

# EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE CARNE BOVINA PARA ELABORAÇÃO DE FILMES COMESTÍVEIS<sup>1</sup>

Sílvia M. A. de SOUZA<sup>2,\*</sup>, Paulo J. do A. SOBRAL<sup>3</sup>, Florencia C. MENEGALLI<sup>4</sup>

## RESUMO

A utilização de proteínas miofibrilares de carne na elaboração de filmes comestíveis implica, inicialmente, na obtenção desta macromolécula, uma vez que ela é indisponível comercialmente. Assim, os objetivos deste trabalho foram a obtenção e caracterização de proteínas miofibrilares de carne bovina, em escala de laboratório, e a elaboração e caracterização da microestrutura de filmes à base dessas proteínas. As proteínas miofibrilares foram extraídas do músculo *Semitendinosus* bovino, pós *rigor mortis*, empregando-se uma técnica de extração por centrifugação diferencial em solução tampão, com diferentes concentrações salinas, segundo metodologia de EISELE & BREKKE [13] modificada neste trabalho. As proteínas, assim obtidas, foram liofilizadas (PML) e analisadas para determinação do teor de proteínas, de lipídios, de sais minerais, de cinzas e da umidade. A composição de aminoácidos foi determinada por cromatografia de troca iônica e o perfil eletroforético foi determinado em gel de poliacrilamida. Alguns filmes foram elaborados com 1g de PML/100g de solução, 60g de glicerol/100g de proteínas e ácido acético glacial para ajuste do pH=2,8. A microestrutura desses filmes foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. A PML, que apresentou teor de proteínas de 84,3%, foi composta de diversas frações de proteínas miofibrilares, com destaque para frações da miosina e da actina, segundo os resultados da eletroforese. Trabalhando-se a composição de aminoácidos, verificou-se que a maior contribuição energética das interações potenciais dos aminoácidos, foram as provenientes de ligações covalentes (58,3%), seguidas das interações iônicas (35,72%). A microestrutura do filme revelou uma estrutura pouco homogênea, porém coesa e densa e uma matriz protéica compacta e fina.

**Palavras-chave:** biopolímeros; aminoácidos; eletroforese; biofilmes; microestrutura.

## SUMMARY

EXTRACTION OF BOVINE MEAT MYOFIBRILLAR PROTEINS FOR ELABORATION EDIBLE FILMS. The use of meat myofibrillar proteins for edible film production involves initially the extraction of the macromolecule, since it is not commercially available. Thus, the objectives of this work were the extraction and characterization of bovine meat myofibrillar proteins, in laboratory scale, and the elaboration and characterization of the microstructure of these films. The myofibrillar proteins were extracted from the *Semitendinosus* bovine muscle, post *rigor mortis*, using a differential centrifugal technique in buffer solution, with different saline concentrations, modifying the Eisele and Brekke [13] method. The proteins were lyophilized (PML) and analyzed for protein, fat, mineral, ash and moisture content. The amino acid composition was determined by ionic exchange chromatography and the electrophoretic profile was done using SDS-PAGE. Films having 1g of PML/100g of solution, 60g of glycerol/100g of proteins and pH maintained at 2.8 with acetic acid were used for the microstructure study using a scanning electronic microscope. The PML which presented 84.3% of protein content, was composed of several fractions of myofibrillar proteins, with emphasis for the myosin and actin fractions, according to the SDS-PAGE results. From the amino acid composition values, was verified that the main energetic contribution came from covalent links (58.3%), followed by the ionic interactions (35.7%). The films microstructure showed a poorly homogeneous structure, but with a protein matrix compact and smooth.

**Keywords:** biopolymers; amino acids; electrophoresis; edible films; microstructure.

## 1 – INTRODUÇÃO

A elaboração de filmes comestíveis requer uma macromolécula de origem biológica, como as proteínas, capaz de formar uma matriz coesa e contínua. As proteínas são biopolímeros formados por 20 tipos de monômeros (aminoácidos) diferentes, cuja estrutura é determinada pela composição e seqüência desses aminoácidos, e conseqüentemente, pelas interações inter e intramoleculares que podem ocorrer através dos resíduos das cadeias laterais polares e não polares [7]. Dessas características estruturais e a composição química do polímero dependem também, as propriedades

funcionais das proteínas, incluindo as propriedades filmogênicas [8, 20, 26]. Essas propriedades podem ser modificadas em função do pH, tratamento térmico e de aditivos [15].

O emprego de proteínas como matérias-primas de filmes comestíveis implica na disponibilidade das mesmas. De modo geral, a produção em escala industrial de proteínas de origem animal e vegetal não é comum no Brasil, com exceção, respectivamente, da gelatina e proteína de soja, que são produzidas por processos competitivos em relação aos países desenvolvidos, o qual se deve a grande escala de produção e ao baixo custo dessas proteínas.

Observa-se na literatura, que as proteínas miofibrilares, particularmente as de peixe, vêm ganhando interesse na tecnologia de biofilmes. CUQ [7], trabalhando com sardinhas do Atlântico (*Sardina pilchardus*), constatou o potencial dessas proteínas ao produzir filmes com propriedades funcionais consideradas promissoras. Em seguida, vários estudos foram realizados com a finalidade de se caracterizar as propriedades funcionais de filmes de proteínas miofibrilares de peixes

<sup>1</sup> Recebido para publicação em 04/04/2003. Aceito para publicação em 26/08/2004 (001099).

<sup>2</sup> Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Av. Alberto Lamego, 2000. CEP: 28015-620, Campos dos Goytacazes (RJ).

<sup>3</sup> Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP. Av. Duque de Caxias Norte, 225. CEP: 13635-900, Pirassununga (SP).

<sup>4</sup> Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Caixa Postal 6121, CEP: 13830-970, Campinas (SP).

\* A quem a correspondência deve ser enviada.

[9,10,11,22,23,28] e de carne bovina [25,30], em função da concentração e do tipo de plastificante, e também em função da espessura do material. As propriedades térmicas e visco-elásticas desses filmes também foram estudadas [5,12,29].

Em todos esses estudos, a utilização das proteínas miofibrilares para a fabricação de biofilmes implicou inicialmente na sua preparação, o que foi feito empregando-se processos análogos ao preparo de surimi [7], onde o músculo moído foi lavado com água destilada, para a extração das proteínas sarcoplasmáticas. A pasta obtida era, em seguida, passada numa peneira fina, para eliminação das proteínas do estroma, obtendo-se assim, uma pasta fina constituída de proteínas miofibrilares [23].

Quando o interesse é a produção de proteínas miofibrilares com elevada pureza, uma alternativa é a extração dessas proteínas por centrifugação diferencial em solução tampão com diferentes concentrações salinas [16]. Evidentemente, que o emprego de proteínas miofibrilares obtidas com essa metodologia é inviável na tecnologia de biofilmes em escala industrial, por questões econômicas e tecnológicas, mas, que pode ser interessante em escala de laboratório, para se poder estudar as características dos filmes sem a influência de outros componentes dos músculos. Por isso, o objetivo deste trabalho foi a extração, e caracterização, de proteínas miofibrilares de carne bovina, em escala de laboratório, e a elaboração e caracterização de filmes à base dessas proteínas. Para isso, modificou-se uma metodologia clássica de extração de proteínas por soluções salinas diluídas.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Extração das proteínas miofibrilares

Utilizou-se o músculo *Semitenidinosus*, pós *rigor mortis*, adquirido no comércio local (Campinas). Após remoção da gordura externa e do tecido conjuntivo visível, o músculo foi cortado no sentido transversal das fibras, com pedaços de peso variando de 100 a 150g, que foram embalados em filmes de PVC. As amostras foram, em seguida, armazenadas a temperatura de -20°C em um freezer doméstico horizontal (Marca Cônsul). Todas as amostras foram utilizadas no prazo de 3 meses. Antes do uso, essas amostras eram descongeladas, mantidas em geladeira a 4°C, durante uma noite.

As proteínas miofibrilares foram extraídas seguindo-se o método de EISELE & BREKKE [13] modificado neste trabalho. Todas as etapas de preparação foram realizadas na faixa de temperatura de 2 a 4°C. Inicialmente, o músculo foi cortado em forma de cubos de aproximadamente 2cm de aresta, e triturado em um moedor de carne (Filizola, São Paulo, Brasil) até a formação de uma pasta. Em seguida, adicionavam-se à pasta, 6 vezes seu peso, de solução tampão (pH 7,0) fosfato de sódio 0,05M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e cloreto de sódio (NaCl) 0,1M. Esse material foi misturado em

um liquidificador por 90 segundos e, posteriormente em um homogeneizador (Agitador Modelo Fisatom 713A, São Paulo, Brasil), durante 2 horas. Após esse tempo, o homogeneizado foi filtrado (dessorador de nylon), para eliminar o resíduo de tecido conjuntivo, e centrifugado numa centrífuga sob refrigeração (Modelo Sorval RC2 – B) utilizando-se o rotor tipo GSA, e uma velocidade rotacional de 6000rpm por 20min. O sobrenadante, constituído de proteínas sarcoplasmáticas, era descartado.

Seguindo-se o processo de re-extração, adicionou-se ao decantado, 1/3 de seu peso, de solução tampão (pH 7,0) fosfato de sódio 0,05M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e cloreto de sódio (NaCl) 2,4M, sob agitação, para dispersar o resíduo. Adicionou-se, então, 1 a 2 vezes, o peso do resíduo inicial, de solução tampão (pH 7,0) fosfato de sódio 0,05M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e cloreto de sódio (NaCl) 0,6M, mantendo-se sob agitação mecânica (Agitador Modelo Fisatom 713A, São Paulo, Brasil) durante 1 hora. Adicionou-se a esta mistura, 7 vezes seu peso, de água destilada refrigerada, sob agitação, seguida de centrifugação a 10.000rpm por 20-30min, descartando-se o sobrenadante. Os resíduos, constituídos de proteínas miofibrilares, foram liofilizados em um liofilizador (Modelo FD3, Heto-Holten, Virtis, New York), que operou com a temperatura da câmara variando de -25 a -40°C. As proteínas liofilizadas usadas neste estudo, foram de um mesmo lote, mantidas sob refrigeração.

### 2.2 – Caracterização das proteínas liofilizadas

#### 2.2.1 – Análises bromatológicas

As proteínas miofibrilares foram analisadas, em triplicatas, quanto ao teor de proteínas, pelo método semimicro Kjeldhal (N x 6,25) [1]; teor de lipídios, segundo o método de BLIGH & DYER [4]; sais minerais, segundo o método de NEVES [24]; cinzas, por incineração em mufla (Quimis, Brasil) a 450°C [1] e umidade, determinada em estufa (Modelo 315-SE, FANEM, Brasil) a 100°C/24h.

#### 2.2.2 – Composição de aminoácidos

A composição em aminoácidos da amostra de proteínas miofibrilares foi determinada por cromatografia de troca iônica e reação pós-coluna com ninidrina. A técnica é baseada na hidrólise da proteína em meio ácido (HCl 6,0 N), a 110°C/22h e, posterior recuperação dos aminoácidos hidrolisados, na forma livre, em tampão citrato de pH 2,2. Em seguida, alíquotas de 25µL dos aminoácidos na forma protonada foram introduzidas na coluna de troca iônica Dionex DX 300. O grau da força de fixação dos aminoácidos protonados à coluna de resina sódica foi função do tipo de cargas positivas ou negativas e da intensidade delas. Os aminoácidos com grupamentos iônicos mais básicos reagiram mais fortemente com a resina retirando os íons sódio, realizando assim, a troca iônica. Dessa forma, ao adicionar os tampões eluentes à coluna, na seguinte ordem: tampão citrato de sódio 2% e cloreto de hidrogênio 0,6%, A, pH 3,15; tampão cloreto 5% e acetato 1,4%

de sódio, B, pH 7,4; regenerante, C, hidróxido 0,6% e cloreto 0,4% de sódio (Pickering Laboratories Inc, USA), os primeiros aminoácidos eluídos foram os de natureza ácida, seguido dos neutros e, por último os básicos, que ao saírem foram coletados em ninidrina. O produto dessa reação foi quantificado num colorímetro e registrado sob a forma de pico. As áreas dos picos obtidos a partir das amostras desconhecidas foram comparadas a de uma mistura padrão de aminoácidos e quantificadas.

### 2.2.3 – Eletroforese (SDS-PAGE)

As proteínas miofibrilares foram analisadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE), de acordo com o procedimento de LAEMMLI [19], empregando-se gel de poli(acrilamida) com gradiente de separação de 5 a 20%. As bandas foram reveladas com o corante Coomassie-G-250. As determinações das faixas de pesos moleculares das proteínas miofibrilares foram efetuadas por densitometria (densitômetro Sharp JX330), utilizando-se “software” Image Master 1 D (Pharmacia). Os padrões utilizados foram da BIO-RAD: 1- Miosina (200.000 Da); 2-  $\beta$ -galactosidase (116.250 Da); 3- Fosforilase B (97.400 Da); 4- Soro albumina (66.200 Da); 5- Ovo albumina (45.000 Da); 6- Anidrase carbônica (31.000 Da); 7- Inibidor tripsina (21.500 Da); 8- Lisozima (14.400 Da).

### 2.2.4 – Caracterização da microestrutura das proteínas

A microestrutura das proteínas miofibrilares liofilizadas foi estudada por microscopia eletrônica de varredura. As proteínas, em pó, eram aderidas adequadamente nos “stubs” e submetidas à análise.

Após condicionamento em alto vácuo, as amostras foram fixadas com ouro, por evaporação num evaporador Balzers Sputter Coater (Modelo SCD050) e submetidas à análise no Microscópio Eletrônico de Varredura (Modelo JEOL/JXA – 840A Electronprobe microanalyzer). Os resultados observados no microscópio foram fotografados com filme Trix 400 ASAS P & B.

### 2.3 – Elaboração de filmes comestíveis

A elaboração dos filmes, segundo o método “casting”, consistiu no preparo de uma solução coloidal de 1 grama de proteína/100 gramas de solução, agregada de 60g glicerol/100g proteína (Merck, Brasil), usado como plastificante, e de ácido acético glacial (Merk, Brasil), para ajuste do pH=2,8, medido com um pHmetro de sensor integrado (SENTRON, Modelo 2001pH, Tecnal, Brasil). Em seguida, essa solução formadora de filme (SFF) era mantida a 50°C, em banho-maria (Ultratermostático, Modelo 111, FANEM, Brasil), por 45 minutos.

A SFF foi então, aplicada em placas retangulares (9,2cm x 17,9cm) de acrílico e desidratada em estufa com ventilação forçada (Modelo 320-SE, FANEM, Brasil), a 37°C/18h. O volume de solução colocado na placa foi calculado de modo a se obter uma espessura constante, determinada com um micrômetro (Modelo Tesa,

Suíça), como a média de 15 medidas em posições diferentes ( $0,040 \pm 0,005$ mm).

### 2.3.1 – Caracterização da microestrutura dos filmes

A microestrutura dos filmes também foi estudada por microscopia eletrônica de varredura. Os filmes eram analisados após crio-fratura, usando-se o nitrogênio líquido. As amostras fraturadas de filmes foram montadas nos “stubs” de maneira que a superfície externa e a superfície fraturada fossem observadas.

Após a crio-fratura dos filmes, o procedimento adotado foi idêntico ao apresentado para a análise da microestrutura das proteínas.

## 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 – Composição química das proteínas miofibrilares

A composição química das proteínas miofibrilares liofilizadas (PML), extraídas do músculo *Semitendinosus* bovino, está apresentada na *Tabela 1*.

**TABELA 1.** Composição química das proteínas miofibrilares liofilizadas.

Componente	Teor (%)
Proteínas	84,3±0,06
Lipídios	4,9±0,02
Sais minerais	0,15±0,01
Cinzas	7,4±0,03
Umidade	3,0±0,05

O teor de proteínas das PML (84,3%) foi superior aos resultados determinados por STANLEY, STONE & HULTIN [31], trabalhando com proteínas miofibrilares extraídas de peito de frango (70,2%), e do músculo bovino *Semimembranosus* (67,9%), utilizando um método de centrifugação diferencial, com solução iônica (30mM), e carnes com seis dias *pós rigor mortis*. Por outro lado, o teor de proteínas determinado neste trabalho foi ligeiramente inferior ao determinado (92,5%) por SOBRAL, OCUNO & SAVASTANO JR. [30], trabalhando com proteínas miofibrilares de carne bovina, *pós rigor mortis*, extraídas de paleta de forma análoga ao preparo de surimi.

O elevado teor de proteínas miofibrilares observado nesse trabalho reflete a eficiência da metodologia empregada, que pode reter algumas frações de proteínas que seriam eventualmente lixiviadas pelas sucessivas lavagens do processo surimi, bem como por implicar na produção de material com baixo teor de gordura.

O teor de gordura das PML (4,9%) foi duas vezes inferior ao valor determinado por SOBRAL, OCUNO & SAVASTANO JR. [30]. Os resultados elevados desses autores podem ser explicados pela insolubilidade da gordura em água, utilizada como solvente no processo surimi.

A presença de 0,15% de sal, e sobretudo de 7,4% de cinzas, verificadas nas proteínas miofibrilares liofilizadas, deve-se muito provavelmente, à presença de resíduos das soluções tampões e de cloreto de sódio utilizadas no processo de extração, uma vez que não se utilizou da técnica da diálise do extrato protéico neste estudo.

### 3.2 – Aminograma

A composição de aminoácidos das proteínas miofibrilares liofilizadas está apresentada na *Tabela 2*. Observa-se que os aminoácidos encontrados em maiores concentrações foram ácido glutâmico (16,16%), cistina (13,26%) e lisina (8,89%). A amostra também apresentou amônia (0,82%), provavelmente resultante do processo de degradação dos aminoácidos asparagina, glutamina e triptofano, na etapa de hidrólise ácida do método adotado.

Segundo CUQ [7], a composição de aminoácidos das proteínas, determina os tipos e quantidades de interações entre as cadeias laterais e, entre essas e a água. Algumas dessas interações são produzidas pelos aminoácidos com grupos polares ionizáveis (Lys, His, Arg, Trp, Pro) e polares não ionizáveis (Ser, Thr, Tyr, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys), que se ligam à água, via pontes de hidrogênio. Outras interações, as hidrofóbicas, podem ser formadas pela aproximação de cadeias laterais constituídas de aminoácidos com grupos hidrofóbicos (Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro).

A cisteína, apesar de classificada como polar não ionizável, pode interagir com outras moléculas de cisteínas, via pontes de dissulfeto (-SS-), formadas a partir do grupo tiol (-SH), se transformando em cistina. Nessa situação, a interação que ocorreu foi a ligação covalente [6].

**TABELA 2.** Composição de aminoácidos das proteínas miofibrilares de carne bovina.

Aminoácidos	Músculo	
	Semitendinosus	Comestível fresco*
	mol Aa ** /100 mol de Aa	
Cisteína	-	-
Serina	2,56	6,10
Treonina	4,66	6,13
Ác. Aspártico	6,67	10,73
Arginina	5,05	5,77
Ác. Glutâmico	16,16	16,51
Histidina	2,30	3,56
Lisina	8,89	9,67
Glicina	3,41	10,29
Alanina	6,14	10,42
Isoleucina	5,30	5,83
Leucina	8,35	9,83
Metionina	2,68	2,88
Fenil-alanina	3,01	4,23
Prolina	3,48	5,21
Tirosina	2,44	3,16
Valina	5,65	6,80
Cistina	13,26	1,68

Fonte: FAO – Nutritional Studies [14]; \*\*Aa: Aminoácidos.

A partir da composição de aminoácidos e considerando-se os diferentes tipos de interações entre as cadeias laterais e a água, pôde-se calcular a energia de interação máxima, obtendo-se assim, as contribuições teóricas de cada grupo de aminoácidos. Para o cálculo da contribuição de cada interação, foram utilizados os valores sugeridos por CUQ et al. [8]: 25kJ/mol para as interações polares não-ionizáveis, 62kJ/mol para as iônicas, 8kJ/mol para as hidrofóbicas e 350kJ/mol para as covalentes. Dessa forma, considerando-se os resultados apresentados na *Tabela 2*, os valores calculados das energias de interação foram: 180,4kJ/100mol Aa para as interações polares não-ionizáveis; 2844,6kJ/100mol Aa para as iônicas, 296,4kJ/100mol Aa para as hidrofóbicas e 4642,1kJ/100mol Aa para as covalentes.

A alta densidade de ligações iônicas potenciais, perfazendo 35,7% da energia total, está de acordo com os resultados encontrados por CUQ et al. [8] e MONTERREY-QUINTERO [21]. Por outro lado, os aminoácidos não ionizáveis polares, que contribuem para a formação de pontes de hidrogênio, corresponderam a apenas 2,3% da energia total, valor esse abaixo do encontrado nas proteínas miofibrilares de Tilápia-do-nylo, *pré rigor mortis*, que foi de cerca de 10% [23]. A diminuição das interações desses aminoácidos pode implicar no aumento das forças de coesão, rigidez e da baixa flexibilidade da rede protéica BANKER [2]. As ligações hidrofóbicas potenciais, corresponderam a apenas 3,7% da energia total, resultado esse de acordo com os resultados obtidos por MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL [23].

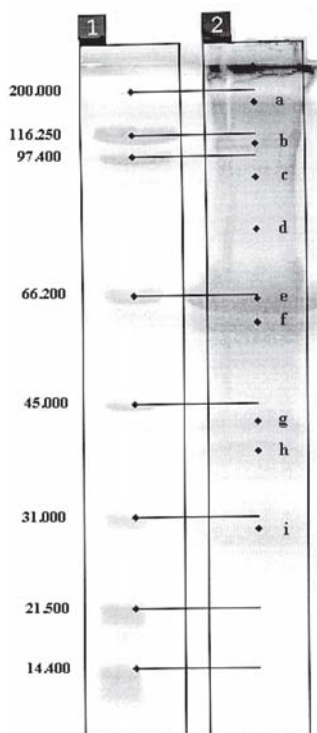
### 3.3 – Eletroforese

Os resultados das análises por eletroforese SDS-PAGE das proteínas miofibrilares liofilizadas estão apresentados na *Figura 1*, onde também se pode observar o perfil eletroforético dos padrões de pesos moleculares conhecidos. De modo geral, o perfil eletroforético das PML é comparável ao observado por outros autores trabalhando com carne bovina [18,33] e de frango [27,31]. Os géis de eletroforese SDS-PAGE foram analisados por densitometria e, os resultados são apresentados na *Figura 2*. As letras minúsculas que aparecem no resultado da densitometria correspondem as mesmas das bandas eletroforéticas da *Figura 1*.

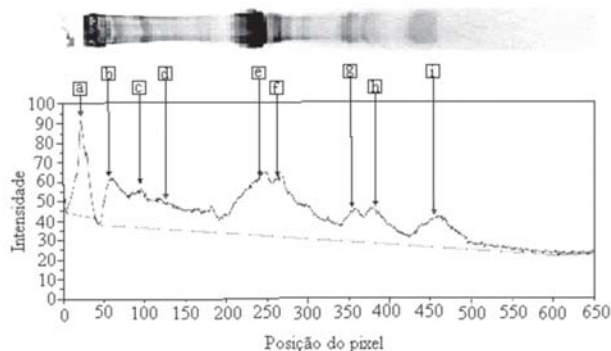
A caracterização das proteínas miofibrilares ficou evidente, com o aparecimento da cadeia pesada de miosina (banda a), de fragmentos das cadeias pesadas da miosina (banda b) e da actina (banda e). Outras frações das proteínas miofibrilares também foram identificadas, destacando-se as frações de  $\alpha$ -actinina (banda c), de fragmentos de cadeia pesada de miosina (banda d), e a troponina (banda f). A presença das bandas (h) e (i) pode corresponder tanto a fragmentos das cadeias leves de miosina, quanto à troponina T ou sub-unidades de  $\beta$ -actina, uma vez que os pesos moleculares destes peptídios se confundem.

De acordo com os resultados da densitometria, a banda (a), foi a mais intensa, com peso molecular de

169.000Da. O outro componente mais abundante (banda e), teve peso molecular próximo a 66.200Da. Estes resultados são semelhantes aos apresentados por CUQ [7], trabalhando com proteínas miofibrilares de sardinha do Atlântico no estado pós *rigor mortis*, porém diferindo dos resultados encontrados por MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL [23], que usaram músculo de Tilápias do nilo pré *rigor mortis*.



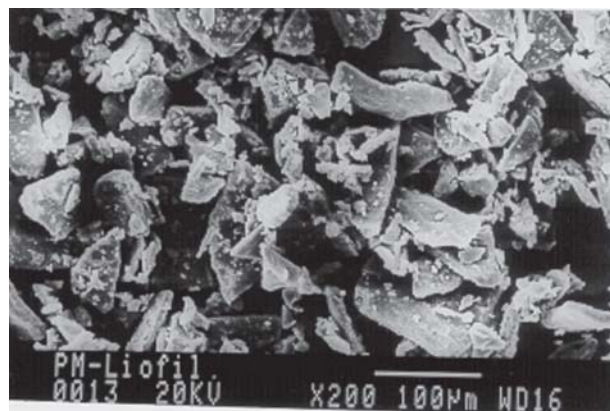
**FIGURA 1.** Perfil eletroforético SDS-PAGE dos padrões BIO-RAD (1): Miosina (200.000Da);  $\beta$ -galactosidase (116.250Da); Fosforilase B (97.400Da); Soro albumina (66.200Da); Ovo albumina (45.000Da); Anidrase carbônica (31.000Da); Inibidor tripsina (21.500Da); Lisozima (14.400Da); e das proteínas miofibrilares de carne bovina (2).



**FIGURA 2.** Resultado da densitometria da eletroforese em SDS-PAGE de proteínas miofibrilares extraídas de carne bovina, pós *rigor mortis*.

### 3.4 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das proteínas

Segundo os resultados da microscopia eletrônica de varredura (MEV), as proteínas miofibrilares liofilizadas aparecem como um conjunto desordenado de partículas cristalizadas de diferentes tamanhos (Figura 3), onde se podem observar pequenos cristais sobre a superfície, que podem ser frações de proteínas de baixo peso molecular como tropomiosina, troponina e  $\alpha$ -actinina. Nota-se também, na Figura 4 de maior aumento, a presença de partículas sistematicamente distribuídas entre as moléculas de proteínas, onde se verifica que as mesmas possuem forma hexagonal, dando a impressão de serem moléculas de proteínas de menor tamanho, mas também semelhantes a cristais.



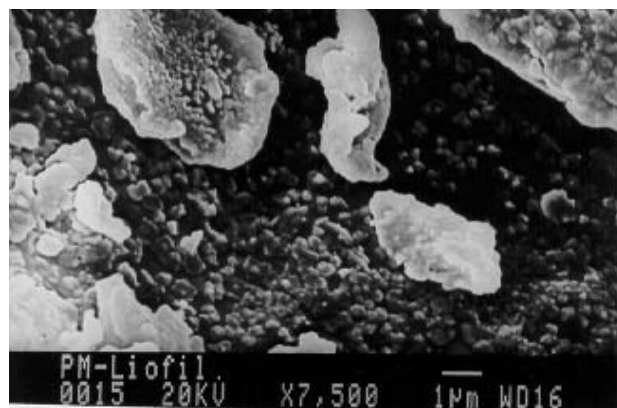
**FIGURA 3.** Microfotografia das proteínas miofibrilares liofilizadas. 200X.

### 3.5 – Microscopia eletrônica de varredura dos filmes

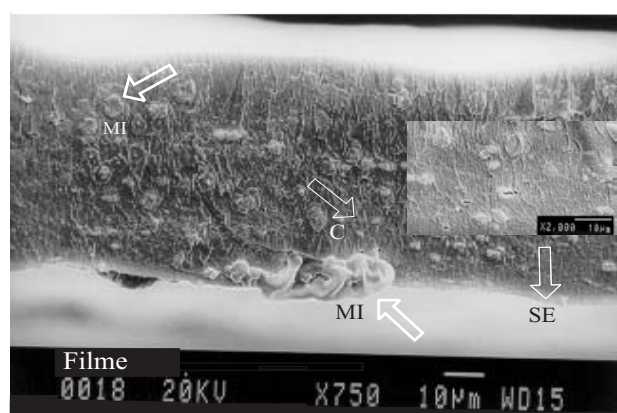
As microfotografias realizadas da fratura ou da seção transversal do filme inclinado 40° (Figuras 5 e 6) revelaram uma estrutura da matriz de proteína fina e compacta, que poderá explicar as propriedades mecânicas e a permeabilidade ao vapor de água, bem como, a solubilidade (dados não mostrados). Contudo, a microfotografia da superfície do filme revelou uma estrutura externa pouco homogênea, apesar de coesa e densa. Essa heterogeneidade se deve provavelmente, aos canais formados no interior da estrutura do filme, quando da saída da água durante a secagem, com conseqüente formação de poros superficiais (Figura 5).

Além desses canais (C na Figura 5), a matriz de proteína mostrou vários pontos brancos (MI), que podem ser algum tipo de materiais insolúveis em solução salina de baixa concentração (0,1M). Observou-se também, embora em pequeno número, algumas descontinuidades na rede protéica, identificadas como fendas (F) visíveis no detalhe da Figura 5. Essas fendas devem ter sido ocasionadas pelo tratamento de vácuo aplicado à amostra, no preparo para microscopia, que pode ter eliminado a glicerina livre, isto é, não totalmente miscível com as proteínas miofibrilares [29]. Essa mesma observação foi realizada com filmes de proteínas

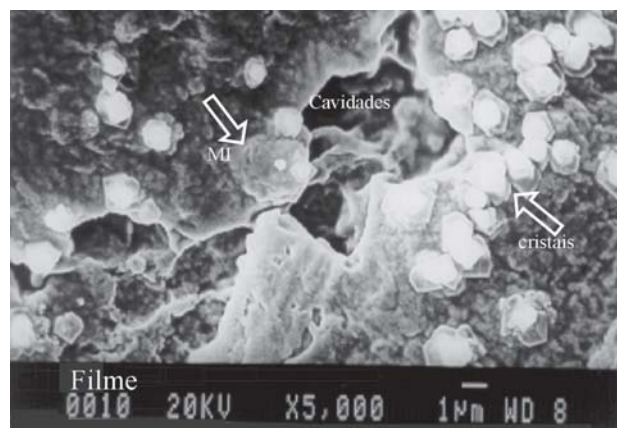
miofibrilares de Tilápia do Nilo, por MONTERREY-QUINTERO & SOBRAL [23].



**FIGURA 4.** Microfotografia das proteínas miofibrilares liofilizadas. 7.500X.



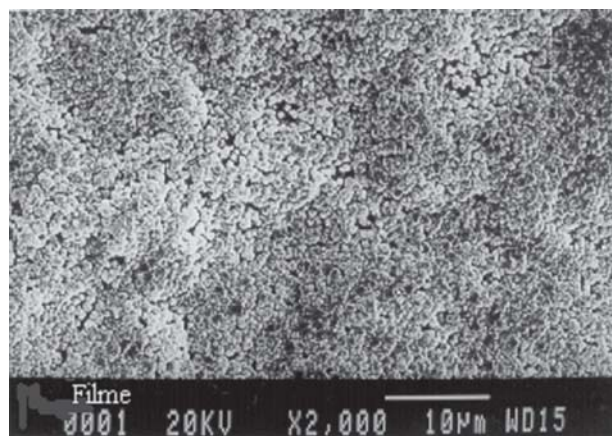
**FIGURA 5.** Microfotografia do filme, corte transversal inclinado 40°, de composição: proteínas miofibrilares, Cp=1% p/p, glicerol Cg=60% p/p proteína seca e pH=2,8. 750 X. C (canais); MI (materiais insolúveis) e SE (superfície externa do filme). Detalhe 2000 X.



**FIGURA 6.** Microfotografia do filme, corte transversal inclinado 40°, de composição: proteínas miofibrilares, Cp=1% p/p, glicerol Cg=60% p/p proteína seca e pH=2,8. 5.000X. MI, materiais insolúveis.

A presença de fendas e poros na estrutura dos filmes podem comprometer a integridade estrutural do filme e, conseqüentemente provocar modificações nas suas propriedades funcionais.

Um outro fenômeno que pode ser explicado pela migração da umidade durante a secagem é o surgimento de cristais distribuídos regularmente na superfície do filme (Figura 7), visíveis em algumas regiões da superfície do filme, isto é, esses cristais não estão presentes em toda a superfície. Essa migração de sais ocorrendo em paralelo com a migração da umidade é um fenômeno conhecido como incrustação (“case hardening”) [3].



**FIGURA 7** – Microfotografia do filme de composição: proteínas miofibrilares, Cp=1% p/p, glicerol Cg=60% p/p proteína seca e pH=2,8. 5.000X. Materiais insolúveis.

Os cristais de sais também são visíveis na microfotografia do corte transversal do filme (Figura 6), onde se pode observar que esses estão em toda parte, isto é, no interior do filme, sobre a superfície de materiais insolúveis e no interior da rede protéica com um grande número de cavidades, que podem ser os espaços vazios anteriormente ocupados pela fração de glicerol. Resultados similares podem ser observados no trabalho de YANG & FRONING [32].

#### 4 – CONCLUSÕES

O método de EISELE & BREKKE [13] modificado neste trabalho foi relativamente prático e muito eficiente na extração de proteínas miofibrilares de carne bovina no estado pós *rigor mortis*. O material assim preparado e liofilizado, apresentou elevado teor de proteínas (84,3%) e foi constituído efetivamente de proteínas miofibrilares, destacando-se a miosina, e seus fragmentos, e a actina, além das proteínas reguladoras.

As proteínas miofibrilares preparadas neste trabalho, apresentaram um perfil de aminoácidos típico do material, e que permitiu o cálculo da energia envolvida nas interações possíveis, observando-se o grande potencial das interações iônicas, que só depende do pH da solução filmogênica. As interações via pontes de hi-

drogênio e entre aminoácidos apolares foram desprezíveis. Por outro lado, as interações via ligação covalente representaram um elevadíssimo nível energético, porém pouco potencial, pois para ocorrer, seria necessário um tratamento térmico forte, o que não foi o caso deste trabalho.

As proteínas miofibrilares extraídas e liofilizadas mostraram-se excelentes matérias-primas para a elaboração de filmes comestíveis. A microestrutura desses filmes, observada tanto na superfície quanto na fratura do filme, foi típica de uma rede de proteína não homogênea, com raras falhas, porém coesa.

## 5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AOAC. **Official Methods of analysis of AOAC International**. 14ª Edição. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1980.
- [2] BANKER, G.S. Film Coating Theory and Practice. **Journal Pharmaceutical**, v. 55, p. 81-89, 1966.
- [3] BEN-YOSEPH, E.; HARTEL, R.W.; HOWLING, D. Tree-Dimensional Model of Phase Transition of Thin Sucrose Films During Drying. **Journal of Food Engineering**, v. 44, n. 1, p. 13-22, 2000.
- [4] BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Canadian Journal Biochemical Physiological**, v. 37, p. 911-917, 1959.
- [5] CHANDRA, P.K.; SOBRAL, P.J.A. Cálculo de Propriedades Viscoelásticas de Biofilmes: Aplicação de Três Modelos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, maio/ago. v. 20, n. 2, p. 250-256, 2000.
- [6] CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L.; LORIENT, D. 1989. **Proteínas Alimentarias: Bioquímica, Propriedades Funcionales, Valor Nutricional, Modificaciones**. Acirbia, Zaragoza.
- [7] CUQ, B. Mise en Forme et Caractérisation de Biomatériaux à Base de Protéines Myofibrillaires. Montpellier, 1996. 213p. Tese (Doutorado em Biochimie et technologies Alimentaires) – Université Montpellier, Academie de Montpellier.
- [8] CUQ, B.; AYMARD, C.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Edible Packaging Films Based on Fish Myofibrillar Proteins: Formulation and Functional Properties. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 6, p. 1369-1374, nov./dez. 1995.
- [9] CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Functional Properties of Myofibrillar Protein-Based Biopackaging as Affected by Film Thickness. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 3, p. 580-584, 1996a.
- [10] CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Stability of Myofibrillar Protein-Based Biopackagings During Storage. **Lebensmittel – Wissenschaft- und -Technologie**, v. 29, n. 4, p. 344-348, 1996b.
- [11] CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J.L.; GUILBERT, S. Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films as Affected by Hydrophilic Plasticizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 622-626, 1997a.
- [12] CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Thermal Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films as Affected by Moisture Content. **Polymer**, v. 38, p. 2399-2405, 1997b.
- [13] EISELE, T.A.; BREKKE, C.J. Chemical and Modification and Functional Properties of Acylated Beef Heart Myofibrillar Proteins. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 4, p. 1095-1102, jul./ago. 1981.
- [14] FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Rome. n. 24, 1970.
- [15] GENNADIOS, A.; WELLER, C.L.; GOODING, C.H. Measurement Errors in Water Vapor Permeability of Highly Permeable, Hydrophilic Edible Films. **Journal of Food Engineering**, v. 21, n. 3, p. 395-409, abr. 1994.
- [16] HOLTON, E.E.; ASP, E.H.; ZOTTOLA, E.A. Corn-Starch-Containing Polyethylene Film Used as Food Packaging. **Cereal Foods World**, v. 39, n. 4, 1994.
- [17] HULF-LONERGAN, E.J.; BEEKMAN, D.D.; PARRISH JR., F.C. Protein Separation and Analysis of Certain Skeletal Muscle Proteins: Principle and Techniques; In: N.S. Hettiarachchy e Ziegler, G.R. (Eds); **Protein Functionality in Food Systems**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 79-119.
- [18] KENNEY, P.B.; KASTENER, C.L.; KROPP, D.H. Muscle Washing and Raw Material Source Affect Quality and Physicochemical Properties of Low-Salt, Low-Fat, Restructured Beef. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 545-551, 1992.
- [19] LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- [20] MILLER, K.S.; CHIANG, M.T.; KROCHTA, J.M. Heat Curing of Whey Protein Films. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 6, p. 1189-1192, 1997.
- [21] MONTERREY-QUINTERO, E.S. **Caracterização Físico-Química de Proteínas Miofibrilares e Elaboração de Biofilmes**. Pirassununga, 1998. 83p. Tese (Mestre em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo (USP).
- [22] MONTERREY-QUINTERO E.S.; SOBRAL P.J.A. Caracterização de Propriedades Mecânicas e Óticas de Biofilmes à Base de Proteínas Miofibrilares de Tilápia do Nilo Usando uma Metodologia de Superfície-Resposta. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 19, n. 2, p. 294-301, 1999.
- [23] MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J.A. Preparo e Caracterização de Proteínas Miofibrilares de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de biofilmes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 179-190, 2000.
- [24] NEVES, E.S. **Estudo da Transferência de Massa em Carne Bovina Salgada Desidratada**. Campinas, 1998. 115p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- [25] OCUNO, D.; SOBRAL, P.J.A. Permeabilidade ao Vapor de Água de Biofilmes à Base de Proteínas Miofibrilares de Carne. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 3, p. 11-16, 2000.
- [26] OKAMOTO, S. Factors Affecting Protein Film Formation. **Cereal Foods World**, v. 23, n. 5, p. 257-262, maio. 1978.
- [27] SAMEJIMA, K.; WOLFE, F.H. Degradation of Myofibrillar Protein Components During Postmortem Aging of Chicken Muscle. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 1, p. 250-254, 1976.
- [28] SOBRAL, P.J.A. Influência da Espessura sobre certas Propriedades de Biofilmes à Base de Proteínas Miofibrilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 1251-1259, 2000.
- [29] SOBRAL, P.J.A.; MONTERREY-QUINTERO, E.S.; HABITANTE, A.M.Q.B. Glass Transition of Nile Tilapia

- Myofibrillar Protein Films Plasticized by Glycerin and Water. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 67, n. 2, p. 499-504, 2002.
- [30] SOBRAL, P.J.A.; OCUNO, D.; SAVASTANO JR., H. Preparo de Proteínas Miofibrilares de Carne e Elaboração de Biofilmes com Dois Tipos de Ácidos: Propriedades Mecânicas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 1, n. 1/2, p. 44-52, 1998.
- [31] STANLEY, D.W.; STONE, A.P.; HULTIN, H.O. Solubility of Beef and Chicken Myofibrillar Proteins in Low Ionic Strength Media. **Journal Agricultural of Food Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 863-867, abr. 1994.
- [32] YANG, T.S.; FRONING, G.W. Selected Washing Process Affect Thermal Gelation Properties and Microstructure of Mechanically Deboned Chicken Meat. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 2, mar./apr. 1992.
- [33] YATES, L.D.; DUTSON, T.R.; CALDWELL, J.; CARPENTER, Z.L. Effect of Temperature and pH on the Post-Mortem Degradation of Myofibrillar Proteins. **Meat Science**, v. 9, n. 2, p. 157-179, 1983.

## 6 – AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pela bolsa de doutorado de SMAS e pela bolsa de pesquisador de PJAS. À FAPESP pelos auxílios.