

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**PROTEÍNAS MIOFIBRILARES E MACIEZ DA CARNE DE BOVINOS
SUPERPRECOSES DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS**

GILMARA BRUSCHI SANTOS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção do
título de Doutor.

BOTUCATU - SP
Julho - 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**PROTEÍNAS MIOFIBRILARES E MACIEZ DA CARNE DE BOVINOS
SUPERPRECOSES DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS**

GILMARA BRUSCHI SANTOS
Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO ROBERTO RODRIGUES RAMOS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção do
título de Doutor.

BOTUCATU - SP
Julho – 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Santos, Gilmara Bruschi.

Proteínas miofibrilares e maciez da carne de bovinos superprecoces de diferentes grupos genéticos / Gilmara Bruschi Santos. – 2006.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

Orientador: Paulo Roberto Rodrigues Ramos

Assunto CAPES: 50405012

1. Bovino de corte - Aspectos genéticos 2. Produção animal 3. Carne bovina - Qualidade

CDD 636.208

Palavras-chave: Carne; Eletroforese; Força de cisalhamento; Músculo; Proteólise

Dedico

A meus pais Marcílio Roque Santos e Sueli Domene Bruschi Santos
pelo esforço e incentivo
em todos os momentos de minha vida,
aos meus irmãos, Willian e André Marcelo e a meus sobrinhos Aline,
Victor e Luiz Felipe e às minhas cunhadas Alessandra e Angélica
Amo vocês!

Ofereço

A Deus, em agradecimento por tudo que me tem dado!

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador, **Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos**, pela oportunidade, orientação, incentivo, hospedagem, amizade e paciência. A ti não bastou passar somente como professor... A cada dia de convívio a lição, a dedicação, a amizade, as conversas, as tristezas e as alegrias ficaram guardadas em meu coração. A você, o meu carinho e respeito.

Ao professor **Luis Arthur Loyola Chardulo** pelas conversas, pelas idéias e pelas valiosas sugestões em diversas fases deste estudo. A ti, o meu respeito e admiração.

Aos Professores **Antônio Carlos Silveira e Henrique Nunes de Oliveira** pela oportunidade que me deram, pelo auxílio e excelente convivência durante muitos anos. A eles minha eterna gratidão.

Aos professores e funcionários do Departamento de Física e Biofísica, em especial à **Cilene** pela simpatia, apoio e serviços prestados.

Aos amigos, **Marcelo (Docinho), Fábio, Saulo, José Antônio, Christiane, Carolina, Fernanda** pela convivência agradável e em especial ao **Jeison (Krugger)** pela ajuda durante as análises finais deste trabalho e a tantos colegas pela convivência agradável durante estes anos.

Aos funcionários do Laboratório de Bromatologia da Universidade Estadual Paulista, **Renato e Conceição** por toda a ajuda e atenção a mim prestadas.

Às funcionárias da secretaria da Pós-Graduação da FMVZ-UNESP-Botucatu, **Seila e Carmen**, pela atenção, apoio e serviços prestados.

Ao **Marco Aurélio**, por encher novamente a minha vida de cor.

À minha amiga **Joicy Mota** pelas incansáveis viagens a Botucatu na fase inicial deste estudo, “em busca do gel perfeito”.

Aos meus alunos **Fábio Figueiroa Sanchez e José Antônio dos Santos** pela ajuda em várias fases deste estudo. São hoje profissionais treinados e capacitados em diversas técnicas de análise de proteínas.

Aos meus amigos **Aline Tonelo e Fabiano Lima** pela inestimável ajuda, digitando textos do exame de qualificação e produzindo figuras para as apresentações.

Ao meu amigo **Daniel Calasans** pela grande força que me deu com os abstracts.

A todos os meus amigos de muitas jornadas. Seria impossível citar nomes sem cometer injustiças. A vocês, a gratidão pela amizade, pelo convívio, pelas festas, pelos conselhos, por momentos compartilhados. Toda a minha alegria de viver foi construída e dedicada a alegrar a vida de cada um de vocês assim como vocês alegra a minha vida.

Em especial ao meu amigo **Renato** (DADA). Você, que sempre dizia ter orgulho da amiga “doutora” e esperava tanto pelo dia da minha defesa, se foi de maneira inesperada e nem tive chance de me despedir, esperava voltar e te encontrar... A você, com sua simplicidade e alegria de viver, que sempre cativou a todos, um agradecimento especial por ter proporcionado a mim e a todos nossos amigos, momentos de grande alegria. Fica com DEUS, “Bonito”!

Aos colegas, professores e funcionários da Escola Superior de Agronomia de Paraguaçu Paulista por todo o apoio e em especial ao Prof. Dr. **José Carlos Pires** por ceder gentilmente seu laboratório para que eu me instalasse.

Aos meus alunos pela compreensão e por me proporcionarem lições que nem mesmo um mestre poderia dar. Quando cada um chega até mim, um novo mundo se abre a minha frente.

A **Universidade Estadual Paulista**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, pela oportunidade concedida.

E a todos que de alguma forma contribuíram ou atrapalharam a execução deste trabalho. De certa forma todos colaboraram!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	1
Referências Bibliográficas.....	17
CAPÍTULO 2 – Degradação miofibrilar e maciez do músculo <i>Longissimus dorsi</i> de bovinos jovens de quatro grupos genéticos submetidos a dois períodos de maturação.....	21
Resumo.....	22
Abstract.....	23
Introdução.....	24
Material e Métodos.....	26
Resultados e Discussão.....	34
Conclusões.....	43
Referências Bibliográficas.....	44
CAPÍTULO 3 – Perfil protéico do músculo <i>Longissimus dorsi</i> de bovinos jovens de quatros diferentes grupos genéticos.....	49
Resumo.....	50
Abstract.....	51
Introdução.....	52
Material e Métodos.....	54
Resultados e Discussão.....	58
Conclusões.....	73
Referências Bibliográficas.....	74
CAPÍTULO 4 – IMPLICAÇÕES.....	76

Lista de Figuras

Capítulo 2

- Figura 1.** Eletroforese em SDS-PAGE (10%) das proteínas miofibrilares do músculo *Longissimus dorsi* de Bovinos de quatro grupos genéticos resfriadas por 24 horas e maturadas por sete dias. 37

Capítulo 3

- Figura 1.** Eletroferograma das proteínas do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, maturadas e não maturadas, submetidos à eletroforese (13%) não denaturante e não redutor na presença de SDS. 59
- Figura 2.** Traçados densitométricos das bandas protéicas de amostras de músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, submetidos à eletroforese não denaturante e não redutor na presença de dodecil sulfato de sódio em géis de 13% de concentração. 61
- Figura 3.** Eletroferograma das proteínas musculares do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, resfriado por 24 horas e maturado por sete dias, submetidos à eletroforese (13%) denaturante na presença de SDS. 65
- Figura 4.** Traçados densitométricos das bandas protéicas de amostras de músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, submetidos à eletroforese denaturante na presença de dodecil sulfato de sódio em géis de 13% de concentração. 68

Lista de Tabelas

Capítulo 2

- Tabela 1.** Valores médios da força de cisalhamento de amostras dos animais Nelore, TRC-Brahman, Brangus, TRC-Pardo maturadas por 7 dias. 34
- Tabela 2.** Mudanças no conteúdo das proteínas (% do total das proteínas) miofibrilares, α -actina, actina, miosina (cadeia pesada), troponina-T, Troponina-I, e da banda de aproximadamente 30 kDa do músculo *Longíssimus dorsi* dos animais Nelore, , TRC-Brahman, Brangus e TRC-Pardo refrigeradas por 24 horas e maturadas por 7 dias. 38

Capítulo 3

- Tabela 1.** Valores em % obtidos na densitometria das bandas protéicas de amostras de músculo *Longíssimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, submetidos à eletroforese não denaturante na presença de SDS a 13%. 60
- Tabela 2.** Coeficientes de correlação obtidos na densitometria das bandas protéicas de amostras de músculo *Longíssimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, submetidos à eletroforese não denaturante e não redutor na presença de SDS em géis a 13%. 64
- Tabela 3.** Valores em % obtidos na densitometria das bandas protéicas de amostras de músculo *Longíssimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, submetidos à eletroforese denaturante na presença de SDS a 13% 66
- Tabela 4.** Coeficientes de correlação obtidos na densitometria das bandas protéicas de amostras de músculo *Longíssimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, submetidos à eletroforese denaturante na presença SDS a 10%. 71

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Brasil vem se consolidando, ano a ano, como grande produtor de carne bovina. As exportações no quarto trimestre de 2005 alcançaram um volume de 208 mil toneladas. Apesar de ter alcançado o maior valor de todos os tempos, as exportações fecharam o ano em ritmo de queda, devido à descoberta do foco de aftosa na região centro-oeste do país (IBGE, 2006). Além da barreira sanitária, outros fatores podem comprometer o bom desempenho da pecuária de corte nacional, como a baixa produtividade dos rebanhos, as baixas taxas reprodutivas e a falta de uniformidade das características de qualidade da carcaça. Quanto a este último fator, muitos estudos têm sido feitos objetivando oferecer um produto de melhor qualidade e competitividade nos mercados nacional e internacional (Chardulo, 2000).

A qualidade da carne é uma característica complexa influenciada pelo componente genético, manejo dos animais durante o processo de produção, transporte, e ainda, pelo tratamento sofrido pela carne durante o processo de abate (Koohmaraie et al., 1996).

O grande problema enfrentado hoje pela indústria é a obtenção de carne macia, visto que o processo de maciez durante o período *post-mortem* é variável entre as carcaças (Thompson, 2002). Diante disso, é necessário conhecer os

mecanismos bioquímicos envolvidos na maturação da carne para que se possa reduzir a variação apresentada pela maciez.

Transformação do músculo em carne

O entendimento da seqüência de eventos bioquímicos que ocorrem no período *post-mortem* do animal é essencial na compreensão do processo de maciez da carne.

Quando o animal é abatido, as funções vitais ainda continuam durante certo tempo e o ATP continua fornecendo energia para o processo de contração durante um período de tempo (Luchiari Filho, 2000).

Devido à falência sangüínea, o aporte de oxigênio e o controle nervoso deixam de chegar à musculatura. Assim, o músculo passa a utilizar a via anaeróbica para obter energia para um processo de contração desorganizado; há, então, transformação de glicogênio em glicose, e como a glicólise é anaeróbica, gera lactato e o pH no músculo cai (Roça, 2005).

Para manter os níveis de ATP, o ADP se liga à fosfocreatina no sarcoplasma por ação da enzima creatina quinase e começa a ser convertido em ATP por refosforilação para suprir as reservas de energia (Bendall, 1973).

Quando o ATP atinge níveis insuficientes para manter a actina e miosina separadas, instaura-se a ligação irreversível da actina e miosina para formar a actinmiosina. A reação que instaura o rigor é a mesma que ocorre durante a

contração muscular, porém, aqui devido à ausência de energia, o relaxamento é impossível pela formação de uniões irreversíveis de actinmiosina (Jiang, 1998).

O processo de conversão do músculo em carne continua com degradações enzimáticas e desnaturação protéica, causando uma pseudo-resolução do *rigor mortis*, que tornará a carcaça menos rígida (Felício, 1997). Porém, somente depois de completamente exauridas as reservas de energia do tecido animal, as enzimas proteolíticas dependentes do cálcio começam a atuar na degradação das proteínas, tornando a carne mais macia (Sgarbieri, 1996).

Maciez da carne bovina

O processo de maciez da carne começa logo após o abate, mas é bastante variável entre raças e mesmo entre indivíduos da mesma raça (Veiseth et al., 2001).

A textura de um corte é determinante da qualidade e provavelmente a mais importante característica sensorial quando se consome a carne (Coró et al., 1999). Os três fatores que determinam a maciez da carne são: maciez residual, a qual é definida com a resistência ao cisalhamento de um corte não encurtado e que é basicamente devida ao tecido conjuntivo; fase de endurecimento, que é causada pelo encurtamento do sarcômero durante o desenvolvimento do rigor; e finalmente o amaciamento *post-mortem* (Koohmaraie & Geesink, 2006).

O comprimento do sarcômero, a quantidade de tecido conjuntivo e a proteólise das proteínas miofibrilares explicam boa parte da variação da maciez

entre diferentes músculos submetidos ao processo de maturação. Contudo, a contribuição relativa de cada componente para a maciez é dependente do músculo avaliado. Por exemplo, enquanto no músculo *Psoas major* o comprimento do sarcômero é o maior determinante da maciez, no músculo *Longissimus dorsi* a proteólise é o fator mais importante. Já nos músculos *Bíceps femoris* e *Semimembranosus* a quantidade de tecido conjuntivo é o fator que mais interfere na maciez (Koohmaraie, 2002).

Dentre os métodos empregados para se medir a maciez da carne deve-se destacar o da força de cisalhamento, que é medida por meio de um aparelho denominado Warner-Bratzler Shear Force (WBSF). Este método associado à classificação de carcaças apresenta alto potencial para predizer a maciez do *Longissimus dorsi* e muitas vezes apresenta alta correlação com avaliação sensorial realizada por pessoas treinadas (Delgado, 2001). Como boa parte da maciez da carne pode ser explicada pela degradação das proteínas miofibrilares, métodos como o Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) e a Eletroforese de proteínas podem ser utilizados para se avaliar o grau de degradação miofibrilar e as proteínas envolvidas no processo (Clayes et al., 1995; Lametsch e Bendixen, 2001; Koohmaraie, 2002; Lametsch et al., 2003; Sawdy et al., 2004).

Maciez e proteínas miofibrilares

A fibra que compõem o músculo esquelético é constituída por miofibrilas, cuja unidade estrutural é o sarcômero. Cada sarcômero é representado como a

distância entre duas linhas transversais e escuras, denominadas linhas Z e é constituído de diversas proteínas, onde ocorrem as alterações que conduzem ao amaciamento *post-mortem*.

Distribuídos dentro de cada um dos sarcômeros de uma fibra muscular, estão dispostos os filamentos grossos e finos. Os primeiros são constituídos pela proteína miosina e outras proteínas como a C, M, I e F. Já os filamentos finos são constituídos principalmente da proteína actina que é uma proteína globular que se polimeriza formando filamentos longos de actina fibrilar. Estes filamentos finos são ainda envoltos por outras proteínas como troponina, a tropomiosina e a β -actina.

Entre as mais importantes proteínas musculares (tabela 1), a actina e miosina representam as principais proteínas contráteis, a troponina, tropomiosina, proteínas M e C são do grupo das proteínas regulatórias. Existem também no sarcômero outras proteínas, como as proteínas da linha Z (entre outras, a α -actina), e outras proteínas citoesqueléticas. Dentro do último grupo, as mais interessantes são a tinina, que é o componente elástico que liga os filamentos grossos à estrutura dos discos Z, nebulina, desmina e vinculina, que ao lado de proteínas que aparecem em menores quantidades, compreendem o citoesqueleto do músculo (Greaser 1997; Greaser et al. 2000).

A actina e a miosina são as principais proteínas responsáveis pelas propriedades funcionais da carne, pela capacidade de reter água, assim como pela emulsão, formação de gel e estabilidade da mesma. No entanto, a maior parte das mudanças nas fibras musculares é causada pela degradação das

proteínas citoesqueléticas. Estas proteínas fazem parte dos costâmeros, modulam as miofibrilas com o sarcolema e estabilizam o arranjo das proteínas miofibrilares no meio intracelular, especialmente na estrutura do disco Z (Kolczak et al., 2003b). Essas mudanças estão associadas à degradação de duas proteínas de grande peso molecular, que são a nebulina e titina. No entanto, o desaparecimento de proteínas menores tem merecido atenção dos pesquisadores.

Tabela 1. Proteínas do músculo esquelético

Principais proteínas contráteis	Actina Miosina
Proteínas Reguladoras	Tropomiosina Troponina α -actina (α -actinina)
Proteínas Cito-esqueléticas	Titina Nebulina Proteína-C Proteína-M (miomesina) Desmina (esqueletina) Filamina Vimentina Sinemina Proteína-Z Proteína-I Creatina-quinase
Proteínas Sarcoplasmáticas	Sarcoplasmáticas solúveis e enzimas mitocondriais Mioglobina hemoglobina Citocromo e flavoproteínas
Proteínas do Estroma	Colágeno e reticulina Elastina Outras proteínas insolúveis

(Adaptado de Judge et al., 1989)

Outro bom indicador do processo de amaciamento após a maturação é o aparecimento de um fragmento de aproximadamente 30 kDa (Penny e Dransfield, 1997), devido à degradação da troponina T (Koohmaraie, 1994; Kolczak et al., 2003).

Todo o processo de degradação das proteínas miofibrilares é mediado por sistemas enzimáticos específicos, responsáveis pelo aumento na maciez da carne.

Sistemas enzimáticos

Três são os sistemas envolvidos no processo de maciez da carne. O primeiro é o complexo multicatalítico das proteinases (MCP), que atua principalmente em peptídeos em pH neutro ou alcalino e em temperaturas em torno de 45°C, apresentando assim pouca importância no processo de degradação das miofibrilas (Jiang, 1998). O segundo é o sistema lisossomal das catepsinas, que tem como substratos a actina, a miosina e a linha Z (Koohmaraie, 1994) e que atuam em temperatura mais alta e em pH mais baixo (pH<6,0) que as calpaínas, e degradam não só proteínas miofibrilares como também proteínas do tecido conjuntivo (colágeno). O terceiro é o sistema das calpaínas, que é considerado atualmente como o maior responsável pela degradação das proteínas post-mortem e sua atividade é regulada por um inibidor, a calpastatina.

As calpaínas são proteinases ativadas pelo cálcio com sua atividade sendo considerada ótima em pH próximo a 7. São três as proteases envolvidas nesse

sistema: a μ -calpaína, a m-calpaína e uma calpaína músculo-específica, a calpaína 3. A atividade destas enzimas é regulada pela calpastatina, um inibidor específico das calpaínas μ e m.

A μ -calpaína e a m-calpaína são enzimas completamente dependentes do cálcio para exercerem seu papel. A primeira necessita de concentrações micro-molares de Ca^{++} , enquanto a segunda atua em concentrações mili-molares (Koochmaraie, 1992). Existem evidências de que a μ -calpaína exerce papel fundamental no processo de maciez da carne, visto que a concentração de Ca^{++} encontrada naturalmente no músculo é suficiente para ativar somente esta enzima (Geesink et al., 2000; Koochmaraie et al., 2002). A terceira protease, conhecida como Calpaína 3 ou p94, tem sido bastante estudada nos últimos tempos e várias pesquisas tem demonstrado que mesmo tendo um sítio de ligação na proteína titina, uma importante proteína que é degradada durante o processo de maciez no período *post-mortem*, esta protease não está relacionada com o aumento da maciez na carne maturada, pois, dentre outras evidências, a incubação das miofibrilas com esta enzima resulta em padrões de degradação diferentes daqueles obtidos na carne maturada. Além disso, ao contrário das outras calpaínas, esta não é inibida pela ação da calpastatina (Geesink et al., 2005).

A proporção entre a atividade de calpastatina e calpaínas determina a velocidade e intensidade do amaciamento *post-mortem* da carne. A atividade da calpastatina nas primeiras horas após o abate está relacionada com a maciez da carne. Assim, animais com alta atividade da calpastatina apresentam carne menos

macia que animais que apresentam baixa atividade desta enzima, até mesmo após 14 dias de maturação (Koochmaraie, 1994).

A atividade da calpastatina tem alta variabilidade genética entre os animais em relação à concentração de calpastatina nos músculos. Assim, a seleção contra esta enzima pode resultar em um aumento da maciez da carne. Em geral a atividade da calpastatina tem herdabilidade variando de 0,15 a 0,65, com média de 0,43. Um trabalho realizado por Shackelford et al., (1994) revelou valores ao redor de 0,65 para os níveis de calpastatina e de 0,5 para sua correlação com valores da força de cisalhamento.

Fatores que afetam a maciez da carne

Grupo Genético

Diversos estudos com diferentes grupos genéticos bovinos têm demonstrado grandes variações quanto à característica de maciez da carne (Koochmaraie et al., 1994 e Wheeler et al., 1995).

O principal efeito da raça na maciez da carne é observado quando se comparam animais extremos (*Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*). Estudos têm demonstrado que à medida que a porcentagem de *B. indicus* aumenta, a maciez tende a ser diminuída e a variabilidade na maciez tende a aumentar (Whipple et al., 1990).

Animais *B. indicus* podem apresentar níveis mais baixos de μ -calpaína e níveis mais elevados de calpastatina, o que possivelmente resulta no decréscimo da maciez da carne (Wheeler et al., 1990).

A atividade da calpastatina é uma característica herdável. Em estudo realizado por Shackelford et. al.,(1994) verificou-se uma herdabilidade em torno de 65%. Nesse estudo que incluiu raças puras e compostas, e a F1 das raças estudadas, verificou-se que a atividade da calpastatina nos animais compostos foi inferior (2,5 U de atividade/g de carne) à atividade média da calpastatina nas raças que contribuíram para sua formação (2,9 U/g de carne). Tal estudo tem grande impacto quando se busca resultados da heterose que se espera nos cruzamentos.

Algumas raças destacam-se quanto a maior maciez de sua carne. A raça Aberdeen-Angus é considerada atualmente como um dos extremos em relação a sua palatabilidade. Em trabalho realizado por Willians et al. (1995) notou-se maior maciez da carne desses animais, medida pela força de cisalhamento, devido à maior precocidade de terminação da carcaça, o que favoreceu a mais eficiente deposição de gordura de cobertura. Os autores fundamentaram suas observações pelo menor impacto proporcionado pelo resfriamento rápido da carcaça no frigorífico, evitando-se o encurtamento das fibras, uma vez que se verificou maior temperatura na carcaça Angus durante resfriamento, concorrendo para maior ação glicolítica muscular, menor índice de pH e conseqüente inibição da calpastatina, possibilitando maior ação da calpaína, a enzima responsável pela maciez da

carne. Outra explicação viável seria o maior grau de marmorização da carne de animais Angus em relação às outras raças utilizadas.

Por outro lado, pela alta capacidade de adaptação dos zebuínos ao ambiente tropical, a utilização destes animais na exploração da heterose em cruzamentos se consolidou ao longo do tempo. Contudo, o genótipo zebuíno introduz grande variação na maciez da carne (Sherbeck et al., 1996). A maior proporção de genótipo zebuíno resulta em aumento na força de cisalhamento de um corte cárneo e diminuição dos escores de avaliação sensorial da maciez (Pringle et al., 1997).

Em trabalho realizado por Whipple et al., (1990) com músculos *Longissimus dorsi* e *Semitendinosus* de bovinos Hereford x Angus e de seus cruzados com animais da raça Sahiwal (3/8 e 5/8 S), foi observado que a carne de bovinos 5/8S é mais dura que a de 3/8 S, mesmo após 14 dias de maturação. A proteólise miofibrilar, observada por eletroforese de proteínas, foi reduzida para este grupo genético. A desmina, do citoesqueleto das células musculares da carne de novilhos 5/8S permaneceu inalterada e a banda de aproximadamente 30 kDa (produto de degradação na proteólise) não apareceu para este grupo, após a maturação. O mesmo foi observado no *Longissimus* de bovinos Brahman por Wheeler et al. (1990).

O problema na maciez ocasionado pelo genótipo *B. indicus* nos cruzamentos com *B. taurus* torna-se mais evidente quando os animais têm 50% ou mais de participação de *B. indicus* em sua composição genética, sendo conveniente que não mais de 25% de componente zebuíno seja utilizado. No

entanto, animais compostos de 3/8 zebu apresentam maciez aceitável desde que os outros 5/8 sejam compostos por raça com alto potencial genético para marmoreio e maciez da carne (Dikeman, 1995).

Crescimento

O crescimento é um aumento de massa corporal que ocorre pelos mecanismos de hiperplasia (multiplicação celular) e hipertrofia (aumento de volume celular) dos diversos tecidos. Na fase embrionária o crescimento é caracterizado por uma intensa hiperplasia em todos os tecidos, enquanto que do nascimento até a puberdade (crescimento “auto-acelerado”) predomina o desenvolvimento hipertrófico do tecido muscular esquelético (Koohmaraie et al., 2002).

Dentre os principais fatores que afetam o crescimento destacam-se as inter-relações do tamanho corporal, a maturidade e a utilização de nutrientes para a formação de tecidos corporais (Owens et al., 1993).

Os sistemas enzimáticos relacionados ao processo de amaciamento da carne no *post-mortem* são grandes responsáveis, também, pelo controle de síntese e degradação de proteínas durante as fases de crescimento animal, podendo ser responsáveis pelas variações nas taxas de deposição de tecido muscular na carcaça (Dransfield, 1994).

Animais de diferentes tamanhos à maturidade apresentam diferentes velocidades de crescimento dos tecidos (Williams et al., 1995) e

conseqüentemente diferentes idades de abate (Cundiff et al., 1993), entretanto quando submetidos a sistemas intensivos de produção, apresentam poucas variações de desempenho, características de carcaça e de carne (May et al., 1992). Cundiff et al. (1993) atribuem este fato as poucas variações encontradas na curva de crescimento corporal.

Purchas et al. (2002) realizaram um estudo para determinar se a maior maciez do músculo *L. dorsi* de animais que alcançam um peso de abate mais rápido, deve ser atribuída principalmente ao seu alto potencial de crescimento ou pela sua menor idade ao abate. Os resultados, os quais foram obtidos se restringido a alimentação do grupo com alto potencial de ganho, possibilitando que estes atingissem o peso de abate ao mesmo tempo em que os de baixo potencial, sugerem que a maciez é determinada mais pela idade ao abate que pelo crescimento mais rápido. Ao compararem animais adultos com novilhos os autores encontraram maior maciez para o grupo de animais jovens.

Maturação

A maturação consiste em se manter a carne fresca a uma temperatura superior ao seu ponto de congelamento, visando torná-la mais macia e é um processo controlado da atuação das enzimas responsáveis pela proteólise das proteínas miofibrilares. Para ser submetida à maturação, a carne é embalada à vácuo, evitando-se assim o crescimento microbiano (Luchiari Filho, 2000). A

adição à carne de cloreto de cálcio, imediatamente após o abate, também acelera a ação das enzimas cálcio-dependentes, responsáveis por sua maciez.

Já está bem estabelecida a influencia da maturação na maciez (Kolczak et al., 2003a) e o papel da proteólise no amaciamento da carne, em condições refrigeradas, tem sido reconhecido por décadas (Penny, 1980). A maciez final será resultante do quão efetiva for a degradação enzimática para desestruturar as miofibrilas compactadas durante o processo de *rigor mortis*. A efetividade da degradação enzimática depende de vários fatores. Dentre eles, o tempo de maturação.

Têm-se observado que as diferenças de maciez entre as raças são reduzidas quando a carne é maturada por um período de tempo adequado. Em trabalho realizado por Mónson et al. (2004), estudou-se a influência da raça e do tempo de maturação na textura da carne, utilizando animais das raças Holandesa (raça especializada para produção leiteira), Pardo – Suíça (dupla aptidão), Limousin (crescimento rápido) e Bondle d' Aquitaine (alta musculosidade). Os autores verificaram que apesar de as raças especializadas levarem menor tempo para responder à maturação, após certo tempo, todas as raças apresentaram maciez aceitável, provando que a maturação é uma ferramenta valiosa para reduzir diferenças na maciez da carne.

Cerca de 80 % da variação encontrada na maciez da carne está relacionada com o enfraquecimento da estrutura miofibrilar (Koohmaraie, 1992). O sistema enzimático das calpaínas é responsável pelas mudanças que resultam no

amaciamento da carne (Koohmaraie et al., 1988) e tem participação superior a 90% no processo de amaciamento da carne maturada.

O Capítulo 2, denominado **Degradação miofibrilar e maciez do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos jovens de quatro grupos genéticos submetidos a dois períodos de maturação** apresenta-se de acordo com as normas para publicação na revista Pesquisa Agropecuária Brasileira. O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de degradação miofibrilar no *post-mortem* de bovinos submetidos ao modelo biológico superprecoce.

O Capítulo 3, intitulado **Perfil Protéico do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos jovens de quatro diferentes grupos genéticos**, apresenta-se de acordo com as normas da Revista Brasileira de Zootecnia. O objetivo deste trabalho foi relacionar as mudanças nas proteínas miofibrilares com a maciez da carne submetida a dois períodos de maturação.

REFERÊNCIAS¹

- BENDALL, J. R. **Post mortem changes in muscles**: the structure and function of muscle. New York: Ed. Bourne, Academic Press, 1973. p. 243-309.
- CHARDULO, L. A. L. **Desempenho, níveis plasmáticos e hormônios, expressão e quantificação de proteínas musculares, características de carcaça e qualidade de carne de bovinos inteiros jovens de cinco diferentes grupos genéticos submetidos a confinamento**. 2000.101f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- CLAYES, E.; UYTTERHAEGEN, BUTS, B.; DEMEYER, D. Quantification of beef myofibrillar proteins by SDS-PAGE. **Meat Sci.**, v.39, p.177, 1995.
- CORÓ, A. G. et al. Carne de zebu: o que está atrás da sua textura? **Revista Nacional da Carne**. São Paulo, v. 17, n. 271, p. 28-34, 1999.
- CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M.; GREGORY, K. E.; CROUSE, J. D. **Characteristics of diverse breeds in Cycle IV of the cattle germoplasm evaluation program**. (Beef Research Progress Rep., 4), USDA, ARS, Clay Center: USDA, ARS, 1993.
- DELGADO, E. F. Fatores bioquímicos que afetam a maciez da carne. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA CARNE. 1., 2001, Campinas. **Anais...** Campinas: CTC/ITAL, 2001.
- DIKEMAN, M. E. Carcass composition and quality of finished crossbred Brahman cattle. Proc. Of the King Workshop. **Arkansas Agric. Exp. Sta. Spec. Rep.**, n. 167, p. 77-88, 1995.
- DRANSFIELD, E. Optimisation of tenderization, ageing and tenderness. **Meat Sci.**, v. 36, p. 105, 1994.
- FELÍCIO, E. P. Fatores *ante e post-mortem* que influenciam na qualidade da carne bovina. In: PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. **Produção do novilho de corte**. Piracicaba: FEALQ, 1997, p.79-97.
- GEESINK, G. H.; TAYLOR, R. G.; KOOHMARAIE, M. Calpain 3/p94 is not involved in postmortem proteolysis. **J. Anim. Sci.**, v. 83, p. 1646-1652, 2005.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação- Referências- Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
BIOSIS. Serial sources for the BIOSIS preview database. Philadelphia, 1996. 468p.

GEESINK, G. H., ILIAN, M.; MORTON, J. D. & BICKERSTAFFE, R. Involvement of calpains in post-mortem tenderization: A review of recent research. **Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.**, v. 60, p. 99-102, 2000.

GREASER, M. L. Postmortem changes in the cytoskeleton proteins in muscle. In: **EUROPEAN SYMPOSIUM "Poultry Meat Quality"**, 13., 1997, Poznań, p.281-291.

GREASER, M. L.; BOYER – BERRY, C.; KUMAZAWA, Y.; SZALATA, M.; POSIECH, E. Titin and tenderness. In: **Proceedings... ICoMST**, 46., 2000, Buenos Aires, 2000. p. 420-423, 4.1-L1.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estatísticas da produção pecuária**. M. Brasília: IBGE, 2006. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 15 de maio de 2006.

JIANG, S. T. Contribution of muscle proteinases to meat tenderization (Review). **Proc. Ntl. Sci. Council**, Roc. v. 22, n. 3, p.97-107, 1998.

JUDGE, M. D.; ABERLE, E. D.; FORREST, J. C.; HEDRICK, H. B. & MERKEL, R. A. **Principles of meat Science**. 2. ed. Dubuque, Kendall/ Hunt Publishing Company, 1989. 351p.

KOLCZAK, T.; POSPIECH, E.; PALKA, K.; LACKI J. Changes in structure of *Psoas major* e *minor* and *Semitendinosus* muscles of calves, heifers and cows during post-mortem ageing. **Meat Sci.**, v. 64, p. 77-83, 2003a.

KOLCZAK, T.; POSPIECH, E.; PALKA, K. LACKI, J. Changes of myofibrillar and centrifugal drip proteins and shear force of *Psoas major* and *minor* and *Semitendinosus* muscles from calves, heifers and cows during post-mortem ageing. **Meat Sci.**, v. 64, p. 69-75, 2003b.

KOOHMARAIE, M. The role of Ca^{2+} dependent proteases (calpains) in post-mortem proteolysis and meat tenderness. **Biochimie.**, v.74, p. 239., 1992.

KOOHMARAIE, M. Muscle proteinases and meat aging. **Meat Sci.** v. 36, p. 93, 1994.

KOOHMARAIE, M. The role of endogenous proteases in meat tenderness. **Proc. Recip. Meat Conf.** v. 41, p. 89, 1988.

KOOHMARAIE, M.; GEESINK, G. H. Contribution of post-mortem biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Sci.**, 2006 (aceito para publicação)

KOOHMARAIE, M.; DOUMIT, M. E.; WHEELER, T.L. Meat toughening does not occur when rigor shortening is prevented. **J. Anim. Sci.**, v.74, p.2935, 1996.

KOOHMARAIE, M.; KENT, M.P.; SHAKELFORD, S. D.; VEISETH, E.; WHEELER, T. L. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Sci.**, v. 62, p. 345-352, 2002.

KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D. **Beef tenderness: regulation and prediction**. Nebraska: US Meat Research Center, 1994.

LAMETSCH, R.; BENDIXEN, E. Proteome Analysis applied to meat science: characterizing post mortem changes in porcine muscle. **J. Agricult. Food Chem.**, v. 49, p. 4531-4537. 2001.

LAMETSCH, R. KARLSSON, A.; ROSENVOLD, K.; ANDERSEN, H. J.; ROERSTORFF, P.; BENDIXEN, E. *Post-mortem* proteome changes of porcine muscle related to tenderness. **J. Agricult. Food Chem.**. V. 51, p. 6992-6997, 2003.

LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**. São Paulo: Luchiari Filho, 2000. 134p.

MAY, S. G., MIES, W. L., EDWARDS, J. W., WILLIAMS, F. L., WISE, J. L, WISE, J. W. MORGAN, J. B., SAVELL, J. W., CROSS, H. R. Beef carcass composition of slaughter cattle differing in frame size, muscle score, and external fatness. **J. Anim. Sci.**, v. 70, p. 2431, 1992.

MÓNSON, F; C. SAÑUDO, C. SIERRA, I. Influence of cattle breed and ageing time on textural meta quality. Influence of cattle breed and ageing time on textural meat quality. **Meat Sci.**, v. 68, p. 595-602, 2004.

OWENS, F. N., DUBESKI, P., HANSON, C. F. Factor that alter the growth and development of ruminants. **J. Anim. Sci.**, v. 71, p. 3138, 1993.

PENNY, I. F.; DRANSFIELD, E. The relationship between toughness and troponin-T in conditioned beef. **Meat Sci.**, v. 75, p. 2955-2961, 1997.

PRINGLE, T.D.; WILLIAMS, S. E.; LAMB, B. S., et al. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. **J. Anim. Sci.**, v 75, p. 2955-2061, 1997.

PURCHAS, R. W: BURNHAM, D. L.; MORIS, S. T. Effects of growth potential and growth path on tenderness of beef longissimus muscle from bulls and steers. **J. Anim. Sci.**, v. 80, p. 3211-3221, 2002.

ROÇA, R. O. **Modificações post-mortem da carne**. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br>> Acesso em: 15 dez. 2005.

SAWDY, J.C.; KAISER, S. A.; St-PIERRE, N. R. WICK, M. P. Myofibrillar 1-D fingerprints and myosin heavy chain MS analyses of beef loin at 36h postmortem correlate with tenderness at 7 days. *Meat Science*, v. 67, p. 421-426, 2004.

SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos**. São Paulo, SP: Varlea, 1996. 517p.

SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; CUNDIFF, L. V.; GREGORY, K. E.; ROHRER, G. A.; SAVELL, J. W. Herdabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine post rigor calpastatina activity, intramuscular fat content, Warner Bratzler Shear force, retail product yield and growth rate. *J. Anim. Sci.*, v. 72, p. 857-863, 1994.

SHERBECK, J. A.; TATUM, J. D.; FIELD, T. G.; MORGAN, J. B.; SMITH, G. C. Effect of phenotypic expression of Brahman breeding on marbling and tenderness traits. *J. Anim. Sci.*, v. 74, p. 304-309, 1996.

THOMPSON, J. Managing meat tenderness. *Meat Sci.*, v. 62, p. 295-308, 2002.

VEISETH, E.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L., et al. Technical note: comparison of myofibril fragmentation index from fresh and frozen pork and lamb longissimus. *J. Anim. Sci.*, v. 79, p. 904-906, 2001.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. **Standardized Warner-Bratzler Shear Force Procedures for Meat tenderness measurement**. Clay Center. Roman L. Hruska U. S., 1995.

WHEELER, T. L.; SAVELL, J. W.; CROSS, H. R., et al. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. *J. Anim. Sci.*, v. 68, p. 4206-4220, 1990.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M.; DIKEMAN, M. E. et al. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in Bos Taurus and Bos indicus cattle. *J. Anim. Sci.*, v. 68, p. 2716-2728, 1990.

WILLIAMS, C. B.; BENNETT, G. L.; KEELE, J. W. Simulated influence of postweaning production system on performance of different biological types of cattle. III. Biological efficiency. *J. Anim. Sci.*, v. 73, p. 686-698, 1995.

Degradação miofibrilar e maciez do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos jovens de quatro grupos genéticos submetidos a dois períodos de maturação

RESUMO

O trabalho objetivou identificar por eletroforese as mudanças nas frações das proteínas musculares, separadas no período *post-mortem* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos (Nelore, TRC-Brahman, Brangus e TRC-Pardo), submetidos ao modelo biológico superprecoce, assim como determinar os valores da força de cisalhamento destas amostras. Foram utilizadas 12 amostras do músculo *Longissimus dorsi* por grupo genético. De cada uma delas foram retiradas duas fatias, uma foi refrigerada por 24 horas e a outra foi maturada por 7 dias a 2°C. As amostras submetidas a 7 dias de maturação não diferiram quanto à maciez da carne nos grupos genéticos, mas todas apresentaram maciez aceitável, o que pode ser explicado pela baixa idade ao abate destes animais. 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

Myofibrillar degradation and tenderness of *Longissimus dorsi* from young cattle of four genetic groups submitted to two periods of ageing

ABSTRACT

This study aimed to identify by means of eletrophoresis the changes in fractions of the muscular proteins, separated within the post-mortem period from cattle from four different genetic groups (Nelore, TRC- Brahman, Brangus and TRC- Pardo), submitted to the superprecoce biologic model, as well as to determine the values of those samples shear force. Twelve samples of the muscle *Longissimus dorsi* were used for each genetic group. From each of those there were taken two slices, one of them was kept cold along 24 hours and the other one was aged during 7 days at 2°C. The samples that came through a seven-day-ageing process didn't show any changes concerning the meat tenderness in the genetic groups, even though all of them had acceptable tenderness, which can be explained due to the low age of these animals when slaughtered. In the analysis of the eletrophoresis' bands, it was noticed some degradation of the myosin (MHC) and of the Troponin-T (TN-T) and the presence of the fragment of 30 kDa for all the genetic groups during the seven-day-ageing period.

Key-words: Proteolysis, meat, shear force, eletrophoresis, Muscle

INTRODUÇÃO

De todas as características de qualidade da carne, a maciez é considerada como o atributo mais importante pelo consumidor no retorno à compra de um corte (Koohmaraie et al., 2002). Estudos têm demonstrado que os consumidores estão dispostos a pagar mais por uma carne mais macia. Porém, um programa que possa assegurar carne com maciez garantida não é de tão simples aplicação (Koohmaraie et al., 2006).

A raça do animal tem um importante efeito na maciez da carne percebida sensorialmente. Carne menos macia tem sido associada com animais *Bos indicus* (Tompson, 1998; Miller, 2001; Dickeman, 2003). Porém, em alguns estudos verifica-se que a maciez pode ser melhorada por meio da maturação até mesmo para as raças não especializadas (Campo et al., 2000; Mónson et al., 2004; Sañudo et al., 2004). A utilização da maturação pode reduzir a força de cisalhamento (Campo et al., 2000), favorecendo, portanto, a maciez, resultado da proteólise miofibrilar, mediada pelas proteases cálcio dependentes.

A maturação da carne, que ocorre *post-mortem*, é resultado de uma série de eventos bioquímicos, que envolve principalmente o sistema enzimático das calpaínas, cuja finalidade é degradar a estrutura miofibrilar (Roncáles et al., 1995). A maior parte da maciez no músculo Longissimus dorsi pode ser explicada pelas mudanças nas proteínas miofibrilares, no período *post-mortem*. Assim, alguns métodos têm sido empregados no intuito de se identificar possíveis diferenças

nessas proteínas entre grupos de animais, ou entre animais de forma a melhor se identificar diferentes níveis de maciez. Nesse sentido, a eletroforese na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) tem se mostrado uma ferramenta valiosa na identificação e caracterização dessas mudanças (Clayes et al., 1995; Kolzack et al., 2003a; Sawdy et al., 2004). Esta técnica tem por finalidade evidenciar os padrões polimórficos das proteínas, dissociando suas cadeias polipeptídicas em cadeias simples e com cargas negativas, sendo possível determinar o peso molecular dos componentes protéicos do músculo, além de ser amplamente utilizada para análise qualitativa de proteínas e suas subunidades (Clayes et al. 1995).

É extensivamente reconhecido que diversas proteínas apresentam modificações em seu conteúdo e que muitas bandas de polipeptídeos aparecem na eletroforese (SDS-PAGE) das proteínas miofibrilares durante o período *post-mortem* nos músculos esqueléticos de diversas espécies animais (Negishi et al., 1996). Entre os produtos originados da degradação das dessas proteínas, o aparecimento da banda de 30 kDa é predominante e tem sido reportada por muitos pesquisadores como indicador da degradação miofibrilar e conseqüentemente da maior maciez da carne (Penny & Dransfield, 1979).

Este trabalho teve como objetivo enfocar e identificar mudanças no padrão eletroforético das proteínas miofibrilares durante a maturação do músculo *Longíssimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, submetidos ao modelo biológico Superprecoces e verificar as diferenças na maciez da carne

destes animais após 7 dias de maturação *post-mortem*, medidas pela força de cisalhamento do corte (WBS).

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Colheita de Amostras

Os animais utilizados neste trabalho pertenciam ao Confinamento Experimental do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Unesp – Botucatu, SP.

Quarenta e oito bovinos pertencentes a 4 grupos genéticos distintos (12 Nelore, 12 cruzados $\frac{1}{2}$ nelore $\frac{1}{2}$ Aberdeen-Angus x Brahman (TRC-Brahman), 12 Brangus, 12 cruzados $\frac{1}{2}$ nelore $\frac{1}{2}$ Aberdeen-Angus x Pardo (TRC-Pardo), foram desmamados aos sete meses de idade em sistema de comedouro privativo (creep feeding) e confinados até atingirem o peso de abate e terminação de carcaça estabelecidos pelo modelo biológico superprecoces, com aproximadamente 450 kg.

Estes animais foram abatidos no frigorífico Marfrig, localizado no município de Promissão, estado de São Paulo, sob Serviço de Inspeção Federal (SIF 2543). Antes do abate os animais foram pesados e receberam apenas dieta hídrica por 16 horas. O procedimento de abate seguiu as normas previstas pelo Serviço de Inspeção Federal. Os animais passaram por insensibilização com pistola pneumática. Em seguida, realizou-se a sangria, evisceração e toalete das carcaças dentro das normas estabelecidas pelo Departamento de Inspeção de

Produtos de Origem Animal (DIPOA). As carcaças foram divididas ao meio, pesadas individualmente e devidamente identificadas. Decorridas 24 horas de resfriamento, sob temperatura de 2°C, estas carcaças foram retiradas e se realizaram as colheitas de amostras para análises. Doze amostras de cada grupo genético, utilizadas no presente trabalho, foram escolhidas aleatoriamente, para serem utilizadas nas análises subseqüentes.

Após a identificação e embalagem as amostras foram congeladas a -20°C e transportadas ao Laboratório de Qualidade de Carnes, na Unesp de Botucatu.

Maturação e análise da força de cisalhamento do músculo *Longissimus dorsi*.

A maturação e as análises de força de cisalhamento foram executadas no Laboratório de Qualidade de Carnes do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da FMVZ, Unesp, Botucatu, SP.

Foram retiradas amostras de aproximadamente 2,5 cm de espessura obtidas entre a 11^a e 13^a costelas da meia carcaça esquerda de cada um dos animais para a realização do procedimento de maturação e análise da força de cisalhamento.

As amostras congeladas foram transferidas para um refrigerador e lá mantidas por aproximadamente 24 horas até atingirem temperatura de 2 a 5°C. Foram retiradas duas amostras por animal, uma foi embalada a vácuo e

submetida ao processo de maturação a aproximadamente 2°C por sete dias e a outra foi imediatamente submetida ao procedimento a seguir.

As amostras resfriadas foram assadas em forno elétrico até atingirem temperatura interna de 71°C, conforme procedimento desenvolvido por Wheeler et al. (1995). Após este processo, as amostras permaneceram resfriadas por 24 horas quando então, foi realizada a determinação da força de cisalhamento. Foram retirados oito cilindros de cada amostra a fim de se obter maior precisão nos dados. O aparelho utilizado nas análises foi um Warner-Bratzler Shear Force mecânico com capacidade de 25 kg e velocidade do seccionador de 20 cm/minuto. Após sete dias as amostras maturadas passaram pelo mesmo procedimento descrito acima.

Das amostras resfriadas e maturadas por sete dias, foram também retiradas amostras para a etapa seguinte.

Determinação da composição protéica do músculo esquelético (método adaptado de Clayer et al., 1995).

Isolamento das miofibrilas

As amostras, resfriadas por 24 horas e maturadas por sete dias, utilizadas nestas análises estavam embaladas em papel alumínio e congeladas a -80°C para evitar degradação indesejável das proteínas miofibrilares.

Aproximadamente 1g de amostra do músculo *Longissimus dorsi* de cada um dos animais em estudo, livre de gordura e tecido conjuntivo, foi homogeneizada em 10 mL de tampão de lise (50mM de Tris-HCl, 0,25 M de sacarose, 1mM de EDTA) usando um microtritador Ultra-Turrax com haste de cisalhamento (Marconi – MA 102/E).

Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 1000 xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* ressuspensionado em 10 mL de nova solução de isolamento (50 mM de TRIS-HCl, 1 mM de EDTA) e levado novamente a centrifuga a 1000 xg por 10 minutos a 4°C.

A seguir, o sobrenadante foi novamente descartado; as miofibrilas foram ressuspensionadas em 10 mL de solução de KCl (0,15 mM), levando-se os tubos novamente a centrifuga por 10 minutos a 1000 xg e 4°C.

Preparação das amostras

Após descartar o sobrenadante, as miofibrilas isoladas (0,9 g) foram dissolvidas em 12 mL de uma quarta solução (10 mM de Imidazol-HCL, 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e 2% de β -mercaptoetanol). Após isto, os tubos contendo as miofibrilas dissolvidas foram tampados e deixados durante 24 horas em RT. O pellet formado foi, então, ressuspensionado. Cada uma das amostras foi filtrada em lã de vidro siliconizada e o conteúdo de cada tubo (12 mL) foi, ao final do procedimento aliqotado em um tubo de 10 mL para realização da

quantificação pelo método de Micro-kjeldahl e em 2 tubos de 1 mL cada para serem usados na corrida eletroforética. Os três tubos devidamente identificados foram congelados a -20°C até sua utilização.

Determinação da proteína pelo método Micro-Kjeldahl (1972)

O nitrogênio presente nos organismos encontra-se principalmente na forma de aminoácidos, nas proteínas, numa proporção média de 16%. Determinando-se o teor de nitrogênio de uma amostra, foi obtido através de cálculos, o teor de proteína da mesma.

Para a quantificação de nitrogênio total foi utilizado o método de Micro-Kjedahl (adotado por Clayes et al., 1995). Este método foi escolhido, pois o SDS e o β -mercaptoetanol presente nas amostras interferem nos resultados de quantificação por outros métodos como o do Macro-Biureto. Foram utilizados 5 mL de solução de cada amostra das miofibrilas previamente isoladas em tubo de digestão, devidamente numerados em duas repetições, contendo 0,8 g de mistura digestora (1 g de Na_2SeO_3 ; 5 g CuSO_4 ; 76,71 g de Na SO_4 triturados em graal de porcelana) e 4,0 mL de H_2SO_4 concentrado. Os tubos permaneceram durante a noite em RT para a digestão a frio e posteriormente foram colocados em bloco digestor até atingirem a temperatura de 400°C (digestão a quente).

Procedida a digestão foram adicionados aos tubos 10 mL de água destilada e 10 mL de ácido bórico com indicador (20 g de ácido bórico, 800 mL de água

destilada, 6,0 mL de solução alcoólica de vermelho de metila 0,1% e 15 mL de solução alcoólica de verde de bromofenol 0,1%, completados com água destilada para 1000 mL) e realizou-se, então, a destilação da amostra com aproximadamente 10 mL de NaOH 15N, recolhendo-se ao final aproximadamente 30 mL do destilado. Após a destilação as amostras foram resfriadas em RT e tituladas com H₂SO₄ 0,05N padronizado (fator 0,04494). Procedida à titulação, foram realizados os cálculos das concentrações de proteína da seguinte forma:

$$\text{Mg de proteína/ mL} = \frac{(VAC - BR) \cdot x \cdot N \cdot x \cdot 14 \cdot x \cdot 6,25}{VAM} \quad \text{onde:}$$

VAC= Volume do ácido sulfúrico concentrado

BR= Valor do Branco

N= Fator do ácido sulfúrico

VAM= volume da amostra

Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (Laemmli, 1970)

Após o isolamento e quantificação das miofibrilas, procedeu-se a eletroforese na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), para verificação da proteólise miofibrilar das frações separadas das proteínas.

Foram empregados no presente estudo géis de poliacrilamida compostos de duas partes, o gel concentrador ou empilhador a 4% de concentração (10 mL

água Milli-Q, 3 mL de Tris (1,5mM pH 6,8), 3 mL de acrilamida/Bis (30:0,8) e 2,5 mL de riboflavina) e gel fracionador ou separador a 10% (16,4 mL de Água Milli-Q, 3 mL de Tris (1,5mM pH 8,8), 10 mL de acrilamida/Bis (30:0,8), 200 µL de Persulfato de Amônio a 10%, 200 µL de SDS a 10% e 60 µL de temed).

Para composição dos moldes dos géis utilizados na eletroforese, duas placas de vidro de 14 cm x 16 cm x 0,10 cm foram justapostas, separadas por espaçadores laterais. Este conjunto foi então embalado em saco plástico e mantido por presilhas para conter os géis.

Terminada a montagem dos moldes, procedeu-se à preparação e aplicação dos géis na placa da seguinte forma: o gel separador foi aplicado até uma altura suficiente para o encaixe do pente e aplicação do gel empilhador. Após isso, aplicou-se aproximadamente 3mL de água destilada para evitar contato do gel com o oxigênio, evitando irregularidades na superfície do gel e a formação de bolhas. Após a polimerização do gel separador o pente foi colocado no topo dos moldes e em seguida, aplicou-se o gel empilhador. Completada a polimerização deste gel sob luz ultravioleta, o pente foi retirado e procedeu-se a lavagem dos poços formados com água deionizada. Após isso foi aplicado o tampão eletrodo, para posterior corrida eletroforética. As proteínas solubilizadas foram padronizadas em 4,0 mg de proteína/mL de solução e receberam uma solução carregadora preparada pela adição de sacarose a 15% (para aumentar a densidade da solução) e 0,3 mL de azul de bromofenol (como marcador de migração para SDS-PAGE). Após esta preparação cada amostra foi aplicada nos poços do gel. Para a identificação do peso molecular das proteínas de interesse,

foi adicionado no primeiro poço do gel um padrão de peso molecular (Kaleidoscope, Biorad). A eletroforese processou-se de acordo com os seguintes parâmetros: 100V, 10 mA e 10 W, durante aproximadamente 6 horas. Após a eletroforese o gel foi colocado em solução corante (comassie blue - R250 em solução de ácido acético conforme instruções do fabricante) por aproximadamente 3 horas. A seguir, o corante foi retirado e o gel foi imerso em solução descorante (água/metanol/ácido acético 1:3:6, V/V) até a completa revelação das bandas protéicas no gel.

Análise das imagens

A captação das imagens das bandas foi realizada por meio de um equipamento de foto-documentação (VDS) para se identificar as mudanças na estrutura das proteínas miofibrilares. Os géis foram analisados utilizando o programa para análise de imagens *Image Máster 3D Prime & Elite*.

Para análise das bandas, os géis foram digitalizados empregando-se o Software Image Máster, sendo as imagens editadas pelo Software Adobe Photopoint 5.0. Na eletroforese foram analisadas as mobilidades relativas de acordo com os pesos moleculares, que identificam as frações separadas.

Os valores da contribuição relativa de cada banda no gel, obtidos das análises das imagens, foram submetidos, posteriormente, a análises estatísticas para verificação da significância das mudanças.

Análise estatística

Os resultados obtidos para as características em estudo foram analisados por meio do procedimento GLM do SAS (1996), onde foi empregada a estatística descritiva para se avaliar a intensidade da proteólise nos diferentes grupos genéticos e nos dois períodos de maturação. O delineamento experimental utilizado para as análises foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 4, considerando-se nas análises os efeitos dos dois tempos de maturação (1 e 7 dias) e quatro grupos genéticos (Nelore, TRC-Brahman, Brangus, TRC-Pardo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os valores médios da força de cisalhamento dos cortes dos animais dos quatro grupos genéticos, submetidos a sete dias de maturação.

Tabela 1. Valores médios da força de cisalhamento de amostras dos animais Nelore, TRC-Brahman, Brangus e TRC-Pardo, maturadas por 7 dias.

Grupo genético	Valores da força de cisalhamento (kg)
Nelore	3,50 ^a
TRC-Brahman	3,75 ^a
Brangus	3,15 ^a
TRC-Pardo	3,50 ^a

a, Médias seguidas por letras iguais, não diferem entre si ($P > 0,01$) pelo teste Tukey.

Não foram encontradas diferenças significativas na maciez da carne, medida pela análise da força de cisalhamento. Tal fenômeno discorda da observação de vários autores que têm observado diferenças na maciez de diferentes grupos genéticos. Jonhson et al. (1990), trabalhando com cruzados Aberdeen-Angus e Brahman, observaram diminuição da maciez e aumento na força de cisalhamento na carne dos animais com o aumento da porcentagem de zebuíno no cruzamento. Estes autores observaram também que a maciez da carne, com porcentagem variando de 0 a 25% de Brahman submetida à maturação teve melhora mais acentuada que as com mais de 50% Brahman. Contudo, em estudo realizado por Campo et al. (2000) a maturação teve efeito mais importante no amaciamento que a raça. Porém, outros fatores relacionados aos grupos genéticos, tais como a composição do tecido conjuntivo, podem afetar de forma significativa a textura da carne. Além de diferenças genéticas na atividade enzimática e bioquímica do músculo e conteúdo de colágeno, existem também diferenças quanto à gordura intramuscular e tipos de fibras presentes no músculo de grupos genéticos distintos (Kolczak et al., 2003a).

A falta de diferença na maciez da carne dos diferentes grupos deste estudo pode ser explicada, provavelmente, pela baixa idade em que esses animais foram abatidos, assim como verificado por outros autores (May et al., 1993; Purchas et al., 2002). Por causa do sistema de terminação em que foram criados, mesmo animais de grupos genéticos extremos, apresentaram características de carcaça bastante semelhantes. Este fato pode ser atribuído às poucas variações encontradas na curva de crescimento corporal dos animais quando abatidos ainda

jovens (Cundiff et al., 1993). Por este mesmo motivo, a maturação por apenas 7 dias apresentou resultados de maciez satisfatória, medidos pela força de cisalhamento, o mesmo verificado por Morales (2004), com bovinos superprecoces, Nelore e mestiços $\frac{1}{2}$ Nelore $\frac{1}{2}$ Brahman. Além disso, neste estudo não foram encontradas diferenças significativas entre os valores de maciez de 7 para 14 dias. O menor tempo de maturação, por sua vez resulta em retorno mais rápido para a indústria da carne, além de economia de energia e espaço físico para o armazenamento, possibilitando assim maior circulação dos produtos. Tais observações demonstram a importância da adoção de tecnologias que favoreçam a menor idade dos animais ao abate para melhora na maciez da carne desses animais.

Para identificação das frações separadas das proteínas miofibrilares, realizou-se a eletroforese. A Figura 1 mostra oito linhas representativas do padrão eletroforético das proteínas miofibrilares do músculo *Longissimus dorsi* dos quatro grupos genéticos estudados, após 24 horas de resfriamento e 7 dias de maturação. Esta mostrou de 22 a 27 bandas.

Das análises densitométricas, obteve-se a porcentagem relativa de cada banda no gel. Os valores do conteúdo das proteínas miofibrilares são mostrados na Tabela 2.

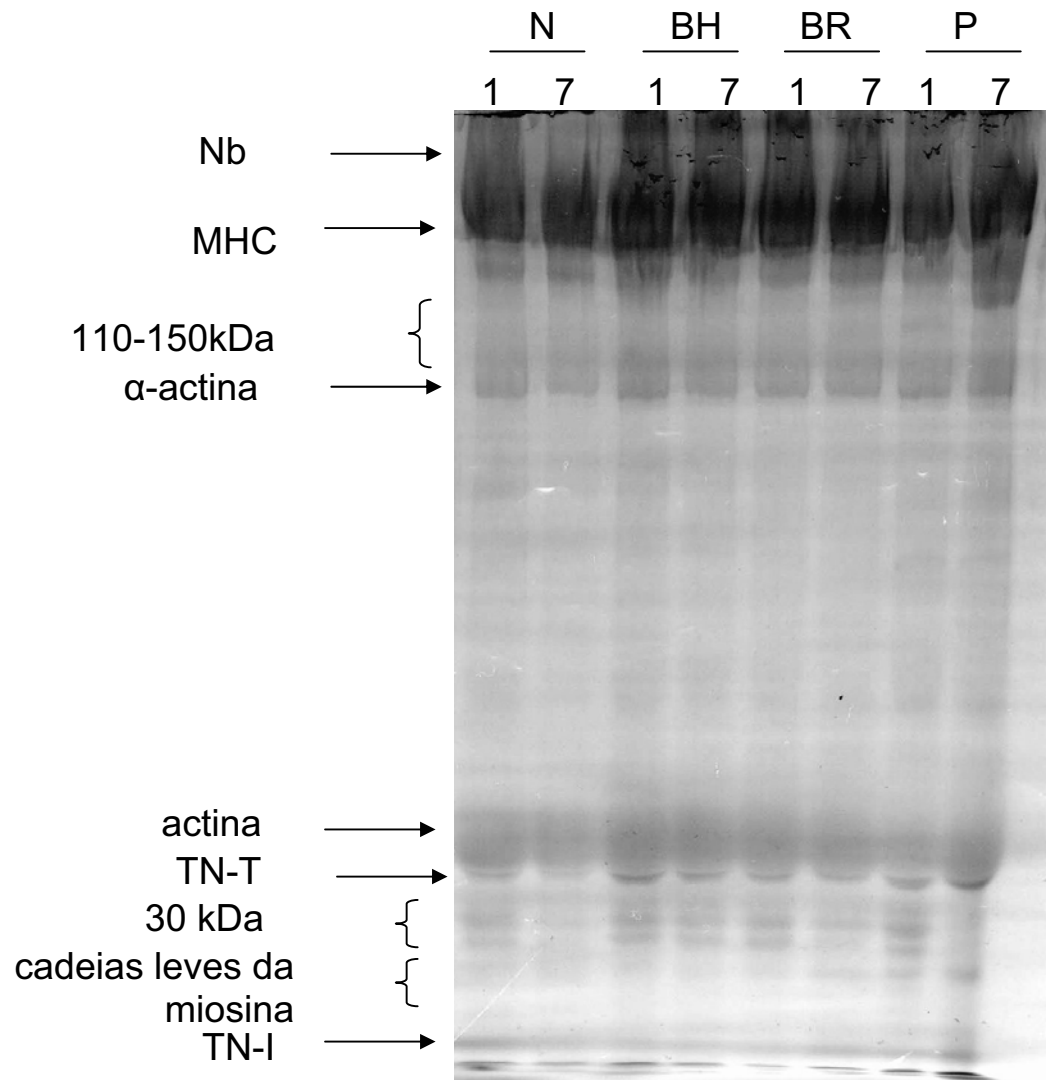


Figura 1. Eletroforese em SDS-PAGE (10%) das proteínas miofibrilares do músculo *Longissimus dorsi* de Bovinos de quatro grupos genéticos resfriadas por 24 horas e maturadas por sete dias.

Tabela 2. Mudanças no conteúdo das proteínas (% do total das proteínas) miofibrilares, actina, α -actina, miosina (cadeia pesada - MHC), troponina-T (TN-T), troponina-I (TN-I), e da banda de aproximadamente 30kDa do músculo *Longissimus dorsi* dos animais Nelore, TRC-Brahman, Brangus e Pardo, refrigeradas por 24 horas e maturadas por 7 dias.

Proteínas	Grupos Genéticos	Tempos de Maturação		Médias
		1	7	
MHC	Nelore	47,05	41,73	44,40 A
	TRC-Brahman	49,17	37,95	43,56 AB
	Brangus	48,75	43,67	46,21 A
	TRC-Pardo	40,15	35,33	37,74 B
	Médias	46,29 a	39,67 b	
α - actina	Nelore	4,88	5,54	5,21 A
	TRC-Brahman	5,98	6,12	6,05 A
	Brangus	5,58	5,94	5,76 A
	TRC-Pardo	5,22	5,58	5,40 A
	Médias	5,42 a	5,80 a	
actina	Nelore	10,39	10,23	10,32 A
	TRC-Brahman	11,79	10,57	11,18 A
	Brangus	9,87	10,82	10,35 A
	TRC-Pardo	11,23	11,68	11,46 A
	Médias	10,82 a	10,83 a	
TNT-T	Nelore	2,57	2,09	2,33 A
	TRC-Brahman	3,07	2,35	2,71 A
	Brangus	3,11	2,63	2,87 A
	TRC-Pardo	3,13	2,53	2,83 A
	Médias	2,97 a	2,40 a	
30 kDa	Nelore	0,19	0,74	0,47 A
	TRC-Brahman	0,68	1,26	0,97 A
	Brangus	0,85	1,03	0,95 A
	TRC-Pardo	0,87	1,23	1,05 A
	Médias	0,65 a	1,07 b	
TN-I	Nelore	4,88	5,54	5,21 A
	TRC-Brahman	5,98	6,12	6,05 A
	Brangus	5,58	5,94	5,76 A
	TRC-Pardo	5,22	5,57	5,40 A
	Médias	5,41 a	5,80 a	

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente quanto aos grupos genéticos e letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente quanto aos tempos de maturação ($P>0.05$) pelo teste Tukey. Tempos de maturação (dias)

Como tem sido relato há muito tempo por diversas pesquisas, a proteína miosina parece não sofrer degradação post-mortem à 4° C até após 56 dias de

maturação (Bandman & Zdanis, 1988; Yates et al., 1983). Estes estudos sugeriram que a falta de proteólise da cadeia pesada da miosina (MHC) foi parcialmente devido à baixa atividade enzimática em temperaturas resfriadas. Contudo, verificou-se no presente estudo, diferenças no conteúdo da miosina. O mesmo relatado por Sawdy et al. (2004), também em estudo com animais jovens, confirmando os resultados obtidos na eletroforese, com análises de “immunoblot” e espectrometria de massa. As diferenças na cadeia pesada da miosina podem ter ocorrido enquanto a carcaça estava relativamente morna e a atividade das enzimas do sistema das catepsinas é alta.

Diferenças quanto ao conteúdo da miosina (MHC) foram observadas com relação ao grupo TRC-Pardo. Este grupo apresentou menor conteúdo de miosina em relação aos outros grupos de maior porcentagem de zebu em sua constituição. Isto pode estar relacionado a diferenças no conteúdo protéico e atividade das enzimas proteolíticas deste grupo genético, além da composição dos tipos de músculos da carcaça desses animais e de diferenças de isoformas de miosina.

Não foi observada qualquer mudança no conteúdo da α -actina após a maturação. Tal observação pode ser explicada, pois pouca ou nenhuma degradação desta proteína é verificada durante a estocagem *post-mortem*. As catepsinas degradam a actina e miosina, além da estrutura dos discos Z a 37°C e liberam a α -actina intacta (Taylor et al., 1995).

A actina não degradou durante o período *post-mortem*, como tem sido verificado por vários estudos (Takahashi, 1992, Bandman & Zdanis, 1988). Esta observação pode contribuir em modelos de associação entre a proteólise

obtida pela eletroforese e a maciez do corte. Neste sentido, Sawdy et al. (2004) relacionando a contribuição relativa de diferentes bandas da eletroforese com a maciez obtida pela força de cisalhamento, retiraram a contribuição da banda referente à actina do modelo de regressão. Como esta proteína parece não sofrer qualquer mudança e por sua alta densidade ótica, sua retirada pode auxiliar na identificação de outras bandas menores que podem influenciar significativamente a maciez da carne.

Não foram encontradas diferenças significativas quanto ao conteúdo da troponina T (TN-T) durante o período de maturação em nenhum dos grupos genéticos. Apesar disto, verifica-se com a maturação, que o conteúdo da TN-T teve leve diminuição e devido à degradação desta proteína, polipeptídeos de aproximadamente 30 kDa aparecem (Negish et al., 1996). É provável que estas mudanças no conteúdo da TN-T, possam estar relacionadas às mudanças que ocorrem na estrutura do músculo, tais como o aumento no comprimento do sarcômero, principalmente devido ao alargamento das bandas-I e também algumas mudanças na banda-A (Kolczak et al., 2003b).

Mesmo nas amostras que não foram maturadas por sete dias o fragmento de 30 kDa apareceu, e se intensificou com o período de maturação em todos os grupos genéticos. Menor aparecimento antes da maturação foi verificado para os animais Nelore. Porém, após 7 dias a deposição deste fragmento se assemelhou à dos outros grupos.

A degradação da TN-T durante a maturação dos músculos tem sido associada com o aumento da maciez da carne por diversos anos (MacBride & Parrish, 1977; Parrish, 1977; Penny & Dransfield, 1979). Como tem sido

documentado e observado em vários músculos independentemente da espécie animal (Koohmaraie et. al., 1984; Negish et al., 1996; Pospiech et al., 2001). Esta banda parece ser mais um indicador da maciez que um causador, como relatado por Whipple et al. (1990), em um estudo buscando explicar as causas das diferenças de velocidade de amaciamento dos músculos *Longíssimus dorsi* e *Semitendinosus* de novilhos europeus puros e seus cruzamentos com a raça Sahiwal. Estes autores verificaram que a banda de aproximadamente 30 kDa não apareceu nos animais com maior porcentagem de Sahiwal, característica das carnes que sofreram maturação (Goll et. al., 1983; Koohmaraie, 1988). Além disso, observaram também nestes animais proteólise reduzida e carne mais dura.

Devido à falta de diferenças na maciez medida pela análise da força de cisalhamento dos quatro grupos genéticos estudados, não houve possibilidade de se associar algum efeito das diferenças da proteólise observada na eletroforese com maciez da carne no presente estudo.

A análise densitométrica das bandas das cadeias leves da miosina foi problemática, devido à proximidade dessas duas cadeias e do grande número de bandas que apareceram nesta região após a maturação (produtos da proteólise durante a maturação).

Apesar de visível em todos os géis deste estudo, a banda da troponina-I alcançou níveis muito altos em alguns géis, o que pode ser explicado por sua proximidade com o final do gel. Desta forma, ela se confunde na análise densitométrica com a frente de corrida, o que pode ter atrapalhado sua correta quantificação.

Como a abordagem aqui adotada para se medir a proteólise considera apenas os pesos moleculares das proteínas ou polipeptídeos de interesse, pode ter ocorrido numa mesma banda a presença de diferentes frações protéicas com o mesmo peso molecular (co-migração), principalmente das proteínas de menor peso. Assim, com a intensificação no aparecimento dos produtos de degradação, à medida que se aumenta o tempo de maturação e conseqüentemente a degradação miofibrilar, pode-se estar subestimando a taxa de degradação total aos sete dias de maturação. Uma alternativa seria a complementação da eletroforese com o uso da Isoeletrofocalização (IEF) ou mesmo a eletroforese bidimensional. Assim, além da separação das proteínas por peso molecular, teremos também sua separação por pontos isoelétricos, o que pode proporcionar, maior compreensão das mudanças estruturais e da taxa de proteólise com o aumento do tempo de maturação.

CONCLUSÕES

O período de sete dias de maturação resultou em carne com maciez aceitável, não sendo observadas diferenças para esta característica entre os grupos genéticos estudados.

Mudanças ocorrem no conteúdo da cadeia pesada da Miosina durante a maturação. O mesmo ocorre com a Troponina-T das proteínas miofibrilares. Sua proteólise está relacionada com o aumento dos produtos de degradação ao redor de 30 kDa.

A maturação tem efeito importante nas mudanças das proteínas miofibrilares, o que pode ser notado pela degradação e surgimento de várias bandas no gel relacionadas à maciez, e confirmado pelos valores da força de cisalhamento aos sete dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDMAN, E.; ZDANIS, D. An immunological method to assess protein degradation in post-mortem muscle. **Meat Sci.**, v. 22, p. 1-19. 1988.

CAMPO, M. M.; SANTOLARIA, P.; SÁNUDO, C. LEPETIT; J. OLLETA, J.L. Assessment of breed type and ageing time effects on beef meat quality using two different texture devices. **Meat Sci.**, v. 55, p. 371-378, 2000.

CLAYES, E.; UYTTERHAEGEN, BUTS, B.; DEMEYER, D. Quantification of beef myofibrillar proteins by SDS-PAGE. **Meat Sci.**, v. 39, p. 177, 1995.

CUNDIFF, L. V.; KOCH, R. M.; GREGORY, K. E.; CROUSE, J. D. **Characteristics of diverse breeds in Cycle IV of the cattle germoplasm evaluation program.** (Beef Research Progress Rep., 4), USDA, ARS, Clay Center: USDA, ARS, 1993.

DIKEMAN, M. E. Carcass composition and quality of finished crossbred Brahman cattle. In: Proceedings King Workshop. **Arkansas Agric. Exp. Sta. Special Rep.**, n.167, p.77-88, 2003.

GOLL, D.E.; OTSUKA, Y.; NAGAINIS, P. A. Role of muscle proteinases in maintenance of muscle integrity and mass. **J. Food Biochem.**, v. 7, p.137-177, 1983.

JONHSON, D. D.; HUFFMAN, R. D.; WILLIAMS, S. E.; HARGROVG, D. D. Effects of percentage Brahman and Angus breeding, age-season of feeding and slaughter end pont ont meat paltability and muscle characteristics. **J. Anim. Sci.**, v. 68, p. 1980-1986, 1990.

KOLCZAK, T.; POSPIECH, E.; PALKA, LACKI, J. Changes in structure of psoas major and minor and semitendinosus muscles of calves, heifers and cows during post-mortem ageing. **Meat Sci.**, v.64, p. 77-83, 2003a.

KOLCZAK, T.; POSPIECH, E.; PALKA, K.; LACKI, J. 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 Sci.**, v. 64, p 69-75. 2003b.

KOOHMARAIE, M. The role of endogenous proteases in meat tenderness. **Proc. Recip. Meat Conf.**, v. 41, p. 89, 1988.

KOOHMARAIE, M.; KEENNICK, W. H.; ANGLEMIER, A. F.; ELGASIM, E. A.; JONES, T. K. Effect of postmortem storage on muscle protein degradation: analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Food Sci.**, v. 49, p. 292-293, 1984.

KOOHMARAIE, M.; KENT, M. P.; SHAKELFORD, S. D., et al. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Sci.**, v. 62, p. 345-352, 2002.

KOOHMARAIE, M, GEESINK, G. H. Contribution of post-mortem biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Science**, 2006. (aceito para publicação)

MAY, S. G.; MIES, W. L.; EDWARDS, J. W.; WILLIAMS, F. L.; WISE, J. L.; WISE, J. W.; MORGAN, J. B.; SAVELL, J. W.; CROSS, H. R. Beef carcass composition of slaughter cattle differing in frame size, muscle score, and external fatness. **J. Anim. Sci.**, v. 70, p. 2431, 1993.

MILLER, M. F.; CARR, M. F.; RAMSEY, C. B. Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. **J. Anim. Sci.**, v. 79, p. 3062-3068, 2001.

MACBRIDE, M. A.; PARRISH, F. C. Jr. The 30.000 dalton component of tender bovine longíissimus muscle. **J. Food Sci.**, v. 42, p. 1627, 1977.

MORALES, D. C. **Estudo da protólise miofibrilar e das características de qualidade de carne de bovinos Bos indicus submetidos ao modelo biológico superprecoce**. 2004. 60f.Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

MÓNSON, F; C.; SAÑUDO, C.; SIERRA, I. Influence of cattle breed and ageing time on textural met quality. Influence of cattle breed and ageing time on textural meat quality. **Meat Sci.**, v. 68, p. 595-602, 2004.

NEGISH, H.; YAMAMOTO, E.; KUTAWA, T. The origin of the 30 kDa component appearing during post-mortem ageing of bovine muscle. **Meat Sci.**, v. 42, p. 289-303, 1996.

PARRISH JUNIOR, F. C. Skeletal muscle tissue disruption. **Proc Rec. Meat. Conf.**, v. 30, p. 87-98, 1977.

PENNY, I. F.; DRANSFIELD, E. The relationship between toughness and troponin-T in conditioned beef. **Meat Sci.**, v. 3, p. 135-138. 1979.

POSPIECH, E.; SAZLATA, M.; VAN LAACK, R.L.J.M., SÓSNICKI, A. A.; GREASER, M. L. Tenderness and protein changes of pork in relation to pig genotype and postmortem glycolysis phenotype. ICoMSY, Kraków, 47., 2001, Poland, **Anais...** Kraków, 2001. p. 38-43.

PURCHAS, R. W.; BURNHAM, D. L.; MORIS, S. T. Effects of growth potential and growth path on tenderness of beef longissimus muscle from bulls and steers. **J. Anim. Sci.**, v. 80, p. 3211-3221, 2002.

RONCÁLES P.; GESSINK, G. H.; VAN LAACK, R. L. ET AL. Meat tenderization: Enzynatic mechanisms. In: Ouali, A.; Demeyer, D. I.; Smulders, J. M. **Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradations related to meat quality**. Utrecht: ECCEAMST, 1995. p. 311-332.

SAÑUDO, C.; MACIE, E.S.; OLLETA, J.L.; VILLARROEL, M.; PANEA, B.; ALBERTI, P. **Meat Sci.**, v. 66, p. 925-932, 2004.

SAWDY, J. C.; KAISER, S. A.; ST.PIERRE, N. R.; WICK, M. P. Myofibrillar 1-D fingerprints and myosin heavy chain MS analyses of beef loin at 36h postmortem correlate with tenderness at 7 days. **Meat Sci.**, v.67, p.421-426, 2004.

SAS INSTITUTE INC. **Sas Users Guide**. 5. ed. Cary: SAS,1996. 956p.

SILVA SOBRINHO, A. G. Características de qualidade da carne de ovinos de diferentes genótipos e idades ao abate. **Rev. Bras. Zootec.**, v.34, n.3, p.1-19, 2005.

TAKAHASHI, K. Structural weakening of skeletal muscle tissue during post-mortem ageing of meat: the non-enzymatic mechanism of meat tenderization. **Meat Sci.**, v. 40, p. 415-423, 1992.

TAYLOR, R. G.; GEESINK, G. H.; THOMPSON, V. F.; KOOHMARAIE, M.; GOLL, D. E. Is Z-Disk degradation responsible for *post-mortem* tenderization? **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 1351-1367, 1995.

THOMPSON, J. M. **Grading**: The Meat Standards Austrália (MAS)

Experience. Armidale: Armidale Feeder Steer School, 1998.

VILELA, F. L.; BRITO, R. A. M.; EUCLIDES, K. F. **O mercado da carne**. 2005. Disponível em: < [http:// www.cnpqg.embrapa.br/publicações](http://www.cnpqg.embrapa.br/publicações) >. Acesso em: 28 nov. 2005.

YATES, L. D.; GREASER, M. L. Quantitative determination of myosin and actin in rabbit skeletal muscle. **Journal of Molecular Biology**, v. 168, p. 123-141, 1983.

WHEELER, E.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. **Standardized Warner-Bratzler Shear Force Procedures for Meat tenderness measurement**. Roman L. Hruska U.S., 1995.

WHIPPLE, G.; KOOHMARAIE, M. E.; DIKEMAN, M. E.; CROUSE, J. D. Evaluation of attributes that affect Longissimus muscle tenderness in Bos Taurus and Bos indicus cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 68, p. 2716-2728, 1990.

Perfil protéico do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos superprecoces de quatros diferentes grupos genéticos

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estudar o padrão de migração das proteínas miofibrilares relacionadas com o processo de amaciamento da carne no período *post-mortem* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos (Nelore, TRC-Brahman, Brangus, TRC-Pardo), empregando-se duas técnicas eletroforéticas distintas. Tanto a técnica denaturante, como a não denaturante foram efetivas na resolução de diferentes apresentações das proteínas em questão, visto as diferenças dos pesos moleculares encontrados. O comportamento das proteínas evidenciadas em ambas as técnicas pode ter correlação com o aumento da maciez almejada no processo de maturação, já que a literatura as relaciona nesse sentido. Diferenças observadas nos padrões eletroforéticos inter-grupos podem ser decorrentes da composição genética, constituindo um polimorfismo protéico genético-bioquímico, o qual deve ser melhor abordado em futuros trabalhos nessa área.

Palavras Chave: *Longíssimus dorsi*, componentes miofibrilares, eletroforese nativa, SDS-PAGE, maturação.

**Proteic portrait of the muscle *Longissimus dorsi* of superprecoces
bovine from four different genetic groups**

ABSTRACT

This research aimed to study the degradation pattern of the myofibrillar proteins related to the meat tenderness process within the post-mortem period from cattle of four different genetic groups (Nelore, Brangus, TRC-Brahman, TRC-Pardo), by the means of two distinct eletrophoretic techniques. Either the denaturing and the non-denaturing technique were effective in the resolution of the different displaying of the mentioned proteins, due to the differences in the molecular weights found. The behavior of the proteins in evidence in both techniques may have correlation with the increase of the desired tenderness in the ageing process, as literature relates so. Differences noticed in the eletrophoretic inter-groups patterns may be consequences of the genetic composition, constituting a genetic bio-chemical proteic polymorphism, which should be better approached in future researches in this field.

Key-words: *Longíssimus dorsi*, myofibrillar components, native eletrophoresis, SDS-PAGE, ageing.

INTRODUÇÃO

Para os consumidores o aspecto de qualidade mais importante a ser considerado no retorno à compra da carne é a maciez. Este fato pode ser confirmado ao se observar a relação entre a maciez e o preço do corte (Koohmaraie et al., 2002). Porém, boa parte das diferenças que ocorrem na maciez da carne pode ser explicada pelo grupo genético do animal, pela idade ao abate e pelas diferenças na expressão das proteínas durante o processo de maturação, visto que o amaciamento, que ocorre *post-mortem*, é resultado de uma série de eventos, que envolvem um sistema enzimático cuja finalidade é degradar a estrutura miofibrilar.

Alguns métodos têm sido empregados, atualmente, para se determinar o grau de proteólise sofrida pelas proteínas miofibrilares. Um dos métodos mais eficientes neste sentido é a eletroforese denaturante na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE), que tem por finalidade evidenciar os padrões polimórficos das proteínas, dissociando suas cadeias polipeptídicas em cadeias simples e com cargas negativas, sendo possível determinar o peso molecular das proteínas do músculo, além de ser amplamente utilizada para análise qualitativa de proteínas e suas subunidades e tem demonstrado ser um método eficaz para a determinação das mudanças que ocorrem no período *post-mortem* na carne (Clayes et al. 1995). Uma variação deste método consiste na realização do fracionamento eletroforético sem o tratamento térmico das amostras, na ausência do β -Mercaptoetanol. Desta maneira mantém-se a estabilidade das proteínas, através da manutenção das pontes de dissulfeto (S-

S), evitando-se a ruptura em cadeias. A presença do detergente (SDS) na solução carregadora recobre as moléculas de proteínas com cargas negativas, havendo, portanto a separação em função do peso molecular. Esta técnica recebe o nome de fracionamento eletroforético em SDS não redutor e não denaturante.

Tem sido demonstrado que alguns componentes da miofibrila mudam durante o período *post-mortem* dos animais, incluindo as proteínas Titina, Nebulina e a Troponina, resultando muitas 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 na eletroforese denaturante em SDS-PAGE à medida que se aumenta o tempo de maturação da carne (Negish et.al., 1996). Entretanto, outras proteínas podem sofrer mudanças em seu conteúdo no processo de maturação, participando das reações bioquímicas que ocorrem na carne no período *post-mortem*, podendo ter interesse comercial ou mesmo acadêmico.

A proposta do presente trabalho é desenvolver uma análise descritiva das alterações quantitativas na composição em proteínas, íntegras e quebradas em suas subunidades em amostras do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de quatro grupos genéticos, submetidos a sete dias de maturação e resfriadas por 24 horas *post-mortem*, empregando-se duas técnicas eletroforéticas na presença de SDS (Hames & Rickwood, 1990).

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Colheita de Amostras

Os animais utilizados neste trabalho pertenciam ao Confinamento Experimental do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu, SP.

Quarenta e oito animais pertencentes a 4 grupos genéticos distintos: 12 Nelore, 12 TRC-Brahman (1/2 Nelore 1/2 Angus x Brahman), 12 Brangus e 12 TRC-Pardo (1/2 Nelore 1/2 Angus x Pardo) foram desmamados aos sete meses de idade em sistema de comedouro privativo (creep feeding) e confinados até atingirem o peso de abate e terminação de carcaça estabelecidos pelo modelo biológico superprecoce, com aproximadamente 450 kg.

Estes animais foram abatidos no frigorífico Marfrig, sob serviço de inspeção federal (SIF 2543). O procedimento de abate seguiu as normas previstas pelo Serviço de Inspeção Federal. Após o abate, as carcaças foram divididas ao meio, pesadas individualmente e devidamente identificadas. Decorridas 24 horas de resfriamento, sob temperatura de 2°C, estas carcaças foram retiradas e se realizaram as colheitas de amostras para as análises. Doze amostras de cada grupo foram escolhidas aleatoriamente para serem utilizadas nas análises subseqüentes.

De cada animal foram retiradas duas fatias do músculo *Longissimus dorsi*; uma foi submetida à maturação a 2°C por sete dias e a outra não passou por este processo. As amostras foram, então, congeladas à -80°C até as análises seguintes.

Determinação do perfil protéico do músculo esquelético

Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (Laemmli, 1970)

As amostras estavam embaladas em papel alumínio e acondicionadas em câmara de congelamento à -80°C para evitar a degradação miofibrilar. Imediatamente após a retirada da câmara, cada uma delas foi pesada em balança de precisão e transferidas para um graal onde se adicionou água (1:1).

A extração consistiu de se juntar 400 µg de amostra em 400 µl de água sob refrigeração por alguns minutos, sendo cada uma macerada manualmente, e em seguida centrifugadas a 10.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos em centrífuga refrigerada à 2°C. O sobrenadante foi retirado e acondicionado em microtubos para posterior diluição e utilização na corrida eletroforética.

As amostras foram reunidas em lotes de acordo com a classificação racial (Nelore, TRC-Brahman, Brangus e TRC-Pardo-Suiço) dentro dos tempos de resfriamento (24 horas e 7 dias), formando amostras compostas.

A eletroforese foi realizada no sistema vertical Mini Protean 3 (BioRad) em géis de poliacrilamida na concentração de 13%, para separar proteínas com peso molecular variando de 15 a 205 kDa. O gel foi preparado contendo água Milli-Q (4,6 mL), 1,5 mM Tris, pH 8,8 (1,0 mL), 30:0,8 acrilamida/bis (4,3 mL), Persulfato de Amônio a 10% (67 uL), SDS a 10% (100 uL) e TEMED (8 uL).

As amostras assim formadas foram diluídas a 1:4 na seguinte solução: água Milli-Q (10,4 mL), 0,5 mM Tris, pH 6,8 (1,9 mL), Glicerol (1,9 mL), SDS a 10% (1,0mL), β -mercaptoetanol (0,5 mL) e azul de Bromofenol a 1% e super-aquecidas para desnaturação das proteínas, por 90 segundos. Na técnica não redutora, a solução foi preparada empregando-se os mesmos componentes, com exceção do Mercaptoetanol, não passando pelo processo de desnaturação.

Os géis foram montados entre placas de vidro (10 cm x 8 cm x 0,075cm) com o pente colocado no topo do mesmo. Após a polimerização do gel os poços foram lavados com água Milli-Q e preenchidos com a solução tampão eletrodo composto por Tris-Hidroximetil-aminometano (30g/L) e Glicina (144g/L), quando então se aplicou 5 μ l das amostras. Como padrão de pesos moleculares para determinação das proteínas foi utilizado no primeiro poço do gel 5 μ l do padrão Precision Plus All Blue, (205 – 10 kDa). As corridas eletroforéticas foram realizadas à voltagem constante de 100V por 15 minutos, dobrando para 200V por 40 minutos. Após a corrida eletroforética, os géis foram retirados dos moldes de vidro e imersos em Coomassie Blue R250 em solução álcool acética, durante 3 a 4 horas.

Transcorrido o tempo de coloração, o gel foi deixado em solução descorante composta de ácido acético, metanol e água, 1:3:6 (v/v), até a completa evidência das bandas.

Análise das imagens

A captação das imagens das bandas protéicas foi realizada em equipamento de foto-documentação (Image-Master VDS – Pharmacia LKB) para se identificar o comportamento das proteínas miofibrilares e as mudanças que ocorrem devido ao processo de maturação, através da densitometria. Os géis foram analisados utilizando o programa para análise de imagens *Image Máster 3D Prime & Elite* (Pharmacia–LKB). Foram analisadas as mobilidades relativas de acordo com os pesos moleculares, identificando as frações separadas.

Os valores densitométricos de cada banda no gel (%), obtidos das análises das imagens, foram empregados no cálculo do Índice de Degradação, através da subtração dos valores obtidos a 7 dias de maturação daqueles das amostras não maturadas.

Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizada análise descritiva e testes de correlação de Pearson entre os resultados densitométricos das bandas

protéicas reveladas nos tempos 1 e 7 dias nos quatro grupos genéticos, conforme Berquó et al, 1980.

Resultados e Discussão

Muitos trabalhos podem ser encontrados na literatura disponível empregando a eletroforese denaturante em SDS com o objetivo de se estudar especificamente algumas proteínas miofibrilares e sua relação com a maciez da carne (Yates et al., 1983, Bandman & Zdanis, 1988; Ho et al., 1994, Clayes et al. 1995, Roncáles et al., 1995, Negish et.al., 1996, Koohmaraie, 2002). Porém, outras proteínas do músculo podem também estar relacionadas com o processo de maciez (Kolczak et al., 2003), como, por exemplo, várias enzimas, proteínas sarcoplasmáticas, proteínas do estroma, entre outras.

A extração em solução de isolamento (Clayes et al., 1995) promove a solubilidade das proteínas miofibrilares, enquanto a extração em água aqui empregada permitiu evidenciar além destas, outras proteínas reveladas tanto na técnica denaturante quanto no SDS não denaturante.

A Figura 1 mostra o perfil protéico das proteínas do músculo *Longissimus dorsi* para os quatro grupos genéticos estudados, submetidas à eletroforese na presença de SDS não denaturante. Pela análise da Tabela 1 nota-se que foram reveladas 25 bandas protéicas neste gel com pesos moleculares variando de aproximadamente 15 a 223 kDa, considerando-se os quatro grupos genéticos e os dois períodos de maturação.

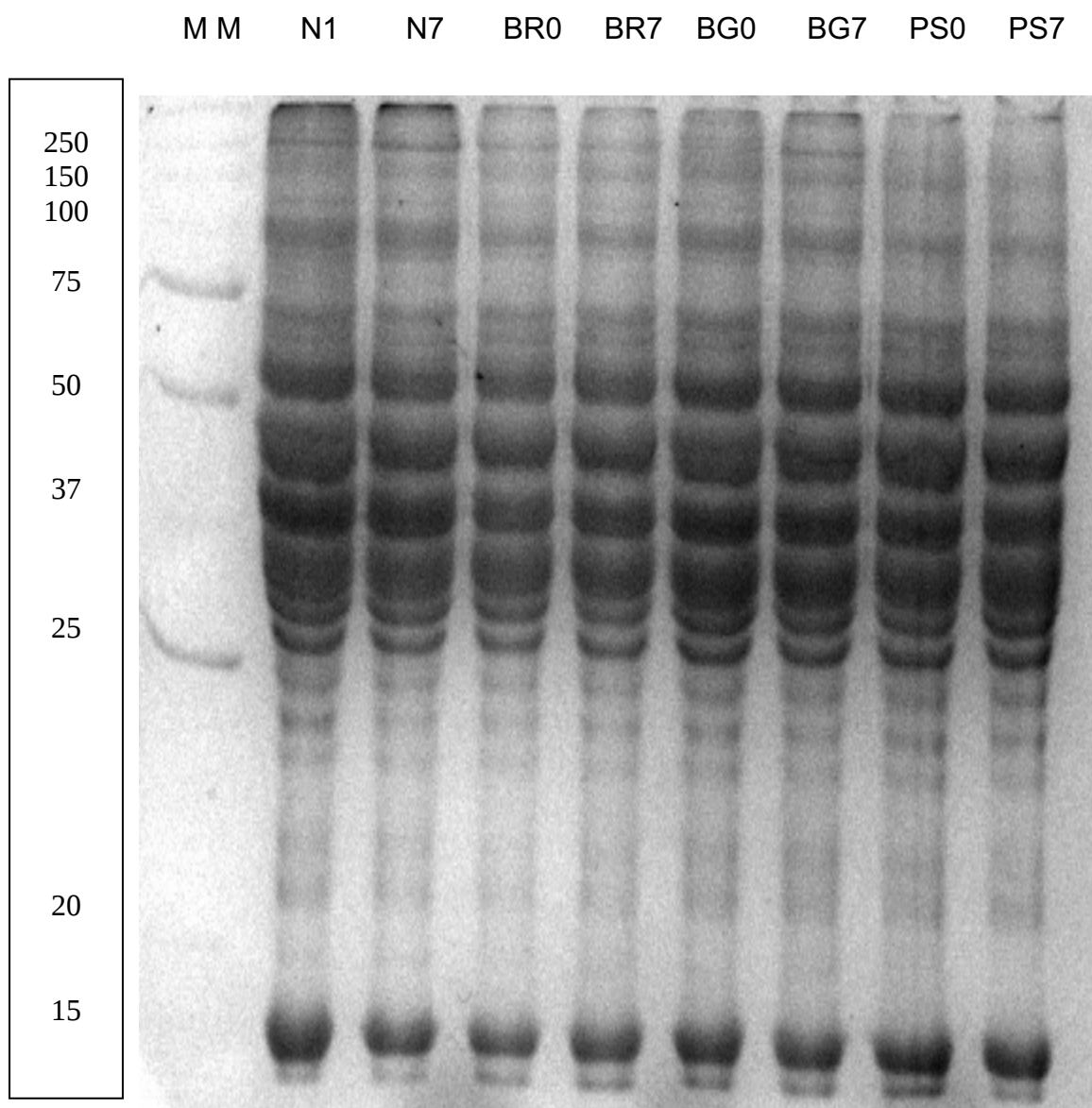


Figura 1: Eletroferograma das proteínas do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, maturadas e não maturadas, submetidos à eletroforese (13%) não denaturante e não redutor na presença de SDS.

(MM – Marcador Molecular, N – Nelore, BR – TRC-Brahman, BG – Brangus – PS – TRC-Pardo-Suiço, 0: resfriamento por 24 horas, 7: sete dias de maturação).

Tabela 1: Valores em % obtidos na densitometria das bandas protéicas de amostras de músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, submetidos à eletroforese não denaturante na presença de SDS a 13%.

BANDAS	PESOS	N 1	N 7	BR1	BR 7	BG 1	BG7	PS 1	PS 7
1	> 250,00	1,05	1,56	1,13	0,72	0,43	0,45	0,10	0,00
2	222,73	0,48	0,43	0,45	0,95	1,31	0,54	0,58	0,31
3	121,88	0,34	0,18	0,10	0,27	0,11	0,17	0,02	0,05
4	98,86	3,18	3,59	2,29	2,52	1,84	1,70	0,90	0,70
5	88,64	1,01	1,23	0,19	0,08	0,11	0,00	0,00	0,00
6	68,06	1,51	1,88	2,42	2,78	1,20	1,85	1,26	1,23
7	63,89	0,60	1,10	1,59	2,05	0,76	1,08	1,78	0,73
8	57,64	0,00	0,00	6,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9	55,56	10,30	9,65	6,63	13,70	8,28	10,00	12,80	9,51
10	46,07	2,77	0,00	0,00	0,00	3,14	0,00	0,00	0,00
11	42,14	8,68	12,30	17,60	14,50	6,86	12,50	13,80	17,50
12	37,61	30,60	0,00	7,94	18,40	27,10	25,10	20,60	15,90
13	37,00	0,00	26,00	8,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	32,47	5,66	10,40	12,50	15,80	27,70	26,10	16,10	26,30
15	30,07	0,86	2,77	3,54	2,09	5,42	4,50	2,31	8,58
16	26,33	3,54	3,71	5,08	3,90	3,72	2,78	4,53	5,09
17	24,69	0,45	0,55	0,60	0,34	0,51	0,54	0,66	0,60
18	23,96	1,32	0,55	0,45	0,68	0,43	0,24	0,76	0,65
19	23,33	0,42	0,35	0,50	0,51	0,25	0,32	0,38	0,22
20	21,98	0,00	0,26	0,00	0,00	0,27	0,00	0,00	0,09
21	21,67	0,53	0,00	0,30	0,22	0,00	0,25	0,05	0,01
22	20,99	0,80	0,46	0,46	0,49	0,25	0,17	0,59	0,28
23	20,10	0,02	0,35	0,27	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00
24	16,22	16,50	14,70	15,90	16,50	9,97	8,38	17,70	11,60
25	15,11	0,04	0,41	1,46	1,64	0,30	0,89	1,47	0,32

N – Nelore, BR – Brahman, BG – Brangus, Ps – Pardo-Suiço, 0: 24 horas de resfriamento, 7: sete dias de maturação, PESOS em kDa.

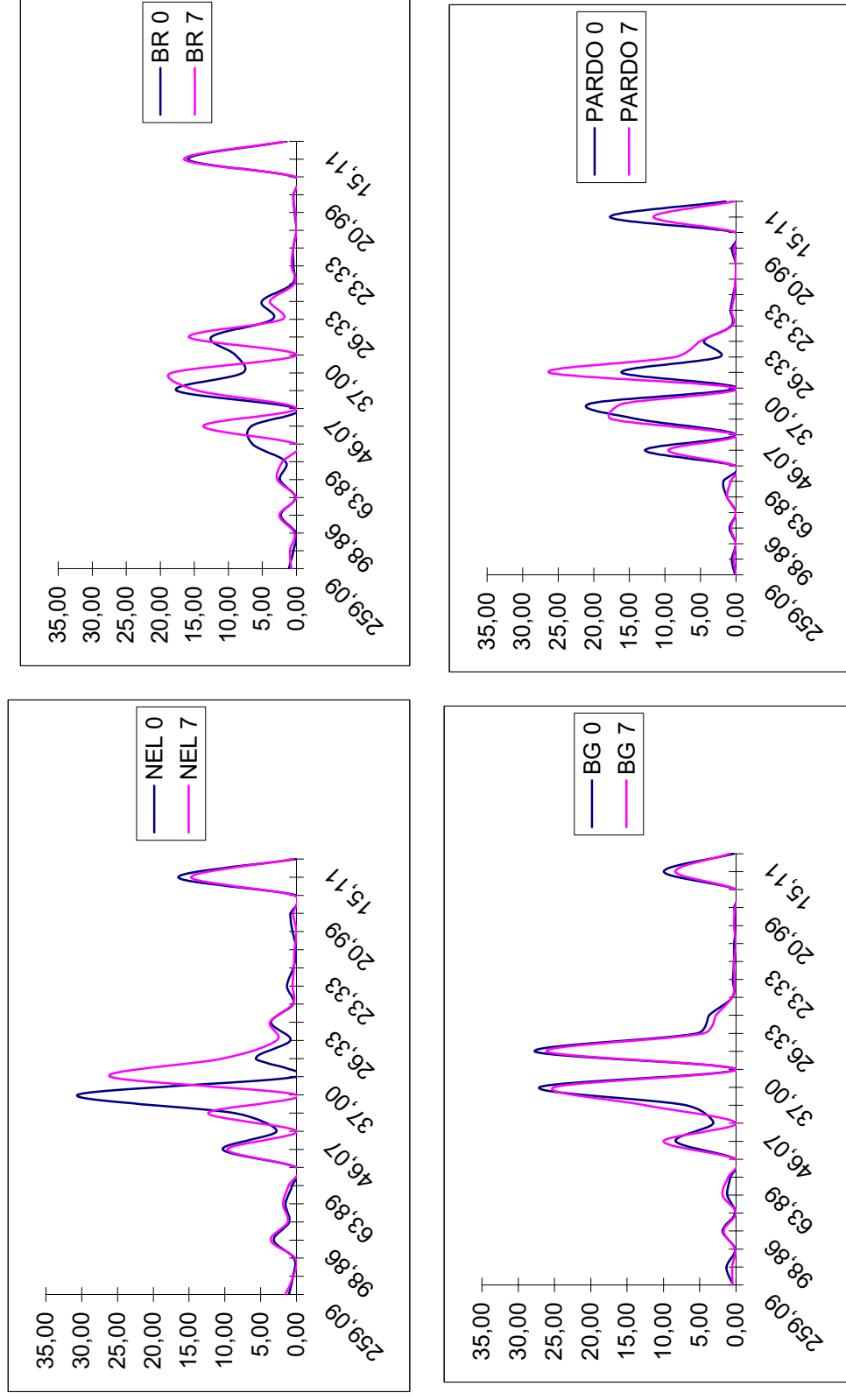


Figura 2: Traçados densitométricos das bandas protéicas de amostras de músculo *Longíssimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, submetidos à eletroforese não denaturante e não redutor na presença de dodecil sulfato de sódio em géis de 13% de concentração. Eixo X – pesos moleculares em kDa; eixo Y em %. NEL : Nelore, BR: TRC-Brahman, BG: Brangus, PARDO: TRC-Pardo-Suiço, 0: 24 horas, 7: sete dias de maturação.

A figura 2 mostra os traçados densitométricos obtidos pelas bandas da eletroforese não denaturante e não redutora. Observa-se pela análise da Figura 1 que existe constância na presença das bandas protéicas. Entretanto, quando se realiza a análise densitométrica, cujos resultados se encontram na Tabela 1 e também na Figura 2, nota-se, eventualmente, a falta de determinadas proteínas em alguns grupos genéticos e tempos de maturação. Esta observação discorda, aparentemente, de autores que empregam semelhante técnica de identificação de espécies com base na situação de que o perfil de proteínas musculares é espécie-específico (Lemos & Moraes, 1992). Contudo, considerando-se que a forma de extração não foi seletiva para determinados tipos de proteínas, e essa discordância se dá nas regiões de pesos moleculares ao redor de 80 kDa, 46 kDa a 57 kDa e de pesos moleculares inferiores a 20 kDa, esta diferença poderia ser explicada pela ocorrência de prováveis polimorfismos genético-bioquímicos de algumas proteínas ou ainda pela ocorrência de produtos de degradação protéica decorrentes do processo de maturação (Negish et.al., 1996; Heineth et al, 1988).

Na eletroforese não denaturante observa-se as proteínas estáveis e como nesta técnica as amostras não sofrem ruptura em suas cadeias e não passam pelo super-aquecimento, a identificação das mudanças que ocorrem no período *post-mortem* no músculo esquelético desses animais fica dificultada, pois provavelmente as mudanças na estrutura das fibras são tão pequenas que somente podem ser melhor observadas quando se quebram estas proteínas em cadeias polipeptídicas.

Devido à ausência de referências na literatura, a identificação das bandas das proteínas fica dificultada quando esta técnica é empregada.

A eletroforese não denaturante resultou em 25 bandas que variam entre 15 e 223 kDa. Pelas quantidades relativas apresentadas na Tabela 1 e peso molecular aproximado, pode-se estimar uma provável posição para a banda da actina em aproximadamente 42,14 kDa.

A proteína C, que compõe o filamento grosso (miosina) tem peso molecular ao redor de 140kDa. Porém não foi visível banda de tal dimensão no gel não denaturante no presente estudo.

Ao redor de 68,06 kDa apresenta-se uma posição provável para a tropomiosina nativa que não se altera durante o período de maturação nem entre os grupos genéticos.

Pela análise dos gráficos densitométricos mostrados na Figura 2 pode-se observar que, considerando os grupos genéticos, a eletroforese não denaturante mostra a manutenção das proteínas de pesos moleculares a partir de 45 kDa até as maiores de 250 kDa, estimadas como 259,09 kDa. Com exceção do grupo genético TRC-Brahman, onde se nota um aumento das proteínas ao redor de 46 kDa. O emprego desta técnica revela o aumento de proteínas originadas no processo de maturação com pesos ao redor de 26 kDa nos grupos estudados, exceto para o grupo Brangus.

O cálculo das correlações entre a determinação das quantidades relativas por densitometria dos géis de eletroforese não denaturante na presença de SDS está disposto na tabela 2.

Tabela 2: Coeficientes de correlação obtidos na densitometria das bandas protéicas de amostras de músculo *Longíissimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, submetidos à eletroforese não denaturante e não redutor na presença de SDS em géis a 13%.

	NEL 7	BR 0	BR 7	BG 0	BG 7	PARDO 0	PARDO 7
NEL 0	0,20						
NEL7		0,73***					
BR 0			0,82***				
BR 7				0,85***			
BG 0					0,98***		
BG 7						0,91***	
PARDO 0							0,90***

N – Nelore, Br – Brahman, Bg – Brangus – Ps – Pardo-Suiço, 0: 24 horas de resfriamento, 7: sete dias de maturação. *** P<0,001.

Os tempos de resfriamento referentes a cada um dos grupos genéticos estudados apresentaram correlação positiva significativa, com exceção da combinação Nelore 0 dias X Nelore 7 dias. O que pode ser resultado de um padrão diferente de degradação das proteínas nos músculos destes animais, ou mesmo diferenças de isoformas dessas proteínas.

Um perfil diferente se observa com o emprego da técnica denaturante. A Figura 3 mostra o padrão protéico das proteínas do músculo *Longissimus dorsi* submetidos à eletroforese em SDS-PAGE e na Tabela 4 observa-se os valores relativos das bandas formadas neste gel.

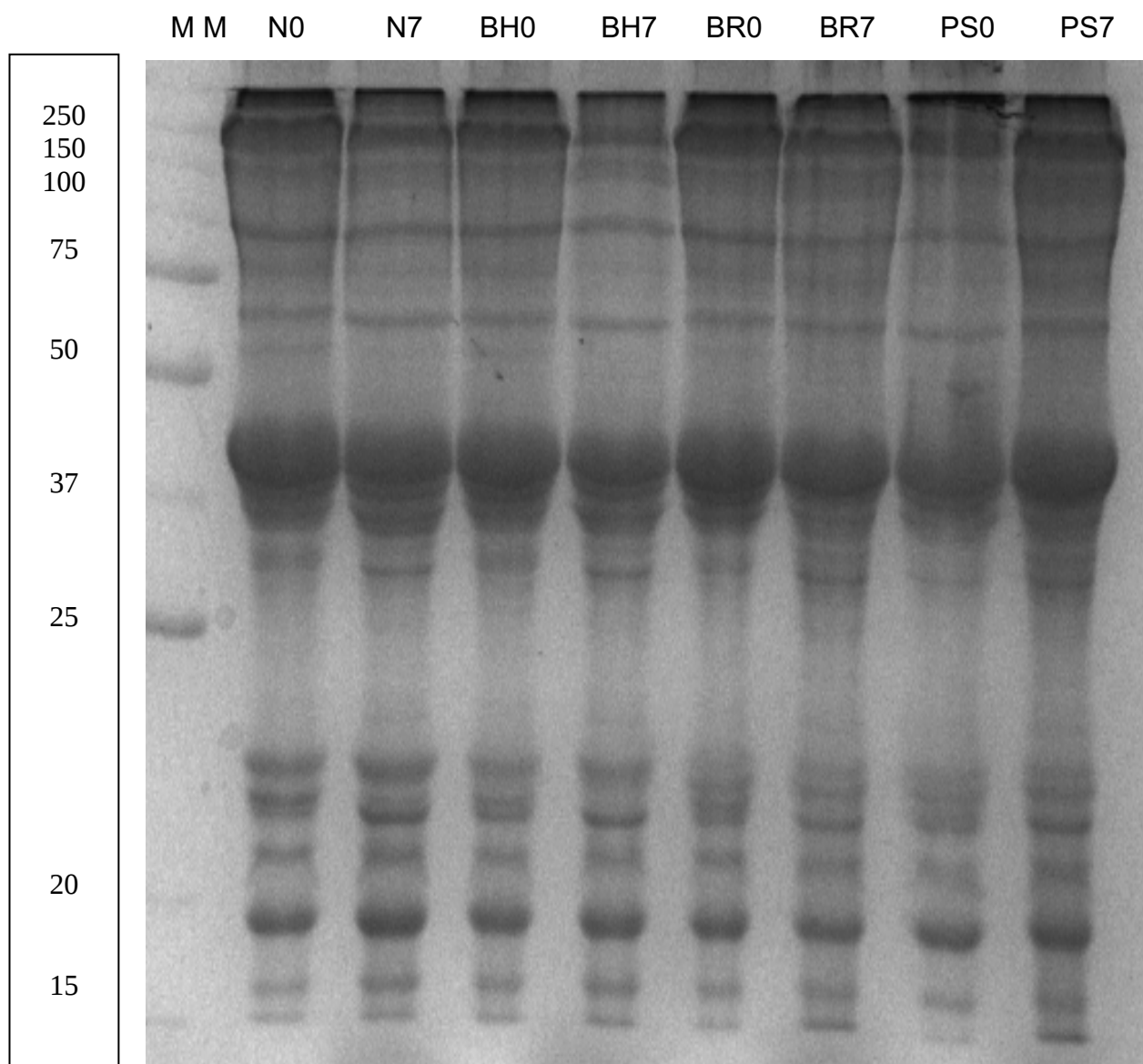


Figura 3: Eletroferograma das proteínas musculares do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, resfriado por 24 horas e maturado por sete dias, submetidos à eletroforese (13%) denaturante na presença de SDS.

MM – Marcador Molecular, N: Nelore, BR: TRC- Brahman, BG: Brangus; PS: Pardo-Suiço, 0- resfriamento por 24 horas, 7 – sete dias de maturação.

Tabela 3: Valores em % obtidos na densitometria das bandas protéicas de amostras de músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, submetidos à eletroforese denaturante na presença de SDS a 13%

BANDAS	PESOS	N 0	N 7	BR 0	BR 7	BG 0	BG 7	PS 0	PS 7
1	> 250,00	11,70	12,50	12,20	10,90	21,30	13,60	10,10	18,00
2	140,63	2,59	0,43	1,08	2,17	1,06	1,27	0,43	2,79
3	121,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,59
4	88,75	1,21	1,24	1,20	1,86	1,35	1,13	1,04	1,11
5	78,75	0,57	0,27	0,26	0,37	0,40	0,95	0,00	0,33
6	67,97	0,67	1,18	0,65	1,56	0,68	0,96	0,64	0,82
7	54,69	0,23	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,63	0,00
8	51,56	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00
9	38,37	9,97	4,51	6,97	11,70	10,00	7,51	5,29	8,74
10	38,27	0,00	0,00	13,20	1,67	1,14	0,00	5,62	0,00
11	35,86	0,79	3,47	4,27	1,67	0,47	0,51	0,00	0,90
12	31,86	0,39	0,00	0,72	0,00	0,51	0,19	0,00	0,37
13	30,71	0,00	0,95	0,00	1,26	0,03	1,01	0,50	0,60
14	23,47	0,00	0,27	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,16
15	22,61	2,12	3,91	0,83	3,87	0,00	0,47	0,41	0,59
16	22,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,86	0,60	0,98	0,78
17	21,88	1,65	0,00	0,66	0,00	2,05	0,00	0,11	0,00
18	21,53	0,00	4,26	1,02	3,68	0,00	0,90	0,00	0,93
19	20,97	0,90	1,29	0,40	0,65	0,81	0,92	0,52	0,68
20	19,25	4,47	7,80	3,98	8,77	3,51	3,14	5,49	3,45
21	16,38	0,41	1,17	0,50	1,10	0,49	0,39	0,66	0,15
22	15,13	0,32	0,50	0,47	0,61	0,18	0,57	0,28	0,56

N – Nelore, Br – Brahman, Bg – Brangus – Ps – Pardo-Suíço, 0 Zero dias de maturação, 7 – sete dias de maturação, PESOS em kDa.

Pela análise da Tabela 3, verifica-se que foram reveladas 22 bandas cujos pesos moleculares variaram aproximadamente 15 a 141 kDa. Nota-se por meio desta Tabela o acentuado aparecimento de proteínas de baixo peso molecular quando se comparam os dois tempos de resfriamento, resultado do processo de maturação, mais evidente nos grupos Nelore e TRC-Brahman.

Poucas mudanças foram encontradas no conteúdo das proteínas com altos pesos, de forma semelhante ao ocorrido na técnica não denaturante. As bandas relativas à actina e miosina parecem inalteradas após a maturação. Estes dados concordam com a observação de diversos autores (Bandman & Zdanis, 1988; Yates et al., 1983) que relatam ausência de proteólise dessas proteínas em condições resfriadas e maior degradação em temperaturas próximas a 37°C, principalmente pelas proteases do sistema das catepsinas, que atua principalmente em pH ácido (Yates, 1983).

A figura 4 mostra os traços densitométricos das amostras que foram gerados no analisador de imagens.

Figura 4: Traçados densitométricos das bandas protéicas de amostras de músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, submetidos à eletroforese denaturante na presença de dodecil sulfato de sódio em géis de 13% de concentração. Eixo X – pesos moleculares em kDa; eixo Y - %. NEL – Nelore, BR: TRC-Brahman, BG: Brangus – PARDO: TRC-Pardo-Suiço, 0: 24 horas de refrigeração, 7: sete dias de maturação.

As duas linhas mostradas em cada um dos gráficos representam o tempo 0 e 7 dias de maturação. Os picos das duas curvas representam o comportamento dos peptídeos antes e após a maturação para cada uma das raças. Estas figuras mostram que o sistema de análises é capaz de identificar e quantificar até diferenças mínimas na degradação das bandas, mesmo para aquelas pouco visíveis nas imagens da eletroforese. Há um aumento na porção das proteínas de baixo peso molecular, provavelmente produtos de degradação de proteínas maiores.

Como mostrado na técnica não denaturante nota-se também na eletroforese denaturante a ausência de determinadas bandas, que podem ser resultado de polimorfismos genéticos-bioquímicos ou mesmo, produtos de degradação durante o processo de maturação, o que pode ser claramente notado pela análise da Figura 4.

A banda de aproximadamente 30 kDa que se intensifica com o aumento no tempo de maturação é um produto da degradação da proteína Troponina-T (Ho et al., 1994). Deve-se notar que o aumento da intensidade desta banda se deu de forma semelhante para os quatros grupos genéticos estudados. A alta correlação encontrada entre as amostras em estudo pode ser explicada pela pouca idade em que os animais foram abatidos, o que refletiu a eficiência do modelo biológico Superprecoce na obtenção de um produto cárneo provavelmente mais macio, apesar de a investigação desta variável não ser objetivo do presente trabalho.

Pelo comportamento e quantidade relativa das bandas, pode-se observar a ocorrência, provavelmente, da actina na região de 38,37 kDa, da fração T da troponina na região de 35,86 kDa (Penny & Dransfield, 1979), e posições prováveis para as cadeias leves de miosina nas regiões de 16,38 kDa e 15,13 kDa. Pode-se ainda, observar a provável ocorrência da fração I da troponina na região ao redor de

20,97 kDa. Estas localizações são estimativas baseadas no pesos de tais fragmentos e na observação do comportamento das bandas.

A proteína C do filamento grosso apresenta-se da mesma forma em condições denaturantes e não denaturante. Uma provável banda relacionada a esta proteína foi identificada ao redor de 140, 63 kDa.

O fragmento de 30 kDa (Negish et. al., 1996) que se intensifica com o tempo de maturação post-mortem aparece em torno de 30,71 kDa.

A proteína Miosina é a mais abundante no músculo esquelético. Apesar do menor conteúdo da Miosina (MHC) neste trabalho, provavelmente devido à extração em água, suas frações permaneceram inalteradas entre grupos genéticos e tempo de maturação. O mesmo foi observado para a proteína Actina (Bandman & Zdanis, 1988; Yates et. al., 1983).

A Tabela 4 mostra os coeficientes de correlação entre os valores obtidos na densitometria das bandas do músculo Longissimus submetidas à eletroforese denaturante.

Tabela 4: Coeficientes de correlação obtidos na densitometria das bandas protéicas de amostras de músculo *Longíssimus dorsi* de bovinos de quatro diferentes grupos genéticos, submetidos à eletroforese denaturante na presença SDS a 10%.

	NEL 7	BR 0	BR 7	BG 0	BG 7	PARDO 0	PARDO 7
NEL 0	0,81***						
NEL7		0,52					
BR 0			0,63***				
BR 7				0,80***			
BG 0					0,98***		
BG 7						0,85***	
PARDO 0							0,83***

N – Nelore, BR: TRC-Brahman, BG: Brangus ; Ps: TRC-Pardo-Suiço, 0: 24 horas de resfriamento, 7: sete dias de maturação. *** (P<0,001).

Nesta Tabela verifica-se que as correlações têm valores mais baixos que na técnica não denaturante, o que pode ser explicado pela alta eficiência desta técnica em revelar pequenas mudanças que ocorrem no padrão de expressão das proteínas musculares e de seus polipeptídeos. Assim, pequenas degradações que ocorrem no período podem ser notadas pelo aumento dos produtos de degradação nas amostras de 7 dias.

A extração em água dá uma visão geral do comportamento de diversas proteínas do músculo inteiro e por ser mais eficiente na revelação das proteínas sarcoplasmáticas, muitas proteínas ou polipeptídeos, podem não aparecer nos géis, ou mesmo se confundir com outras bandas.

Há necessidade de extrações específicas para o isolamento de determinadas proteínas e de suas frações aqui não reveladas, porém a extração em água pode constituir-se numa alternativa quando se querem verificar mudanças no conteúdo de algumas proteínas de fácil visualização, como no caso da Miosina (MHC), da Actina e da Troponina T.

Ambas as técnicas parecem ser adequadas em revelar as mudanças que ocorrem no músculo dos bovinos durante o período *post-mortem*, visto que mostram bem as diferenças na ontogênese das proteínas durante a maturação da carne.

Com o advento da análise proteômica e uso de técnicas mais avançadas na identificação de proteínas, e o emprego cada vez mais freqüente da espectrometria de massas na identificação de proteínas e peptídeos, a resolução da eletroforese será facilitada, podendo-se com isso formar uma impressão digital protéica do músculo, identificando diferenças entre isoformas de diversas proteínas, além de diferenças na proteólise miofibrilar entre grupos genéticos e mesmo entre indivíduos do mesmo grupo.

CONCLUSÕES

Tanto a técnica denaturante, como a não denaturante são efetivas na resolução de diferentes apresentações das proteínas em questão, o que pode ser notado pelas diferenças dos pesos moleculares encontrados.

O comportamento das proteínas evidenciadas em ambas as técnicas tem correlação com o aumento da maciez almejada no processo de maturação, visto que a literatura as relaciona nesse sentido.

Diferenças observadas nos padrões eletroforéticos entre os grupos genéticos são decorrentes da composição genética, constituindo um polimorfismo protéico genético-bioquímico, o qual deve ser melhor abordado em futuros trabalhos nessa área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDMAN, E.; ZDANIS, D. An immunological method to assess protein degradation in post-mortem muscle. **Meat Sci.**, v. 22, p. 1-19, 1988.

BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB, S. L. D. **Bioestatística**. São Paulo: Editora Pedagógica Universitária, 1980. 325p.

CLAYES, E.; UYTTERHAEGEN, BUTS, B.; DEMEYER, D. Quantification of beef myofibrillar proteins by SDS-PAGE. **Meat Sci.**, v. 39, p. 177, 1995.

HAMES, B.D.; RICKWOOD, D. **Gel Electrophoresis of proteins: a practical approach**. 2^a ed. Oxford: IRL Press, 1990. 383p.

HEINET, H.H.; BREHME, H.; BAUMANN, H.J.; KLINGER, H.E. Animals Species determination of Native Muscle Meal y Meons of Standard Gel Electrophoresis (PAGE). Testing and Reproducibility of Examination Results. **Fleischwirtschaft**, v. 68, n. 3, p. 386-389, 1988.

HO, C. Y.; STROMER, M. H.; ROBSON, R. M. Identification of 30 kDa polipeptide in postmortem skeletal muscle as a degradation product of troponin-T. **Biochimie**, v. 76, p. 369-375, 1994.

KOLCZAK, T.; POSPIECH, E.; PALKA, K.; LACKI, J. 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 Sci.**, v. 64, p 69-75, 2003.

KOOHMARAIE, M.; KENT, M.P.; SHAKELFORD, S. D.; VEISETH, E.; WHEELER, T. L. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Sci.**, v. 62, p. 345-352, 2002.

LEMOS, A.L.S.C.; MORAES, M.A.C. Identificação Eletroforética de Peixes de Água doce (Família Pimelodidae) de Valor Comercial. **Alim. Nutr.**, v. 4, p. 57-63, 1992.

NEGISH, H.; YAMAMOTO, E.; KUTAWA, T. The origin of the 30 kDa component appearing during post-mortem ageing of bovine muscle. **Meat Sci.**, v. 42, p. 289-303, 1996.

PENNY, I. F.; DRANSFIELD, E. The relationship between toughness and troponin-T in conditioned beef. **Meat Sci.**, v. 3, p. 135-138. 1979.

RONCÁLES P.; GESSINK, G. H.; VAN LAACK, R. L. Meat tenderization: Enzymatic mechanisms. In: Ouali, A.; Demeyer, D. I.; SMULDERS, J. M. **Expression of tissue proteinases and regulation of protein degradations related to meat quality**, Utrecht: ECCEAMST, 1995. p. 311-332.

YATES, L. D.; GREASER, M. L. Quantitative determination of myosin and actin in rabbit skeletal muscle. **J. Mol. Biol.**, v. 168, p. 123-141, 1983.

Implicações

A maior parte da maciez da carne pode ser explicada pela degradação das proteínas miofibrilares na fase de maturação que ocorre no período *post-mortem* dos animais.

Diversas mudanças ocorrem no conteúdo protéico do músculo *Longissimus dorsi* com o processo de maturação. Além disso, diferenças ocorrem quanto à expressão das proteínas musculares entre grupos genéticos e entre indivíduos do mesmo grupo. Por outro lado, a idade de abate pode diminuir as diferenças na expressão das proteínas miofibrilares, e como consequência aumento na maciez da carne.

A eletroforese de proteínas torna-se uma ferramenta valiosa na caracterização das proteínas e peptídeos relacionados ao processo de maciez. O seu emprego pode auxiliar na identificação de possíveis marcadores e genótipos superiores em programas de melhoramento genético. Além disso, compreendendo os mecanismos envolvidos na proteólise miofibrilar, relacionados à maciez da carne, pode-se manipular estes processos no sentido de se obter carne mais macia em um menor espaço de tempo, o que resulta em retorno mais rápido, maior circulação do produto e maciez garantida para o mercado consumidor.