



**Degradação miofibrilar no músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de dois grupos genéticos, submetidos a três tempos de resfriamento**

Luiz Gustavo Yokota<sup>1</sup>, Gilmara Bruschi Santos<sup>2</sup>, Matheus Cavaletti<sup>3</sup>, Jeison Solano Spim<sup>4</sup>, Paulo Roberto Rodrigues Ramos<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Zootecnista formado pela Escola Superior de Agronomia de Paraguaçu Paulista. e-mail: [lgyokota@hotmail.com](mailto:lgyokota@hotmail.com)

<sup>2</sup>Professora Doutora do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agronomia de Paraguaçu Paulista - Orientadora. e-mail: [gilmara@funge.com.br](mailto:gilmara@funge.com.br)

<sup>3</sup>Aluno do curso de Zootecnia da Escola Superior de Agronomia de Paraguaçu Paulista

<sup>4</sup>Aluno do curso de Mestrado em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu.

<sup>5</sup>Professor Doutor do Departamento de Biofísica da UNESP de Botucatu

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi identificar por eletroforese as mudanças nas frações das proteínas musculares, separadas no período *post-mortem* de bovinos de dois diferentes grupos genéticos (Nelore e Angus). Foram utilizadas 12 amostras do músculo *Longissimus dorsi* por grupo genético. De cada uma delas foram retiradas três fatias, uma foi refrigerada por 24 horas, uma foi maturada por 7 dias e ainda outra maturada por 14 dias a 4°C. As amostras submetidas a 0, 7 e 14 dias de maturação não diferiram quanto à maciez da carne nos grupos genéticos. Na análise das bandas da eletroforese, notou-se degradação da miosina (MHC) e da Troponina-T (TN-T) e o aparecimento do fragmento de 30 kDa para todos os grupos genéticos durante o período de 7 dias de maturação.

**Palavras-chave:** proteólise, carne, força de cisalhamento, eletroforese, músculo

**Miofibrillar Degradation and tenderness of *Longissimus* muscle of two genetic groups submitted to three times of ageing**

**Abstract:** The aim of this paper was the electrophoretic identification of muscular fractions, separate proteins in *post-mortem* of four different two bovine genetic groups (Nelore e Angus). 24 samples of the *Longissimus* muscle had been used (12 for genetic group). Each sample was separated in three slices that was aged for 7 and 14 days e another was not aged. The 0, 7 and 14 days samples had not differed in relation to the genetic groups. In the analysis of the bands, degradation of myosin (MHC), Troponina-T (TN-T) was noticed and the 30 kDa fragment for the genetic groups during the period of 7 days of ageing.

**Keywords:** Proteolysis, meat, shear force, electrophoresis, muscle

**Introdução**

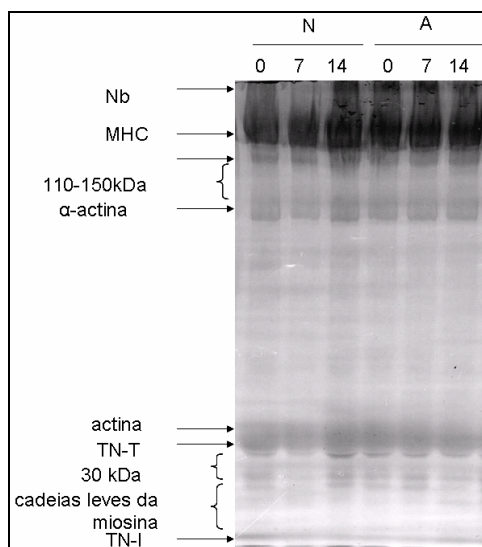
O aumento da maciez da carne, que ocorre pós-morte, é resultado de uma série de processos, que envolvem um sistema enzimático cuja finalidade é degradar a estrutura miofibrilar. A utilização da maturação pode reduzir a força de cisalhamento, favorecendo, portanto, a maciez da carne, resultado da proteólise miofibrilar, mediada pelas proteases cálcio dependentes. Além da maturação, a genética do animal tem um importante efeito na maciez da carne percebida sensorialmente. Porém, ainda poucos estudos têm avaliado a influência do genótipo na palatabilidade da carne. Tem sido demonstrado que algumas proteínas componentes da miofibrila mudam durante o post-mortem dos animais, incluindo a Tinina, Nebulina e a Troponina, resultando muito vezes no desaparecimento de determinadas frações das proteínas ou o aparecimento de produtos de degradação, como é o caso do aparecimento de uma banda de aproximadamente 30 kDa à medida que se aumenta o tempo de maturação da carne (Negish et al., 1996). Muitos métodos têm sido empregados atualmente para se determinar o grau de proteólise sofrida pelas proteínas miofibrilares. Um dos métodos mais eficientes utilizados atualmente é o do eletroforese na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) que é empregada para determinação de peso molecular, quantificação e identificação de padrões polimórficos em estudo de qualidade de carne. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar as mudanças na composição das proteínas miofibrilares do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos da raça Nelore e Angus, submetidos a três tempos de maturação por meio da técnica de eletroforese SDS-PAGE.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado na Faculdade de Agronomia de Paraguaçu Paulista. Foram utilizadas 24 amostras do músculo *Longíssimus dorsi* de bovinos da raça Nelore e Angus, submetidos a três tempos de maturação: 0, 7 e 14 dias. Estas amostras foram homogeneizadas, isoladas e quantificadas para que se procedesse à análise da degradação das proteínas miofibrilares por meio de eletroforese. Cada amostra foi pesada em balança de precisão e macerada em solução de isolamento. Após processadas as amostras foram centrifugadas a 10.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos em centrífuga refrigerada à 0°C. O sobrenadante foi retirado e acondicionado em microtubos para posterior diluição e utilização na corrida eletroforética. Cada amostra foi então diluída com solução tampão (glicerol, SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol e azul de bromofenol) na proporção de 1:1 em microtubos contendo 30  $\mu$ l de amostra e 30  $\mu$ l da solução tampão. As amostras diluídas foram então superaquecidas por 90 segundos em banho-maria. Em seguida o gel de poliacrilamida foi preparado a uma concentração de 7,5% e aplicado em cada uma das placas para polimerização. Após completa polimerização do gel, as amostras foram aplicadas em cada um dos poços. Cada gel então foi submetido à corrente elétrica contínua durante 6 horas. Após a corrida os géis foram retirados das placas e imersos em solução corante de comassie blue (solução 0,1%), por 24 horas. Em seguida foram mergulhados em solução descorante (metanol 30%, ácido acético 10% e H<sub>2</sub>O 60%), para revelação das bandas das proteínas durante 24 horas. Cada gel então foi retirado da solução descorante e colocado num analisador de imagens para identificação das frações separadas. As análises estatísticas foram realizadas através do procedimento GLM do sistema de análises estatísticas SAS para verificação do efeito da raça e do tempo de maturação sobre a estrutura das proteínas miofibrilares, utilizando delineamento inteiramente ao acaso em esquema fatorial 2 x 3 (duas raças e três tempos de maturação).

## Resultados e Discussão

A eletroforese das miofibrilas dos músculos de animais Nelore e Angus apresentou de 20 a 27 bandas. A figura 1 mostra seis linhas representativas do padrão eletroforético das proteínas miofibrilares do músculo *Longíssimus dorsi* após os tempos 0, 7 e 14 dias de maturação.



**FIGURA 1.** Eletroferograma das proteínas miofibrilares do músculo *Longíssimus dorsi* de Bovinos Nelore (N) e Angus (A) submetidos a três tempos de maturação.

Nela estão representados os locais aproximados de acordo com o peso molecular determinado pelo padrão de peso molecular das proteínas ou frações protéicas consideradas mais importantes no processo de amaciamento da carne bovina durante o resfriamento: Nebulina (Nb), Cadeia pesada da miosina (MHC), produtos de degradação de aproximadamente 110 a 150 kDa, alfa-actina ( $\alpha$ -actina), Troponina-T (TN-T), Fragmento de aproximadamente 30kDa, produto da degradação da troponina, Cadeias leves da miosina e Troponina-I (TN-I). Pode-se notar pela análise figura pequena diminuição de determinadas frações protéicas e aparecimento de outras, denominadas produtos de degradação, à medida que se aumenta o tempo de maturação da carne, independente do grupo genético. Isto pode ser facilmente observado quando se faz a análise densitométrica das bandas do gel em programa de análise de géis de eletroforese específico, que por sua alta sensibilidade pode detectar até mudanças mínimas na composição das proteínas miofibrilares. Apesar desta observação, quando os dados dos géis foram

submetidos à análise estatística, não foram observadas diferenças significativas na degradação das miofibrilas. Isso pode ser notado pela análise da tabela 1.

**TABELA 1.** Mudanças no conteúdo das frações das proteínas miofibrilares (% da proteína total) do músculo *Longíssimus dorsi* de bovinos Nelore e Angus submetidos a 0; 7 e 14 dias de maturação.

| Proteínas                         | Animais  |          |          |          |          |          |
|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                                   | Nelore   |          |          | Angus    |          |          |
|                                   | 00       | 07       | 14       | 00       | 07       | 14       |
| <b>Titina</b>                     | 7,83 Aa  | 7,54 Aa  | 7,52 Aa  | 7,21 Aa  | 6,82 Aa  | 6,82 Aa  |
| <b>MHC</b>                        | 26,13 Aa | 27,59 Aa | 28,14 Aa | 26,71 Aa | 25,07 Aa | 27,13 Aa |
| <b>Actina</b>                     | 19,48 Aa | 18,70 Aa | 18,83 Aa | 21,59 Aa | 20,04 Aa | 20,49 Aa |
| <b><math>\alpha</math>-actina</b> | 4,38 Aa  | 5,31 Aa  | 5,14 Aa  | 4,00 Aa  | 5,12 Aa  | 4,89 Aa  |
| <b>30 kDa</b>                     | 0,89 Aa  | 1,09 Aa  | 1,11 Aa  | 0,75 Aa  | 0,98 Aa  | 1,01 Aa  |
| <b>TroponinaT</b>                 | 2,86 Aa  | 2,58 Aa  | 2,51 Aa  | 3,05 Aa  | 2,98 Aa  | 2,97 Aa  |

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem significativamente quanto aos grupos genéticos e letras minúsculas iguais não diferem significativamente quanto aos tempos de maturação ( $P < 0.05$ ) pelo teste de Tukey.

Não foram observadas mudanças na quantidade das principais proteínas contráteis actina e miosina entre grupos genéticos e tempos de maturação. Assim como observado por outros autores essas proteínas parecem não sofrer degradação post-mortem à 4° C até após 56 dias de maturação (Bandman & Zdanis, 1988). Eles sugeriram que a falta de proteólise da MHC foi parcialmente devido à baixa atividade enzimática à temperaturas resfriadas. De acordo com Kolczak et. al., (2003) durante 12 dias de maturação da carne o comprimento do sarcômero aumenta, principalmente devido ao alargamento das bandas-I e também algumas mudanças na banda-A. Não foram encontradas diferenças significativas quanto ao conteúdo da TN-T ao longo dos tempos de maturação em nenhum dos grupos genéticos, mas nota-se que conforme aumentou o tempo de maturação, o conteúdo da TN-T diminui e devido à degradação da TN-T, polipeptídeos de aproximadamente 30 kDa aparecem. A degradação da TN-T durante a maturação dos músculos tem sido associada com a melhora na maciez. Como tem sido documentado e observado em vários músculos independentemente da espécie animal (Negish et al., 1996). É possível que a degradação possa estar relacionada à mudanças estruturais tais como o alargamento da banda I, e encurtamento das miofibrilas do sarcômero, o qual é encontrado em observações microscópicas. A raça, assim como o peso ao abate, influencia nos parâmetros de qualidade, incluindo a estrutura e a fisiologia muscular. Não foram encontradas diferenças significativas quanto à maciez da carne em bovinos Nelore e Angus do presente estudo, porém estudos têm mostrado que há maior maciez da carne nos animais Angus. Essas diferenças na maciez entre as raças podem ser devido a diferenças genéticas na atividade enzimática do músculo e na composição bioquímica, principalmente em relação à proporção de gordura, principalmente quanto à gordura intramuscular, tipos de fibras presentes no músculo e conteúdo de colágeno (Kolczak et al., 2003).

### Conclusões

Conclui-se que não se obteve resultados significativos na degradação das proteínas, porém podemos observar que maiores mudanças ocorrem na Troponina-T durante o processo de maturação. Sendo assim, mais estudos devem ser realizados no intuito de se verificar mudanças na composição miofibrilar entre raças bovinas e períodos de maturação.

### Literatura citada

- BANDMAN, E.; ZDANIS, D. An immunological method to assess protein degradation in post-mortem muscle. *Meat Science*, 22, p. 1-19. 1988.
- KOLCZAK, T.; POSPIECH, E.; PALKA, K. et. al. Changes of myofibrillar and centrifugal drip proteins and shear force of Psoas major and minor and Semitendinosus muscles from calves, heifers and cows during postmortem ageing. *Meat Science*, v. 64, p 69-75. 2003.
- NEGISH, H.; YAMAMOTO, E.; KUTAWA, T. The origin of the 30 kDa component appearing during post-mortem ageing of bovine muscle. *Meat Science*, 42, p. 289-303, 1996.