable, el cual depende tanto de factores biológicos (edad, sexo, tipo de músculo) como de condiciones de procesamiento (Sancho y col., 1997). Consiste en mantener la carne fresca a una temperatura levemente superior al punto de congelación durante el cual se desarrollan todos los atributos organolépticos (Lawrie, 1985). La temperatura ideal comprende el rango de  $-0,5 \pm 1,0$  °C. Mayores temperaturas (2,0 a 3,0 °C) podrían llegar a ser aceptables sólo para cortos períodos de maduración -1 a 2 semanas (Paschetta y col., 2012). De este modo, 4 semanas de maduración a  $-0,5$  °C llegan a producir el mismo grado de maduración que 2 semanas a  $5,0$  °C. No obstante, el

mayor grado de mejora de la terneza se observa durante las primeras etapas, decreciendo con el tiempo (*Meat Technology Update*, 2010).

Uno de los procesos de mayor relevancia que ocurren durante dicha maduración es la fragmentación de las fibras musculares debido a la degradación de proteínas del sarcómero (proteólisis), hecho que conduce al consiguiente incremento de la terneza (Xiong y col., 2007). Si bien en el músculo esquelético se encuentran numerosos sistemas proteolíticos (calpaínas, catepsinas, proteosomas, caspasas, metalopeptidasas, serin-peptidasas), el principal responsable de la tiernización *post mortem* es el sistema endógeno de calpaínas, junto a su inhibidor específico calpastatina (Teira y col., 2006).

Cabe mencionar que no sólo las proteínas miofibrilares y su degradación son responsables de la terneza de la carne, sino que las proteínas del tejido conectivo también contribuyen, aunque en menor proporción, al valor de terneza final de la carne. Durante el proceso de maduración ocurre la desnaturalización e hidrólisis del tejido conectivo intramuscular, proceso llevado a cabo por metaloproteinasas de matriz extracelular, como por ejemplo, colagenasas y gelatinasas (Paschetta y col., 2012). La proteólisis que ocurre durante la maduración promueve, además, la formación de compuestos nitrogenados solubles en agua, los cuales actúan a su vez como precursores del aroma (Mandell y col., 2001).

Por otra parte, se ha demostrado incluso que el tiempo de maduración óptimo puede depender de la raza de los bovinos en cuestión. De este modo, carnes provenientes de razas como *Limousin* tendrían plazos óptimos de maduración de

aprox. 10 días, mientras que cortes de *Blonde d'Aquitaine*, *Holstein* u *Old Brown Swiss* tendrían plazos óptimos de maduración cercanos a los 35 días (Monsón y col., 2005). Más allá de estos resultados, se ha demostrado además que en estos casos, parámetros de calidad como el aroma genuino, la intensidad del *flavor* y la aceptabilidad general comienzan a disminuir a partir de los 35 días de maduración, en comparación con resultados de dicho parámetros obtenidos a los 21 días de maduración (Monsón y col., 2005).

En conclusión, la correcta maduración de la carne depende de varios factores, entre los cuales la temperatura, el periodo de tiempo y las condiciones de empaque y juegan un papel preponderante. Condiciones inadecuadas pueden llegar a alterar el proceso de la maduración, con el consiguiente deterioro de la calidad y/o aptitud del producto final.

En Argentina, el mercado interno suele demandar animales livianos/jóvenes en busca de ternera atentando contra el nivel de producción de carne del país. Este hecho contrasta con el mayor peso de faena que demanda el mercado externo. La incorporación de estrategias de maduración mínima por res o por cortes permitiría mejorar la ternera y la aceptabilidad del público de cortes tradicionalmente menos tiernos. La extensión del período de maduración dependerá del corte de carne, del biotipo animal, de la dieta y del manejo peri-faena. Si bien existe información al respecto a nivel internacional, el conocimiento del manejo de esta herramienta y su interacción con las distintas variables a nivel local es escaso.

Dada la complejidad de escenarios que pueden crear los elementos antes mencionados en el desarrollo de la calidad final de la carne, resulta necesario realizar abordajes simplificados para permitir su estudio. Más aún, trabajos de investigación que requieren del estudio conjunto de la etapa primaria de producción bovina y de diversas muestras *post mortem* (ej.: sangre, carne, grasa, etc.) que se generan, suelen presentar un gran inconveniente imposible de evitar. Dicho inconveniente se encuentra a nivel de la faena -comercial-, proceso que suele generar importantes distorsiones en algunas variables que pueden encontrarse en estudio. En este sentido, en el presente trabajo de investigación con bovinos y carne vacuna, se decidió realizar en simultáneo un abordaje más simplificado y focalizado. Dicho abordaje consistió en un ensayo controlado de estrés agudo animal en rumiantes menores, mediante la administración de dosis conocidas de hormonas de estrés (ver trabajo anexo). Dicho ensayo permitió estudiar los efectos del estrés generado sobre la calidad de conversión del músculo en carne, y su capacidad de maduración, bajo condiciones de faena -no comercial- completamente controladas. Dicho abordaje complementario, como sus resultados, permitieron respaldar y/o contrastar resultados del ensayo principal objeto de la presente tesis doctoral.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Se plantea como objetivo general del presente trabajo de tesis establecer el efecto de diversas variables extrínsecas de producción bovina sobre los procesos biológicos involucrados en la conversión del músculo en carne, como así también sobre la calidad final de producto, considerando las posibles interacciones.

Mediante este objetivo general, se intenta generar información que contribuya a definir estrategias de producción y manejo peri-faena del ganado que permitan obtener carne de calidad garantizada al consumidor así como una mayor retribución al productor. Este hecho contribuiría a incrementar el ingreso a distribuir entre los distintos integrantes de la cadena, incentivando el nivel de producción nacional del sector.

## **2.2. Objetivos Específicos**

En el marco general mencionado previamente, se establecen como objetivos específicos:

- determinar el efecto del nivel de estrés agudo (manejo peri-faena en las instalaciones del frigorífico) sobre la bioquímica, los procesos de conversión de músculo en carne y la calidad final del producto, tanto fresco como madurado durante 21 días.

- determinar el efecto de la dieta y del sistema de producción, sobre indicadores bioquímicos, los procesos de conversión de músculo en carne y la calidad final del producto, tanto fresco como madurado durante 21 días.

- evaluar la factibilidad del uso de indicadores bioquímicos o físico-químicos como posibles predictores del grado de bienestar animal y/o de calidad de carne.

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1. Animales

Se utilizaron novillos de raza británica *Aberdeen Angus* en fase de engorde con dos dietas contrastantes, en los que se realizó un seguimiento durante los 60 días previos a la faena. Esta etapa fue llevada a cabo en la estación experimental de INTA EEA General Villegas, Bs As, en la que se trabaja habitualmente bajo normas de bienestar animal. Los animales de cada tratamiento tuvieron un peso inicial del período experimental (**PI**) variable en función de sus antecedentes nutricionales y de manejo de la alimentación en la etapa precedente. Los tratamientos fueron:

- dieta de terminación a corral **-TC-**, alimentación en base a silaje de maíz (consumo a voluntad de una dieta compuesta 39% de silaje de maíz (con 37% de grano), 59% de grano entero de maíz y 2% de núcleo mineral con monensina). En este tratamiento se utilizaron 20 novillos con una edad promedio de 18 meses y un peso inicial promedio de  $418,8 \pm 17,5$  kg. La ganancia de peso, en el período experimental fue de  $0,712 \pm 0,18$  kg/animal/día.

- dieta de terminación a pastoreo **-TP-**, alimentación a base de pastoreo de triticale (*Triticosecale Wittmack*) en estado fenológico vegetativo (Zadoks, 1974), con una asignación de forraje equivalente al 2,5% del peso vivo. En este tratamiento se utilizaron 20 novillos con una edad promedio de 30 meses y un peso inicial promedio de  $465,2 \pm 21,6$  kg. La ganancia de peso, en el período experimental fue de  $0,748 \pm 0,15$  kg/animal/día.



Durante el período experimental se realizaron muestreos de sangre en 8 animales por tratamiento, los días 60, 45, 30 y 15 previos a la faena, monitoreándose diversas variables productivas, tales como ganancia diaria de peso, consumo, eficiencia de conversión y tasa de engrasamiento. La fecha precisa de terminación de los animales se definió mediante medición del espesor de grasa dorsal (EGD) por ecografía.

Cumplido el período experimental, y alcanzado el objetivo del grado de terminación, los animales provenientes de ambas dietas fueron enviados a la planta de faena (Frigorífico Mattievich S.A., Rosario, Argentina) donde tuvieron un descanso de 12 h en corrales con libre acceso a sombra y agua de bebida. El protocolo utilizado para el ensayo fue previamente supervisado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio perteneciente al Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVyA) de INTA, aclarando que la manipulación y los estudios experimentales realizados sobre los animales se llevaron a cabo según los procedimientos establecidos por SENASA (2013) en Argentina.

Previo a la faena, los animales fueron asignados a dos grupos con manejos diferentes:

- bajo estrés (**BE**), manejo con minimización de estrés en la planta de faena, involucrando: traslado del grupo completo desde el corral, ducha individual y acceso individual a la manga previa al cajón de volteo, iluminación de la entrada al mismo, minimización de ruidos, ayuda con banderines. El grupo BE fue faenado en primera instancia, al inicio de la faena, minimizando el efecto de ruidos, la visualización de

movimientos y percepción de olores propios del sector de aturdimiento y degüelle. Los animales asignados a este grupo esperaron 20 min (de acostumbramiento) en las calles antes de entrar en la manga hacia el cajón de aturdimiento. Todo el proceso fue realizado con el fin de evitar ruidos, sin gritos u otras acciones comúnmente utilizadas para estimular la movilidad de los animales. Asimismo, las zonas oscuras de la manga fueron iluminadas estratégicamente con el fin de evitar cualquier tipo de sombras.

- alto estrés (**AE**), manejo en condiciones tradicionales de la planta de faena: incluyendo el método de rutina sobre el traslado desde los corrales, ducha y acceso a la manga previa al cajón de noqueo aplicado en planta frigorífica seleccionada. Los animales del subgrupo AE fueron sacrificados en segundo lugar, sin espera previa. Las sombras y los olores propios de la faena, como el ruido propio de todo el proceso, no fueron minimizados durante el manejo de este grupo de animales.

## **3.2. Diseño del muestreo**

Se tomaron muestras de sangre, tejido adiposo peri-renal, músculo *Longissimus dorsi* (LD) pre-rigor y corte de músculo LD post-rigor.

### **3.2.1. Sangre**

Se tomaron muestras de sangre de los animales, en el momento de su pesada, a los 60, 45, 30 y 15 días previos a la faena. Se tomaron 5 mL en tubos

debidamente etiquetados, en ausencia y presencia de 50  $\mu\text{L}$  de anticoagulante W (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Sueros y plasmas respectivos fueron separados mediante centrifugación, y almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

### **3.2.2. Tejido adiposo peri-renal**

Se extrajeron aproximadamente 10 g de tejido adiposo peri-renal en el momento de oreo, dentro de las 2 h *post mortem*. Su color y el espectro de reflectancia se midieron usando un espectrocolorímetro de reflectancia portátil (BYK Spectro guide 45/0 gloss, Heathrow, Gran Bretaña).

### **3.2.3. Músculo LD pre-rigor**

Se extrajo una muestra de 2 g de músculo *LD* a la altura de la 13<sup>a</sup> costilla dentro de las 2 h *post mortem*, se congeló inmediatamente en  $\text{N}_2$  líquido, y se conservó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior procesamiento.

### **3.2.4. Corte de carne fresca**

Luego de medir el pH final (a las 24 h *post mortem*), se tomaron bloques de 4 costillas de bife *LD* de cada media res izquierda (10<sup>a</sup> a 13<sup>a</sup> costilla) y se remitieron inmediatamente al Instituto Tecnología de Alimentos (CNIA-INTA), donde cada costilla fue separada del bloque, envasada al vacío y asignada a diferentes tiempos de maduración: 0 y 21 días. La maduración se realizó en cámara a  $1 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Cumplido el tiempo de maduración, las costillas fueron almacenadas a  $-20 \pm 1$  °C hasta su análisis (Almada y col., 2011).

### 3.3. Métodos

#### 3.3.1. Análisis de marcadores bioquímicos de estrés

Sobre las muestras de sangre recolectadas se cuantificaron el hematocrito y las concentraciones de glucosa, ácido láctico, proteínas totales, actividad enzimática creatin-quinasa (CK), cortisol, insulina y adrenalina.

#### **Hematocrito**

El hematocrito (**Hto**) se midió inmediatamente después de obtenidas las muestras de sangre anticoaguladas con EDTA (anticoagulante W), mediante el método de micro-hematocrito (Kee, 2001). Se tomó una pequeña muestra de sangre en un capilar de 75 mm de longitud y diámetro interno de 1,4 mm (Biocap®, Argentina) sin heparina. Se selló el tubo en su borde inferior con plastilina y se colocó en posición sobre el disco rotor de la microcentrífuga (Cavour®, VT-1224, Argentina). La medición de la micro-eritro-sedimentación se llevó a cabo con una regla milimétrica desde el borde superior midiendo el volumen total de plasma hasta los eritrocitos (L2) y la altura total de la columna de líquido (L1). Los valores se expresaron como porcentaje (%).

$$\text{Hematocrito}(\%) = \frac{L_2}{L_1} \times 100$$

### **Glucosa**

La concentración sérica de glucosa se determinó mediante el método espectrofotométrico del sistema enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa - GOD/POD- (Henry, y col., 1974), utilizando el kit comercial Glicemia Enzimática (Wiener Lab. Rosario, Argentina). Los resultados obtenidos se expresaron como mmol/L (mM).

### **Ácido láctico**

La concentración plasmática de ácido láctico se determinó mediante el método espectrofotométrico utilizando kit comercial enzimático L-LACTATO (LAC) utilizando las enzimas lactato oxidasa/peroxidasa/ascorbato oxidasa (Lavery, y col., 2007; Noll, F., 1985) marca Randox Ltd. (Gran Bretaña). Los resultados obtenidos se expresaron como mmol/L (mM).

### **Proteínas plasmáticas**

La concentración de proteína plasmática total se evaluó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se usó albúmina sérica bovina (SIGMA, St. Louis, MO, EE. UU.) como estándar.

### **Actividad Creatin Quinasa (CK)**

La actividad de CK se evaluó usando un kit enzimático comercial CK-NAC UV *unitest* (Wiener Lab. Rosario, Argentina).

### **Cortisol**

La concentración sérica de cortisol fue determinada mediante el método ELISA, utilizando un kit comercial de la marca DiaSource KAPDB270 (Bélgica). El principio del inmunoensayo enzimático fue la unión competitiva entre el antígeno no marcado (presente en estándares, control y muestra) y aquel conjugado – marcado- con enzima para un número limitado de sitios de unión de anticuerpos en la micro placa. De este modo, la intensidad del color formado fue inversamente proporcional a la concentración de cortisol en la muestra. Se usó un conjunto de estándares para trazar una curva de calibración a partir de la cual se pudo leer directamente la cantidad de cortisol presente en las muestras. El coeficiente de variabilidad intra-ensayo del kit utilizado es de 2,9 %. Los resultados obtenidos se expresaron como  $\mu\text{g/dL}$ .

### **Insulina**

La concentración plasmática de insulina fue determinada mediante el método ELISA, utilizando un sistema no competitivo con anticuerpos monoclonales anti-insulina, del kit comercial de la marca DiaSource (Bélgica). El coeficiente de variabilidad intra-ensayo del kit utilizado (Flier y col., 1979) es de 4,8 %. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{UI/mL}$ .

## **Adrenalina**

La concentración plasmática de adrenalina fue determinada mediante el método ELISA, utilizando el sistema de unión competitiva del kit comercial de la marca DiaSource KAPL10-0100 (Bélgica). El coeficiente de variabilidad intra-ensayo de este kit (Romero Peñuela, M. H. 2011) es de 14,5 %. Los resultados obtenidos se expresaron como ng/mL.

Para la lectura de absorbancia en los kits ELISA antes mencionados se utilizó un lector de placas SpectraCount™ Mod. BS10001 (Packard-Becker, Groningen, Holanda).

### **3.3.2. Niveles musculares de glucógeno**

El contenido muscular de glucógeno se determinó mediante el método de hidrólisis ácida en presencia de calor, a 100 °C durante un lapso de 1 h y en agitación constante, seguida de neutralización con NaOH 2 N y centrifugación a 3000 g. Brevemente, para tal fin, se pesaron 300 mg de músculo pre-rigor y se homogeneizó rápidamente, mientras aún se encontraba congelado, con HCl 2 N. La cantidad de glucosa liberada en el sobrenadante se cuantificó utilizando el método enzimático glucosa GOD/POD previamente mencionado (ver determinación de glucosa).

### **3.3.3. Análisis lipídico (en muestras de carne y suero sanguíneo)**

#### ***Determinación de lípidos totales en carne a tiempo 0 de maduración***

El contenido de grasa intramuscular fue determinado por duplicado mediante el método de Soxhlet (AOAC 1999), con destilación continua en hexano a partir de 5 g de muestra (músculo LD libre de grasa externa y picado cuidadosamente). Se utilizó un equipo “Soxtec System HT 1043 Extraction Unit” de la marca Tecator (Suecia) para la extracción de grasa y una estufa ORL – Hornos eléctricos mod.: NZ-1105 (Argentina). Los resultados se expresaron como porcentaje (%).

#### ***Determinación del perfil de composición de ácidos grasos en carne***

El perfil de composición de ácidos grasos se determinó mediante cromatografía de gases, previa extracción de los lípidos mediante método de Folch y col. (1957) y metilación ácida (Metanol + 4 % HCl) de los ácidos grasos presentes de acuerdo a Garcia y col. (2008).

Los metilésteres fueron analizados en un cromatógrafo de gases Varian CP 3800 (Varian Inc., Walnut Creek, CA – EE. UU.), provisto de una columna capilar de sílice Varian WCOT Fused Silica de 100 metros x 0,25 mm Coating CP-Sil 88 for FAME DF=2.0, y utilizando como gas portador nitrógeno ultra puro. Las temperaturas del detector de ionización de llama (FID) y del inyector 1079 se establecieron en una temperatura de 250 °C. El programa del horno de la columna utilizado fue: inicio en 70 °C por 4 min, se elevó la temperatura hasta los 170 °C a razón de 8 °C/min, manteniéndola por 25 min, luego se elevó a 200 °C a razón de



2,5 °C/min y se lo mantuvo a esa temperatura por 15 min., luego se llevó a 220 °C a razón de 5 °C/min y se lo mantuvo 5 min.

Los ácidos grasos fueron identificados mediante comparación de sus respectivos tiempos de retención con el estándar PUFA N°2, Animal Source, Supelco, EEUU. El perfil de composición de ácidos grasos fue expresado en forma porcentual con respecto al total de ácidos grasos identificados. Dicho porcentaje, referido al contenido de lípidos totales, permitió también expresar el contenido de ácidos grasos por peso de muestra (músculo LD).

#### ***Determinación del perfil de composición de ácidos grasos en suero***

Los lípidos del suero sanguíneo fueron extraídos mediante el método de Folch y col. (1957), seguido de metilación ácida de los ácidos grasos presentes. Brevemente, en una probeta de 25 mL con tapa plástica se colocaron 6 mL de metanol *P.A.*, para luego agregar gota a gota 2,4 mL de suero. Se agitó enérgicamente para favorecer la precipitación de las proteínas presentes. Luego, en forma sucesiva, e intercalando agitaciones, se agregó 6 mL de cloroformo y 3 mL de agua destilada. Finalmente, se centrifugó durante 10 min para separar las fases. Se eliminó la fase acuosa mediante aspiración, se filtró y la fase superior fue evaporada a temperatura ambiente y en atmósfera de nitrógeno hasta sequedad. Inmediatamente se agregó 2 mL de reactivo para metilar (Metanol + 4% de HCl). Luego de ser sellados se los llevó a baño de agua caliente durante 2 h a 70 °C.

Finalmente, se procedió como se detalló previamente para la obtención de los ME en carne.

#### **3.3.4. Análisis de sustancias bio-activas**

El contenido de los péptidos carnosina y anserina, como así también el contenido de aminoácidos libres en el corte LD fue analizado por triplicado. Para tal fin, previo a las determinaciones, las muestras fueron tratadas con ácido tricloroacético (TCA) 0,6 M para desnaturalizar las proteínas presentes (Peiretti y col., 2012).

##### ***Determinación de dipéptidos de histidina***

Luego de realizada la desproteinización de las muestras, el sobrenadante de la solución de TCA fue diluido con una solución 90 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 5 y transferido a viales para su análisis cromatográfico. Los niveles de los dipéptidos de histidina se determinaron usando el método HPLC descrito por Sri Kantha y col. (2000). El ensayo fue realizado en un HPLC Shimadzu equipado con un detector de UV. Los parámetros de ensayo fueron: columna Zorbax 300-SCX, solución de 90 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  eluyente que contenía 10% de metanol. El caudal fue de 1 mL/min y el volumen de inyección 20  $\mu\text{L}$ . Las corridas cromatográficas se llevaron a cabo a 55 °C, y la detección se estableció a 210 nm. Los estándares de anserina y carnosina se adquirieron en Sigma Chemical Co. (Chamorro y col., 2014)

### **3.3.5. Determinación de aminoácidos libres**

El pH de la solución sobrenadante se ajustó a 2,2 antes de los análisis de cromatografía de intercambio iónico. La cromatografía de los extractos se llevó a cabo en un analizador de aminoácidos Biochrom 30 (Biochrom Ltd. Gran Bretaña) equipado con una columna de intercambio catiónico. Como estándar interno se utilizó el aminoácido L-Norleucina y una solución de 18 aminoácidos puros (Sigma Chemical Co.) fue utilizada para identificar la composición de los aminoácidos restantes.

### **3.3.6. Análisis de parámetros de calidad de la carne**

#### ***Valor de pH final y curva pH/T***

El pH se midió en el músculo LD en la media res izquierda a nivel de la 12<sup>a</sup> costilla, a las 3, 6 y 24 h *post mortem* utilizando un pH metro portátil (Thermo Orion modelo 420, Pittsburgh, PA, EEUU.) con electrodo combinado. Simultáneamente, se registró la temperatura del interior del músculo LD (a 2 cm del lugar de medición del pH) durante las primeras 24 h *post mortem* utilizando registradores de temperatura (Maxim, San José, CA, EE.UU.), programados para registrar dicha información cada minuto durante 24 h.

Luego del desposte, los bloques fueron fraccionados y asignados a los diferentes tiempos de maduración antes mencionados. Una vez cumplido dicho periodo de tiempo, los cortes fueron congelados a -20 °C hasta su posterior procesamiento.

### **Perfil de textura**

Los músculos congelados se descongelaron a  $4 \pm 1$  °C durante 24 h con el fin de realizar las mediciones de calidad (Almada y col., 2011). El análisis del perfil de textura (TPA) se realizó en muestras de LD cocidas. Para tal fin, las muestras se colocaron sobre tiras dobladas de aluminio y se cocinaron hasta un punto final de temperatura interior de  $71,5 \pm 0,5$  °C en una parrilla eléctrica (Philips, Buenos Aires, Argentina). La temperatura interna se monitoreó con un termopar de tipo T insertado en el centro geométrico de cada muestra. Después de cocinar, los bifes se enfriaron a temperatura ambiente durante 30 min y luego se refrigeraron a  $4 \pm 1$  °C durante 24 h. De cada ojo de bife se obtuvieron, paralelamente a las fibras musculares, seis cilindros de 1,3 cm de diámetro y 1,3 cm de altura. La evaluación instrumental de la textura se realizó con un Texturometro TA-XT2 de Stable Micro Systems (Godalming, Surrey, Gran Bretaña) con las fibras musculares paralelas a la dirección de la fuerza. Las mediciones se llevaron a cabo utilizando una sonda cilíndrica SMS P / 35 (35 mm de diámetro) y los siguientes ajustes: velocidad de la sonda durante la prueba 1 mm/s, esfuerzo final 70 % y 1 s entre la primera y la segunda carrera. Cada muestra se evaluó seis veces en promedio. En la curva de fuerza en función del tiempo, se calcularon los siguientes parámetros de TPA: dureza, cohesividad, elasticidad, resiliencia, adhesividad y masticabilidad (Caine y col., 2003).

### ***Color instrumental***

Los parámetros de color instrumental del músculo LD expresados en el sistema CIE Lab ( $L^*$  luminosidad,  $a^*$  de negativos a positivos, representan de verde a rojo y  $b^*$ , de negativos a positivos, de azul a amarillo) fueron evaluados con un espectrocolorímetro portátil de reflectancia (BYK Spectro guide 45/0 gloss, Heathrow, Reino Unido), con iluminante D65 (luz diurna) y una abertura de 8 mm.

Para la evaluación de color en LD se tomaron cuatro mediciones de la superficie del músculo que comprenden parámetros de color y datos de reflectancia, evitando áreas de tejido conectivo o grasa intramuscular. Cada muestra se dejó reposar durante 45 min a  $5 \pm 1$  °C antes de la medición del color.

### ***Concentración de pigmentos***

La cantidad relativa de formas de mioglobinas (oximioglobina, OMB%, desoximioglobina, DMB% y metamioglobina, MMB%) se obtuvo aplicando las guías para el color de la carne de AMSA (2012). La reflectancia a las longitudes de onda que son isobélicas (reflectancia igual para dos o más de las tres formas de mioglobina) se midió con el espectrocolorímetro y se convirtió a atenuación reflejada ( $A$ ). Los valores a longitudes de onda específicas se incluyeron en las ecuaciones correspondientes:

$$\%MMB = \left\{ 1.395 - \left[ \frac{A572 - A700}{A525 - A700} \right] \right\} * 100$$

$$\%DMB = \left\{ 2.375 * \left[ 1 - \frac{A473 - A700}{A525 - A700} \right] \right\} * 100$$

$$\%OMB = 100 - (\%MMB + \%DMB)$$

Se determinaron los datos de reflectancia en cuatro zonas diferentes de cada muestra y se calculó un valor medio para cada muestra. El color del tejido adiposo de la grasa perirrenal y el espectro de reflectancia se midieron utilizando un espectrocolorímetro de reflectancia portátil (BYK Spectro guide 45/0 gloss, Reino Unido) de acuerdo con la escala de CIE Lab y un iluminante D65. El instrumento midió la reflectancia entre 400 y 700 nm a intervalos de 10 nm. También se utilizó el ángulo del tono para caracterizar el color de la superficie, lo que representa una desviación del verdadero eje rojo. Un número mayor indica un cambio del rojo al amarillo (Ramanathan y col., 2010). El ángulo de tono se calculó como  $\tan^{-1} (b^* / a^*)$  y la conversión de radianes a grado se logró multiplicando por  $180 / \pi$  (Dunne y col., 2004). La reflectancia superficial total (RT) representa la cantidad de luz reflejada desde la superficie. Se calculó de acuerdo con Ramanathan y col. (2010):

$$RT = \sum R_{400-700 \text{ nm}} \div 30$$

### **Capacidad de retención de agua (CRA)**

La capacidad de retención de agua fue determinada por el método de “jugo exprimible”, descrito por Pla Torres (2005), en músculo LD 24 h *post mortem*. Brevemente, se utilizaron dos placas de metacrilato de 9 x 12 cm y 5,5 x 11,5 cm, respectivamente. Las mismas se emplearon como prensa, aplicando una presión

equivalente a 50 Kg fuerza mediante dos tornillos y la carne se contuvo sobre un papel de filtro tipo Albert-238, donde se imprimió el área de humedad post compresión. Luego se calculó como el cociente entre las superficies central (ocupada por la muestra solida comprimida) y el anillo exterior (ocupado por el jugo exprimido). El resultado se expresó como porcentaje.

### **Maduración**

Como se mencionó previamente, el músculo LD proveniente de cada animal se fraccionó en dos partes, sobre los cuales se realizaron los ensayos de maduración a los tiempos 0 y 21 días.

Con el propósito de evaluar el nivel de degradación proteica ocurrida como consecuencia del proceso de maduración, sobre cada corte se realizaron extracciones de proteínas solubles y miofibrilares conforme a la metodología descrita por Pighin y col. (2008), cuyos perfiles de composición fueron analizados mediante electroforesis (SDS-PAGE en gradiente de concentración de acrilamida). Se usó un kit de alto peso molecular (53.000–220.000 Da) como estándar de calibración (HMW-SDS Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido). El análisis densitométrico se llevó a cabo con el software Quantity One (Bio Rad®). Asimismo, con el mismo fin se determinó también el perfil de aminoácidos libres como ya se mencionó previamente.

### 3.4. Análisis estadístico

El diseño experimental aplicado fue un arreglo factorial con el procedimiento GLM (software estadístico SAS versión 9.1), el que consistió de dos factores con dos niveles cada uno: sistemas de alimentación (Corral: TC y Pasto: TP) y condiciones de manejo previo a la faena (Bajo: BE y Alto: AE). Para las comparaciones múltiples se aplicó la prueba de Bonferroni o la t-Student, según correspondiera. En todos los análisis se tuvo en cuenta como valor de significancia  $p=0,05$  (Weber y Skillings, 2000).

Las mediciones de las muestras de sangre tomadas 2 semanas antes sacrificio se tuvieron en cuenta como co-variable de referencia (efecto aleatorio) para interpretar la naturaleza de los efectos de los tratamientos y ajustar, si fuese necesario, y así, controlar el error y aumentar la precisión (Cayuela y col., 2014) para las mediciones de las variables de los parámetros bioquímicos.

Las mediciones de las muestras de sangre y las variables de perfil lipídico sanguíneo fueron analizadas mediante un diseño de medidas repetidas.

Por un lado, durante el período de enfriamiento de las canales se realizaron las mediciones de pH y temperatura a 3 diferentes tiempos *post mortem*: 3, 6 y 24 h en el músculo LD de cada animal de ambos tratamientos experimentales (sistemas de alimentación y manejo). Para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, los datos de pH y temperatura debieron ser transformados según Box and Cox (1964) por el logaritmo. Luego, se tuvo en cuenta



el arreglo factorial de tres factores: sistemas de alimentación (TC y TP), sistemas de manejo previo a la faena (BE y AE) y tiempo (3, 6 y 24 hs *post mortem*).

Por otro lado, durante el período experimental se realizaron muestreos de sangre en 8 de los 20 animales empleados en el diseño original, los que fueron seleccionados aleatoriamente para evaluar la variación del perfil lipídico sanguíneo en ambos tratamientos: dietas (TC y TP) y en el tiempo: cada 15 días (60, 45, 30 y 15 días previos a la faena) en cada unidad experimental (animal) se realizó la medición de las variables (perfil de ácidos grasos), donde se tuvo en cuenta el arreglo factorial de dos factores (dieta: TP y TC y tiempo: 60, 45, 30 y 15 días previos a la faena) para las variables de perfil lipídico.

Se empleó el procedimiento MIXED (software estadístico SAS/STAT® versión 9.1) debido a que las mediciones fueron realizadas varias veces en la misma unidad experimental (animal) a lo largo del tiempo. Se emplearon las sentencias LSMEANS, ADJUST=BON y DDFM= KR para las comparaciones de medias y la corrección en los cálculos de la prueba F debido a las mediciones repetidas, respectivamente. La sentencia LSMEANS para realizar las comparaciones múltiples en las interacciones y los efectos principales ajustando con Prueba Bonferroni (SAS/STAT® 9.1, User's Guide The MIXED. Procedure SAS®, SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, North Carolina 27513. 2014). El procedimiento Kenward-Roger (KR) se empleó porque es robusto para contrastar el efecto principal de medidas repetidas, con esfericidad asumida, ante ausencias en la homogeneidad de varianzas y distintas faltas en la normalidad (Arnau y col., 2012).

## **4. Resultados y discusión**

### **4.1. Marcadores bioquímicos de estrés**

En la Tabla 1 se presentan los valores promedios y errores estándares para los parámetros bioquímicos sanguíneos. Los niveles de glucosa al momento de la faena fueron significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) en los animales sometidos a condiciones de estrés tradicional antes del sacrificio (AE) para ambos sistemas de alimentación. Estos datos obtenidos son similares a aquellos reportados por Tadich y col. (2003), en el cuyo trabajo se relaciona el aumento de los niveles de glucosa en sangre con el estrés durante el transporte.

Los niveles de ácido láctico en plasma presentaron una respuesta similar a la de la glucosa. Podría pensarse que esta respuesta se debió a un aumento en la tasa de glucólisis anaeróbica en los animales con tratamiento de AE (Matteri y col., 2000; Tadich y col., 2003). Los niveles de glucosa y lactato observados fueron acordes a la práctica de BE aplicada, para ambos sistemas de alimentación, representando efectivamente un manejo menos estresante que la práctica de AE.

Resultados similares obtenidos en el ensayo anexo, permiten suponer que estas variaciones mencionadas obedecen a un incremento en los niveles circulantes de las hormonas adrenalina y/o cortisol.

**Tabla 1.** Medias y error estándar (EE) de los parámetros bioquímicos sanguíneos peri-mortem de animales terminados en el sistema base de grano (TC) o basado en pasturas (TP) y sometidos a diferente manejo antes del sacrificio (reducción de estrés-BE; estrés convencional-AE).

	TC		TP		EE
	BE	AE	BE	AE	
Hematocrito (%)	41,0 B	38,4 B	43,6 A	45,2 A	1,7
Glucosa (mM)	5,61 b	6,46 a	5,57 b	6,42 a	0,18
Lactato (mM)	5,85 b	6,75 a	6,17 b	7,07 a	0,18
Proteínas totales (g%)	5,40 b	6,82 a	6,26 b	7,68 a	0,27
Creatin-kinasa (CK) actividad (U/L)	108,3	133,0	105,4	130,1	9,4
Insulina ( $\mu$ U/mL)	16,8 B	15,1 B	27,7 A	25,9 A	6,3
Cortisol ( $\mu$ g/dL)	25,9	19,7	29,9	23,6	4,8

*Letras minúsculas (a,b,...) indican diferencias estadísticamente significativas en el efecto del manejo antes del sacrificio dentro de cada sistema de alimentación ( $p < 0,05$ ).*

*Letras mayúsculas (A,B,...) indican diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas de alimentación ( $p < 0,05$ ).*

La concentración total de proteínas plasmáticas también mostró un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) asociado al manejo previo a la faena. Los animales de ambos sistemas de alimentación expuestos al manejo de AE mostraron valores más elevados de proteínas totales en comparación con los expuestos al manejo BE. En este sentido, datos reportados previamente por Tarrant y col. (1992) y Earley y O'Riordan (2006) quienes mencionan que el cambio obedece a modificaciones del metabolismo de las proteínas, son similares a los obtenidos en el presente trabajo. Estos autores reportaron alteraciones de metabolismo proteico debido al estrés asociado al transporte previo al sacrificio. Dado que las diferencias de las concentraciones de proteínas plasmáticas totales encontradas en el presente estudio estarían relacionadas con un aumento a corto plazo en el nivel de estrés, la participación relativa de la albúmina, globulinas y proteínas de estrés agudo debería considerarse en futuras investigaciones.

Los valores de hematocrito mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) asociadas con la estrategia de alimentación. Es decir, los animales alimentados con pastura mostraron valores de hematocrito más altos en comparación con aquellos animales alimentados en base a grano, independientemente del manejo aplicado antes del sacrificio. Estos resultados pueden estar asociados con el aumento de la ansiedad o la deshidratación mostrada por estos animales durante el transporte o en las instalaciones del frigorífico, puesto que los animales alimentados en pasturas se encuentran menos acostumbrados al contacto humano que aquellos animales alimentados a grano. A pesar de que los animales tuvieron libre acceso al agua durante toda la noche, es posible que estos no se hayan rehidratado adecuadamente. En este sentido, Ferguson y Warner (2008) informaron que los animales suelen mostrar una gran variabilidad en el grado de rehidratación en las instalaciones del frigorífico, dependiendo de diversos factores, tales como desconocimiento de las instalaciones y acceso limitado al agua, entre otros. Los animales alimentados en pasturas también tendieron a aumentar su nivel de proteínas plasmáticas totales ( $P > 0,05$ ). Observados en conjunto, los datos de hematocrito y proteínas totales indican deshidratación en estos animales, posiblemente debido a un bajo grado de rehidratación (Ferguson y Warner, 2008) o bien a un incremento de la diuresis (Parker y col. 2003).

La actividad enzimática CK no difirió significativamente ( $P > 0,05$ ) entre grupos. Sin embargo, los animales pertenecientes a AE mostraron una tendencia a incrementar ( $P > 0,05$ ) dicha actividad enzimática. Dado que la actividad de la enzima CK generalmente se considera un marcador importante de contusiones

(Tarrant, 1990), la ausencia de diferencias marcadas entre BE y AE apoya la idea de que el daño muscular fue minimizado en ambos grupos de manejo previo al sacrificio.

Los niveles de insulina sérica fueron asociados con la estrategia de alimentación. De este modo, los animales alimentados con pasturas mostraron valores más elevados ( $P < 0,05$ ) de insulina circulante en comparación con aquellos animales alimentados con grano. Pighin y col. (2011) y Hersom y col. (2004) han informado previamente que en animales de igual edad, al aplicarse dietas de elevada densidad energética se observan mayores niveles de insulina en sangre. En el presente estudio, dado que el punto final se estableció por medio del espesor de grasa dorsal, los animales de los sistemas de alimentación contrastantes fueron sacrificados en la misma fecha pero con diferentes edades. Así, los animales alimentados con pasturas fueron seleccionados cuando alcanzaron el punto final con una edad media de 30 meses mientras que los animales alimentados en base a grano lo alcanzaron con 18 meses. En este sentido, varios autores han informado que los incrementos en los niveles de insulina se encuentran más relacionados con la edad de los animales que con la estrategia de alimentación, con los mayores niveles de insulina en los animales de mayor edad (McCann y col., 1986; Lorenz, 2000). Es posible que los resultados obtenidos en este trabajo obedezcan a este efecto.

Los niveles de cortisol en sangre en faena no mostraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los animales, independientemente del sistema de producción o el manejo previo a la faena. Sin embargo, los valores registrados en

la sangre obtenida al momento del degüello fueron significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) a los niveles basales obtenidos dos semanas antes del sacrificio. Este hecho, asociado a cambios del metabolismo, previamente mencionado (glucosa, lactato y niveles de proteínas totales), apoyan la idea de las condiciones de alto estrés asociadas con el procedimiento de sacrificio propio. Dado que los niveles de cortisol pueden aumentar en unos pocos minutos (Manteca, 1998), es posible que el estrés asociado con el proceso de aturdimiento fuera lo suficientemente intenso como para incrementar el nivel de cortisol circulante en todos los animales estudiados. Así, las posibles diferencias asociadas con el nivel de estrés en el manejo pre sacrificio podrían haberse visto enmascaradas cuando se intenta evaluar el estrés por medio de niveles plasmáticos de cortisol. Estos resultados observados coinciden con los publicados por Tadich y col. (2005). Estos autores también han reportado una respuesta equivalente de los niveles de cortisol sanguíneo en condiciones de estrés diversas, evaluados en el momento del sacrificio.

En términos generales, los niveles de los constituyentes sanguíneos observados sugieren que el tratamiento AE fue más estresante que el tratamiento BE en los animales de ambos sistemas de producción. Más aún, cuando estos resultados se comparan con aquellos del modelo del ensayo anexo, los mismos se equiparan en mayor medida con el cuadro bioquímico de aquellos animales inyectados con adrenalina, reforzando la idea del efecto agudo del estrés generado por el tratamiento AE. Por su parte, el nivel de insulina se incrementó

significativamente en los animales alimentados a pasto, lo que sugiere un efecto asociado a la mayor edad de los animales.

#### **4.2. Niveles musculares de glucógeno**

Los animales provenientes de TC ingresaron a la playa de faena con niveles más elevados ( $P < 0,05$ ) de glucógeno muscular (Tabla 2). La concentración de glucógeno muscular en el momento del sacrificio es un factor importante que afecta la calidad de la carne. El glucógeno es el sustrato metabólico que impulsa la producción de lactato *post mortem* y, por lo tanto, permite la disminución del pH. Las reservas de glucógeno insuficientes en el momento del sacrificio resultan en valores de pH superiores a 5,5 y, en casos extremos, en un problema serio de calidad conocido como “corte oscuro”. La mejor calidad de la carne y el bienestar de los animales sacrificados y la rentabilidad financiera se lograrán mejor evitando los estresores potenciales de los animales: privación de alimentos y agua, ruido, olores desconocidos, vibración y cambios en la aceleración, temperaturas y humedad extremas, ruptura de los agrupaciones, confinamiento cercano y hacinamiento (Warriss, 1990). En este sentido, se sabe que dietas de elevada densidad energética pueden mitigar el efecto del estrés, ya que las buenas prácticas de alimentación que proporcionan precursores gluconeogénicos apropiados pueden proteger a los animales antes del sacrificio (Immonen y col. 2000). De igual manera, hay que tener en cuenta que los animales provenientes de sistemas extensivos (TP) suelen estar menos familiarizados con las personas y el manejo humano (Grandin, 1993).

**Tabla 2.** Medias y desvío estándar de los niveles de glucógeno muscular en *longissimus dorsi* de animales terminados en el sistema base de grano (TC) o basado en pasturas (TP) y sometidos a diferente manejo antes del sacrificio (reducción de estrés-BE; estrés convencional-AE).

	TC		TP	
	AE	BE	AE	BE
Glucógeno ( $\mu\text{mol/g}$ )	64,13 $\pm$ 5,42A	64,75 $\pm$ 2,41A	48,44 $\pm$ 5,09B	49,81 $\pm$ 2,55B

Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas de alimentación ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Análisis lipídico

#### 4.3.1. Perfil de ácidos grasos en suero sanguíneo

El perfil de composición de ácidos grasos en el suero sanguíneo de los animales se modificó diferencialmente durante la fase final del período de engorde para los sistemas evaluados. Los resultados obtenidos sobre el perfil de ácidos grasos en suero a los distintos tiempos permitieron observar diferentes cinéticas de incorporación de los principales ácidos grasos de interés nutricional (Tabla 3).

Se observó un efecto de interacción entre el tiempo de engorde y las dietas administradas sobre los niveles de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), ácidos grasos poliinsaturados totales (AGPI) y la relación AGPI n-6/ AGPI n-3 (n-6/n-3). De este modo, al final del periodo experimental se observaron diferencias significativas en las proporciones de AGMI (10,90 y 15,62% para TC y TP respectivamente), de AGPI (53,55 y 49,23% para TC y TP respectivamente) y para n-6/n-3 (21,41 y 1,06% para TC y TP respectivamente). Esto último se condice con estudios previos que caracterizaron el perfil lipídico en carne de animales alimentados con dietas contrastantes similares a las del presente trabajo (García y col., 2008).



Al respecto el estudio de la composición lipídica de la sangre (suero) de bovinos de producción se presenta como un interesante indicador temprano *-in vivo-* de la composición lipídica de la carne a obtener. Más aún, su estudio permite monitorear la cinética de incorporación de los lípidos conforme a los diferentes sistemas de alimentación (Cunzolo y col., 2015 y 2018).

Estos tratamientos dietarios sirvieron de base para confeccionar los lotes que posteriormente fueron sometidos a los dos manejos de estrés, TC (AE y BE), y TP (AE y BE).

**Tabla 3.** Porcentaje (%) (medias y desvío estándar) de ácidos grasos relativo a los ácidos grasos identificados en suero sanguíneo de los animales provenientes de TP y TC, y los diferentes días de muestreo previos a la faena.

AG	DIETA	Tiempo (días previos a la faena)				p val trat	p val tiempo	p val interac
		60	45	30	15			
14:0	TC	0,58 ± 0,08 c	0,60 ± 0,07 c	0,59 ± 0,06 c	0,61 ± 0,04 c	***	***	***
	TP	0,87 ± 0,08 b	0,78 ± 0,11 b	1,19 ± 0,12 a	1,16 ± 0,12 a			
16:0	TC	12,91 ± 0,31	13,49 ± 0,25	13,01 ± 0,72	12,91 ± 0,88	NS	NS	NS
	TP	13,21 ± 0,82	13,05 ± 0,37	13,57 ± 0,81	13,66 ± 0,77			
16:1/n-7	TC	1,02 ± 0,15 Bb	0,99 ± 0,12 Ab	0,89 ± 0,07 Bb	0,83 ± 0,04 Bb	***	***	NS
	TP	1,74 ± 0,10 Ba	1,94 ± 0,27 Aa	1,87 ± 0,13 Ba	1,69 ± 0,05 Ba			
18:0	TC	20,61 ± 0,69 b	19,10 ± 0,42 c	17,11 ± 0,61 d	19,46 ± 1,01 c	***	***	***
	TP	23,27 ± 0,53 a	22,77 ± 0,49 a	19,79 ± 0,55 bc	17,83 ± 0,82 d			
18:1 t	TC	0,49 ± 0,07 c	1,23 ± 0,17 b	1,28 ± 0,13 b	0,70 ± 0,09 c	***	***	***
	TP	1,56 ± 0,12 a	1,64 ± 0,27 a	1,79 ± 0,23 a	1,14 ± 0,09 b			
18:1 n-9	TC	8,21 ± 0,48 e	9,55 ± 0,80 d	10,65 ± 0,37 d	10,07 ± 0,39 d	***	***	***
	TP	18,46 ± 0,80 a	18,04 ± 0,68 a	16,04 ± 0,85 b	13,93 ± 1,21 c			
18:1 n-7	TC	0,76 ± 0,09 a	0,51 ± 0,10 b	0,42 ± 0,06 bc	0,41 ± 0,09 bcd	***	***	***
	TP	0,32 ± 0,04 cd	0,31 ± 0,03 cd	0,31 ± 0,08 cd	0,29 ± 0,05 d			
18:2 n-6	TC	47,81 ± 1,05 a	47,08 ± 1,69 a	48,26 ± 1,29 a	46,45 ± 1,59 a	***	NS	NS
	TP	18,42 ± 0,88 b	17,44 ± 0,76 b	18,29 ± 1,16 b	20,57 ± 1,32 b			
18:3 n3	TC	0,76 ± 0,09 e	0,81 ± 0,06 e	0,88 ± 0,10 e	0,89 ± 0,14 e	***	***	***
	TP	11,90 ± 0,48 d	14,62 ± 0,57 c	18,56 ± 1,63 b	20,41 ± 1,05 a			
CLA	TC	0,09 ± 0,01 b	0,08 ± 0,01 b	0,11 ± 0,02 b	0,12 ± 0,02 b	***	NS	NS
	TP	0,20 ± 0,05 a	0,22 ± 0,04 a	0,19 ± 0,04 a	0,19 ± 0,02 a			
20:4 n-6	TC	4,19 ± 0,36 bc	4,74 ± 0,51 b	3,89 ± 0,31 c	4,15 ± 0,31 bc	**	***	0,01
	TP	5,66 ± 0,50 a	4,47 ± 0,31 b	4,17 ± 0,34 bc	3,87 ± 0,38 c			
20:5 n-3	TC	0,41 ± 0,02 ef	0,51 ± 0,05 de	0,55 ± 0,07 d	0,31 ± 0,05 f	***	***	***
	TP	1,26 ± 0,07 c	1,30 ± 0,12 c	1,55 ± 0,11 b	1,83 ± 0,12 a			
22:4 n-6	TC	0,63 ± 0,11 bc	0,70 ± 0,09 b	0,74 ± 0,12 b	0,56 ± 0,09 bc	*	***	***
	TP	1,02 ± 0,20 a	0,75 ± 0,09 b	0,63 ± 0,06 bc	0,50 ± 0,10 c			
22:5 n-3	TC	1,00 ± 0,13 b	0,90 ± 0,10 b	0,81 ± 0,04 b	0,85 ± 0,07 b	***	NS	NS
	TP	1,24 ± 0,10 a	1,26 ± 0,24 a	1,22 ± 0,13 a	1,29 ± 0,10 a			
22:6 n-3	TC	0,45 ± 0,10 Bb	0,42 ± 0,09 Bb	0,49 ± 0,07 Ab	0,34 ± 0,08 Cb	***	**	NS
	TP	0,87 ± 0,08 Ba	0,82 ± 0,07 Ba	0,84 ± 0,09 Aa	0,76 ± 0,06 Ca			

Tabla 3. Continuación.

AG	DIETA	Tiempo (días previos a la faena)				p val trat	p val tiempo	p val interac
		60	45	30	15			
AGS	TC	34,11 ± 0,85 bc	33,18 ± 0,29 bc	30,71 ± 1,16 d	32,98 ± 0,96 bc	***	***	***
	TP	37,35 ± 0,76 a	36,60 ± 0,70 a	34,56 ± 1,18 b	32,65 ± 1,53 c			
AGMI	TC	9,23 ± 0,56 e	10,54 ± 0,87 d	11,55 ± 0,35 d	10,90 ± 0,39 d	***	***	***
	TP	20,20 ± 0,74 a	19,98 ± 1,03 a	17,91 ± 0,81 b	15,62 ± 1,20 c			
AGPI	TC	55,25 ± 1,05 a	55,16 ± 1,58 a	55,62 ± 1,06 a	53,55 ± 1,95 b	***	***	***
	TP	40,37 ± 0,81 e	40,66 ± 0,50 e	45,26 ± 2,01 d	49,23 ± 1,92 c			
n-3	TC	2,62 ± 0,29 e	2,64 ± 0,14 e	2,73 ± 0,13 e	2,39 ± 0,23 e	***	***	***
	TP	15,27 ± 0,40 d	18,00 ± 0,55 c	22,17 ± 1,55 b	24,28 ± 1,00 a			
n-6	TC	52,63 ± 1,02 a	52,52 ± 1,58 a	52,89 ± 1,07 a	51,16 ± 1,78 a	***	*	***
	TP	25,10 ± 0,93 b	22,66 ± 0,80 c	23,09 ± 1,04 c	24,94 ± 1,13 b			
n-6/n-3	TC	20,09 ± 1,31 ab	19,89 ± 1,18 b	19,37 ± 0,83 b	21,41 ± 1,85 a	***	***	***
	TP	1,64 ± 0,09 c	1,26 ± 0,08 c	1,04 ± 0,08 c	1,03 ± 0,04 c			
AGMI/AGS	TC	0,27 ± 0,02 e	0,32 ± 0,03 d	0,38 ± 0,02 c	0,33 ± 0,02 cd	***	***	***
	TP	0,54 ± 0,03 a	0,55 ± 0,04 a	0,52 ± 0,02 ab	0,48 ± 0,05 b			
AGPI/AGS	TC	1,62 ± 0,07 b	1,66 ± 0,04 b	1,81 ± 0,10 a	1,62 ± 0,10 b	***	***	***
	TP	1,08 ± 0,04 d	1,11 ± 0,02 d	1,31 ± 0,10 c	1,51 ± 0,11 b			

NS: Diferencias no significativas; \* p<0,05, \*\* p<0,005, \*\*\* p<0,0005; Letras mayúsculas indican diferencia en el tiempo y minúsculas negritas indican diferencia en efecto de dietas; minúsculas interacción, **AGS**: C14:0+C16:0+C18:0; **AGMI**: C16:1n-7+C18:1n-9; **AGPI**: C18:2n-6+C18:3n-3+C20:4n-6 + C20:5n-3+C22:4n-6+C22:5n-3+C22:6n-3; **n-3**: C18:3n-3+C20:5n-3+C22:5n-3+C22:6n-3; **n-6**: C18:2n-6+C20:4n-6+C22:4n-6

#### 4.3.2. Perfil de ácidos grasos y contenido de grasa total en corte de LD

La Tabla 4 muestra un efecto significativo de la dieta administrada sobre los porcentajes en carne de diversos AG. TP incrementó los AG 14:0, 16:0, 16:1 n-7 y 18:3 n-3, mientras que TC incrementó los AG 18:2 n-6 y 20:4 n-6. En términos generales, TP presentó porcentajes más elevados de AGS, AGPI n-3 y CLA (este último como tendencia), con porcentajes más bajos de AGPI n-6 y n-6/n-3 que la carne proveniente de TC, ésto se condice con resultados obtenidos previamente a nivel local (García y col., 2008) e internacional (Van Elswyk y McNeill, 2014). Interesantemente, estos resultados reflejan un paralelismo con el perfil lipídico de los sueros de estos animales al momento de la faena (Cunzolo y col., 2015). Dicho

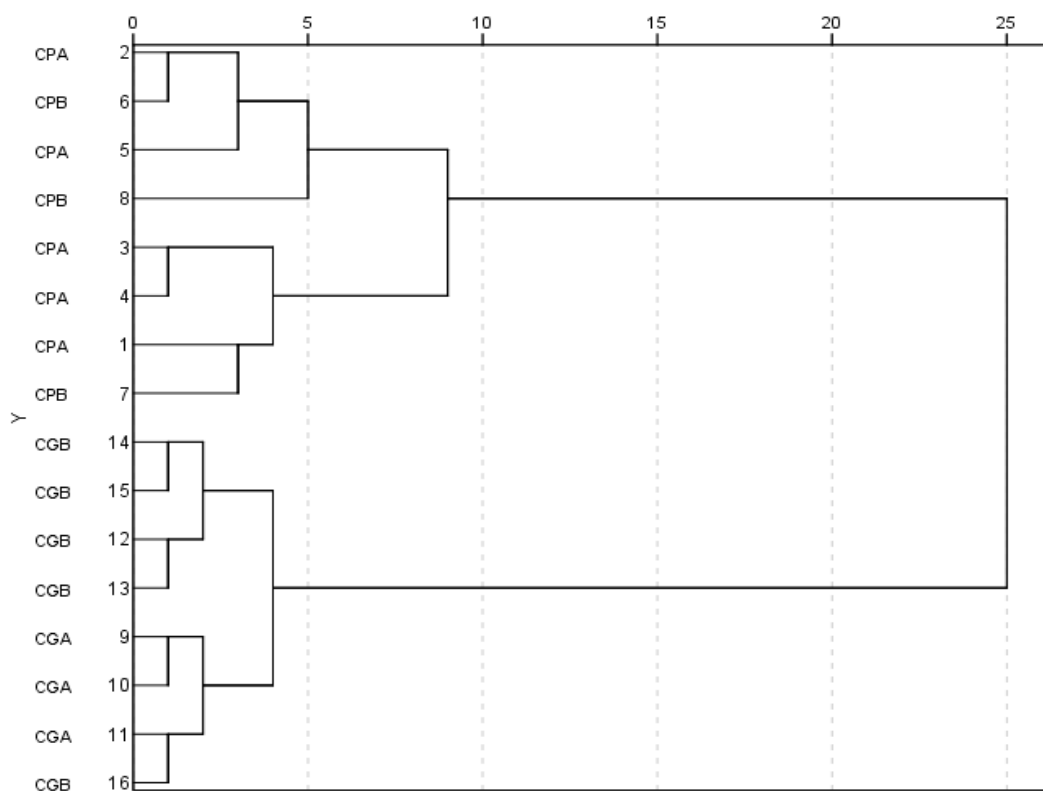
paralelismo puede observarse puntualmente en los niveles porcentuales de AG n-3 y n-6, no así en el caso de AGS. El contenido de grasa intramuscular (EE%) entre tratamientos no presentó diferencias significativas, encontrándose el mismo dentro de los parámetros típicos de la raza utilizada.

**Tabla 4.** Porcentaje (%) (Medias y desvío estándar) de ácidos grasos relativo a los ácidos grasos identificados en carne y contenido de grasa intramuscular (EE%).

Ácidos grasos % (AG%)	TC	TP	Significancia
14:0	2,99±0,10	3,19±0,09	*
16:0	27,67±0,44	29,46±0,83	***
16:1/n-7	3,48±0,23	4,09±0,32	**
18:0	15,64±0,4	15,07±0,86	NS
18:1t	1,01±0,06	1,07±0,16	NS
18:1/n-9	41,41±0,47	41,02±0,81	NS
18:1/n-7	1,08±0,07	0,97±0,37	NS
18:2/n-6	4,21±0,43	2,47±0,22	***
18:3/n-3	0,29±0,02	0,58±0,09	***
CLA	0,25±0,05	0,28±0,08	NS
20:4/n-6	1,11±0,16	0,91±0,17	*
20:5/n-3	0,19±0,06	0,23±0,08	NS
22:4/n-6	0,16±0,05	0,18±0,04	NS
22:5/n-3	0,39±0,06	0,37±0,11	NS
22:6/n-3	0,12±0,03	0,12±0,01	NS
<b>AGS</b>	46,30±0,57	47,72±1,10	*
<b>AGMI</b>	44,89±0,41	45,11±0,74	NS
<b>AGPI</b>	6,72±0,62	5,13±0,38	***
<b>n-3</b>	0,99±0,13	1,29±0,15	**
<b>n-6</b>	5,48±0,55	3,56±0,27	***
<b>n-6/n-3</b>	5,62±0,82	2,79±0,35	***
<b>AGMI/AGS</b>	0,97±0,02	0,95±0,4	NS
<b>AGPI/AGS</b>	0,15±0,02	0,11±0,01	***
<b>EE%</b>	3,66±1,15	3,08±0,73	NS

**NS:** Diferencias no significativas; \* p<0,05, \*\* p<0,005, \*\*\* p<0,0005; **AGS:** C14:0+C16:0+C18:0; **AGMI:** C16:1n-7+C18:1n-9; **AGPI:** C18:2n-6+C18:3n-3+C20:4n-6 + C20:5n-3+C22:4n-6+C22:5n-3+C22:6n-3; **n-3:** C18:3n-3+C20:5n-3+C22:5n-3+C22:6n-3; **n-6:** C18:2n-6+C20:4n-6+C22:4n-6

La Figura 2 muestra el análisis de *cluster* de los ácidos grasos medidos en la carne (LD) proveniente de animales sometidos a dos dietas (TC y TP) donde luego recibieron dos condiciones de estrés peri faena. Como puede observarse, la clasificación obtenida fue en función de la dieta administrada, y no por efecto del estrés impartido previo a la faena (AE y BE). Este hecho resulta lógico, considerando, en primera instancia, que modificaciones en el perfil de composición lipídica de la carne requieren periodos de tiempos comprendidos entre semanas y meses. Más aún, no hay evidencias fehacientes que vinculen mecanismos de estrés agudo peri faena con perfiles de composición lipídica muscular.



**Figura 2:** Dendrograma jerárquico de *cluster* de los ácidos grasos medidos a las carnes (LD) proveniente de animales sometidos a dos dietas (TC y TP) y efecto del estrés (AE y BE)

### 4.3.3. Contenido de sustancias bioactivas

La Tabla 5 muestra el contenido de anserina y carnosina en los músculos LD de los animales estudiados. Como se puede observar, los animales de ambos sistemas de alimentación contrastantes (TC y TP) expuestos a bajo estrés (BE) mostraron una menor concentración de anserina y carnosina que los expuestos a manejo pre faena tradicional (AE) ( $P < 0,05$ ). Por otro lado, el sistema de alimentación animal mostró un efecto significativo en los niveles de anserina ( $P < 0,05$ ), los animales alimentados en pastura mostraron un aumento del contenido de anserina en el músculo LD. No se observó ningún efecto de interacción entre el sistema de alimentación y el manejo previo al sacrificio.

**Tabla 5.** Medias y desvío estándar de los niveles de Anserina (A) y Carnosina (C) (mg / g) en *longissimus dorsi* de animales terminados en el sistema base de grano (TC) o basado en pasturas (TP) y sometidos a diferente manejo antes del sacrificio (reducción de estrés-BE; estrés convencional-AE)

	TC		TP	
	AE	BE	AE	BE
<b>A</b>	0,243 ± 0,097 aB	0,153 ± 0,059 bB	0,319 ± 0,106 aA	0,209 ± 0,113 bA
<b>C</b>	1,633 ± 0,527 a	1,000 ± 0,384 b	1,711 ± 0,554 a	1,343 ± 0,610 b

Las letras minúsculas en diferentes celdas indican efecto del manejo. Las letras mayúsculas en diferentes celdas indican el efecto del sistema de alimentación. ( $P < 0,05$ ).

Dado que estos dipéptidos presentan importantes funciones antioxidantes y de eliminación de radicales libres, se podría suponer que la práctica AE (para ambos sistemas de alimentación) condujo a un aumento de los niveles de estos dipéptidos con el fin de proteger el tejido muscular. Más aun, pese a la escasa literatura acerca de los dipéptidos en los animales estresados, los resultados coinciden con los de

otros autores que han encontrado que el contenido de carnosina en el músculo humano total se ha correlacionado con ejercicio de alta intensidad (Suzuki y col., 2002). Los datos publicados también relacionan concentraciones más altas de estos dipéptidos en atletas que participan en deportes anaeróbicos (Parkhouse y col., 1985, Boobis y col., 2005). Estas correlaciones sugieren que el aumento de los niveles de dipéptidos encontrados sería una consecuencia de un aumento de la glucólisis anaeróbica involucrados en animales AE antes del sacrificio.

Los animales del sistema basado en pastura mostraron valores más altos de anserina ( $P < 0,05$ ) que los animales del sistema basado en granos, independientemente del manejo previo al sacrificio. Este efecto podría deberse a la mayor edad de los animales TP, en ratones, el contenido en músculo de estos dipéptidos aumentó con la edad de los animales (Peñafiel y col., 2004). Otros autores (Liu, 2011) encontraron que el sistema de alimentación es una fuente significativa de variación para los niveles de carnosina y anserina.

Estos resultados podrían estar asociados con el aumento de la ansiedad y la deshidratación de estos animales durante el transporte o en las instalaciones del frigorífico, ya que los animales alimentados con pastura estarían menos acostumbrados al contacto humano que los alimentados con grano.

#### **4.3.4. Contenido de aminoácidos libres**

La Tabla 6 muestra la concentración total de aminoácidos libres de los músculos LD de los animales estudiados.

**Tabla 6.** Medias y desvío estándar de los niveles de aminoácidos libre (mg / 100 g) en *longissimus dorsi* de animales terminados en el sistema base de grano (TC) o basado en pasturas (TP) y sometidos a diferente manejo antes del sacrificio (reducción de estrés-BE; estrés convencional-AE).

TC		TP	
AE	BE	AE	BE
119,87±6,14	127,20±22,00	127,40±4,06	115,55±48,01

Como puede observarse, ni el sistema de alimentación ni el manejo previo al sacrificio modificaron el contenido de aminoácidos libres en el musculo LD de los animales. Esto es lógico, ya que solo se esperaría un incremento en aminoácidos libres en la etapa de maduración de la carne debido a los procesos bioquímicos involucrados en dicha etapa (Aristoy, y Toldrá, 1998).

#### 4.3.5. Parámetros de calidad de la carne

##### **Valor de pH final y curva pH/T**

Las tablas 7a y 7b muestran los valores de pH y T en el músculo LD registrados a las 3, 6 y 24 h *post mortem*. Los valores de pH final se encontraron todos dentro del rango normal (< a 5,9) y no se evidenció la condición de corte oscuro (carne DFD, oscura, firme y seca resultante del agotamiento y, por lo tanto, de un agotamiento del glucógeno antes del sacrificio). Los valores de pH de la carne proveniente del sistema pastoril fueron más bajos que los de la proveniente de la dieta grano. Los valores de temperatura fueron mayores en la carne proveniente de los animales con dieta en base a grano (P < 0,05). Las tasas de disminución del pH



y de la T en el músculo mostraron un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) asociado con la estrategia de alimentación.

El pH y la T del músculo no estuvieron afectados por el manejo antes del sacrificio. Teniendo en cuenta el pH fisiológico del músculo, la carne proveniente del sistema pastoril muestra la mayor tasa de descenso de pH muscular durante las primeras 3 h *post mortem* y el menor decrecimiento del pH durante las 3 – 24 h *post mortem* (Tabla 7a). Varios autores (Ohtsuka y col., 1995; Forst y col., 2006) han reportado que los mecanismos de resistencia a la insulina producen alteraciones relacionadas con la termorregulación del cuerpo en los seres humanos. Puesto que los animales alimentados con pastura mostraron mayores niveles de insulina en circulación ( $P < 0,05$ ), los mecanismos de resistencia a la insulina pueden contribuir a una mayor temperatura en el músculo. Por otra parte, los valores de pH bajos encontrados en carne del sistema pastoril a las 3 hs *post mortem* pueden ser una consecuencia de la utilización anaeróbica de glucosa estimulada inmediatamente *post mortem* por medio del aumento de los niveles de insulina (Mayes y Bender, 2003) y la temperatura del músculo (Offer, 1991).

El análisis de la temperatura del músculo muestra una mayor disminución de temperatura de la carne proveniente del sistema pastoril respecto a la que proviene del sistema a base de grano ( $P < 0,05$ ) para el periodo de 3 – 24 h *post mortem* (Tabla 7b).

**Tabla 7a.** Valores medios de pH 3 h, 6 h y 24 h *post mortem* en LD de animales criados y terminados en el sistema basado en grano (TC) o el sistema basado en pastura (TP) y sujetos a diferentes manejos pre-faena (estrés reducido-BE; estrés convencional-AE).

pH	TC			TP		
	3 h	6 h	24 h	3 h	6 h	24 h
<b>BE</b>	6,19 ± 0,07Aa	5,85 ± 0,25Ab	5,74 ± 0,27Ab	5,87 ± 0,27Ba	5,39 ± 0,14Bb	5,48 ± 0,07Bb
<b>AE</b>	6,20 ± 0,25Aa	5,81 ± 0,21Ab	5,70 ± 0,06Ab	5,90 ± 0,39Ba	5,66 ± 0,27Bb	5,58 ± 0,08Bb

A, B.. letras mayúsculas indican diferencias en efecto de la Dieta ( $p < 0,05$ )

a, b.. letras minúsculas indican diferencias en efecto del tiempo ( $p < 0,05$ )

**Tabla 7b.** Valores medios de temperatura tomados 3 h, 6 h y 24 h *post mortem* en LD de animales criados y terminados en el sistema basado en grano (TC) o el sistema basado en pastura (TP) y sujetos a diferentes manejos pre-faena (estrés reducido-BE; estrés convencional-AE).

T (°C)	TC			TP		
	3 h	6 h	24 h	3 h	6 h	24 h
<b>BE</b>	26,31 ± 1,29Ba	17,20 ± 1,28Bb	2,72 ± 0,20Bc	27,92 ± 0,89Aa	19,30 ± 1,06Ab	3,33 ± 0,41Ac
<b>AE</b>	26,49 ± 1,42Ba*	15,82 ± 2,13Bb*	2,44 ± 0,44Bc*	27,42 ± 0,85Aa*	17,74 ± 0,97Ab*	3,08 ± 0,47Ac*

A, B.. letras mayúsculas indican diferencias en efecto de la Dieta ( $p < 0,05$ )

\* Indica diferencias de temperatura en el efecto manejo ( $p < 0,05$ )

a, b.. letras minúsculas indican diferencias en efecto del Tiempo ( $p < 0,05$ )

Debido a inconvenientes técnicos y logísticos, las temperaturas musculares iniciales no pudieron ser registradas, hecho que dificulta la comparación de las tasas de disminución de T entre las dos estrategias de alimentación durante las primeras 3 h *post mortem*. Las diferencias en la carcasa, el músculo y la composición de grasa debido a las estrategias de alimentación pueden estar implicadas en las diferentes velocidades de enfriamiento registrados (Judge, 1986; Garcia y col., 2008). En general, la tendencia ( $P > 0,05$ ) a mostrar temperatura muscular más alta en el sistema pastoril respecto al sistema en base a grano, reforzaría la idea de que los animales a pasto eran más propensos a experimentar ansiedad y estrés durante la manipulación humana, hipótesis previamente postulada por medio de los niveles de hematocrito registrados (Tabla 1).

### **Perfil de textura y color instrumental**

La Tabla 8a muestra el análisis de perfil de textura del músculo LD. Se observa para el parámetro de dureza una interacción significativa ( $P < 0,05$ ) entre el manejo antes del sacrificio y la estrategia de alimentación (dieta). La carne de los animales provenientes del sistema en base a grano y sometidos a tratamiento de estrés reducido (BE), muestran una disminución significativa ( $P < 0,05$ ) de la dureza, en comparación con los animales provenientes del sistema en base a grano y sometidas a manejo tradicional (AE) y los animales provenientes del sistema pastoril para ambos manejos en cuanto al estrés pre faena (BE y AE). Este efecto puede estar relacionado con mecanismos independientes del pH, dado que no se evidenció ningún caso de corte oscuro y el pH final en el músculo LD no mostró diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). En este sentido, el ensayo anexo demostró una asociación positiva (tendencia significativa) entre el incremento de adrenalina o de cortisol con incrementos de la dureza y la adhesividad de la carne, sin valores de pH final por encima del valor de 5,80. Más aún, se ha demostrado que las experiencias del animal previas a la faena, incluyendo el estrés agudo, pueden influir notablemente en la dureza de la carne en bovinos (Warner y col., 2007; Gruber y col., 2010) y en corderos (Warner y col., 2005a) a través de mecanismos que aún no son muy bien entendidos. Por un lado, Warner y col., (2005b) plantearon la hipótesis de que los niveles liberados de óxido nítrico durante el estrés afectarían la actividad proteolítica que conduce a una disminución de la ternura de la carne. En el presente trabajo, el estrés pre faena en los animales alimentados con granos sometidos a manejo con estrés tradicional (AE) pudo llevar a elevados niveles de

óxido nítrico, que estarían involucrados en los valores de dureza medidos. Dado que los resultados publicados muestran que la degradación de proteínas musculares también podría ser suprimida mediante la presencia de catecolaminas (Ferguson y Warner, 2008), grandes niveles de catecolaminas en el músculo también pueden contribuir a los niveles de dureza que se encuentran en el presente estudio.

**Tabla 8a.** Valores medios del perfil de TPA y CRA % en LD de animales criados y terminados en el sistema basado en grano (TC) o basado en pastura (TP) y sujetos a diferentes manejos pre-faena (estrés reducido-BE; estrés convencional-AE)

	TC		TP	
	BE	AE	BE	AE
Dureza (N)	76,19±7,91 b	85,29±8,07 a	90,73±4,55 a	87,85±4,52 a
Cohesividad	0,480±0,02	0,479±0,03	0,464±0,04	0,463±0,03
Elasticidad (g)	0,476±0,03	0,478±0,03	0,478±0,03	0,468±0,03
Resiliencia	0,149±0,01	0,149±0,01	0,147±0,01	0,150±0,01
Adhesividad	-10,35±2,16	-10,23±3,45	-9,65±1,96	-9,05±1,20
Masticabilidad (N)	17,96±2,45	20,23±3,58	19,92±1,39	18,98±3,08
CRA %	50,88±3,68	52,31±5,09	51,84±3,54	54,17±3,21

*a, b Letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) del efecto de interacción entre el sistema de alimentación y manejo antes del sacrificio.*

En cuanto a carne proveniente del sistema pastoril, se vio que el manejo con estrés reducido ha presentado niveles elevados de dureza en el perfil de textura. Es posible que el manejo pre faena implicara una circunstancia más estresante para los animales del sistema pastoril que para los animales alimentados con grano (Grandin, 1993). Esto resultaría evidente en el mayor valor de hematocrito de los animales alimentados con pasturas (Tabla 1). Además, puesto que el acoplamiento estructural del colágeno aumenta con la edad del animal (Warner y col., 2010) y teniendo en cuenta que los animales alimentados a pasto eran de mayor edad que

aquellos alimentados a grano (30 *versus* 18 meses respectivamente), no podría descartarse una contribución significativa del tejido conectivo en los valores de dureza para carne proveniente del sistema pastoril (Sañudo y col., 2004; Guzek y col., 2013). También se puede observar (Tabla 4) que la cantidad de grasa total (EE%) como así también la composición y de los ácidos grasos (Tabla 3) se ha considerado un rasgo importante que contribuye a la ternura de la carne, es por esto que se pueden observar valores más bajos de dureza en animales TC (Venkata Reddy, B. y col., 2015).

En la Tabla 8b puede observarse que los parámetros de color en LD no estuvieron afectados por las estrategias de alimentación o el manejo previo al sacrificio. En este último caso, resultados similares se observaron en el ensayo con administración de hormonas de estrés (ver anexo), en el cual incrementos de adrenalina o cortisol circulantes no condujeron a cambios significativos en los parámetros de color en el corte LD. Con respecto al papel de la dieta sobre el color de la carne, se sabe que se encuentra principalmente relacionado con efectos indirectos sobre el metabolismo, almacenamiento de glucógeno, pH, tasa de enfriamiento y acumulación de antioxidantes (Mancini, 2009).

**Tabla 8b.** Valores medios de los parámetros espectrofotométricos en LD de animales criados y terminados en el Sistema basado en grano (TC) o basado en pastura (TP) y sujetos a diferentes manejos pre-faena (estrés reducido-BE; estrés convencional-AE).

	TC		TP	
	BE	AE	BE	AE
L*	36,63±3,41	35,32±2,37	33,57±2,43	33,73±2,18
a*	15,82±3,45	16,18±1,11	14,90±2,46	16,28±1,88
b*	13,81±3,47	14,28±1,96	12,51±2,25	13,40±2,05
MMB (%)	29,20±2,73 B	28,17±2,07 B	32,24±2,19 A	31,16±2,14 A
DMB (%)	15,65±3,07	14,35±2,95	12,92±2,30	12,87±3,49
OMB (%)	55,15±3,26	57,48±3,13	54,84±3,04	55,96±3,33

Letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas en el efecto del sistema de alimentación ( $p < 0.05$ ).

### **Concentración de pigmentos**

Se observó (Tabla 8b) un efecto significativo de la estrategia de alimentación ( $p < 0,05$ ) en los valores del contenido de metamioglobina (MMB), siendo este mayor en el sistema pastoril. Estudios previos de nuestro grupo encontraron diferencias en los parámetros de color asociados con la dieta al comparar animales con igual edad al sacrificio. Así también, Pordomingo y col. (2012) observaron efectos en las características de la carne novillos Angus en sistemas a corral con dietas de heno de alfalfa al 40, 70 o 100% o en pastoreo. İnsani y col. (2008) estudiaron la estabilidad del color del Psoas Mayor, asociado con dietas en base a pastos y cereales durante 110 días hasta la faena. Los autores mencionan que la dieta de granos aumentó los valores del parámetro L\*, pero no afectó el parámetro b\* y el contenido MMB% se vio aumentado en la carne de los animales provenientes de sistemas pastoriles.

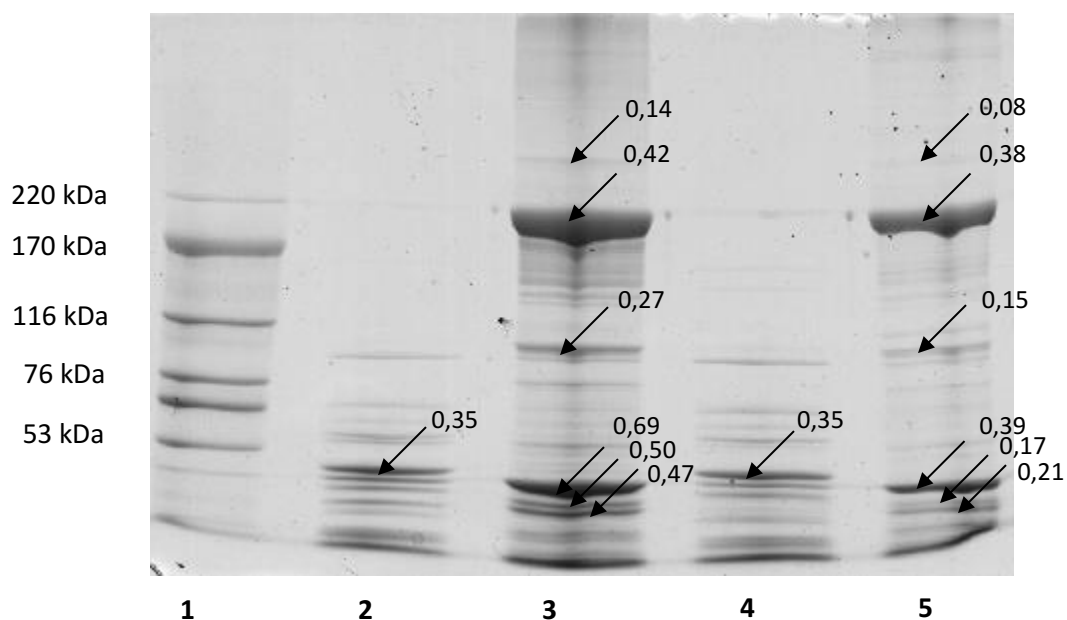
## **Maduración**

Las imágenes obtenidas mediante el análisis SDS-PAGE en gradiente de los extractos de proteínas solubles muestran una serie de bandas cuyo PM es menor a 50 kDa. Con respecto a los extractos de proteínas miofibrilares, se observan numerosas bandas, cuyos PM tuvieron valores que pertenecieron a un rango muy amplio, probablemente entre 20 y 2000 kDa. Las bandas más representativas en cuanto a su cantidad relativa (aproximadamente 70%) corresponden a la cadena pesada de miosina (220 kDa), actina (43 kDa), y tropomiosina, entre otras. Estos patrones coinciden con trabajos previamente publicados por el equipo de trabajo (Pighin y col., 2008).

El análisis electroforético de las proteínas del músculo LD de animales provenientes de sistemas intensivos (TC) y sometidos a estrés pre-faena minimizado (BE) puede observarse en la Figura 3. Como era de esperar, el sistema SDS-PAGE en gradiente 3-12% permitió el desarrollo de todas las proteínas presentes, más allá de las grandes diferencias de PM entre ellas.

El análisis electroforético del mismo demostró importantes diferencias de DO en las bandas correspondientes a las proteínas miofibrilares: cadena pesada de miosina (220 kDa, 0,42 vs. 0,38),  $\alpha$ -actinina (0,27 vs. 0,15), actina (43 kDa, 0,69 vs. 0,39). Estas diferencias permiten inferir que dichas muestras sufrieron un importante grado de proteólisis ocurrida durante la maduración de 21 días. El escaso o nulo incremento de las densidades ópticas de las bandas correspondientes a las proteínas solubles sugeriría que los principales productos de dicha degradación

serían péptidos y/o aminoácidos, los cuales no llegan a ser perfectamente resueltos en el presente sistema.



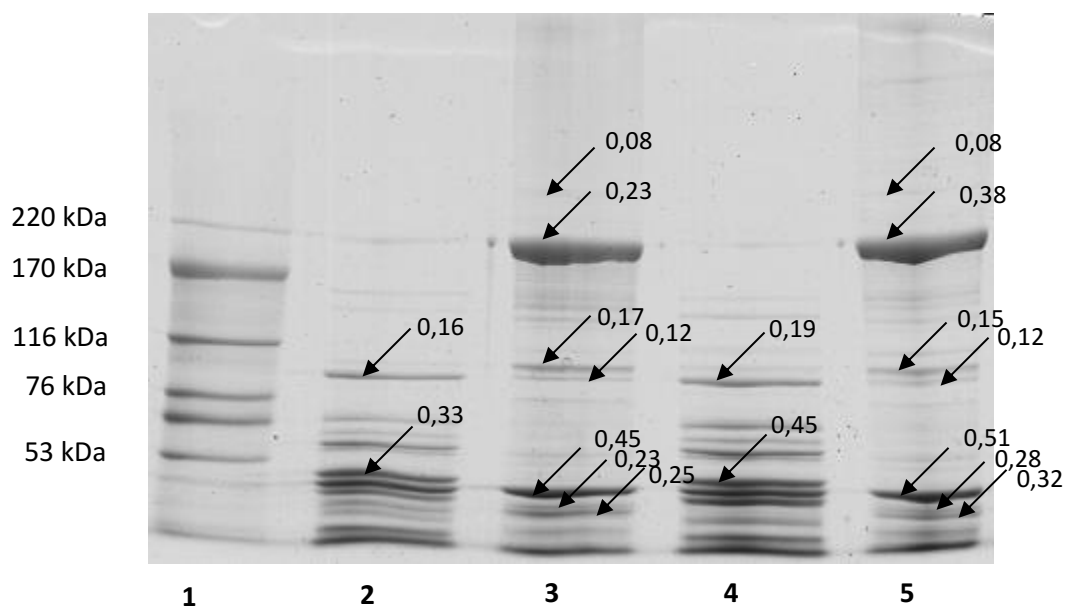
**Figura 3:** Análisis SDS-PAGE de proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de LD proveniente de sistema intensivo (TC) y sometido a estrés pre-faena minimizado (BE), y madurado a 0 (t0) o 21 días (t21). 1, Estándar HMW-SDS; 2, Extracto Soluble t0; 3, Extracto Miofibrilar t0; 4, Extracto Soluble T21; 5, Extracto Miofibrilar t21.

En la Figura 4 puede observarse el desarrollo electroforético de las proteínas musculares de músculo LD de animales provenientes de sistema intensivo (TC) y sometidos a un mayor nivel de estrés pre-faena (AE). Como puede observarse, la maduración de 21 días no se manifestó en diferencias en las DO de las principales bandas de proteínas miofibrilares antes mencionadas: cadena pesada de miosina (220 kDa, 0,23 vs. 0,38),  $\alpha$ -actinina (0,17 vs. 0,15), actina (43 kDa, 0,45 vs. 0,51). En este mismo sentido, tampoco se observaron diferencias en el perfil de proteínas solubles.



Este hallazgo sugeriría que la bioquímica relacionada con el mayor nivel de estrés previo a la faena afectó el desarrollo de la proteólisis muscular usualmente desarrollada durante 21 días de maduración. Al respecto, se ha mostrado que experiencias previas al sacrificio, entre las que se incluye el estrés agudo, pueden influir notablemente sobre la dureza de la carne vacuna (Gruber y col., 2010; Warner y col., 2007) mediante mecanismos aún no bien descritos.

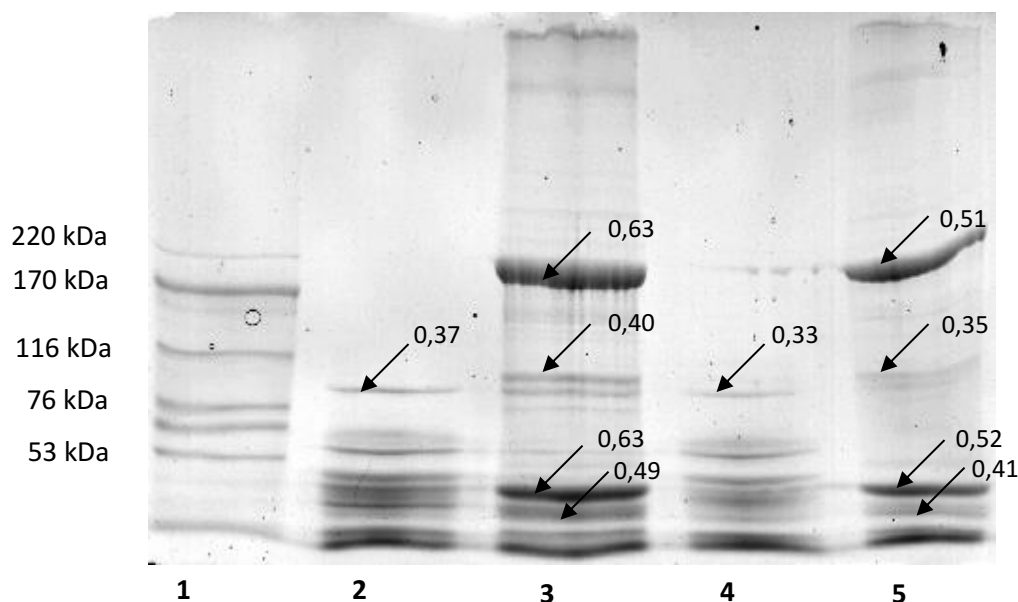
Resultados previos publicados han evidenciado que la degradación proteica endógena puede ser alterada mediante la acción específica de las catecolaminas adrenalina y/o noradrenalina (Ferguson y Warner, 2008). Por otra parte, Warner y col. (2005) han planteado la hipótesis de que los niveles de liberación de óxido nítrico durante el estrés también afectarían la actividad proteolítica, hecho que conduciría a una disminución en la terneza de la carne, tanto fresca como madurada.



**Figura 4:** Análisis SDS-PAGE de proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de LD proveniente de sistema intensivo (TC) y sometido a estrés pre-faena tradicional (AE), y madurado a 0 (t0) o 21 días

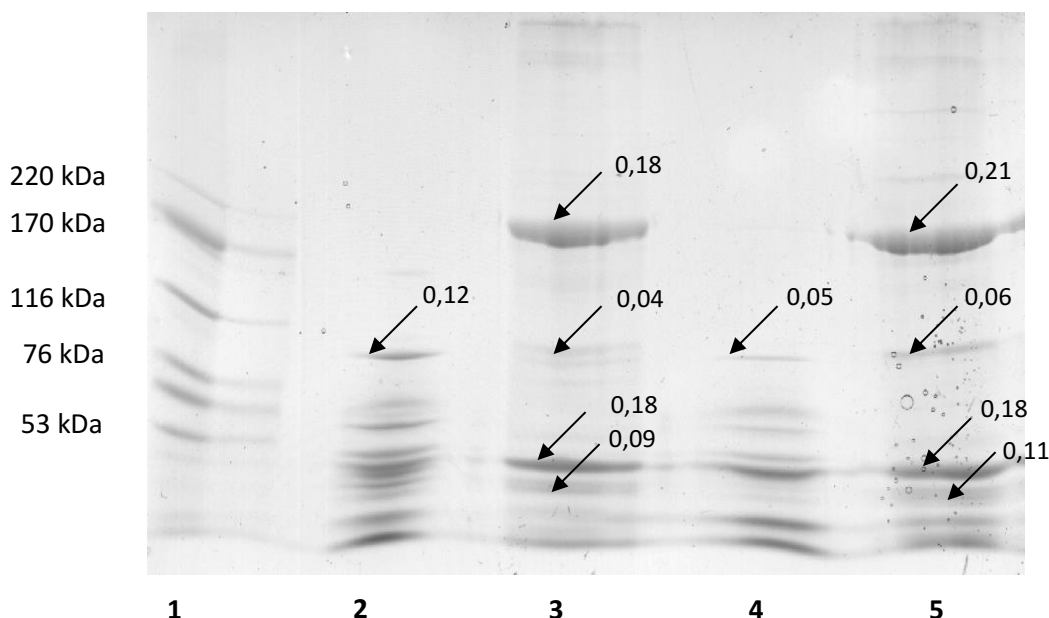
(t21). 1, Estándar HMW-SDS; 2, Extracto Soluble t0; 3, Extracto Miofibrilar t0; 4, Extracto Soluble T21; 5, Extracto Miofibrilar t21.

En la Figura 5 puede observarse el desarrollo electroforético de las proteínas musculares de LD de animales provenientes de sistema extensivo (TP) y sometidos a estrés pre-faena minimizado (BE). Como puede observarse, dicho patrón electroforético coincide con el de la Figura 3, donde las principales bandas correspondientes al extracto miofibrilar con maduración presentan menores valores de DO que los correspondientes a sin maduración. Este hallazgo también permite suponer que la proteólisis muscular ocurrida durante el proceso de maduración produjo estos cambios en el patrón electroforético.



**Figura 5:** Análisis SDS-PAGE de proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de LD proveniente de sistema extensivo (TP) y sometido a estrés pre-faena minimizado (BE), y madurado a 0 (t0) o 21 días (t21). 1, Estándar HMW-SDS; 2, Extracto Soluble t0; 3, Extracto Miofibrilar t0; 4, Extracto Soluble T21; 5, Extracto Miofibrilar t21.

En la Figura 6 puede observarse el desarrollo electroforético de las proteínas musculares de músculo LD de animales provenientes de sistema extensivo (TP) y sometidos a un mayor nivel de estrés pre faena (AE). En este caso, el efecto de la maduración no se reflejó en diferencias considerables entre las DO de las bandas.



**Figura 6:** Análisis SDS-PAGE de proteínas sarcoplasmáticas y miofibrilares de LD proveniente de sistema extensivo (TP) y sometido a estrés pre-faena tradicional (AE), y madurado a 0 (t0) o 21 días (t21). 1, Estándar HMW-SDS; 2, Extracto Soluble t0; 3, Extracto Miofibrilar t0; 4, Extracto Soluble T21; 5, Extracto Miofibrilar t21.

Los perfiles proteicos analizados, en su conjunto, permiten sugerir que los cortes LD de aquellos animales que fueron sometidos a mayores niveles de estrés agudo pre faena, independientemente de la dieta, no maduraron adecuadamente. Por el contrario, la minimización de dicho estrés se vio reflejada en mayores niveles de degradación de la fracción de proteínas miofibrilares.

Resulta importante remarcar que en el presente trabajo no se observó variación significativa en los valores de pH 24 h, siendo todos ellos considerados óptimos, es decir, menores a 5,70. De este modo, puede considerarse que los efectos estudiados corresponderían a mecanismos independientes del pH final. Si bien los mecanismos exactos no se conocen, se sabe que la degradación de las proteínas miofibrilares comienza a las 12 h post mortem, siendo dicho proceso dependiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

A pesar del cúmulo de evidencias que apuntan a las calpaínas como responsables del proceso de proteólisis muscular, existe una teoría que considera que la tiernización ocurre por efecto del calcio, independientemente de la acción enzimática (Takahashi, 1996). En concentraciones no fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$  (0,1 mM) se ha podido determinar alteración de la estructura miofibrilar (degradación de titina, nebulina y desmina) y resolución del rigor mortis por translocación de la para-tropomiosina dentro del sarcómero.

En este sentido, dado que la magnitud del proceso de proteólisis post mortem sería el mayor responsable de la variación de la terneza de la carne (Koochmaraie y col., 1995), los resultados obtenidos permitirían relacionar el nivel de estrés agudo pre-faena con la variabilidad de la calidad de la carne mediante mecanismos independientes del pH.

### 4.3.6 Color en el tejido adiposo

En la Tabla 9 se muestran datos sobre el color de la grasa peri renal. Los resultados mostraron un efecto significativo de la alimentación en el color grasa. La grasa de animales alimentados con pastura mostró una diferencia mayor de coloración amarilla (parámetro  $b^*$ ) y una inferior en intensidad de luminosidad y reflectancia ( $L^*$  y  $RT$ ) estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) en comparación con la grasa de los alimentados en base a grano. Los parámetros  $a^*$  y Hue tuvieron efectos significativos en el manejo ( $p < 0,05$ ) e inversos, los valores más altos de  $a^*$  y Hue, correspondieron a BE y AE respectivamente.

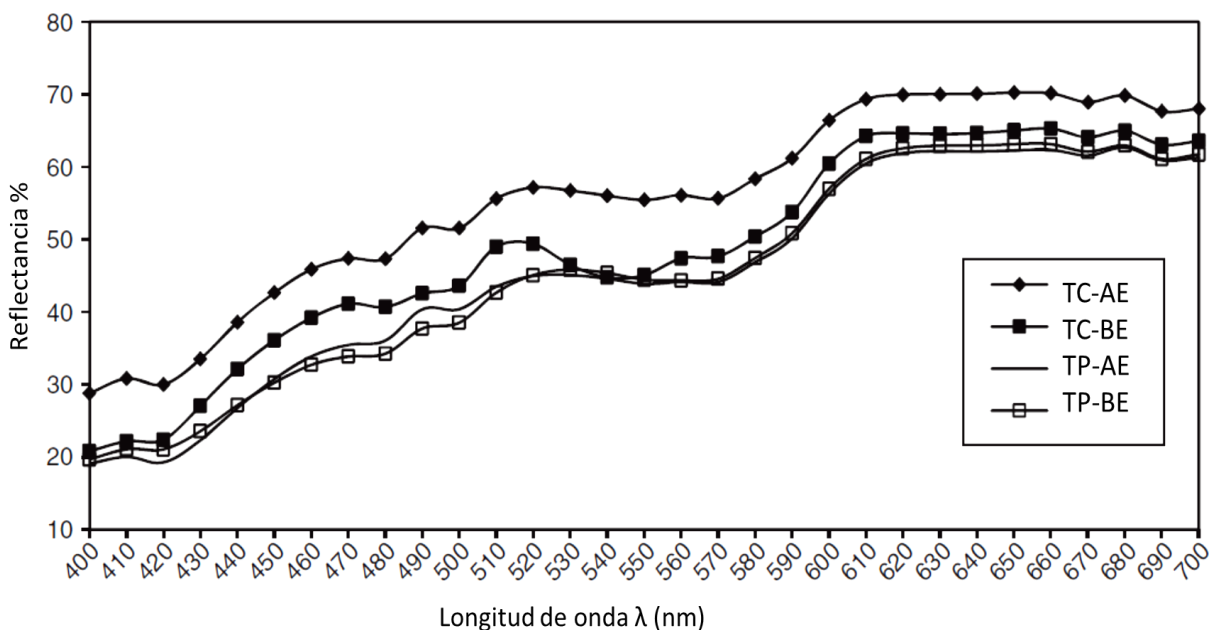
**Tabla 9.** Valores medios de los parámetros espectrofotométricos de tejido adiposo peri renal de animales criados y terminados en un sistema basado en grano (TC) o un sistema basado en pastura (TP) y sujetos a diferentes manejos pre-faena (estrés reducido-BE; estrés convencional-AE).

	TC		TP		SE
	BE	AE	BE	AE	
$L^*$	76,86±7,35A	80,55±2,94 A	74,00±3,76 B	73,91±4,22 B	2,40
$a^*$	5,81±2,54 a	2,45±1,27b	5,19±2,25 a	4,30±1,82 b	0,40
$b^*$	17,26±2,21 B	16,84±1,67 B	21,85±3,49 A	20,55±2,82 A	2,10
Hue	72,73±7,21 b	82,02±3,92 a	76,82±3,63 b	78,44±3,96 a	1,12
RT	50,69±9,45A	57,00±4,89 A	47,46±5,43 B	47,50±6,19 B	2,38

*a, b Letras minúsculas indican diferencias estadísticamente significativas en el efecto de manejo antes del sacrificio ( $p < 0,05$ ).*

*A, B Letras mayúsculas indican diferencias estadísticamente significativas entre los sistemas de alimentación ( $p < 0,05$ ).*

La intensidad de la reflectancia en la región del espectro se relacionó con luminosidad. Estos resultados concuerdan con datos estudiados por Dunne y col. (2009), quienes destacaron la asociación entre grasa amarilla con ganado de mayor edad y al contenido de carotenoides de carne de animales alimentados con pasto.



**Figura 7.** Espectro de reflectancia del tejido adiposo peri renal de animales criados y terminados en el sistema a base de grano (TC) o un sistema basado en pastos (TP) y sometidas a diferentes manejos previos al sacrificio.

Irie (2001) informó que el mínimo de reflectividad en el tejido adiposo podría haberse originado debido a la hemoglobina residual asociada con capilares o hemorragias. La reflectancia a 430 y 500 nm; 420, 540 y 580 nm, y 410, 500 y 630 nm derivan de desoxi-, oxi- y meta-hemoglobina, respectivamente. El autor citado afirma que concentraciones de hemoglobina afectaron el componente de color rojo del tejido adiposo. La Figura 7 muestra que el sistema de alimentación a pasto produjo una menor intensidad de la reflectancia que el sistema basado en grano. Así, fue posible observar diferencias en la forma de los espectros de longitudes de onda más asociados a los derivados de la hemoglobina. El parámetro  $a^*$  de la grasa peri renal mostró un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) asociado con el manejo pre-sacrificio, siendo los valores de  $a^*$  de los animales sometidos a manejo con estrés

reducido superiores a los registrados en la de los animales en condiciones de estrés convencional. Swatland (1995) ha propuesto que el parámetro  $a^*$  puede reflejar el grado de exsanguinación de vasos del tejido adiposo. Así, los valores más altos del parámetro  $a^*$  pueden interpretarse como más alto contenido de sangre en el tejido adiposo en los animales sometidos al manejo con estrés reducido. Una posible explicación incluye el efecto de las catecolaminas, que pueden inducir vasoconstricción periférica que conduce a cambios en el flujo sanguíneo.

Teniendo en cuenta que en el presente trabajo el manejo de los animales en condiciones de estrés convencional se asoció con cambios en los niveles de los componentes de la sangre sugiriendo mayor estrés antes del sacrificio, es posible que este aumento en el nivel de estrés previo a la faena podría conducir a una mayor exsanguinación de los vasos periféricos y a un menor parámetro  $a^*$ . Sin lugar a dudas, estudios futuros deberán profundizar el conocimiento acerca de la relación entre el parámetro  $a^*$  del tejido adiposo y los factores de estrés *peri mortem*.

## **5. ANEXO: Modelo experimental de estrés agudo en rumiantes**

### **Efecto de la inyección de adrenalina o de cortisol sobre aspectos bioquímicos y atributos indicadores de calidad de carne en corderos Merino.**

*Resultados publicados en Pighin y col., (2013) y Cunzolo y col., (en redacción).*

#### **I. Introducción**

Se sabe que la biología del estrés implica la activación del sistema nervioso autónomo y del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (HHS) (Moberg, 2000). Por una parte, la respuesta autónoma, mediada por catecolaminas -adrenalina y noradrenalina-, se inicia como reacción a estresores que requieren una acción rápida e incluyen diversos efectos metabólicos. Por otro lado, la activación del eje HHS, puesto de manifiesto mediante la liberación de glucocorticoides (p. ej., cortisol), tiende a amplificar los efectos metabólicos de las catecolaminas, siendo su respuesta típicamente más lenta (Moberg, 2000). En los últimos años, nuevas evidencias apoyan que los efectos de estas hormonas de estrés (catecolaminas y cortisol) incluyen modificaciones metabólicas y/o estructurales *post mortem* en el músculo (Ferguson y Warner, 2008). Estos eventos serían independientes de los niveles de glucógeno muscular y el consiguiente pH final (pH<sub>f</sub>, medido evaluado 24 h después del sacrificio) y podrían llegar a afectar los procesos proteolíticos *post mortem*, con posible impacto sobre la capacidad de retención de agua (CRA), terneza y sabor durante la maduración (Ferguson y col., 2001; Warner y col., 2007;



Ferguson y Warner, 2008). En este sentido, la pendiente de descenso de la curva pH y temperatura jugaría un papel preponderante durante las primeras 24 h *post mortem*, pudiendo impactar en varios eventos *post mortem* en el músculo (Dransfield 1992; Thornberg 1996).

El abordaje temático del estrés animal, junto a su perfil hormonal y bioquímico, representa numerosas dificultades. Al respecto, se sabe que la respuesta al estrés no sólo muestra una gran variabilidad, sino que además se encuentra condicionada por experiencias previas. Diferentes factores de estrés también inducen respuestas biológicas diversas (Moberg, 2000). Estos hechos, en su conjunto, hacen complejo el estudio del efecto del estrés agudo en el desarrollo de la calidad de carne, y sus mecanismos implicados.

Por lo antes expuesto, los modelos experimentales de animales inyectados con hormonas del estrés (adrenalina y/o cortisol) representan un enfoque interesante para estudiar el efecto del estrés en la bioquímica *peri mortem* de un modo más controlado. Resultados previamente publicados han sugerido efectos deletéreos de la adrenalina inyectada en animales. Bond y col. (2004) no encontraron ningún efecto en los valores de fuerza de corte del músculo *Semimembranosus* con una dosis única de adrenalina en corderos. Más recientemente, se encontró una reducción en los valores del índice de fragmentación miofibrilar (MFI) en los músculos *Longissimus Dorsi* y *Semimembranosus* de corderos inyectados con adrenalina a las 3 o 24 h previas al sacrificio (Ferguson y Warner, 2008). Con respecto a los glucocorticoides, Sugden y Fuller (1991) han revisado los datos publicados y han postulado que en caso de

que hubiera efectos sobre la degradación de la proteína muscular, estos efectos serían probablemente transitorios. Ferguson y Warner no encontraron cambios en la fuerza de cizalla durante una maduración de 5 días en un estudio en el que se administró una dosis de ACTH 6 h antes del sacrificio a ovejas (Ferguson y Warner, 2008). Pese a los estudios realizados hasta el momento, el efecto del cortisol sobre el metabolismo de las proteínas musculares y la calidad de la carne relacionada sigue siendo poco entendido. Por lo tanto, el objetivo del presente ensayo fue investigar de un modo controlado el efecto de la inyección de adrenalina o de cortisol *pre mortem* sobre la bioquímica del músculo en corderos, y sus consecuencias sobre principales aspectos indicadores de calidad de carne.

## II. Materiales y Métodos

El estudio se realizó en la Estación Experimental Agropecuaria INTA (EEA INTA) Bariloche (Provincia de Río Negro, Argentina).

### II.a. Animales y tratamientos experimentales

Se utilizaron corderos raza merino ( $n = 27$ ) de una edad media de 15 meses y un peso vivo medio de 36,8 kg. Los animales fueron criados bajo un sistema de producción extensivo de pastizales nativos en la Granja Experimental Pilcaniyeu de INTA ( $70^{\circ} 35'21''W$  y  $41^{\circ} 01'42''S$ , 970 m a.s.l.) en la Provincia de Río Negro, Argentina. Esta zona se caracteriza por una estepa arbórea dominada por *Mulinum spinosum*, *Senecio filaginoides*, *Poa ligularis* y *Stipa speciosa* (Bran y col., 2000).

El manejo de los animales y los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con los procedimientos de regulación para el bienestar animal del Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) de Argentina.

Los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes grupos: a) grupo control (C); b) grupo adrenalina (A); y c) grupo cortisol (Co). Los grupos C, A y Co se inyectaron con solución salina-NaCl al 0,9% (p / v), adrenalina (Sigma-Aldrich, EE.UU.) (0,2 mg de adrenalina kg<sup>-1</sup> de peso corporal) y solución de cortisol (Sigma-Aldrich) (2,86 mg de cortisol kg<sup>-1</sup> de peso corporal), respectivamente. La inyección de hormonas se realizó a través de la vena yugular. Las dosis inyectadas de adrenalina y cortisol se seleccionaron considerando los protocolos experimentales publicados y los niveles hormonales fisiológicos en ovejas (Watanabe y col., 1996, Bond y col., 2004).

Los animales de los grupos C y A fueron aturdidos eléctricamente y sacrificados 3-5 min después de la inyección. Los animales del grupo Co fueron aturdidos y sacrificados 10-12 min después de la inyección. El tiempo transcurrido entre la inyección y el procedimiento de sacrificio fue establecido de acuerdo con la vida media de las hormonas y el gasto cardíaco estimado para las ovejas. Durante el procedimiento de sacrificio se registró la temperatura rectal (Ti) en todos los animales, utilizando un termómetro digital con una resolución de 0,1 °C.

## II.b. Niveles de componentes sanguíneos

Las muestras de sangre se recogieron durante el desangrado en tubos con y sin solución anticoagulante (EDTA), y se colocaron inmediatamente en hielo. El suero y el plasma de cada muestra fue obtenido como se describió previamente.

En las muestras obtenidas se evaluó: nivel de hematocrito, concentración plasmática de glucosa y ácido láctico, actividad creatin-quinasa, y niveles séricos de adrenalina y cortisol, como se describió previamente.

## II.c. Parámetros de calidad de la carne

La temperatura *post mortem* de *Longissimus dorsi* (LD) se registró a dos tiempos: 45 min (T45) y 24 h (Tu), utilizando *data loggers* de temperatura (Maxim, CA, EE.UU.) situados a 2 cm del sitio de medición del pH. El pH del músculo también se evaluó a 45 min (pH<sub>45</sub>) y 24 h (pH<sub>r</sub>) *post mortem* con un medidor de pH Testo (modelo 230, Testo, Bs As, Argentina), equipado con un electrodo de pH de vidrio y una sonda de temperatura.

Los parámetros de color instrumental del músculo *LD* se midieron como ya se mencionó, expresados en el sistema CIELab (L\*, a\* y b\*).

En muestras de músculo LD de 24 h *post mortem* también se determinó la capacidad de retención de agua y el análisis del perfil de textura (TPA), conforme se mencionó previamente.

## **II.d. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se expresan como media  $\pm$  desvío estándar. Los datos recogidos se analizaron según el procedimiento PROC MIXED del paquete estadístico SAS v. 9.1 (SAS Inst. Inc. Cary, EEUU). Las diferencias entre los valores medios de cada tratamiento frente al control se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis ( $P = 0,05$ ).

## **III. Resultados y Discusión**

### **III.a. Niveles de parámetros sanguíneos**

Los parámetros sanguíneos determinados se muestran en la Tabla 1. Como puede observarse, los animales inyectados con adrenalina mostraron un incremento significativo (aproximadamente de 12 veces) de los niveles de adrenalina circulante en relación con los animales pertenecientes al grupo control. Asimismo, los animales inyectados con la solución de cortisol mostraron un aumento significativo (aproximadamente de 22 veces) de los niveles de cortisol circulante en relación con aquellos animales pertenecientes al grupo control. Estas diferencias encontradas en los niveles de hormonas inyectadas permitieron suponer en primera medida que el modelo de estrés agudo fue generado con éxito.

En términos generales, el nivel medio de cortisol registrado en los animales controles fue mayor que aquellos publicados previamente por Zimmerman (2012) (22.4 vs. 10.1  $\mu\text{g/dL}$ , respectivamente). Dado que estos animales fueron inyectados

con solución salina, podría suponerse que el mismo procedimiento de inyección fue la razón de dicho nivel medio de cortisol incrementado.

**Tabla 10.** Parámetros sanguíneos registrados en corderos inyectados con solución salina (C), adrenalina (A) o cortisol (Co)

	Control (C)	Adrenalina (A)	Cortisol (Co)
Hematocrito (%)	41,1 ± 3,57	43,4 ± 3,1	43,0 ± 3,46
Adrenalina (mg/L)	0,10 ± 0,08	1,20 ± 0,41 **	0,04 ± 0,03
Cortisol (µg/dL)	24,4 ± 2,6	44,8 ± 16,5 **	550,0 ± 142,3 **
Glucosa (mM)	0,59 ± 0,08	0,84 ± 0,19 **	0,59 ± 0,05
Lactato (mM)	4,80 ± 0,74	6,10 ± 0,72 *	6,90 ± 0,50 *
CK (U/L)	80,1 ± 24,6	116,1 ± 33,6 *	105,4 ± 58,8

\* Efecto significativo entre A y C o Co y C,  $p < 0,05$ ; \*\* efecto significativo entre A y C o Co y C,  $p < 0,001$

Como puede verse en la Tabla 10, la inyección de adrenalina condujo a un incremento en los niveles sanguíneos de glucosa ( $P < 0,05$ ) y lactato ( $P < 0,05$ ), como así también a una mayor actividad enzimática de creatin-quinasa (CK) ( $P < 0,05$ ). Estos hallazgos coinciden con resultados publicados previamente, demostrando que las catecolaminas modifican el metabolismo energético (Kuche 1991; Moberg, 2000). En este estudio, el incremento de la actividad sanguínea de la enzima CK indicaría un aumento de la actividad de los músculos en el estado *peri mortem* y, posiblemente, un aumento del daño muscular como resultado de dicha actividad. En este sentido, los datos disponibles hasta el momento son dispares. Por un lado, los resultados publicados por Warner y col. (2000) y Kannan y col. (2003) mostraron un incremento significativo de la actividad CK como resultado del estrés físico. Por otro lado, Zimerman y col. (2011) no encontraron cambios significativos en la actividad de dicha enzima en corderos sometidos a

ayuno, ejercicio o miedo como estresores previos al sacrificio. Es posible que la disparidad observada en estos resultados puede estar asociada a la intensidad y duración del estrés inducido, como así también a los niveles de hormonas de estrés relacionadas.

La inyección de cortisol generó un incremento significativo en el nivel de lactato en sangre ( $P < 0,05$ ) y no significativo en el hematocrito y la actividad CK. En conjunto, estos resultados sugieren cambios en el metabolismo energético y alteraciones en la actividad muscular. Cabe señalar que el efecto del cortisol sobre los parámetros bioquímicos analizados parece ser menos desarrollado en comparación con el efecto generado por la inyección de adrenalina.

## II.b. Atributos de la calidad de la carne

El color instrumental de los músculos *LD* y *PM* y la capacidad de retención de agua (CRA) del músculo *LD* se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Color instrumental de los músculos *LD* y *PM* y CRA del músculo *LD* de corderos inyectados con solución salina (C), adrenalina (A) o cortisol (Co)

	Control (C)	Adrenalina (A)	Cortisol (Co)
L* <i>LD</i>	38,00 ± 1,97	38,40 ± 1,30	37,40 ± 1,60
a* <i>LD</i>	20,10 ± 1,20	20,80 ± 0,60	19,90 ± 0,93
b* <i>LD</i>	6,74 ± 0,47	7,20 ± 0,62	7,10 ± 0,93
CRA <i>LD</i>	30,4 ± 5,8	29,9 ± 3,9	30,1 ± 3,5
L* <i>PM</i>	41,80 ± 2,13	43,10 ± 1,70	42,50 ± 1,80
a* <i>PM</i>	23,75 ± 1,30	24,10 ± 1,40	24,30 ± 1,30
b* <i>PM</i>	9,00 ± 0,59	9,40 ± 0,80	9,50 ± 0,75

\* Efecto significativo entre A y C o Co y C,  $p = 0,05$ ; \*\* efecto significativo entre A y C o Co y C,  $p < 0,001$

Como puede observarse, la inyección de adrenalina o de cortisol no generaron cambios significativos en estos parámetros indicadores de calidad. Estos resultados pueden estar posiblemente asociados al hecho de que no se observaron diferencias significativas en los valores de pH a 24 h (Tabla 12). Sin embargo, dada la creciente evidencia de mecanismos independientes del pH que pueden operar en el vínculo entre estrés y calidad de carne, (Ferguson y col., 2001; Warner y col., 2007; Ferguson y Warner, 2008), no se podrían descartar otros efectos de las hormonas inyectadas sobre aspectos de calidad en carne madurada.

La Tabla 12 muestra los valores registrados de temperatura rectal ( $T_i$ ) y de temperatura y pH del músculo *LD*.

**Tabla 12.** Disminución de la temperatura y el pH en el músculo *LD* de corderos inyectados con solución salina (C), adrenalina (A) o cortisol (Co)

	Control (C)	Adrenalina (A)	Cortisol (Co)
$T_i$	39,4 ± 0,2	40,0 ± 0,2 **	39,8 ± 0,1 *
$T_{45}$	35,0 ± 0,3	35,9 ± 1,0 *	36,2 ± 0,5 **
$T_u$	13,3 ± 1,4	13,2 ± 1,6	13,3 ± 1,4
pH <sub>45</sub>	6,50 ± 0,10	6,20 ± 0,10 **	6,40 ± 0,20
pH <sub>f</sub>	5,40 ± 0,03	5,40 ± 0,03	5,45 ± 0,47

\* Efecto significativo entre A y C o Co y C,  $p = 0,05$ ; \*\* efecto significativo entre A y C o Co y C,  $p < 0,001$

La inyección de hormonas incrementó significativamente los valores de temperatura registrados, tanto a  $T_i$  como a  $T_{45}$  (registrada 45 min *post mortem*). Estos resultados concuerdan con trabajos previos que mostraban un incremento de la temperatura corporal como consecuencia de eventos estresantes (Pighin y col.,



2010). Curiosamente, la inyección de adrenalina condujo a una significativa disminución de  $pH_i$  en el músculo *LD* ( $P < 0,001$ ) (medida 45 min *post mortem*), hecho que sugiere una mayor tasa de glucólisis anaeróbica en el músculo inmediatamente *post mortem*.

La bibliografía demuestra que la curva de descenso de  $pH/T$  suele desempeñar un papel importante en la conversión del músculo en carne (Ferguson y col., 2001; Devine y col., 2002). Al respecto, se ha propuesto que la cinética *post mortem* del  $pH$  y la temperatura pueden influir en la tasa y grado de desnaturalización de proteínas, oxidación y proteólisis, oxidación de lípidos, características de color, aspectos sensoriales de la carne y capacidad de retención de agua (Lawrie, 1992; Ferguson y col., 2001). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que la inyección de hormonas condujo a cambios en  $T$  y  $pH$ , hecho que reforzaría la importancia del estrés agudo en el adecuado desarrollo de la calidad de la carne.

Los datos del análisis de perfil de textura (TPA) compilados en la Tabla 4 muestran que los tratamientos hormonales tendieron a incrementar los valores de dureza y adhesividad medidos en el músculo *LD* 3 días *post mortem*. Esta tendencia fue especialmente evidente en el tratamiento con cortisol, donde la elevada dispersión de los datos podría ser responsable de la ausencia de diferencias estadísticamente significativas. En este sentido, Caine y col. (2003) demostraron que la dureza y la adhesividad en el TPA puede ser útil para explicar una proporción significativa de la variabilidad de la terneza en el bife, donde estos parámetros mostraron una relación inversa con la terneza general.

Se ha propuesto que la terneza de la carne varía, no sólo con la tasa de glucólisis y el rigor *post mortem*, sino también con el grado de glucólisis, identificado clásicamente a través del pH final (pH<sub>f</sub>) alcanzado en un músculo (Ferguson y col., 2001). Dado que en el presente estudio no pudo observarse ninguna diferencia significativa en los valores de pH<sub>f</sub>, podría ser posible asociar los cambios observados en la dureza y la adhesividad a las diferencias observadas en la curva de descenso de pH/T.

Por otro lado, los valores de elasticidad y resiliencia del músculo *LD* (Tabla 13) mostraron valores similares para todos los tratamientos. Al respecto, se ha demostrado que estos parámetros pueden ser incluidos en los modelos de predicción de la jugosidad, la conveniencia de sabor y la intensidad del sabor a través de análisis de regresión paso a paso (Caine y col., 2003). Dureza, consistencia y elasticidad generalmente son parámetros muy útiles para la evaluación de textura de la carne (Ruiz de Huidobro y col., 2005).

**Tabla 13.** Estadística descriptiva de los parámetros de análisis de perfil de textura del músculo *LD* (3 días post mortem) de corderos inyectados con solución salina (C), adrenalina (A) o cortisol (Co)

Parámetros de análisis del perfil de textura	Control (C)	Adrenalina (A)	Cortisol (Co)
Dureza (N)	78,5 ± 5,2	80,3±7,4	84,6±8,9
Cohesividad	0,47 ± 0,02	0,47±0,02	0,49±0,02
Elasticidad	0,43 ± 0,02	0,44±0,02	0,45±0,02
Resiliencia	0,15 ± 0,01	0,15±0,01	0,16±0,02
Adhesividad (g s)	-22,08 ± 3,96	-25,73±3,50	-27,88 ± 3,84
Masticabilidad	16,14 ± 1,34	16,48 ± 2,10	18,11 ± 1,74

En términos generales, estos resultados sugieren que un incremento agudo de hormonas de estrés como la adrenalina y/o el cortisol puede afectar la textura de la carne, de modo independiente del pH final del músculo. De este modo, constituyen una herramienta importante para poder interpretar resultados obtenidos en esquemas experimentales/comerciales más complejos, como los de la presente tesis.

#### **IV. Conclusión del ensayo**

La dosis única *pre mortem* de adrenalina o cortisol utilizada en el presente estudio generó cambios en el metabolismo animal, emulando una respuesta fisiológica frente al estrés agudo. La adrenalina indujo un incremento en el metabolismo de la glucosa y afectó el pH inicial y la temperatura inicial del músculo *LD*, sugiriendo una mayor velocidad glucolítica. El cortisol también afectó las temperaturas del músculo pre-rigor -*T<sub>i</sub>* y *T<sub>45</sub>*-, pero no afectó el pH inicial del músculo. Aunque no se observó ningún efecto de las hormonas inyectadas en el color instrumental o la *CRA*, las hormonas del estrés tendieron a afectar el perfil de textura -dureza y adhesividad- del músculo *LD*.

## 6. Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran claramente que las estrategias de alimentación en etapa de engorde y de manejo previo al sacrificio -estrés agudo- en las instalaciones del frigorífico se asocian con diversos cambios en el perfil bioquímico, tanto *in vivo* como *post mortem*.

Los sistemas contrastantes de terminación impactaron sobre el perfil de composición lipídica de la carne obtenida. Dichos cambios en el perfil de composición de AG n-3 y n-6 pudieron ser incluso visualizados en la sangre obtenida previo a la faena. Futuros trabajos deberían profundizar el análisis de este paralelismo entre sangre y tejido muscular, con perspectivas que apunten a monitorear en tiempo real el efecto de las dietas, pudiendo generar correcciones a tiempo, con el objetivo final de mejorar la calidad de la carne, optimizando tiempos y recursos destinados.

La estrategia de alimentación se asoció también con los niveles de hematocrito y de insulinemia medidos al momento del sacrificio. Además, el espectro de reflexión -gama visible- del tejido adiposo peri-renal, la tasa de descenso de la curva de pH/T durante las primeras 24 h *post mortem* y el contenido de dipéptidos funcionales – anserina- en la carne también se relacionaron con la estrategia de alimentación de los animales.

Por su parte, el manejo pre faena afectó el metabolismo *in vivo* de carbohidratos y proteínas, visualizados en las muestras de sangre, a la vez que se relacionó con cambios del color del tejido adiposo, el contenido de dipéptidos

funcionales -anserina y carnosina- y el grado de proteólisis muscular *post mortem*, demostrando esto último que dicho estrés afectaría la calidad de la maduración del músculo LD.

En su conjunto, los resultados obtenidos en el ensayo anexo permitieron demostrar un papel preponderante de las hormonas adrenalina y cortisol en estos cambios mencionados en el presente trabajo de tesis, pudiéndose vincular los incrementos agudos de estas hormonas no sólo con modificaciones del perfil bioquímico *peri mortem*, sino también con alteraciones de la calidad de la carne obtenida, mediante mecanismos independientes del pH muscular.

Los parámetros bioquímicos *in vivo* evaluados, tanto en el trabajo central de tesis como en el ensayo anexo, permitieron detectar diferentes niveles de estrés *peri mortem*. Consecuentemente, podrían ser considerados en su conjunto como candidatos a indicadores tempranos de cambios metabólicos musculares que podrían afectar el desarrollo de la calidad de la carne.

Interesantemente, la dureza del músculo LD se vio afectada por un efecto de interacción de la estrategia de alimentación y el manejo previo al sacrificio, hecho que refuerza la participación de mecanismos independientes del pH. Según el presente estudio, en bovinos, la reducción del estrés previo al sacrificio en las instalaciones del frigorífico no sería suficiente como para asegurar una disminución adecuada de la curva pH/T muscular y la calidad de carne, dado que la estrategia de alimentación animal también parece jugar un papel clave.

Finalmente, los resultados obtenidos en ambos ensayos, tanto a nivel comercial como a nivel experimental, coinciden en demostrar la participación e importancia de mecanismos independientes de los niveles finales de pH en el desarrollo de la calidad final de la carne, tanto fresca como madurada. Este panorama requerirá, sin lugar a dudas, nuevos estudios en un horizonte futuro, los cuales permitan profundizar interacciones asociadas entre las diversas estrategias de alimentación y de manejo en producción bovina en los diferentes planos, nacional e internacional.

## 6. Bibliografía

- Almada, C.A., Bonato, P., Carduza, F., Cossu, M.E., Grigioni, G.M., Irurueta, M., Perlo, F., Picallo, A.B., Teira, G. (2011). Manejo de muestras en el Laboratorio. In 'Manual de procedimiento. Determinación de los parámetros de Calidad física y sensorial de carne bovina'. pp. 29–30. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina.
- AMSA (American Meat Science Association) (1995). Research guidelines for cookery, sensory evaluation, and instrumental tenderness measurement of fresh meat. American Meat Science Association, Chicago, IL.
- AMSA (American Meat Science Association) (2012). Guidelines for meat colour evaluation. American Meat Standard Association, Champaign, IL.
- Amtmann, V.A., Gallo, C., Van Schaik, G., Tadich, N. (2006). Relaciones entre el manejo ante mortem, variables sanguíneas indicadoras de estrés y pH de la canal en novillos. Archivos de Medicina Veterinaria. 38, 1–10.
- AOAC. (1990). Official methods of analysis of the Association of Oficial Analytical Chemists. 15th ed. Vol. II. p. 1298. Association of Oficial Analytical Chemists (AOAC), Arlington, Virginia, USA.
- Aristoy, M. C. y Toldrá, F. (1998). Concentration of free amino acids and dipeptides in porcine skeletal muscles with different oxidative patterns. Meat Science 50(3): 327-332.
- Baker, S.D., Szasz, J.I., Klein, T.A., Kuber, P.S., Hunt, C.W., Glaze, J.B. Jr., Falk, D., Richard, R., Miller, J.C., Battaglia, R.A. y Hill, R.A. (2006). Residual feed intake of purebred Angus steers: Effects on meat quality and palatability. Journal of Animal Science. 84: 938-945.

- Bond, J.J., Can, L.A. y Warner, R.D. (2004). The effect of exercise stress, adrenaline injection and electrical stimulation on changes in quality attributes and proteins in Semimembranosus muscle of lamb. *Meat Science*, 68: 469–477.
- Boobis, L.H., Tallon, M.J., Harris, R.C., Fallowfield, J. y Wise, J.A. (2005). The carnosine content of vastus lateralis is elevated in resistance-trained bodybuilders. *Journal of Strength and Conditioning Research* 19(4): 725–729.
- Box, G.E.P y R.D. Cox. (1964). An analysis of transformations. *Journal of the Royal Statistical Society. B.* (26): 211-252.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697 (76)90527-3.
- Caine, W.R., Aalhus, J.L., Best, D.R., Dugan, M.E.R., Jeremiah, L.E. (2003). Relationship of texture profile analysis and Warner-Bratzler shear force with sensory characteristics of beef rib steaks. *Meat Science* 64, 333–339.
- Castellano, P., González, C., Carduza, F., Vignolo, G. (2010). Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. *Meat Science*, 85: 394-401.
- Cayuela, L., García-Fayos, P., Puerta-Piñero, C., Rodríguez-Gironés, M.A. (2014). Área de Biodiversidad y Conservación, Universidad Rey Juan Carlos, Móstoles (Madrid), España. *Ecosistemas* 23(1):65.
- Chamorro, V.C., Pazos, A.A., Godoy, M.F., Pighín, D.G., Cunzolo, S.A., Sancho, A. M., and Grigioni, G.M. (2014). Histidine dipeptides and free amino acids of beef from cattle raised under contrasting feeding systems and pre-slaughter management. (60th International Congress of Meat Science and Technology, 17-22 agosto 2014, Punta del Este, Uruguay)
- CICCRA (2018). Cámara de la Industria y el Comercio de Carnes y Derivados de la República Argentina.



- Cooper, C.A., Evans, C.O., Cook, S., Rawlings, N.C. (1995). Cortisol, progesterone and b-endorphin response to stress in calves. *Canadian Journal of Animal Science* 75, 197–201.
- Cunzolo, S.A., Davies, P. y Pighin, D.G. (2015). Perfil de ácidos grasos en sueros de novillos británicos provenientes de sistemas contrastantes de producción. 38° Congreso Argentino de Producción Animal – AAPA. Santa Rosa, La Pampa, Argentina.
- Cunzolo, S.A.; Sancho, A.; Davies, P.; Pighin, D.G. (2018) Efecto de sistemas de terminación contrastantes sobre el perfil lipídico de la carne bovina (A. Angus). 41° Congreso Argentino de Producción Animal – AAPA. Mar del Plata, Bs As, Argentina.
- Dransfield, E. (1992). Modelling post mortem tenderization-III: role of calpain I in conditioning. *Meat Science* 31, 85–94.
- Duckett, S.K., Neel, J.P.S., Fontenot, J.P. Clapham, W.M. (2009). Effects of winter stocker growth rate and finishing system on: III. Tissue proximate, fatty acid, vitamin, and cholesterol content. *Journal of Animal Science* 87: 2961-2970.
- Dunne, P.G., Keane, M.G., O'Mara, F.P., Monahan, F.J., y Moloney, A.P. (2004). Colour of subcutaneous adipose tissue and M. longissimus dorsi of high index dairy and beef x dairy cattle slaughtered at two liveweights as bulls and steers. *Meat Science* 68, 97–106.
- Dunne, P.G., Monahan, F.J., O'Mara, F.P., y Moloney, A.P. (2009). Colour of bovine subcutaneous adipose tissue: a review of contributory factors, associations with carcass and meat quality and its potential utility in authentication of dietary history. *Meat Science* 81, 28–45.
- Earley, B, O'Riordan E.G. (2006) Effects on transporting bulls at different space allowances on physiological, haematological and immunological responses to

- a 12-h journey by road. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 45, 39–50.
- Ferguson, D.M., Warner, R.D. (2008) Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? *Meat Science* 80, 12–19.
- Flier, J.S., Kahn, C.R. and Roth, J. (1979) Receptors, antireceptor antibodies and mechanisms of insulin resistance. *New England Journal of Medicine* 300; 8:413-419.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497
- Forst, T., Caduff, A., Talary, M., Weder, M., Brandle, M., Kann, P., Flacke, F., Friedrich, C., Pfutzner, A. (2006). Impact of environmental temperature on skin thickness and microvascular blood flow in subjects with and without diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics* 8, 94–101.
- Garcia, P.T., Pensel, N.A., Sancho, A.M., Latimori, N.J., Kloster, A.M., Amigone, M.A., Casal, J.J. (2008). Beef lipids in relation to animal breed and nutrition in Argentina. *Meat Science* 79, 500–508.
- Gaughan, J.B., Mader, T.L. (2009). Effects of sodium chloride and fat supplementation on finishing steers exposed to hot and cold conditions. *Journal of Animal Science* 87, 612–621.
- Grandin, T. (1993). *Livestock handling and transport*. Cambridge, UK: University Press.
- Gruber, S.L., Tatum, J.D., Engle, T.E., Chapman, P.L., Belk, K.E., Smith, G.C. (2010). Relationship of behavioral and physiological symptoms of preslaughter stress to beef LM tenderness. *Journal of Animal Science* 88, 1148–1159.

- Guzek, D., Głabska, D., Pogorzelski, G., Kozań, K., Pietras, J., Konarska, M., ... Wierzbicka, A. (2013). Variation of meat quality parameters due to conformation and fat class in Limousin bulls slaughtered at 25 to 27 months of age. *Asian Australasian Journal of Animal Science*, 26(5): 716–722.
- Hannula, T., Puolanne, E. (2004). The effect of cooling rate on beef tenderness: the significance of pH at 7 °C. *Meat Science* 67, 403–408.
- Henry, R.J., Cannon, D.C., Winkelman, J. (1974). *Clinical Chemistry, Principles and Techniques*, 2<sup>nd</sup>. Ed., Harper and Row Publishers Inc. NY. p. 1288.
- Hersom, M.J., Wettemann, R.P., Krehbiel, C.R., Horn, G.W., Keisler, D.H. (2004). Effect of live weight gain of steers during winter grazing: III. Blood metabolites and hormones during feedlot finishing. *Journal of Animal Science* 82, 2059–2068.
- Hughes, D.T y V. Sperandio. (2008). Inter-kingdom signaling: Communication between bacteria and their hosts. *Nature Reviews Microbiology* 6: 111-120.
- Immonen, K., Ruusunen, M., Hissa, K., Puolanne, E. (2000). Bovine muscle glycogen concentration in relation to finishing diet, slaughter and ultimate pH. *Meat Science*, 55, 25-31
- Insani, E. M., Eyherabide, A., Grigioni, G., Sancho, A. M., Pensel, N. A., Descalzo, A. M. (2008). Psoas major (PM) muscle oxidative stability and its relationship with natural antioxidants during refrigerated retail display of beef produced in Argentina. *Meat Science* 79, 444–452.
- IPCVA (2018). Instituto de Promoción de la Carne Vacuna Argentina. [www.ipcva.com.ar](http://www.ipcva.com.ar).
- Irie, M. (2001). Optical evaluation of factors affecting appearance of bovine fat. *Meat Science* 57, 19–22.

- Jaime Arnau, Rebecca Bendayan, María J. Blanca y Roser Bono. Efecto de la violación de la normalidad y esfericidad en el modelo lineal mixto en diseños split-plot. *Psicothema* 2012. Vol. 24, nº 3, pp. 449-454.
- Judge, M.D. (1986). Using post mortem technology to complement livestock production practices. *Journal of Animal Science* 62, 1449–1457.
- Kee, J. Le Fever. *Handbook of Laboratory and Diagnostic Tests*. 4th ed. (2001). Upper Saddle River, NJ.
- King, D.A., Schuehle Pfeiffer, C.E., Randel, R.D., Welsh, T.H., Oliphint, R.A., Baird, B.E., Curley Jr., K.O., Vann, R.C., Hale, D.S. and Savell, J.W. (2006). Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. *Meat Science* 74: 546-556.
- Koohmaraie, M. and Geesink, G.H. (2006). Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science* 74: 34-43.
- Kuchel, O. (1991). Stress and catecholamines. In G. Jasmin & M. Cantin (Eds.), *Stress revisited 1. Neuroendocrinology of stress* (pp. 80–103). Basel, Switz: Karger.
- Lavery, G.G., Hauton, D., Hewitt, K.N., Brice, S.M., Sherlock, M., Walker, E.A., and Stewart, P.M. (2007). Hypoglycemia with Enhanced Hepatic Glycogen Synthesis in Recombinant Mice Lacking Hexose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Endocrinology* 148(12):6100 – 6106.
- Lawrence, T.E., Whatley, J.D., Montgomery, T.H., Perino, L.J. and Dikeman, M.E. (2001). Influence of dental carcass maturity classification on carcass traits and tenderness of longissimus steaks from commercially fed cattle. *Journal of Animal Science* 79: 2092-2096.
- Lawrie, R.A. (1985). *Meat Science*. Pergamon Press. Headington, Oxford.

- Lensink, B.J., Fernandez, X., Gozzi, G., Florand, L. and Veissier, I. (2001). The influence of farmer behaviour on calves reactions to transport and quality of veal meat. *Journal of Animal Science*, 79: 642–652.
- Liu, Q. (2011). Concentrations of creatine, creatinine, carnosine, and anserine in bovine longissimus muscle and their correlations with carcass and palatability traits. *Graduate Theses and Dissertations*. Paper 10080.
- López-Olvera, J.R., Marco, I., Montane, J., Lavín, S. (2006). Transport stress in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) and its modulation by acepromazine. *Veterinary Journal (London, England)* 172, 347–355.
- Lorenz, I. (2000). Retrospective study of serum glucose concentration in cattle with mucosal disease. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 47, 489–493.
- Mancini, R.A. (2009). Meat color. In 'Applied muscle biology and meat science'. (Eds M Du, RJ McCornick) pp. 217–225. (CRC Press: London).
- Mandell, I.B., Maclaurin, T., Battenham, S. (2001). Effects of carcass weight class and postmortem aging on carcass characteristics and sensory attributes in grain-fed veal. *Journal of Food Science* 66(5): 762-769.
- Manteca, X. (1998) Neurophysiology and assessment of welfare. *Meat Science* 49, S205–S218.
- Matteri, R.L., Carroll, J.A., Dyer, C.J. (2000). Neuroendocrine responses to stress. In 'The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare'. (Eds GP Moberg, JA Bench) pp. 43–76. (CABI Publishing: Guildford, UK).
- Mayes, P.A. and Bender, D.A. (2003). Glycolysis and the oxidation of pyruvate. In 'Harper's illustrated biochemistry'. (Eds RK Murray, DK Granner, PA Mayes, VW Rodwell) pp. 136–144. (Lange Medical Publications: New York, NY).

McCann, J.P., Ullmann, M.B., Temple, M.R., Reimers, T.J., Bergman, E.N. (1986). Insulin and glucose responses to glucose injection in fed and fasted obese and lean sheep. *The Journal of Nutrition* 116, 1287–1297.

Meat Technology Update, 2010 (April, 2010). [www.meauupdate.csiro.au](http://www.meauupdate.csiro.au).

Moberg, G.P. (2000). Biological response to stress implications to animal welfare. In G. P. Moberg & J. A. Mench (Eds.). *The biology of animal stress – Basic principles and implications for animal welfare* (pp. 1–22). Oxon, UK: CABI Publishing.

Monsón, F., Sañudo, C., Sierra, I. (2005). Influence of breed and ageing time on the sensory meat quality and consumer acceptability in intensively reared beef. *Meat Science*, 71: 471–479.

Noll, F. (1985). L+ lactate determination. In 'Methods of enzymatic analysis. (Ed. HU Bergmeyer) pp. 583–588. (VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim, Germany)

Offer, G. (1991). Modelling of the formation of pale, soft and exudative meat: effect of chilling regime and rate and extent of glycolysis. *Meat Science* 30, 157–184.

Ohtsuka, Y., Yabunaka, N., Watanabe, I., Noro, H., Fujisawa, H., Agishi, Y. (1995). Thermal stress and diabetic complications. *International Journal of Biometeorology* 38, 57–59.

Parker, A.J., Hamlin, G.P., Coleman, C.J., Fitzpatrick, L.A. (2003). Dehydration in stressed ruminants may be the results of cortisol-induced diuresis. *Journal of Animal Science* 81, 512–519.

Parkhouse, W.S., McKenzie, D.C., Hochachka, P.W. and Ovalle, W.K. (1985). Buffering capacity of deproteinized human vastus lateralis muscle. *Journal of Applied Physiology* 58: 14-17.

- Paschetta, F., Pazos, A. y Grigioni, G. (2012). Terneza, un atributo de importancia para el consumidor. En: Herramientas Tecnológicas Aplicadas a Calidad y Diferenciación de Carne. Grigioni, G. y Pascheta F. (Eds.). PROCISUR. Montevideo: IICA, Uruguay.
- Pavan, E. 2006. Enhancing beef conjugated linoleic acid content through oil supplementation to grazing steers. Dissertation, University of Georgia, Athens, GA, USA.
- Peiretti, P.G., Medana, C., Visentin, S., Dal Bello, F. and Meineri G. (2012). Effect of cooking method on carnosine and its homologues, pentosidine and thiobarbituric acid-reactive substance contents in beef and turkey meat. *Food Chemistry* 132(1): 80-85.
- Peñafiel, R., Ruzafa, C., Monserrat, F. and Cremades, A. (2004). Gender-related differences in carnosine, anserine and lysine content of murine skeletal muscle. *Amino Acids* 26: 53–58.
- Perry, D., and Thompson, J.M. (2005). The effect of growth rate during backgrounding and finishing on meat quality traits in beef cattle. *Meat Science* 69: 691-702.
- Pighín, D; Sancho, A. and Gonzalez, C. (2008) "Effect of salt addition on the thermal behavior of proteins of bovine meat from Argentina". *Meat Science*; 78: 549 - 556.
- Pighin, D.G, Warner, R.D., Brown, W., Ferguson, D.M. and Fisher, A.D. (2010). Predicting post-slaughter muscle glycogen content and dark-cutting through changes in pre-slaughter body temperature of lambs. In *Proceeding 56th International Congress of Meat Science and Technology* (pp. 100), 15-20 agosto 2010, Jeju, South Korea.
- Pighin, D.G., Warner, R., Jacob, R., Beatty, D., Naththarampatha, A., Ferguson, D. (2011). The impact of long term grain feeding on glycolytic metabolism of

- cattle. En 'Fifty-seventh international congress of meat science and technology'. p. 157. ICoMST 2011 Secretariat. Ghent, Belgium.
- Pighin, D.G., Cunzolo, S.A., Zimmerman, M., Pazos, A.A., Domingo, E., Pordomingo, A.J. and Grigioni, G. (2013). Impact of Adrenaline or Cortisol Injection on Meat Quality Development of Merino Hoggets. *Journal of Integrative Agriculture*. 12(11): 1931-1936
- Pla Torres, M. (2005). Capacidad de retención de agua. In: Cañeque, V., Sañudo, C. (Eds.), *Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa) en los rumiantes*. Monografías INIA, Madrid, España, Serie Ganadera No. 3, pp. 243–250.
- Pordomingo, A.J., Grigioni, G., Carduza, F., Volpi Lagreca, G. (2012). Effect of feeding treatment during the backgrounding phase of beef production from pasture on: I. Animal performance, carcass and meat quality. *Meat Science* 90, 939–946.
- Purchas, R. W., Rutherford, S.M., Pearce, P.D., Vather, R. and Wilkinson, B.H.P. (2004). Concentrations in beef and lamb of taurine, carnosine, coenzyme Q10, and creatine. *Meat Science* 66: 629-637.
- Purchas, R.W., Burnham, D.L. and Morris, S.T. (2002). Effects of growth potential and growth path on tenderness of beef longissimus muscle from bulls and steers. *Journal of Animal Science* 80: 3211-3221.
- Purchas, R.W., Yan, X. and Hartley, D.G. (1999). The influence of a period of ageing on the relationship between ultimate pH and shear values of beef m. longissimus thoracis. *Meat Science* 51: 135-141.
- Ramanathan, R., Mancini, R.A., Naveena, B.M., Konda, M.K.R. (2010). Effects of lactate-enhancement on surface reflectance and absorbance properties of beef longissimus steaks. *Meat Science* 84, 219–226.



- Romero Peñuela, M.H., Uribe-Velásquez, L.F., Sánchez Valencia, J.A. (2011). Stress biomarkers as indicators of animal welfare in cattle beef farming. *Biosalud* vol.10 no.1 (Manizales, Colombia)
- Sancho, R., Jaime, I., Beltrán, J.A., Roncales, P. (1997). Degradation of actin by cathepsins in beef fibres stored at 20 °C. *Journal of Muscle Foods*, 8:137-146.
- Sañudo, C., Macie, E.S., Olleta, J.L., Villarroel, M., Panea, B., Alberti, P. (2004). The effects of slaughter weight, breed type and ageing time on beef meat quality using two different texture devices. *Meat Science* 66, 925–932.
- Schor, A., Cossu, M.A., Picallo, A., Martínez Ferrer, J., Grigera Naón, J.J., Colombatto, D. (2008). Nutritional and eating quality of Argentinean beef: A review. *Meat Science* 79: 408-422.
- SENASA (2013) Manual de Bienestar Animal: un enfoque práctico para el buen manejo de especies domésticas durante su tenencia, producción, concentración, transporte y faena. <http://www.senasa.gob.ar/informacion/bienestar-animal/manuales-bienestar-animal>. Verificado 22 octubre 2014.
- Shaw, F.D., Tume, R.K. (1992). The assessment of pre-slaughter and slaughter treatments livestock by measurement of plasma constituents. A review of recent work. *Meat Science* 32, 311–329.
- Sri Kantha, S., Takeuchi, M., Watabe, S. and Ochi, H. (2000). HPLC determination of carnosine in commercial canned soups and natural meat extracts. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 33: 60-62.
- Suzuki, Y., Ito, O., Mukai, N., Takahashi, H. and Takamatsu, K. (2002). High levels of skeletal muscle carnosine contributes to the latter half of exercise performance during 30-s maximal cycle ergometer sprinting. *Japanese Journal of Physiology* 52:199-205.

- Swatland, H.J., (1995). 'On-line evaluation of meat.' (Technomic Publishing Company: Lancaster, PA).
- Tadich, N., Gallo, C., Bustamante, H., Schwerter, M., Van Schaik, G. (2005). Effects of transport and lairage time on some blood constituents of Friesian-cross steers in Chile. *Livestock Production Science* 93, 223–233.
- Tadich, N., Gallo, C., Echeverria, R., Van Schaik, G. (2003). Efecto del ayuno durante dos tiempos de confinamiento y de transporte terrestre sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés en novillos. *Archivos de Medicina Veterinaria* 2, 171–185.
- Tarrant, P.V. (1990). Transportation of cattle by road. *Applied Animal Behaviour Science* 28, 153–170.
- Tarrant, P.V., Kenny, F.J., Harrington, D., Murphy, M. (1992). Long distance transportation of steers to slaughter: effect of stocking density on physiology, behavior, and carcass quality. *Livestock Production Science* 30, 223–238.
- Teira, G., Perlo, F., Bonato, P., Tisocco, O. (2006). Calidad de carnes bovinas. Aspectos nutritivos y organolépticos relacionados con sistemas de alimentación y prácticas de elaboración. *Ciencia, Docencia y Tecnología* N° 33, Año XVI, 173-193.
- Tornberg, E. (1996). Biophysical aspects of meat tenderness. *Meat Science* 43, S175–S191.
- Van Elswyk, M.E. y McNeill, S.H. (2014). Impact of grass/forage feeding versus grain finishing on beef nutrients and sensory quality: The U.S. experience. *Meat Science* 96: 535–540.
- Venkata Reddy, B., Sivakumar, A.S., Jeong, D.W., Woo, Y., Park, S., Lee, S., Byun, Y., Kim, C., Cho, S. y Hwang, I. (2015). Beef quality traits of heifer in comparison with steer, bull and cow at various feeding environments. *Animal Science Journal* 86: 1-16.

- Warner, R.D., Bond, J.J. and Kerr, M.G. (2000). Meat quality traits in lamb *M. Longissimus thoracis et lumborum*: The effect of pre-slaughter stress and electrical stimulation. In *Proceeding 46th International Congress of Meat Science and Technology* (pp. 154–155), 27 agosto - 1 septiembre 2000, Buenos Aires, Argentina.
- Warner, R.D., Ferguson, D.M., McDonagh, M.B., Channon, H.A., Cottrell, J.J., Dunshea, F.R. (2005a). Acute exercise stress and electrical stimulation influence the consumer perception of sheep meat eating quality and objective quality traits. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 45, 553–560.
- Warner, R.D., Dunshea, F.R., Ponnampalam, E.N., Cottrell, J.J. (2005b). Effects of nitric oxide and oxidation in vivo and post mortem on meat tenderness. *Meat Science* 71, 205–217.
- Warner, R.D., Ferguson, D.M., Cottrell, J.J., Knee, B.W. (2007). Acute stress induced by the preslaughter use of electric prodders causes tougher beef meat. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 47, 782–788.
- Warner, R.D., Greenwood, P.L., Pethick, D.W., Ferguson, D.M. (2010). Genetic and environmental effects on meat quality. *Meat Science* 86, 171–183.
- Warriss, P.D. (1990). The handling of cattle pre-slaughter and its effects on carcass and meat quality. *Applied Animal Behaviour Science*, 28, 171-186
- Warriss, P.D. (2003). *Ciencia de la carne*. Acribia, 2003. 309 p. Zaragoza (España).
- Watanabe, A., Dalyb, C.C. and Devine, C.E. (1996). The Effects of the Ultimate pH of Meat on Tenderness Changes During Ageing. *Meat Science*, Vol. 42, No. 1: 67-78.
- Weber, D.C., Skillings, J.H. (2000). 'A first course in the design of experiments: a linear models approach.' (CRC Press: Boca Raton, FL).

- Wulf, D.M., Morgan, J.B., Tatum, J.D. and Smith, G.C. (1996). Effects of animal age, marbling score, calpastatin activity, subprimal cut, calcium injection, and degree of doneness on the palatability of steaks from limousin steers. *Journal of Animal Science* 74: 569-576.
- Xiong, Y., Mullins, O., Stika, J., Chen, J., Blanchard, S., Moody, W. (2007). Tenderness and oxidative stability of post-mortem muscle from mature cows of various ages. *Meat Science*, 77: 105-113.
- Zadoks, J. C. Chang, T. T. Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, Vol. 14, 415-421.
- Zimerman, M., Grigioni, G., Taddeo, H. and Domingo, E. (2011). Physiological stress responses and meat quality traits of kids subjected to different pre-slaughter stressors. *Small Ruminant Research*, Vol. 100, No.2-3: 137-142.