

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



DESNATURALIZACION DE PROTEINAS  
DE MUSCULO BOVINO DURANTE  
LA CONGELACION Y EL ALMACENAMIENTO  
EN ESTADO CONGELADO

JORGE RICARDO WAGNER

TESIS

- 1986 -

*Tesis 898*

DONACION.....F.....  
▲.....  
Fecha.....28-6-99.....  
Inv. B.....Inv.....B.56.200


El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la Dirección de la Doctora María Cristina Añón.

*a Elda*

*a mis hijos, Ariel y Anabel*

*a mis padres*

## MI AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme permitido iniciar, desarrollar y concluir este trabajo de investigación, mediante las becas que me fueron otorgadas.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por haberme incorporado en sus claustros, permitiéndome optar al grado de Doctor.

A la Doctora María Cristina Añón por haber aceptado dirigir mi trabajo de tesis con responsabilidad y dedicación, brindándome su ayuda, guía y estímulo permanentes durante la realización del mismo.

Al Doctor Alfredo Calvelo quien me brindó su apoyo y confianza al facilitarme el grupo y lugar de trabajo.

Al Señor José Fernando De Olano De Tena por su dedicación en la tarea de mecanografía.

A mis compañeros del CIDCA quienes colaboraron con su ayuda y amistad a la concreción de este trabajo.

Dos caminos divergían en el bosque; y yo fui por el menos transitado,  
y eso hizo que todo fuese diferente.

El camino no tomado, Robert Frost

## INDICE

	página
<b>1. INTRODUCCION</b>	
1.1 Consideraciones generales sobre el músculo y la carne	1
1.2 Composición del músculo	2
1.3 Estructura del músculo esquelético	3
1.4 Proteínas del músculo	4
1.4.1 Fracción soluble: proteínas sarcoplásmicas	4
1.4.2 Fracción insoluble: proteínas del tejido conectivo	4
1.4.3 Proteínas contráctiles ó miofibrilares	5
1.4.3.1 Miosina	5
1.4.3.2 Actina	7
1.5 Bioquímica del músculo	8
1.6 Cambios post - mortem en la estructura muscular:	
<b>Conversión de músculo a carne</b>	9
1.7 Conservación de la carne	10
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b>	
2.1 Muestras utilizadas	16
2.2 Congelación de la carne	16
2.2.1 Congelación de cilindros de carne	16
2.2.1.1 Obtención de rodajas de carne congelada a distintas velocidades: congelación rápida, intermedia y lenta	16
2.2.2 Congelación directa de rodajas de carne	21
2.2.2.1 Obtención de rodajas de carne congeladas a velocidad rápida y lenta	21
2.3 Almacenamiento congelado	24
2.4 Composición y pH del músculo	24
2.4.1 Medición del pH del músculo	24
2.4.2 Determinación de humedad	24
2.4.3 Determinación del contenido total de proteínas	25
2.4.4 Determinación del contenido de proteínas miofibrilares, sarcoplásmicas y tejido conectivo	25

	página
2.5 Solubilidad de proteínas totales del músculo	25
2.6 Preparación de miofibrillas y proteínas sarcoplásmicas de músculo bovino	26
2.7 Determinación de la concentración de proteínas en los extractos miofibrilar y sarcoplásmico	27
2.8 Medición de la actividad ATPásica de miofibrillas	28
2.9 Solubilidad de las miofibrillas	29
2.10 Viscosidad y comportamiento reológico de miofibrillas	30
2.11 Capacidad de absorción de agua de las miofibrillas	31
2.12 Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS - PAGE)	32
2.12.1 Preparación de placas de gel de poliacrilamida	33
2.12.2 Preparación de las muestras de proteínas miofibrilares, sarcoplásmicas y patrones de PM conocido	33
2.12.3 Condiciones de corrida	34
2.12.4 Coloración de bandas	34
2.12.5 Densitometría	34
2.13 Calorimetría Diferencial de Barrido ( D.S.C. )	34
2.13.1 Cálculo de las constantes cinéticas de las transiciones térmicas de las proteínas miofibrilares en músculo bovino	39
2.13.1.1 Método dinámico	40
2.13.1.2 Método isotérmico	41
2.14 Tratamiento estadístico	41
<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
3. <b>DESNATURALIZACION DE PROTEINAS EN MUSCULO BOVINO: EFECTO DE LA CONGELACION</b>	
3.1 Caracterización de las muestras. Condiciones iniciales	43
3.2 Propiedades de solubilidad de las proteínas del músculo	44
3.3 Modificaciones estructurales de las proteínas miofibrilares	48

	página
3.4 Estabilidad de miosina y actina	52
3.5 Cambios en la interacción actina - miosina	69
3.6 Viscosidad, comportamiento reológico y capacidad de absorción de agua de miofibrillas aisladas	74
3.7 Implicancias generales del efecto de la congelación sobre la desnaturalización proteica.	77
<b>4. DESNATURALIZACION DE PROTEINAS EN MUSCULO BOVINO: EFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO</b>	
4.1 Estado de conservación de las muestras durante el período de almacenamiento	84
4.2 Modificaciones en la estructura de los filamentos gruesos y finos	87
4.3 Cambios en la miosina y en la interacción actina - miosina	95
4.4 Estado de agregación de las proteínas miofibrilares: Solubilidad de las proteínas miofibrilares	102
4.5 Comportamiento reológico y capacidad de absorción de agua de las miofibrillas aisladas de músculo almacenado	108
4.6 Estudio cinético del deterioro proteico en músculo congelado	115
4.6.1 Cinética de Desnaturalización	116
4.6.2 Cinética de Insolubilización	124
4.6.3 Mecanismo de Deterioro	127
4.7 Efectos globales del almacenamiento congelado sobre la desnaturalización y agregación proteica.	133
<b>5. CONCLUSIONES</b>	141
<b>APENDICE I</b>	143
<b>ESTUDIO DE LA CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE LAS PROTEINAS MIOFIBRILARES DE MUSCULO BOVINO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO</b>	

	página
I.1 Influencia del pH	143
I.2 Cinética de desnaturalización térmica de las proteínas miofibrilares	148
I.2.1 Determinación de las constantes cinéticas por el método dinámico	148
I.2.2 Confirmación de las constantes cinéticas por el método isotérmico	154
I.3 Estimación de la entalpía de las transiciones individuales	157
I.4 Estimación de las funciones termodinámicas de cada transición	159
I.5 Conclusiones del estudio cinético	163
<b>APENDICE II</b>	165
6. REFERENCIAS	167

## INTRODUCCION

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 Consideraciones generales sobre el músculo y la carne

Una amplia variedad de tejidos animales han sido y son utilizados como alimento para consumo humano. De éstos, el tejido muscular es uno de los más apreciados por su alto valor nutritivo y económico.

Los términos "músculo" y "carne" son empleados indistintamente; sin embargo sería más apropiado hablar de músculo cuando nos referimos al tejido funcional y aplicar el término carne para indicar el tejido muscular que ha sufrido una serie de cambios químicos y bioquímicos después de la muerte. La carne es entonces un miosistema comestible, derivado de especies animales (tales como mamíferos, aves de corral, pescados, moluscos), susceptible al deterioro microbiológico y enzimático a temperaturas superiores a 0°C. Aunque los músculos esqueléticos y viscerales en animales sanos se encuentran generalmente estériles o con poblaciones microbianas no patógenas muy bajas; después de la muerte del animal se produce inevitablemente su contaminación por invasión de microorganismos, tanto por vía interna (sistema vascular) como por vía externa (flora intestinal, ambiente, agua de lavado, operarios) (Urbain, 1976).

El tiempo de vida útil de miosistemas intactos, desde el punto de vista de la degradación bacteriana, depende fundamentalmente del tipo y la cantidad inicial de microorganismos contaminantes, del pH del tejido y tamaño de la pieza (relación superficie-volumen) y de la temperatura de almacenamiento (Fennema et al, 1973).

Por su alto contenido acuoso, la carne es uno de los alimentos más perecederos. Su adecuada conservación constituye entonces una necesidad básica para el consumo, siendo importante aplicar aquellos procesos de preservación, capaces de evitar o retardar no sólo el desarrollo microbiano, sino además los cambios bioquímicos post-mortem que inutilizan a la carne como alimento o que reducen su calidad. Estos cambios incluyen alteraciones indeseables en el color, en el sabor y aroma (flavor) y en la textura del producto cárneo después de su cocción (Lawrie, 1974). A fin de comprender la naturaleza de estas alteracio-

nes, es importante conocer la composición y la estructura del tejido muscular.

## 1.2 Composición del músculo

La composición química del músculo varía con la edad, sexo, especie, genotipo y estado de nutrición del animal del cual proviene. Para un mismo animal la función y la localización anatómica del músculo, también influyen sobre la relación de sus componentes. Sin embargo, la composición es relativamente constante para una amplia variedad de animales, siendo el contenido lipídico el más variable. Un análisis promedio de músculos magros provenientes de animales bien alimentados daría los siguientes valores aproximados: Fracción nitrogenada: 19.5% (proteína, 18% y nitrógeno no proteico, 1.5%), Grasa: 3.0%, Agua (inversamente proporcional al contenido de grasa): 75.0%, Glucógeno: 1.0% y Cenizas: 1.5% (Ockerman, 1977).

Al alto contenido de proteínas del músculo, se suma su alta calidad o valor biológico, ya que la relación de aminoácidos esenciales es muy similar a la requerida para el mantenimiento y crecimiento del tejido humano. La fracción de nitrógeno no proteico consiste en compuestos nitrogenados que incluyen principalmente pequeños péptidos, aminoácidos libres, creatina y nucleótidos (Bodwell y Mc Clain, 1976).

En las células musculares, la mayoría de los lípidos está en forma de triglicéridos y en sus membranas se encuentra la mayor proporción de fosfolípidos. Los lípidos varían cuanti y cualitativamente con el nivel de dieta y con la especie y tipo de músculo y fibras (Lawrie, 1974).

Respecto a los elementos inorgánicos, los cuales se encuentran en el tejido muscular formando parte de moléculas inorgánicas y orgánicas, comunmente se analizan sobre las cenizas resultantes de la calcinación. El músculo es una buena fuente de Fe y P, y es bastante pobre en Ca (aproximadamente 10 mg/100 g de músculo). Del total de sales minerales, el 38% son iones  $K^+$  intracelulares y el 7% iones  $Na^+$  extracelulares (Lawrie, 1974; Hultin, 1976).

Como vimos, el mayor componente de la célula muscular es el agua ( $\sim 75\%$ ), que por ser una molécula altamente polar se encuentra dentro y entre

las células del músculo, formando uniones electrostáticas y químicas con grupos polares e iónicos; aunque también hay agua atrapada físicamente por fuerzas de capilaridad. La relación de agua libre (agua removida del músculo por acción física) a agua unida, depende de las interacciones agua-proteína y proteína-proteína. Estas últimas determinan el tamaño de los espacios capaces de contener agua en el retículo proteico, formado esencialmente por las proteínas miofibrilares, elementos contráctiles fibrosos que juegan el rol principal en la retención de agua dentro del músculo (Briskey y Fukazawa, 1971). Los mismos autores describen al tejido muscular como un sistema coloidal, es decir una balanceada suspensión proteica en una solución salina diluída.

### 1.3 Estructura del músculo esquelético

El músculo esquelético está compuesto por largas y delgadas células (fibras musculares) cilíndricas y multinucleadas, de una longitud que puede alcanzar hasta 47 cm y un diámetro de 10 a 100  $\mu\text{m}$ . Estas fibras están organizadas en forma paralela formando atados o paquetes; grupos de los cuales forman el músculo (Hultin, 1976).

Rodeando al músculo entero hay una funda de tejido conectivo o conjuntivo, llamada "epimisium". Desde la superficie interna del epimisium, prolongaciones del mismo tejido conectivo penetran en el interior del músculo separando los atados de fibras. Este tejido se denomina "perimisium". Desde éste salen finas películas de tejido conjuntivo ("endomisium") que rodean a las fibras musculares individualmente (Ockerman, 1974).

La superficie exterior de la fibra actúa como una membrana semipermeable, que es llamada sarcolema. Su función es mantener la presión osmótica celular y transmitir la acción potencial a lo largo de la fibra (Katz, 1966). El sarcolema está a su vez conectado al retículo sarcoplásmico, sistema membranoso que atraviesa el interior de la fibra, en forma de túbulos y vesículas. El retículo sarcoplásmico posee la habilidad de unir y liberar iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Cassens y Cooper, 1971) y de transmitir desde el sarcolema, los impulsos nerviosos necesarios para la contracción y relajación muscular (Price y Schweigert,

1971; Pearson, 1976).

Cada fibra muscular contiene un número elevado de pequeñas fibrillas (miofibrillas) que constituyen el sistema contráctil. Las miofibrillas están rodeadas y embebidas por un material semifluido denominado sarcoplasma, el cual contiene enzimas glucolíticas, mioglobina, péptidos, aminoácidos, glucógeno, trifosfato de adenosina (ATP), fosfocreatina y electrolitos inorgánicos. Rodean además a las miofibrillas elementos tales como mitocondrias, lisosomas, ribosomas y núcleos (Hultin, 1976).

#### 1.4 Proteínas del músculo

Las proteínas musculares pueden clasificarse según su funcionalidad y solubilidad, en tres fracciones: proteínas solubles, insolubles y contractiles (Ockerman, 1974).

##### 1.4.1 Fracción soluble: proteínas sarcoplásmicas

Las proteínas sarcoplásmicas (llamadas también miógeno o extracto sarcoplásmico) pueden ser extraídas del músculo con agua o con soluciones salinas diluídas (0.1 M KCl) y comprenden cerca del 6% del músculo. Estas proteínas están en el fluido que rodea y penetra a las miofibrillas y a otras organelas de la fibra muscular.

Las proteínas sarcoplásmicas están compuestas de las siguientes subunidades: 1) sobrenadante citoplásmico (4% del músculo) formado por enzimas glucolíticas solubles; 2) fracción nuclear y 3) fracción microsomal, compuesta por mioglobina (pigmento del tejido que representa el 0.2 - 0.4% del músculo), hemoglobina (pigmento de la sangre, 0.4% del músculo) y proteínas solubles de las mitocondrias y lisosomas (estructuras que contienen enzimas hidrolíticas) (Scopes, 1970).

##### 1.4.2 Fracción insoluble: proteínas del tejido conectivo

Las proteínas del tejido conectivo son proteínas fibrosas, insolubles

en agua y en soluciones salinas tanto diluídas como concentradas ( $\geq 0.6M$  KCl) a temperatura ambiente y comprenden el 2% del músculo. El tejido conectivo representa el mayor soporte para los tejidos del cuerpo; engloba estructuras, cubre y conecta a los músculos, órganos y huesos entre sí, además de mantener unidas a las fibras musculares. Las proteínas del tejido conectivo se encuentran en las siguientes estructuras: piel, cartílagos, tendones, venas; y dentro del músculo, en sarcolema, perimisium, epimisium y endomisium (Cheftel y Cheftel, 1976).

El tejido conectivo está compuesto por los siguientes tipos de proteínas: 1) Colágeno, tejido conectivo blanco que se solubiliza y convierte en gelatina por calentamiento, 2) Elastina, tejido conectivo amarillo y 3) Reticulina (Hamm, 1970).

#### 1.4.3 Proteínas contráctiles o miofibrilares

Las proteínas miofibrilares son insolubles en agua y en soluciones salinas diluídas, pero pueden ser extraídas con soluciones más concentradas ( $\simeq 0.6M$  KCl) y representan cerca del 10% del músculo entero. Estas proteínas forman las miofibrillas, las cuales le otorgan rigidez a la célula y son mecánicamente responsables de la conversión de energía química a mecánica. Las miofibrillas recorren longitudinalmente a la célula muscular y están compuestas por filamentos paralelos, alternativamente gruesos y delgados, que le confieren a la miofibrilla su aspecto estriado (Briskey y Fukazawa, 1971).

Las principales proteínas miofibrilares son: miosina, actina y proteínas menores (tropomiosina, troponina,  $\alpha$  y  $\beta$  - actininas), que corresponden respectivamente al 5.8%, 2.5% y 1.7% del músculo (Ockerman, 1977).

##### 1.4.3.1 Miosina

La miosina es una molécula proteica muy alargada ( $PM \simeq 5.10^5$ ), altamente asimétrica y hexamérica, que contiene numerosos dominios funcionales y estructurales (Hamm, 1970; Harrington y Rodgers, 1984). Consiste en dos cabe-

zas o regiones globulares unidas a una larga cola en forma de varilla. La miosina posee entonces ambas propiedades: globular (soluble en agua) y fibrosa (insoluble en agua). Debido a esta característica puede ser extraída del músculo únicamente con soluciones salinas concentradas (0.5M KCl), dando soluciones altamente viscosas (Briskey y Fukazawa, 1971).

La zona de la cola contiene los sitios de unión responsables del montaje de las moléculas de miosina, para formar la estructura funcional de los filamentos gruesos. Las cabezas globulares contienen varios sitios activos: el enzimático (unión e hidrólisis del ATP), el de unión a actina y muchos sitios de unión para cationes divalentes. Entre las cabezas y la cola, hay una región denominada cuello, que le confiere flexibilidad al movimiento de las cabezas durante la contracción (Harrington y Rodgers, 1984).

En las células musculares, centenares de moléculas de miosina están simétricamente organizadas en las estructuras bipolares de los filamentos gruesos. Las cabezas de miosina se proyectan desde las superficies de estas estructuras para interactuar cíclicamente con los vecinos filamentos finos de actina y generar la fuerza contráctil (Murray y Weber, 1974).

La molécula de miosina posee seis cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas ( $PM \approx 23 \cdot 10^4$ ), dos cadenas livianas esenciales ( $PM \approx 16-20 \cdot 10^3$ ) y dos cadenas livianas regulatorias ( $PM \approx 16-20 \cdot 10^3$ ) (Harrington y Rodgers, 1984). La sección de la cola de miosina está formada por el enrollamiento de las cadenas pesadas en la zona de conformación  $\alpha$ -hélice (Davey, 1983) dando una estructura superenrollada, con una elevada densidad de cargas positivas y negativas. Aproximadamente cada tres aminoácidos hay un grupo cargado (Bendall, 1969).

La zona globular de cada cadena pesada (que no interviene en la cola) se mantiene unida, por uniones no covalentes, con una cadena liviana esencial y una cadena liviana regulatoria para formar la región o cabeza globular de miosina llamada subfragmento-1 (S-1). Esta es la porción de la molécula que permite la interacción entre los filamentos de miosina y actina. Cada cabeza contiene dos grupos tioles altamente reactivos, que están involucra

dos en la hidrólisis del ATP y en la interacción con actina, para formar el complejo actomiosina (Harrington y Rodgers, 1984).

La acción de algunas enzimas proteolíticas, tales como la tripsina, escinde a la molécula de miosina en dos porciones: meromiosina pesada (HMM) y meromiosina liviana (LMM) (Hamm, 1970). La porción LMM es la 2/3 partes de la cola de miosina, tiene igual que la cola una conformación de  $\alpha$ -hélice superenrollada y es soluble solamente a altas fuerzas iónicas (Lowey et al., 1966). La porción HMM está compuesta por la cabeza, el cuello y el 1/3 restante de la cola de miosina. Esta estructura conserva las propiedades enzimáticas de miosina y es soluble a bajas fuerzas iónicas (Hamm, 1970).

#### 1.4.3.2 Actina

La actina es la mayor proteína de los filamentos finos. Está unida a la estructura muscular más firmemente que la miosina. La molécula de actina existe en el músculo como una estructura en doble hélice, llamada actina fibrosa o F-actina. Su monómero es la actina globular o G-actina ( $PM \approx 45.10^3$ ), la cual consiste en una cadena polipeptídica con un alto contenido en prolina y un número elevado de residuos laterales no polares (Bendall, 1969). Esto hace que la cadena se pliegue y adquiera una baja densidad de carga superficial, produciendo una molécula con una estructura compacta, un bajo contenido helicoidal y una forma esférica-globular.

La actina, en su interacción con miosina, forma el complejo actomiosina, el cual exhibe igual que la miosina libre, una alta viscosidad en solución. Aunque la molécula de actina por sí misma no tiene actividad enzimática, modifica significativamente la actividad ATPásica de miosina en el complejo actomiosina. La miosina pura requiere de ión  $Ca^{2+}$  para su actividad y es inhibida por  $Mg^{2+}$ . La actividad ATPásica de la actomiosina en cambio, es estimulada por  $Mg^{2+}$  (Bodwell y Mc Clain, 1976).

Los filamentos finos están compuestos básicamente por F-actina, tropomiosina, troponina y  $\alpha$ - y  $\beta$ -actinina. La columna vertebral de estos filamentos es la estructura enrollada de actina, alrededor de la cual se ubican las

proteínas menores (Hamm, 1970).

La tropomiosina (molécula corta y fina,  $PM \approx 35 \cdot 10^3$ ) forma delgados filamentos que se unen a la estructura de actina. Está localizada además en las líneas Z (zonas de mayor densidad, que unen los filamentos finos entre sí). La troponina es una proteína globular oblonga, que se encuentra en los filamentos finos a razón de una troponina por cada tropomiosina. Cada 7 moléculas de G-actina hay una troponina y una tropomiosina. Estas últimas tienen la propiedad de unir  $Ca^{2+}$ , confiriéndole sensibilidad al complejo actomiosina (Murray y Weber, 1974). Las  $\alpha$ - y  $\beta$ -actininas son las proteínas menores de más baja concentración en los filamentos finos. La  $\alpha$ -actinina interviene en el entrecruzamiento de actina y está localizada también en la línea Z, en tanto que la  $\beta$ -actinina está asociada con la troponina (Briskey et al., 1967).

### 1.5 Bioquímica del músculo

En presencia de ATP e iones  $Mg^{2+}$  (mientras los iones  $Ca^{2+}$  quedan retenidos en el retículo sarcoplásmico), la miosina no tiene actividad ATPásica y el músculo está en estado de relajación (no hay interacción entre filamentos finos y gruesos). La miosina se encuentra entonces como un complejo miosina- $Mg^{2+}$  - ATP.

Cuando el retículo sarcoplásmico libera iones  $Ca^{2+}$  ( $\geq 10^{-7} M$ ) en respuesta a un estímulo nervioso, se manifiesta la actividad ATPásica de miosina. La hidrólisis del ATP libera energía y se produce la contracción muscular por la interacción miosina-actina. Cuando cesa el impulso nervioso, el retículo sarcoplásmico recobra el  $Ca^{2+}$  ( $< 10^{-7} M$ ) y la contracción llega a su fin, bajo la condición de que hayan siempre ATP e iones  $Mg^{2+}$  disponibles (Cheftel y Cheftel, 1976).

Normalmente, el contenido de ATP permanece casi constante; se regenera principalmente a través de los siguientes caminos: refosforilación del ADP (adenosin difosfato) a partir de fosfocreatina y glucólisis anaerobia del glucógeno muscular. A estas dos vías se suma la formación de ATP por medio del ciclo de Krebs (recuperación aeróbica del músculo en reposo o trabajo modera-

do) (Hultin, 1976).

## 1.6 Cambios post-mortem en la estructura muscular:

### Conversión de músculo a carne

El cambio físico más notable después de la muerte del animal, es el endurecimiento y la inextensibilidad del sistema muscular. Este estado es conocido como rigidez cadavérica (o rigor mortis). Los factores químicos que son parcialmente responsables y acompañan el rigor son, el descenso del pH y el agotamiento del ATP (Cheftel y Cheftel, 1976; Ockerman, 1977).

La interrupción de la circulación sanguínea priva al músculo del aporte de oxígeno: la respiración celular se paraliza, disminuye el potencial redox y surge la glucólisis anaerobia. En estas condiciones el glucógeno en vez de degradarse en  $H_2O$  y  $CO_2$ , se transforma en lactato, con una generación de ATP insuficiente para mantener un nivel constante; ya que por acción de las ATPasas sarcoplásmicas y miofibrilar, se sigue hidrolizando ATP en el músculo post-mortem. Al momento de la muerte, el retículo sarcoplásmico libera todo el  $Ca^{2+}$  y pierde su habilidad de recobrarlo. La presencia permanente de iones  $Ca^{2+}$  (a una concentración  $\geq 10^{-7}$  M), activa la ATPasa de miosina, y aunque la fosfocreatina disponible regenera algo de ATP, éste se agota rápidamente. Por otro lado, la liberación de  $H^+$  en la hidrólisis de ATP (que se correlaciona con el aumento de lactato), conduce a un descenso del pH (desde 7.2 a 5.5 aproximadamente), produciéndose la inhibición progresiva de algunas enzimas, especialmente la fosforilasa (Hultin, 1976). En definitiva, la glucólisis se detiene y el contenido de ATP se aproxima a cero. En ese instante, los filamentos de actina y miosina se unen irreversiblemente produciendo el estado de rigor. La temperatura del músculo post-mortem puede alterar la velocidad de caída del pH y consecuentemente, de la aparición del rigor. En músculo bovino a temperatura ambiente, este proceso exige unas 8 horas (Cheftel y Cheftel, 1976).

El valor de pH alcanzado, afecta las características del músculo. Un

pH final elevado ( $\approx 5.8$ ) produce cortes oscuros de carne bovina y en el otro extremo, los músculos PSE (pálido, blando y exudativo) están asociados a muy bajos valores finales de pH y a altas temperaturas post-mortem ( $30^{\circ}\text{C}$ ), que conducen a la reducción de la extractibilidad de proteínas sarcoplámicas y miofibrilares, y de la capacidad de retención de agua (Briskey et al., 1966).

El término "resolución del rigor" o "maduración" se utiliza para describir el pasaje del músculo de su condición rígida a un estado de flacidez. Esta maduración no es el resultado de la disociación de los enlaces establecidos entre actina y miosina, sino de la acción proteolítica de enzimas endógenas tales como las catepsinas (enzimas liberadas de los lisosomas por el descenso del pH) sobre las líneas Z y los filamentos-g (estructuras fibrosas que rodean y atraviesan las miofibrillas)(Davey, 1983).

A medida que se resuelve el rigor, mejora la textura y aumenta la capacidad de retención de agua del músculo (mayor terneza y jugosidad después de la cocción). Sin embargo, si la maduración se extiende por tiempos prolongados a temperaturas superiores a  $0^{\circ}\text{C}$ , comienzan a aparecer cambios organolépticos que desfavorecen la aceptabilidad de la carne, ocasionados fundamentalmente por desarrollo de microorganismos. La influencia del crecimiento bacteriano, parece seguir dos caminos; la degradación de proteínas y la modificación del pH (Hasegawa et al., 1970; Ockerman et al., 1974).

El color del músculo es principalmente afectado por el pH, el cual controla el estado físico de las miofibrillas y por lo tanto, la reflexión de la luz desde el músculo. El pasaje de mioglobina a metamioglobina (color marrón) también se ve favorecido con un aumento del pH (Hultin, 1976).

La proteólisis y el metabolismo de nucleótidos (tales como el ATP y el ADP) pueden generar compuestos que contribuyen significativamente a los cambios en el aroma y sabor (flavor) del producto cocido (Lawrie, 1974).

### 1.7 Conservación de la carne

El propósito de la mayoría de las técnicas de preservación aplicadas a los alimentos, es disminuir o prevenir los cambios que conducen al deterio-

ro del producto. Estas alteraciones son causadas principalmente por el desarrollo de microorganismos contaminantes, por reacciones químicas y bioquímicas de los componentes naturales del tejido alimenticio y/o por fenómenos físicos simples como la deshidratación. Para evitar estos cambios se siguen generalmente algunos de los siguientes procedimientos: 1) Remoción de agua (disminución de la actividad acuosa), 2) Remoción de sustancias activas (por ejemplo oxígeno), 3) Empleo de aditivos químicos, 4) Disminución de la temperatura, 5) Aplicación de calor y 6) Envasado. En la combinación de dos o más de estas operaciones fundamentales, se basa la mayoría de las técnicas de procesado de alimentos (Hultin, 1976).

Ocurre muy a menudo que el logro de un objetivo deseable conduce inevitablemente a consecuencias indeseables. Esto se ve especialmente, cuando el principal objetivo del proceso es reducir la contaminación de microorganismos, y se terminan generando importantes cambios físico-químicos en el alimento procesado. Se debe tener presente entonces, que el tratamiento en sí mismo, de ser aplicado inadecuadamente y sin control, puede producir efectos tanto o quizás más perjudiciales que aquellos a los cuales se quiere evitar.

Habiendo visto la propensión de la carne a la degradación enzimática y bacteriana durante su almacenamiento a temperaturas mayores a 0°C (favorecida por el elevado contenido de agua y de nutrientes en el tejido), es de esperar que la remoción de agua y el control de la temperatura, permitan conservar la carne durante tiempos prolongados. También, la inhibición directa de los microorganismos y la inactivación de enzimas, pueden resultar de utilidad en tal objetivo.

De los métodos de conservación existentes, los aplicables a la carne son: a) Tratamiento térmico, b) Deshidratación, c) Salazón, d) Conservadores químicos, e) Aplicación de radiaciones ionizantes, f) Refrigeración y g) Congelación. Mientras que el calentamiento, las radiaciones ionizantes y los conservadores basan su acción en la inactivación enzimática y en la disminución de microorganismos viables, la deshidratación y la salazón, en el control del agua disponible; la refrigeración y la congelación lo hacen por medio del con

trol de la temperatura. Sin embargo, la congelación es en realidad una combinación de al menos dos efectos: deshidratación interna del tejido y descenso de la temperatura. La deshidratación de la carne en estado congelado, que produce una considerable disminución de la actividad acuosa ( $a_w$ ), se debe tanto a la formación de cristales de hielo como al aumento de la concentración salina en la porción de agua no congelada (Fennema et al., 1973). Estos dos efectos sumados al de la baja temperatura ( $<-1^{\circ}\text{C}$ , temperatura media de congelación de los tejidos musculares), controlan satisfactoriamente el crecimiento bacteriano sin requerir del agregado de aditivos químicos preservadores (como ocurre en el caso de la refrigeración) logrando conservar la carne desde el punto de vista higiénico y nutricional, durante períodos prolongados (Lawrie, 1974; Urbain, 1976; Desrosier y Desrosier, 1977).

A pesar de sus ventajas, la congelación de la carne y más aún su almacenamiento en estado congelado traen aparejados cambios indeseables en sus atributos sensoriales, principalmente cambios en la textura, pérdida de la capacidad de retención de agua y desarrollo de rancidez (Fennema et al., 1973).

La mayoría de los estudios, llevados a cabo principalmente sobre músculos de pescado (Matsumoto, 1979, 1980; Shenouda, 1980), indican que la desnaturalización de las proteínas del músculo, especialmente de las miofibrilares, juegan un rol importante en los cambios de calidad mencionados; con excepción de la rancidez que está relacionada con reacciones de oxidación de los lípidos durante el almacenamiento congelado y que conduce a modificaciones desfavorables en el sabor y en el olor del producto cárneo una vez cocido.

El color, aunque sólo a nivel superficial, también se ve alterado durante el almacenamiento congelado, debido a la oxidación de mioglobina a metamioglobina. A esta reacción contribuyen la difusión de oxígeno y la deshidratación superficial del tejido congelado por sublimación del hielo (quemadura por frío) (Fennema et al., 1973).

El método de congelación, el tipo de envasado y la temperatura de almacenamiento, influyen significativamente sobre el tiempo en que la calidad se mantiene a un nivel aceptable. La alteración del color y el desarrollo de

rancidez, se controlan satisfactoriamente con la baja temperatura y el empleo de películas impermeables al oxígeno y a la humedad. En cambio las alteraciones vinculadas a la desnaturalización proteica son las más difíciles de controlar, pues se producen por el proceso mismo de la congelación, viéndose influenciadas por la velocidad de congelación (que gobierna la morfología y la distribución de los cristales de hielo), por la temperatura (que determina la cantidad de hielo formado) y su fluctuación durante el almacenamiento (que favorece la recristalización del hielo) (Shenouda, 1980).

La velocidad de congelación queda determinada por la rapidez con que desciende la temperatura en el músculo congelado. Así, por ejemplo, cuando se colocan piezas de carne relativamente grandes a temperaturas no inferiores a  $-10^{\circ}\text{C}$ , resulta una velocidad lenta de congelación. Bajo esas condiciones, hay únicamente congelación del fluido extrafibrilar con formación de grandes columnas de hielo. Al aumentar la velocidad de congelación (lo que se logra por ejemplo, congelando piezas más pequeñas y empleando temperaturas de congelación inferiores a  $-30^{\circ}\text{C}$ ), además del hielo extracelular, comienza a formarse hielo intracelular, desde un único cristal hasta la aparición de numerosos cristales pequeños cuando la congelación es muy rápida (Love, 1966; Bevilacqua et al., 1979; Jul, 1969).

La cantidad de agua tisular congelada depende de la temperatura alcanzada en la congelación. Por debajo del punto de congelación, el contenido de hielo aumenta rápidamente hasta alcanzar los  $-5^{\circ}\text{C}$ , temperatura a la cual, en el caso del músculo bovino, está congelada cerca del 74% del agua total del tejido (Riedel, 1957). A temperaturas más bajas, continúa la formación de hielo a partir del agua disponible o congelable presente en el tejido. Hay un porcentaje de agua ligada fuertemente a las proteínas, que no congela aún cuando la temperatura alcanza los  $-70^{\circ}\text{C}$ . Es conocida como agua unida y representa aproximadamente el 10% del agua total (Fennema et al., 1973).

Durante el almacenamiento congelado, el hielo formado se ve afectado por el fenómeno conocido como recristalización, el cual consiste en el crecimiento de grandes cristales a expensas de los más pequeños en un sistema poli-

cristalino, conduciendo a la reducción en el número de cristales y al incremento del tamaño medio cristalino (Brook, 1976; Bevilacqua y Zaritzky, 1982).

Estos cambios, aunque parecen limitarse a la fase acuosa, son los que directa o indirectamente causan las alteraciones proteicas del músculo en estado congelado y conducen como efecto más notable a la pérdida de solubilidad (Connell, 1962, 1968; King, 1966; Awad et al, 1968). Los mismos factores que controlan el desarrollo de microorganismos y la acción enzimática, son a su vez los que propician la desnaturalización de las proteínas musculares: formación y crecimiento del hielo, deshidratación interna del tejido, e incremento de la concentración salina (Shenouda, 1980).

En general, la funcionalidad de las proteínas en los sistemas biológicos requiere el mantenimiento dentro de límites relativamente estrechos de una estructura o conformación particular. Cuando la proteína es capaz de realizar su función, se dice que posee conformación o estructura nativa. Dicha estructura puede sufrir profundos cambios, con la consiguiente alteración de las propiedades específicas que determinan la funcionalidad e identidad de la molécula proteica. Estos cambios son comunmente conocidos como "desnaturalización" (Bodwell y Mc Clain, 1976).

Los efectos de la desnaturalización de proteínas se pueden reunir en los siguientes puntos: a) aumento de la susceptibilidad de la proteína a la hidrólisis por enzimas proteolíticas, b) disminución de la solubilidad, c) pérdida de la capacidad de cristalizar, d) disminución o pérdida de la actividad biológica (en el caso de una enzima, pérdida de la actividad enzimática), e) incremento de la reactividad química (por exposición de grupos reactivos), f) cambios en la forma molecular, g) incremento de la viscosidad intrínseca y h) de la rotación óptica de la proteína en solución. Estos cambios sugieren que el pasaje del estado nativo al desnaturalizado, implica el desplegamiento de la cadena polipeptídica con aumento de la exposición de residuos hidrofóbicos. La desnaturalización puede definirse entonces como una modificación en las estructuras secundaria, terciaria y/o cuaternaria de la molécula proteica, que no involucra la ruptura de uniones covalentes. Es un proceso en el cual se

rompen puentes hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y uniones salinas (Wu e Inglett, 1974; Anglemier y Montgomery, 1976).

El objetivo de este trabajo de tesis es estudiar el efecto de la congelación y del almacenamiento en estado congelado sobre la desnaturalización de las proteínas del músculo bovino; y analizar la influencia que ejercen la velocidad de congelación, el tiempo y la temperatura de almacenamiento. Se propondrá una cinética de desnaturalización y de agregación de las proteínas musculares y un mecanismo de deterioro global del músculo en estado congelado. Para ello se estudiaron los siguientes parámetros indicativos de desnaturalización y agregación proteica: actividad enzimática, solubilidad, viscosidad, comportamiento reológico y electroforético, capacidad de absorción de agua y transiciones térmicas.

MATERIALES  
Y  
METODOS

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Muestras utilizadas

Los experimentos se llevaron a cabo con músculo semitendinoso bovino ("Peceto"), de 48 horas post mortem, proveniente de novillos clasificados A ó B por la Junta Nacional de Carnes de la República Argentina. Se emplearon muestras en estado fresco, congelado a distintas velocidades y almacenado en estado congelado a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2 Congelación de la carne

El proceso de congelación del músculo se realizó siguiendo dos técnicas diferentes: en cilindros y en rodajas.

2.2.1 Congelación de cilindros de carne: de cada músculo utilizado se separó un trozo de aproximadamente 30 gramos para realizar los estudios en estado fresco (no congelado) y con el resto se cortaron con un sacabocados, cilindros de 8 a 10 cm de largo y 5 cm de diámetro (con su eje longitudinal paralelo a las fibras musculares). Cada cilindro de carne, así obtenido, se envolvió con una película de polietileno, dejando al descubierto sus bases y se colocó entre dos semitubos cilíndricos de acrílico de 10 cm de longitud y 5 cm de diámetro interno, los cuales poseían pequeños orificios laterales distantes de la base y entre sí en 0.5 cm, para introducir termocuplas en el eje longitudinal del cilindro y poder entonces conocer su historia térmica durante la congelación, siguiendo las variaciones de temperatura con el tiempo. Los cilindros con sus cubiertas de acrílico fueron además aislados del ambiente rodeándolos lateral y superiormente con una capa aislante de polietileno expandido a fin de evitar la transferencia lateral y superior de calor. (Figura 1). (Mascheroni y Calvelo, 1978; Bevilacqua et al., 1979; Añón y Calvelo, 1980).

2.2.1.1 Obtención de rodajas de carne congelada a distintas velocidades: congelación rápida, intermedia y lenta.

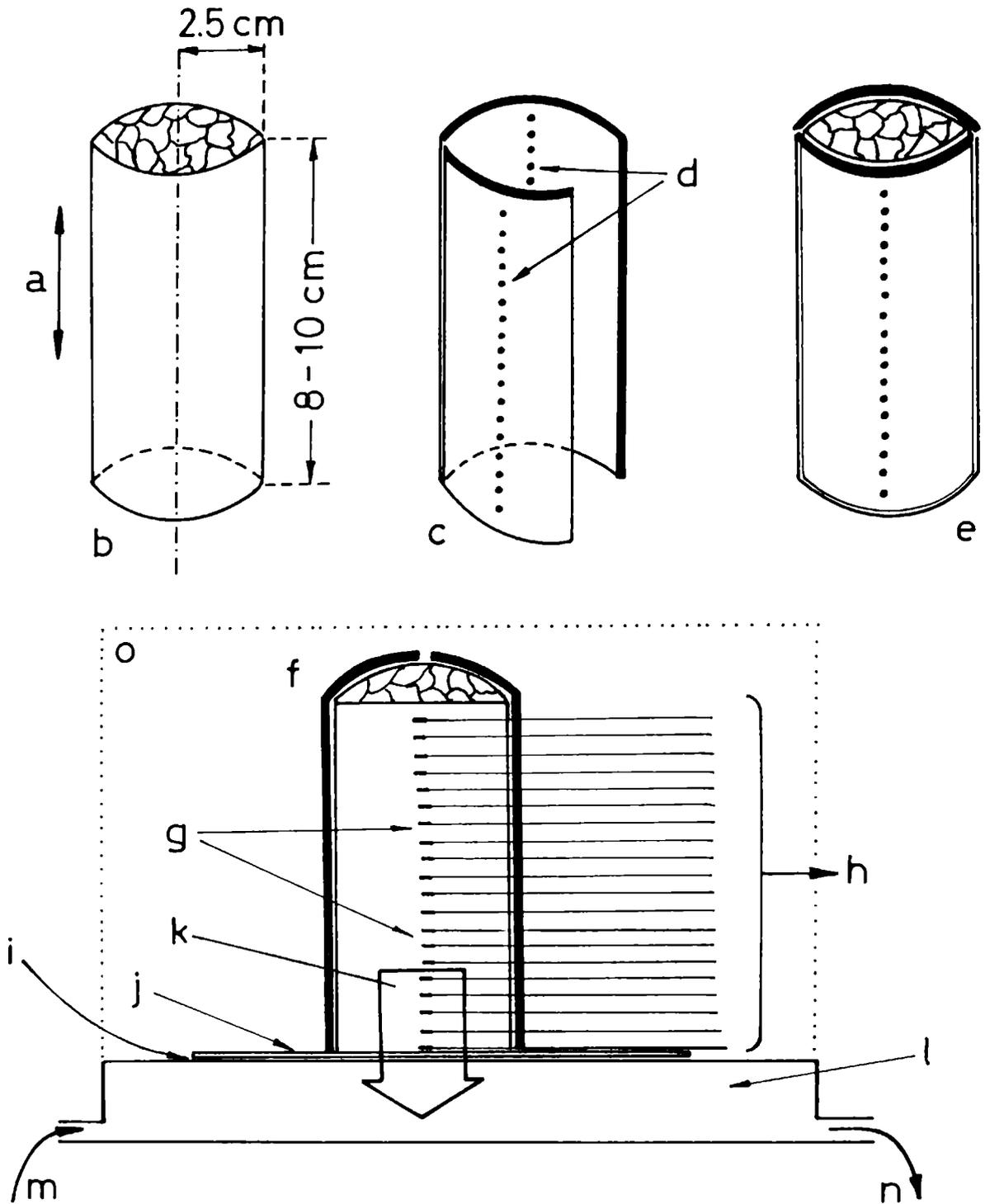


Figura 1: Congelación de un cilindro de músculo semitendinoso bovino.

a) Dirección de las fibras musculares; b) Cilindro de músculo fresco; c) Semitubos cilíndricos de acrílico con orificios (d) para pasar las termocuplas; e) Cilindro (b) envuelto en polietileno y rodeado con las camisas de acrílico; f) Corte longitudinal de (e) preparado para la congelación; g) Termocuplas; h) Conexión al registrador; i) Película de contacto; j) Lámina de acrílico; k) Flujo térmico; l) Placa intercambiadora; m) y n) Entrada y reciclo de metanol; o) Aislamiento térmico.

El cilindro de carne preparado con su camisa de acrílico y con las termocuplas cobre - constantan (Cu - Cn) ubicadas a través de su eje desde la base inferior a la superior (termocuplas 0.1.2....n), se congeló apoyando la base inferior descubierta sobre una placa metálica con circulación de metanol a  $-40^{\circ}\text{C}$  proveniente de un criostato (Ultra Kryostat UK 50 D - MGW LAUDA). Se obtuvieron así cilindros de carne congelada con gradientes de velocidad de congelación a lo largo de su eje, debido al flujo calórico unidireccional.

Para obtener velocidades lentas de congelación, se colocaron entre la placa intercambiadora y la carne, una lámina de acrílico de 2.4 mm de espesor y entre ésta y la placa, una película de contacto de grasa de litio.

Las termocuplas Cu - Cn (calibradas a  $0^{\circ}\text{C}$  y  $100^{\circ}\text{C}$  con una mezcla agua - hielo y agua en ebullición, respectivamente) se conectaron a un Registrador Data Logger marca Fluke 2240C, registrando las temperaturas (en  $^{\circ}\text{C}$ ) como una función del tiempo (en minutos).

Una vez que los cilindros de carne alcanzaron homogéneamente la temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$ , se llevaron a una cámara frigorífica a  $-20^{\circ}\text{C}$ , donde se cortaron en rodajas circulares de 0.5 cm de espesor, asignándoles a cada una su correspondiente velocidad de congelación local expresada como el tiempo característico de congelación,  $t_c$  (Bevilacqua et al., 1979; Añón y Calvelo, 1980). El  $t_c$  está definido como el período de tiempo en minutos que tarda la temperatura de un punto de la carne en pasar de  $-1.1^{\circ}\text{C}$  (temperatura de congelación del agua del tejido muscular) a  $-7^{\circ}\text{C}$  (temperatura a la cual está congelada el 80% del agua tisular) (Riedel, 1957; Mascheroni, 1977).

En la Figura 2 se puede observar la historia térmica de un cilindro de carne congelada unidireccionalmente, en tanto que la Figura 3 muestra el cálculo del tiempo característico  $t_c$  para cada rodaja de carne obtenida. Las rodajas congeladas de carne se agruparon según su valor  $t_c$ , seleccionando solamente aquellas que fueron congeladas a las siguientes velocidades:

Congelación rápida,  $t_c < 5$  minutos

Congelación intermedia,  $t_c = 20-25$  minutos

Congelación lenta,  $t_c > 60$  minutos

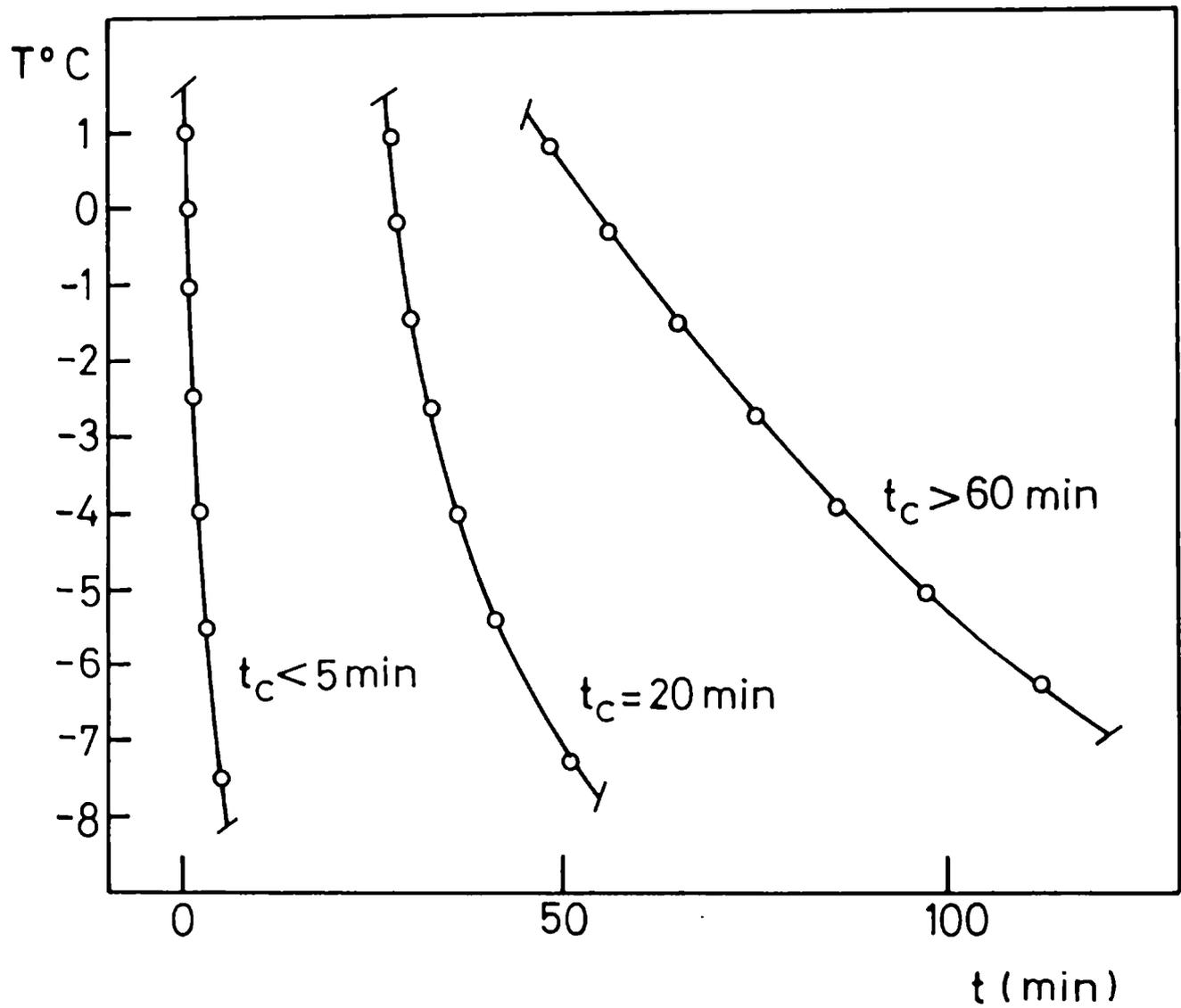


Figura 2: Historia térmica de un cilindro de músculo congelado unidireccionalmente, a diferentes tiempos característicos ( $t_c$ ) de congelación.  $T^\circ\text{C}$  es la temperatura a través del eje longitudinal del cilindro y  $t$  (min) es el tiempo relativo transcurrido durante la congelación.

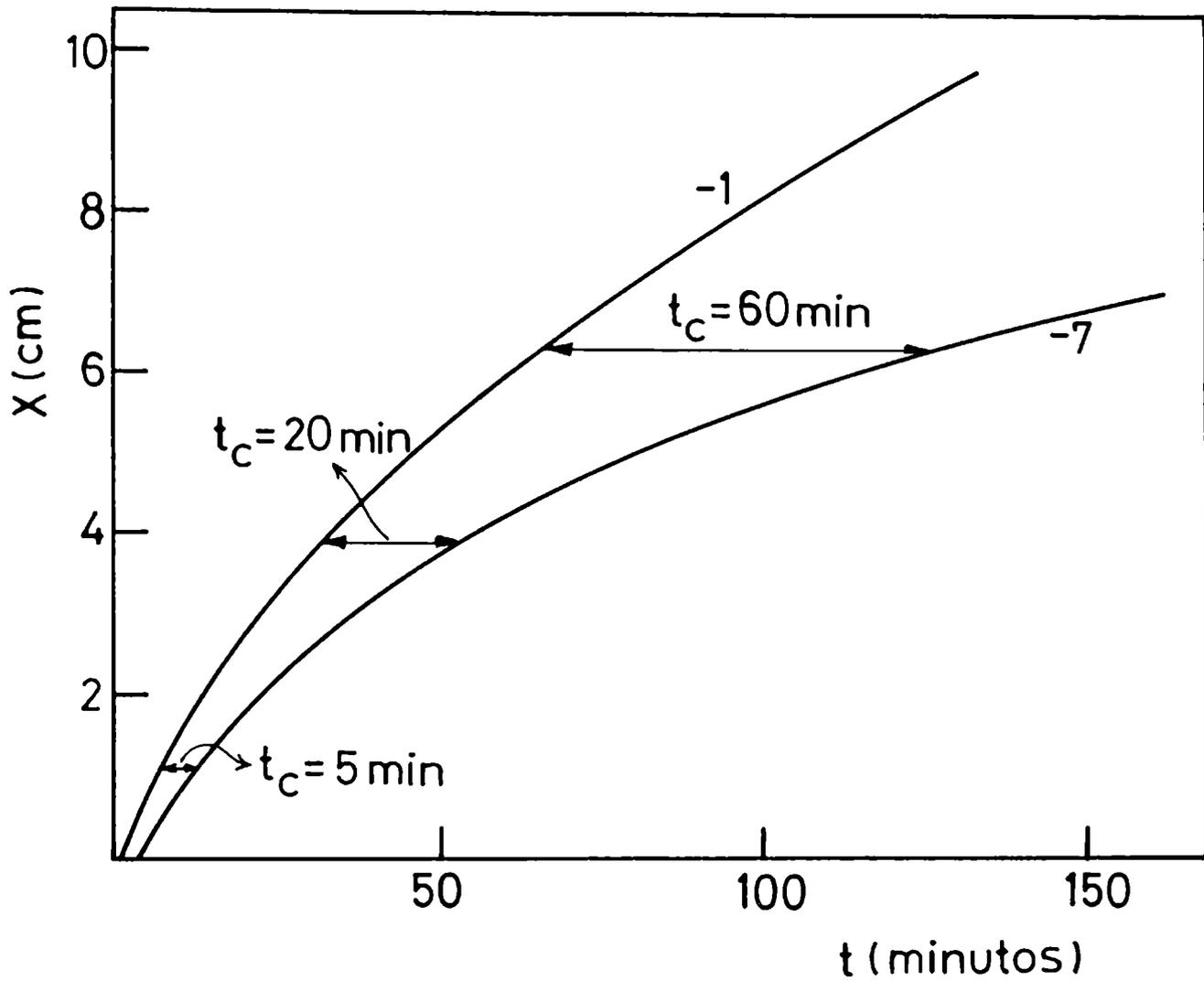


Figura 3: Determinación experimental de los tiempos característicos de congelación ( $t_c$ ). Las curvas -1 y -7 indican respectivamente los tiempos requeridos para alcanzar localmente las temperaturas  $-1^\circ\text{C}$  y  $-7^\circ\text{C}$ .  $X$  (cm) es la distancia longitudinal medida desde la placa refrigerada. Condiciones de congelación:  $T_i = 4^\circ\text{C}$ ,  $T_f = -25^\circ\text{C}$ .

Las rodajas obtenidas por este método se utilizaron para el estudio del efecto de la congelación en sí, ya que nos permite trabajar con muestras provenientes de un mismo músculo, diferenciables únicamente por la velocidad con la que fueron congeladas.

2.2.2 Congelación directa de rodajas de carne: a diferencia de la técnica anterior, se cortaron directamente rodajas de músculo en estado fresco de 5 cm de diámetro y 1 cm de espesor y se congelaron en una placa intercambiadora en condiciones tales como para obtener tiempos característicos de congelación:  $t_c < 5$  minutos y  $t_c > 60$  minutos (velocidad rápida y lenta respectivamente).

2.2.2.1 Obtención de rodajas de carne congeladas a velocidad rápida y lenta.

Este método permitió un mayor rendimiento de rodajas congeladas por pieza de carne. A diferencia de la congelación de cilindros donde muchas rodajas eran descartadas por no tener un  $t_c$  con valores utilizables. Aún así, el número de rodajas congeladas obtenidas por peceto resultó insuficiente para efectuar estudios de almacenamiento prolongado durante los períodos de tiempo previstos. Por músculo semitendinoso bovino se obtuvieron entre 20 y 25 rodajas de las dimensiones mencionadas, debiéndose utilizar en total seis pecetos de idénticas condiciones y características iniciales, para almacenar un número suficiente de rodajas por cada temperatura de almacenamiento ( $T_1 = -5^\circ\text{C}$ ,  $T_2 = -10^\circ\text{C}$  y  $T_3 = -20^\circ\text{C}$ ). El total de rodajas de cada músculo se dividió en dos partes iguales, con el objeto de efectuar en una la congelación rápida y en la otra la lenta. El siguiente esquema muestra el procedimiento de congelación - almacenamiento empleado en este trabajo:

Peceto	Nº de Rodajas	Velocidad de congelación	Almacenamiento	Nomenclatura
1	$N_1$	$\frac{N_1}{2}$ Rápida	$T_1 = -5^\circ\text{C}$	$R_1$
		$\frac{N_1}{2}$ Lenta		$L_1$
2	$N_2$	$\frac{N_2}{2}$ Rápida	$T_1 = -5^\circ\text{C}$	$R_2$
		$\frac{N_2}{2}$ Lenta		$L_2$
3	$N_3$	$\frac{N_3}{2}$ Rápida	$T_2 = -10^\circ\text{C}$	$R_3$
		$\frac{N_3}{2}$ Lenta		$L_3$
4	$N_4$	$\frac{N_4}{2}$ Rápida	$T_2 = -10^\circ\text{C}$	$R_4$
		$\frac{N_4}{2}$ Lenta		$L_4$
5	$N_5$	$\frac{N_5}{2}$ Rápida	$T_3 = -20^\circ\text{C}$	$R_5$
		$\frac{N_5}{2}$ Lenta		$L_5$
6	$N_6$	$\frac{N_6}{2}$ Rápida	$T_3 = -20^\circ\text{C}$	$R_6$
		$\frac{N_6}{2}$ Lenta		$L_6$

Según este esquema los pecetos 1 y 2 dan duplicados para congelación rápida y lenta con almacenamiento a  $-5^{\circ}\text{C}$ ; los pecetos 3 y 4 para  $-10^{\circ}\text{C}$  y los pecetos 5 y 6 para  $-20^{\circ}\text{C}$ . Sobre cada peceto se realizaron los correspondientes estudios en estado fresco (reservándose una rodaja sin congelar en cámara de  $+ 2^{\circ}\text{C}$  a tal efecto), para control y conocimiento de la variabilidad biológica entre ellos. Las rodajas de carne, una vez congeladas, se envasaron en una película de polietileno para evitar la deshidratación durante el almacenado, etiquetándolas con la nomenclatura correspondiente a su velocidad de congelación, temperatura de almacenamiento y número de peceto.

Las rodajas congeladas  $R_1, R_2, \dots R_6$  (congelación rápida) se obtuvieron conjuntamente, colocándolas entre dos placas metálicas intercambiadoras de calor (congelación bidireccional) por las que circulaba metanol a  $-35^{\circ}\text{C}$  desde un criostato (Ultra Kryostat UK 50 D, MGW LAUDA). Para que la congelación sea rápida se colocó únicamente entre placas y rodajas, un papel de aluminio que facilitó la separación de las rodajas una vez congeladas. La congelación se dió por concluída cuando las muestras alcanzaron  $-25^{\circ}\text{C}$ .

Las rodajas congeladas  $L_1, L_2, \dots L_6$  (congelación lenta) se obtuvieron también en conjunto, pero colocando entre ellas y las placas, una tabla de material aglomerado de 2 cm de espesor y con una temperatura del metanol circulante de  $-20^{\circ}\text{C}$ , a fin de obtener valores de  $t_c$  superiores a los 60 minutos. Una vez que las rodajas llegaron a  $-15^{\circ}\text{C}$ , se bajó la temperatura del criostato a  $-40^{\circ}\text{C}$  para que las rodajas congeladas a velocidad lenta alcanzaran  $-25^{\circ}\text{C}$ . De esta manera, tanto las muestras congeladas rápida como lentamente al ser llevadas hasta la misma temperatura final, tienen idéntica cantidad de hielo formado (Riedel, 1957).

Para poder conocer los  $t_c$  medios de las rodajas congeladas de músculo, se siguieron sus historias térmicas, colocando termocuplas Cu - Cn en el centro de cada rodaja y midiendo la variación de la temperatura con el tiempo.

Se llevó a cabo una segunda serie de experiencias de congelación - almacenamiento, en las condiciones anteriormente descritas con otros seis pecetos, siguiendo el procedimiento detallado en el esquema. Con esto se aseguró

un mayor número de replicados para cada dato obtenido.

### 2.3 Almacenamiento congelado

Las rodajas congeladas por la técnica detallada en el punto 2.2.2, se almacenaron en freezers a  $-5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante un período máximo de 11 meses, en el transcurso del cual se fueron retirando periódicamente muestras al azar correspondientes a cada velocidad de congelación, temperatura y tiempo de almacenamiento, para ser estudiadas. El control de las temperaturas de las cámaras se efectuó colocando termocuplas Cu - Cn dentro de las rodajas de carne y los valores fueron registrados en un Registrador Data Logger Marca Fluke 2240C.

### 2.4 Composición y pH del músculo

Sobre muestras de cada músculo utilizado en estado fresco, se determinó el pH y el contenido porcentual de humedad, de proteínas totales, miofibrilares, sarcoplasmáticas y de tejido conectivo. Estas determinaciones se realizaron para asegurar la homogeneidad de los músculos bovinos empleados en este trabajo. Durante el almacenamiento, la determinación del porcentaje de humedad en las muestras congeladas sirvió para controlar la ausencia de deshidratación del tejido. El pH de las muestras también fue seguido en el transcurso del almacenamiento, sirviendo de parámetro indicador de degradación enzimática y desarrollo microbiano.

#### 2.4.1 Medición del pH del músculo

El pH se midió en un pH-metro Marca MACO HL-02, empleando un electrodo de punta especial para carnes INGOLD LOT 405-M4, a temperatura ambiente.

#### 2.4.2 Determinación de humedad

El porcentaje de humedad se determinó según el método de la AOAC 13<sup>o</sup> Edición (1980). Se pesaron en un pesafiltro aproximadamente 2 gramos de músculo

lo desmenuzado y se secaron durante 16 - 18 hs en una estufa a 100-102 °C con circulación de aire. La humedad se expresó como la pérdida de peso por 100 g de muestra húmeda.

#### 2.4.3 Determinación del contenido total de proteínas

La determinación del contenido de Nitrógeno total en las muestras de músculo se realizó según el método de Kjeldahl-Arnold-Gunning (AOAC, 1945) utilizando un equipo Buchi 320 como unidad de destilación y un Buchi 427 como unidad de digestión. Como patrón de Nitrógeno se usó urea p.a.. El porcentaje de proteína bruta total se calculó a partir del porcentaje de Nitrógeno total, usando el factor de conversión  $f = 6.25$  ( $\% P = \% N \times 6.25$ ) (Lillevik, 1970).

#### 2.4.4 Determinación del contenido de proteínas miofibrilares, sarcoplásmicas y tejido conectivo

Los porcentajes de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas se calcularon a partir de la concentración de los extractos miofibrilar y sarcoplásmico (ver inc. 2.7), obtenidos como resultado de la aislación de cada fracción proteica (ver inc. 2.6). Durante este procedimiento se separó un residuo insoluble en solución KCl 0.6M, compuesto principalmente por colágeno y elastina, que una vez secado en estufa a 100-102°C durante 24 hs., se informó como el contenido en tejido conectivo del músculo.

#### 2.5 Solubilidad de proteínas totales del músculo

Sobre 2 g de músculo desmenuzado se ensayó la solubilidad de proteínas musculares con 20 ml de solución 0.6M KCl - 0.03 M Tris - HCl pH 7.6 (Solución 4). Se homogeneizó a 4°C en un homogeneizador OMNI - MIXER (Sorvall - Model 17106), en 3 períodos de 15 segundos cada uno, con intervalos de 45 segundos. La suspensión resultante fue agitada suavemente con un agitador magnético durante 12 horas a 4°C y centrifugada a 16000 x g por 1 hora a 2°C en una centrifuga Sorvall - RC 5 B Refrigerated Dupont. Se midió luego la concentración de pro

teínas en el sobrenadante siguiendo el método de Lowry (1951). La solubilidad de proteínas totales (% Ts) se expresó como la cantidad de proteína extraída de 100 g de músculo entero y se calculó según la expresión

$$\% Ts = \frac{(Ps \times 20) \times 100}{m} \quad (1)$$

donde Ps = concentración en mg/ml de proteínas en el sobrenadante; 20 = ml de solución 4 utilizada en la extracción; m = mg de muestra de carne entera.

## 2.6 Preparación de miofibrillas y proteínas sarcoplásmicas de músculo bovino

Las miofibrillas se prepararon siguiendo esencialmente el procedimiento descrito por Goll y Robson (1967) con algunas modificaciones. Todos los pasos incluidos en la extracción se realizaron a 2-4°C con el fin de evitar modificaciones de las proteínas musculares por efecto térmico. Las soluciones utilizadas para la aislación y purificación de miofibrillas fueron las siguientes:

### Aislación de miofibrillas y solubilización de proteínas sarcoplásmicas

Solución A: 0.25 M Sacarosa, 1 mM EDTA, 0.05 M Tris - HCl, pH 7.6

### Resuspensión de miofibrillas y separación del tejido conectivo

Solución B: 1 mM EDTA, 0.05 M Tris - HCl pH 7.6

### Purificación de miofibrillas aisladas

Solución 1: 0.15 M KCl, 0.03 M Tris - HCl pH 7.6

Solución 2: 1 mM EDTA, pH 7.6

Solución 3: Agua bidestilada

Solución 4: 0.6 M KCl, 0.03 M Tris - HCl pH 7.6

Aproximadamente 2 g de músculo finamente desmenuzado se pesaron en un papel de aluminio con una precisión de  $\pm 0.2$  mg; se transfirieron a un homogeneizador OMNI - MIXER con 10 ml de solución A (5 volúmenes) y se homogeneizaron en tres períodos de 15 segundos de duración y 45 segundos de intervalo a

2°C. El extracto fue transferido a un vaso de precipitado y agitado lentamente con agitador magnético durante 30 minutos a 2°C. La suspensión resultante fue luego centrifugada a 2500 x g durante 10 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall - RC 5 B Refrigerated Superspeed de Du Pont Ints.

El sobrenadante obtenido, que contiene la mayoría de las proteínas sarcoplásmicas, se transfirió a un matraz de 50 ml. El sedimento, constituido principalmente por miofibrillas, fue resuspendido con 10 ml de solución A, se agitó suavemente con agitador magnético durante 15 minutos a 2°C y se centrifugó nuevamente a 2500 x g por 10 minutos a 4°C. El nuevo sobrenadante, reunido al anterior y completado a 50 ml con agua destilada contiene la totalidad de las proteínas sarcoplásmicas del músculo. Las miofibrillas sedimentadas se resuspendieron con solución B y filtraron a través de una gasa doble, para separar el tejido conectivo. A este proceso de aislación le siguió el de purificación de las miofibrillas por sucesivas resuspensiones con agitación magnética en soluciones 1, 2, 3, 1 y 1, seguidas por centrifugación.

Finalmente, las miofibrillas purificadas se suspendieron en solución 1 o se solubilizaron parcialmente en solución 4 (volumen final 25 ml) según su posterior utilización.

A ambas fracciones, miofibrilar y sarcoplásmica, se les agregó Azida sódica a una concentración 1 mM, para asegurar su preservación en cámara de 4°C, evitando el desarrollo de bacterias y hongos. Con anterioridad se había ensayado la ausencia de un efecto desnaturalizante de la Azida sódica a dicha concentración, sobre las proteínas en estudio.

## **2.7 Determinación de la concentración de proteínas en los extractos miofibrilar y sarcoplásmico**

Se utilizaron dos métodos a) El método de Biuret descrito por Gornall et al. (1949) y modificado por Robson et al. (1968) y b) El método de Lowry (1951). Para la aplicación de ambos métodos se realizó una curva de calibración con Solución 10 mg/ml de albúmina bovina. La determinación de proteínas miofibrilares por ambos métodos, arrojó resultados significativamente compara-

bles. En cambio, la concentración de proteínas sarcoplásmicas, sólo pudo determinarse por el método de Lowry, ya que según lo observado, el alto contenido de mio y hemoglobina, interfirió en la determinación por el método de Biuret. Llegando a dar con este método valores de concentración hasta del doble respecto al método de Lowry.

Para corroborar estos resultados se efectuó la determinación de nitrógeno total por el método de Kjeldahl - Arnold - Gunning (AOAC 1945), usando un factor  $f$  de conversión de nitrógeno a proteína de:  $f = 6.00$  para miofibrillas (Lillevik, 1970; Hay et al., 1973a) y  $f = 6.25$  para proteínas sarcoplásmicas (Awad et al., 1968; Lillevik, 1970).

## 2.8 Medición de la actividad ATPásica de miofibrillas

La actividad ATPásica miofibrilar en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$  como activadores, se midió a  $25^\circ\text{C}$  en una solución C: 0.02 M KCl, 0.02 M Tris - acetato (pH 7.0), 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (ó  $\text{CaCl}_2$ ) y 1 mM ATP, con una concentración de miofibrillas de 0.2 - 1.0 mg/ml. El procedimiento seguido es esencialmente el descrito por Hay et al. (1973a). Después de iniciada la reacción (agregado de las miofibrillas a la solución C), se tomaron alícuotas a los 30, 60, 90, 120 y 150 segundos y se mezclaron en un tubo conteniendo solución acuosa de ácido tricloroacético 10 %, con lo cual se frena la reacción y se precipitan las proteínas. Después de centrifugar a 14000 x g durante 15 minutos a  $20^\circ\text{C}$ , en una centrífuga Sorvall RC 5 B para sedimentar las proteínas, se determinó la concentración de ortofosfato (Pi) en el sobrenadante, aplicando el método del ácido ascórbico de Ammon y Hinsberg modificado por Lowry y descrito por Chen et al. (1956). El reactivo se preparó en el momento de ser usado, de la siguiente manera: 1 volumen de ácido ascórbico 10% + 1 volumen de molibdato de amonio 2.5% + 1 volumen de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  6N + 2 volúmenes de agua destilada. La relación reactivo ascórbico-molibdato a sobrenadante era 7:3.

Después de una incubación de 20 minutos en un baño termostático a  $45^\circ\text{C}$  (tiempo y temperatura necesaria para el desarrollo de color) se leyó la densidad óptica (DO) a 820 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV - 150-02 de do-

ble haz. La concentración de Pi se calculó a partir de las DO leídas a cada tiempo de reacción, utilizando una curva de calibración: (Pi) vs  $DO_{820}$ . Esta curva se realizó con una solución madre de Pi (10  $\mu$ moles Pi/ml), usando  $H_2KPO_4$  p.a. como sustancia patrón. La actividad ATPásica específica miofibrilar se calculó como el cociente entre la velocidad de hidrólisis enzimática del ATP y los mg de proteína miofibrilar presentes en el tubo de reacción.

La velocidad de hidrólisis  $v = \mu$ moles Pi/min es igual a la pendiente resultante de graficar los  $\mu$ moles de Pi liberados vs. el tiempo de reacción en minutos. La actividad ATPásica específica queda entonces expresada como  $A = \mu$ moles Pi/min/mg de proteína.

Se comprobó que la concentración de ATP utilizada era saturante para la concentración de enzima ATPasa miofibrilar ensayada.

## 2.9 Solubilidad de las miofibrillas

Sobre las miofibrillas aisladas (ver inc. 2.6) se ensayó la solubilidad de las proteínas miofibrilares con solución 0.6 M KCl, 0.03 M Tris - HCl a pH 7.6 (solución 4) según el siguiente procedimiento: a 2 ml de miofibrillas aisladas en solución 4 se le agregaron 4 ml de la misma solución y se agitó el preparado con agitación magnética lenta durante 12 hs a 4°C. Luego se centrifugó en una centrífuga Sorvall - RC 5 B a 17000 x g por 15 minutos a 4°C, dosando por el método de Biuret modificado (Robson et al., 1968) la cantidad de proteínas miofibrilares extraídas en el sobrenadante resultante. El sedimento de miofibrillas insolubles se reservó para estudios posteriores, conservándolo en cámara de + 2°C, previo agregado de Azida sódica. La concentración proteica en el sobrenadante se confirmó espectrofotométricamente (Layne, 1957). Se leyó la DO a 280 nm y 260 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV - 150 - 02 de doble haz, siendo coincidentes los resultados obtenidos por ambos métodos. El porcentaje de solubilidad de miofibrillas se calculó según la siguiente expresión:  $\% Ms = \frac{d.B}{M} \cdot 100$  donde: (2)

M = concentración proteica en la solución de miofibrillas ensayada (mg/ml)

B = concentración de proteína en el sobrenadante (mg/ml)

d = dilución (en este caso d = 3)

% Ms = porcentaje de miofibrillas solubles.

## 2.10 Viscosidad y comportamiento reológico de miofibrillas

Las miofibrillas aisladas y suspendidas en solución 0.6 M KCl, 0.03 M Tris-HCl pH 7.6, se comportó como una solución viscosa, cuya viscosidad y características reológicas reflejaban el grado de desnaturalización de las proteínas miofibrilares. La medición de estas propiedades se llevó a cabo a 10°C en un viscosímetro Haake Rotavisco RV 2 Viscometer usando un sistema de medición NV y una velocidad n del rotor de 0 hasta 64 rpm, según el programa siguiente: 2 minutos, barrido de la velocidad desde 0 a 64 rpm; 1 minuto, mantenimiento de la velocidad en 64 rpm y 2 minutos, barrido de la velocidad desde 64 rpm a 0 rpm. Este programa se realizó con un programador PG 142 Haake. Las curvas de flujo, S (en ordenadas) vs n (en abscisas), fueron registradas con un registrador Hewlett Packard x-y-t Haake. La viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) de la solución analizada se calculó según la siguiente fórmula:  $\eta_{ap} = G \cdot \frac{S}{n}$  (m Pa. seg) (3)

donde: G = factor del instrumento (m Pa. seg/divisiones de la escala /min)

S = valor observado en la escala (divisiones de la escala, correspondiente al valor alcanzado en ordenadas)

n = velocidad del rotor ( $\text{min}^{-1} = \text{rpm}$ )

y m Pa. seg = mili-Pascal segundo = 1 cp (centi-poise)

El valor S es proporcional a la tensión de empuje  $\tau$  (pa) según la expresión  $\tau = a \cdot S$  (4) donde a es un factor de empuje dependiente del sistema de medición y tipo de cabezal empleado. El valor n es proporcional al gradiente de velocidad D ( $\text{seg}^{-1}$ ) según  $D = m_c \cdot n$  (5) donde  $m_c$  es un factor de cizallamiento también dependiente del sistema de medición. Como el factor G es igual a  $10^3 \frac{a}{m_c}$  (m Pa. seg/división de la escala) surge que  $\eta_{ap} = \frac{\tau}{D}$  (mPa. seg.) (6) que es la ecuación habitual con la cual se define la viscosidad.

Para líquidos newtonianos las curvas de flujo:  $S$  vs  $n$  son rectas con ordenada al origen igual a cero y pendiente igual a la viscosidad. En cambio, para sistemas no newtonianos (como lo son las suspensiones viscosas de miofibrillas), la relación  $S/n$  no es constante, con lo cual para cada velocidad  $n$  del rotor hay un valor diferente de la viscosidad, al cual se lo define como viscosidad aparente. Con el objeto de hacer comparables los resultados obtenidos entre las diferentes muestras de miofibrillas, fue necesario tener en cuenta la concentración miofibrilar de cada suspensión estudiada. Se calcularon entonces las correspondientes viscosidades reducidas según la expresión:  $\eta_{red} = \eta_{ap} / M$  (7) donde  $\eta_{ap}$  es la viscosidad aparente calculada según la expresión (3) para una velocidad del rotor  $n = 64$  rpm y  $M$  es la concentración de miofibrillas expresada en mg /ml. Todas las suspensiones de miofibrillas estudiadas tenían una concentración entre 10 y 12 mg /ml.

En las curvas de flujo obtenidas, además de las mediciones de viscosidad reducida, fue posible observar los cambios en el comportamiento reológico con el tiempo de almacenamiento congelado de las muestras de carne.

### 2.11 Capacidad de absorción de agua (o hinchamiento) de las miofibrillas

La medición de la capacidad de absorción de agua se realizó sobre las miofibrillas aisladas y suspendidas en solución 0.15 M KCl, 0.03 M Tris - HCl pH 7.6 (Solución 1), según el siguiente procedimiento: una alícuota de la suspensión de miofibrillas en solución 1 fue centrifugada a  $3000 \times g$  durante 10 minutos a  $2^\circ C$  en una centrífuga Sorvall - RC 5 B. Las miofibrillas sedimentadas fueron pesadas ( $m_1$ ) y seguidamente resuspendidas en 8 veces su volumen de agua destilada con agitación magnética lenta durante 12 hs. a  $4^\circ C$ . La suspensión viscosa resultante fue nuevamente centrifugada a  $3000 \times g$  por 10 minutos a  $2^\circ C$ , pesando luego el sedimento obtenido ( $m_2$ ). En ambas centrifugaciones se separó el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur. La capacidad de absorción de agua de las miofibrillas se calculó como sigue: en presencia de solución 1,

$$(8) \quad WAC_1 = \frac{m_1 - m}{m} \quad \text{y en presencia de agua destilada,}$$

(9)  $WAC_2 = \frac{m_2 - m}{m}$  donde  $m$  = masa de miofibrillas ensayadas (en mg; se calculó a partir de la concentración de miofibrillas en mg/ml y el volumen de la alícuota ensayada);  $m_1$  = masa del sedimento de miofibrillas suspendidas en solución 1 (mg) y  $m_2$  = masa del sedimento de miofibrillas suspendidas en agua destilada (mg).

## 2.12 Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se prepararon placas de gel de poliacrilamida 10% con agregado de SDS, de acuerdo al sistema de buffer discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970; Laemmli y Favre, 1973). Las corridas electroforéticas se realizaron en un equipo para electroforesis en gel de la Marca Pharmacia GE - 214. Se requirió de las siguientes soluciones:

- a) Solución madre de acrilamida-bisacrilamida: acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8% en agua destilada (bisacrilamida = N, N', metilen-bis-acrilamida).
- b) Solución buffer para el gel de "Stacking" (gel apilador): Tris 0.5 M, SDS 0.4%, TEMED 0.4%, HCl 1N hasta pH 6.8 (Tris = Tris (hidroximetil) aminometano, TEMED = N, N, N', N', tetrametil etilendiamina)
- c) Solución buffer para el gel separador: Tris 1.5 M, SDS 0.4%, TEMED 0.4%, HCl 1 N hasta pH 8.8
- d) Solución buffer de corrida, 3.5 x: Tris 0.05 M, glicina 0.384 M, SDS 0.35%, HCl 1 N hasta pH 8.3
- e) Solución buffer para preparación de la muestra: Tris 0.125 M, EDTA 0.001 M, SDS 2% (con o sin ME 5%) glicerol 10%, azul de bromofenol 0.001%, HCl 1 N hasta pH 6.8 (ME = mercapto etanol)
- f) Solución fijadora: isopropanol 25%, ácido acético 10% en agua destilada.
- g) Solución colorante (para coloración por difusión en el gel): Coomassie Brilliant blue R-250 0.02% en solución acuosa de ácido acético 7.5%.
- h) Solución decolorante: Metanol 25%, ácido acético 10% en agua destilada.

2.12.1 Preparación de placas de gel de poliacrilamida (14 carriles por placa)

- Gel separador (acrilamida 10%, bisacrilamida 0.27%): 1 volumen de solución (a) + 1 volumen de solución (c) + 1 volumen de persulfato de amonio 0.1%.
- Gel de "Stacking" (acrilamida 4%, bisacrilamida 0.1%): un volumen de solución (a) + 2 volúmenes de solución (b) + 1 volumen de Glicerol + 3.5 volúmenes de persulfato de amonio 0.1%.

2.12.2 Preparación de las muestras de proteínas miofibrilares, sarcoplásmicas y patrones de PM conocido

A alícuotas de los extractos miofibrilar y sarcoplásmico, se les agregó igual volumen de solución (e) y se incubaron a 100°C durante 5 minutos. De estas preparaciones se sembraron entre 15 y 25  $\mu$ l en cada carril del gel, lo cual corresponde a una siembra de 30-50  $\gamma$  de proteína.

Como proteínas patrones se utilizó un kit de Pharmacia de la siguiente composición:

Proteína	PM	$\mu$ g/vial
fosforilasa b	94000	64
sero albúmina bovina	67000	83
ovoalbúmina	43000	147
anhidrasa carbónica	30000	83
inhibidor de tripsina (soja)	20100	80
lactoalbúmina	14400	121

578  $\gamma$  totales de proteína/vial

Al vial se le agregaron 100  $\mu$ l de solución (e) con ME 5% y se incubó a 100°C durante 5 minutos. De esta preparación se sembraron 10  $\mu$ l (58  $\gamma$  de proteína) en el carril central de cada placa, para poder estimar los PM de las bandas obtenidas con las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas.

### 2.12.3 Condiciones de corrida

Como buffer de corrida se utilizó la solución (d) diluída con agua, 3.5 veces (1x). Se conectó el equipo para electroforesis a una fuente y se reguló la tensión para que circulen 25 mA de intensidad por placa. El tiempo total de corrida fue aproximadamente de 24 horas.

### 2.12.4 Coloración de bandas

Una vez concluídas las corridas, se trataron los geles por inmersión sucesiva en:

i) Solución fijadora (f), 2 horas

ii) Solución colorante (g), 24 horas

y iii) Solución decolorante (h), el tiempo suficiente para decolorar las zonas desprovistas de proteínas. Finalmente se las lavó y conservó en agua destilada.

### 2.12.5 Densitometría

Los geles fueron leídos en un espectrofotómetro Shimadzu dual-Wavelength TLC Scanner CS - 910, acoplado a un registrador C-R IA Chromatopac Shimadzu Integrator. Las lecturas se realizaron por transmisión, barrido lineal (20 mm/min) y con doble longitud de onda ( $\lambda$  muestra = 570 nm y  $\lambda$  referencia = 395 nm).

## 2.13 **Calorimetría Diferencial de Barrido (D.S.C.)**

Se realizaron estudios por DSC sobre las siguientes muestras:

a) músculo entero, b) músculo desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y de tejido conectivo, c) miofibrillas aisladas, d) proteínas sarcoplásmicas y f) tejido conectivo.

Los ensayos a), b) y c), se efectuaron tanto para muestras de músculo fresco como de músculo congelado y almacenado, en tanto que las muestras d) y f) sólo se estudiaron para músculo en estado fresco. Las muestras b)

fueron preparadas según el procedimiento descrito por Stabursvik y Martens (1980): se cortaron con un escalpelo pequeños trozos (de aprox. 30 mg) de músculo entero y se trataron con solución Ringer modificada (Solución fisiológica salina isotónica con el tejido muscular; 0.15 M NaCl, 0.003 M KCl y 0.003 M CaCl<sub>2</sub>), con suave agitación magnética durante 4 horas a 4°C. Durante este período se ajustó el pH al valor requerido con solución NaOH 1 N o HCl 1 N, hasta lograr una constancia del mismo. (Se emplearon 10 ml de solución Ringer por gr. de músculo). Este tratamiento permitió la solubilización de las proteínas sarcoplásmicas y el ajuste del pH a un valor conocido. El tejido conectivo se removió manualmente con ayuda de un escalpelo, separando las fibras blandas de miofibrillas del tejido más resistente de elastina y colágeno. Las muestras c) se obtuvieron por centrifugación de la suspensión de miofibrillas en solución 1 (0.15 M KCl, 0.03 M Tris-HCl pH 7.6). Una alícuota de esta suspensión se centrifugó a 2500 x g durante 15 minutos en una centrífuga Sorvall RC-5 B refrigerada a 2°C. Las miofibrillas sedimentadas se resuspendieron 1 hora con agitación magnética lenta en una solución Ringer a un pH elegido. La suspensión resultante se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones y el sedimento miofibrilar se lavó nuevamente con la misma solución por resuspensión y centrifugación sucesiva.

Los termogramas DSC (gráficos de flujo de calor,  $\frac{\partial H}{\partial t}$ , en función de la temperatura o del tiempo) se obtuvieron en un calorímetro diferencial de barrido Du Pont Model 910 System con un registrador Hewlett Packard 7046 B. La calibración de temperatura se realizó según la norma ASTM E 698-79 a través de las endotermas de fusión de Indio ( $T_f = 156.6^\circ\text{C}$ ) registrados como  $\partial H/\partial t$  (en mv/cm) vs temperatura (en mv). Se pesaron 15 mg de Indio con una precisión de 0.01 mg, en una cápsula DSC de aluminio, la cual se selló herméticamente y fue luego calentada en el calorímetro con un programa de barrido constante de la temperatura desde 100 a 200°C, usando como referencia una cápsula de aluminio vacía. Se obtuvieron así las endotermas de fusión de Indio a diferentes velocidades de calentamiento ( $\beta$ , barrido de temperatura de 1 a 25°C/min) y de cada endoterma se calcularon los dos términos de corrección de temperatura

expresados en mv:

- i) retardo térmico (conocido como Thermal Lag),  $TL_c$
- ii) Corrección por velocidad de calentamiento,  $\beta_c$

Como se puede ver en la Figura 4, la resistencia térmica  $R_o$  se calcula según la expresión:

$$R_o \text{ (adimensional)} = \frac{b(\text{cm}) \cdot Sx \text{ (mv/cm)}}{a(\text{cm}) \cdot Sy \text{ (mv/cm)}} \quad (10)$$

donde Sx y Sy son las sensibilidades en abscisas y en ordenadas respectivamente. El término de corrección por retardo térmico para cada velocidad queda expresado entonces como:

$TL_c \text{ (mv)} = R_o \cdot h(\text{cm}) \cdot Sy \text{ (mv/cm)}$  (11) donde h es la altura del pico desde la línea de base (Figura 4).

El punto de fusión del Indio es  $T_f = 156.6^\circ\text{C}$  que equivale a 6.403 mv (para las termocuplas tipo K-Cromel-Alumel del sensor de la celda DSC). Este valor tiene que coincidir con la temperatura del pico una vez corregida por los términos  $TL_c$  y  $\beta_c$ , o sea que:

$$6.403 = T_{In} - TL_c - \beta_c \quad (12)$$

donde  $T_{In}$  es la temperatura observada en mv del pico DSC de fusión del Indio. De esta expresión se calcula  $\beta_c$  en mv.

Las temperaturas de los picos en las endotermas de las muestras a) a f) pudieron así ser calculadas según la expresión:

$$T_{max} = T_p - R_o \cdot h \cdot Sy - \beta_c \quad (13)$$

siendo  $T_{max}$ : la temperatura corregida del pico (mv)

$T_p$ : temperatura observada del pico (mv)

$Sy$ : sensibilidad en el eje y (mv/cm)

$h$ : altura del pico (cm)

$R_o$  y  $\beta_o$ : valores calculados para el Indio, a cada velocidad de barrido.

Las  $T_{max}$  se expresaron finalmente en  $^\circ\text{C}$  sirviéndonos de la tabla de

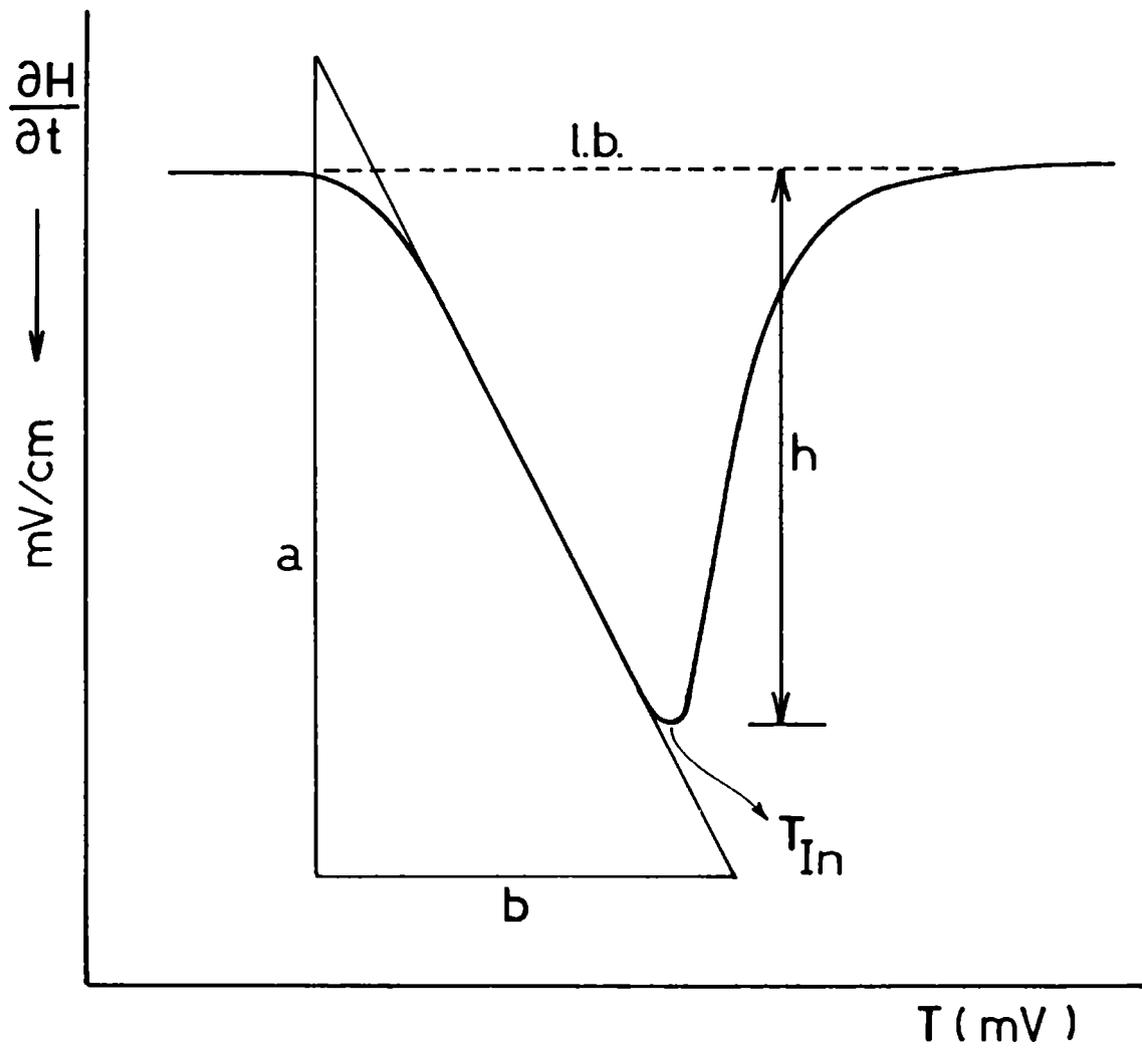


Figura 4: Termograma DSC de fusión del Indio, para la determinación de los términos de corrección de temperatura y para el cálculo de la constante de la celda.

l.b = línea de base; h = altura del pico;  $b/a = R_o$  = resistencia térmica;  $T_{In}$  = Temperatura del pico.

conversión de mV a °C del manual del equipo para termocuplas tipo K-Cromel-Alumel

El coeficiente de calibración, E, de la celda se calculó también de las endotermas de fusión del Indio pero registradas como  $\partial H/\partial t$  vs tiempo (minutos) usando como datos su masa y su calor de fusión. El valor E (mw/mv) fue calculado por duplicado para cada una de las velocidades de barrido empleadas, según la fórmula:

$$E = \frac{Q_f \cdot m}{60 \cdot A \cdot B \cdot S_y} \quad (14)$$

con  $Q_f = 28.4$  J/g (calor de fusión del Indio)

m = masa del Indio en mg

60 = 60 seg/min

A = área de la endoterma en  $\text{cm}^2$

B = base de tiempo en min/cm

$S_y$  = escala en ordenadas en mv/cm

Con el valor E se calculó la sensibilidad  $\Delta q_s$  utilizada en el eje  $\partial H/\partial t$ , expresada en mcal/seg/cm, teniendo en cuenta que  $1\text{mw} = 1\text{mJ/seg}$  y aplicando la siguiente expresión:

$$\Delta q_s = S_y \text{ (mv/cm)} \cdot E \text{ (mJ/seg/mv)} \cdot \frac{1}{4.186 \text{ mJ/mcal}} \quad (15)$$

Las corridas DSC para las muestras a) hasta f) se realizaron con 15-25 mg de muestra húmeda colocadas en una cápsula DSC de aluminio herméticamente sellada a presión, asegurando un buen contacto entre la muestra y el fondo de la cápsula. Se empleó una velocidad de calentamiento  $\beta = 10^\circ\text{C/min}$ , un barrido de la temperatura desde  $30^\circ\text{C}$  hasta  $100^\circ\text{C}$  y con sensibilidades  $S_y = 0.5$  mV/c  $S_x = 0.2$  mV/cm. El peso seco de la muestra se determinó por diferencia, luego de la corrida, haciendo un orificio en la cápsula y secándola en estufa a  $105^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Como referencia se utilizó indistintamente una cápsula de aluminio hermética con  $15 \mu\text{l}$  de agua destilada o una cápsula doble de aluminio; ambas con una capacidad calorífica comparable a la de la muestra.

Para cada termograma obtenido se trazó la correspondiente línea de base, construída como una línea recta que une el comienzo y la finalización

de la transición térmica. El área resultante se midió con un error máximo del 1%, en un analizador de imágenes Morphomat 34 Zeiss.

La entalpía de la transición térmica se estimó usando la siguiente ecuación:

$$\Delta H = \frac{A \ 60 \ \Delta q_s \ S_x}{m} \quad (16)$$

donde  $\Delta H$  = entalpía de la reacción (cal/g)

$A$  = área de la endoterma ( $\text{cm}^2$ )

$60$  = 60 seg/min

$\Delta q_s$  = sensibilidad en eje y (mcal/seg/cm)

$S_x$  = sensibilidad en eje x ( $^{\circ}\text{C}/\text{cm}$ )

$\beta$  = velocidad de calentamiento ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )

$m$  = masa de muestra seca (mg)

El valor  $\Delta H$  asociado a las transiciones térmicas dadas por muestras proteicas, está actualmente considerado como la contribución de la entalpía de desnaturalización proteica ( $\Delta H_d$ ) mas la entalpía asociada a la agregación de las proteínas ( $\Delta H_a$ ) (Privalov y Khechinashvili, 1974; Arntfield y Murray, 1981)

Sobre los termogramas que mostraron más de un pico (como es el caso del músculo entero) se estimaron además del  $\Delta H$ , las áreas específicas para cada pico individual, calculadas como la relación entre el área parcial y los mg totales de muestra seca. Las áreas parciales son el resultado de la división del área total de la endoterma, por líneas rectas perpendiculares al eje x, trazadas por los mínimos entre picos hasta la línea de base.

### 2.13.1 Cálculo de las constantes cinéticas de las transiciones térmicas de las proteínas miofibrilares en músculo bovino

Se usó músculo en estado fresco, desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y de tejido conectivo, tratado con solución Ringer a un pH determinado (muestra b) preparada según se describió en inc. 2.13.

Se prepararon cápsulas herméticas de aluminio con 12 a 24 mg de muestra húmeda. Después de realizadas las corridas DSC se perforaron las cápsulas

y se secaron a 105°C por 24 horas dando un peso seco de 3 a 6 mg.

Los métodos DSC empleados fueron:

2.13.1.1 Método dinámico (para calcular las constantes cinéticas): Se realizaron corridas desde 20°C a 100°C para obtener termogramas  $\partial H/\partial t$  vs temperatura a diferentes velocidades de calentamiento, para una misma muestra, de acuerdo al procedimiento detallado en la norma ANSI - ASTM E 698/79. Se programaron las siguientes velocidades de calentamiento:  $\beta$  (°C/min) = 1, 2, 3, 5, 7, 10, 12.5, 15 y 20. Sobre cada endoterma se determinaron los  $T_{\max}$  de los picos, según lo explicado en 2.13.

Debido a que de las muestras estudiadas surgieron termogramas con más de un pico, cada pico se debió analizar en forma independiente, graficando  $-\ln(\beta/T_{\max}^2)$  vs  $\frac{1}{T_{\max}}$ . Se obtuvo así una recta para cada pico del termograma, cuya pendiente es proporcional a la energía de activación  $E_a$  de la correspondiente transición térmica. De acuerdo a la ecuación formulada por Ozawa (1970) resulta:

$$\ln(\beta/T_{\max}^2) = \ln\left(\frac{ZR}{E_a}\right) - \frac{E_a}{R T_{\max}} \quad (17)$$

en donde  $\beta$  es la velocidad de barrido de la temperatura (K/min),  $T_{\max}$  es la temperatura del pico (K),  $Z$  es el factor preexponencial de la ecuación de Arrhenius ( $\text{min}^{-1}$ ) y  $R$  es la constante universal de los gases (cal/mol/K). Se aplicó una regresión lineal por cuadrados mínimos a  $-\ln(\beta/T_{\max}^2)$  como variable independiente y a  $10^3/T_{\max}$  como variable dependiente (Pravisaní et al, 1985).

El valor de la energía de activación  $E_a$  se calculó entonces de la pendiente según:

$$E_a \text{ (cal/mol)} = R \cdot \text{pendiente} \quad (18)$$

Los valores de  $Z$  y  $k$  (constante de velocidad en  $\text{min}^{-1}$ ) para cada transición se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones:

$$Z = \frac{E_a e^{E_a/RT_{\max}}}{R T_{\max}^2} \quad (19) \quad (\text{surge de despejar } Z \text{ de la ecuación de Ozawa (17)})$$

$$k = Z \cdot e^{-E_a/RT} \quad (\text{ecuación de Arrhenius}) \quad (20)$$

Asumiendouna cinética de reacción de primer orden respecto al tiempo ( $n_t = 1$ ), se estimó el tiempo de vida media  $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$  (min)

2.13.1.2 Método isotérmico (para corroborar los valores cinéticos hallados por el método dinámico): como se mencionó anteriormente, los termogramas analizados poseían mas de un pico, no siendo posible la aplicación del método isotérmico para obtener directamente las constantes cinéticas (Duswalt, 1974). Sin embargo, este método sí sirvió para confirmar los valores hallados por el método dinámico y resolver la endoterma compleja por estimación de las áreas correspondientes a cada transición individual.

Las cápsulas de muestras selladas herméticamente, fueron sumergidas en un baño de agua termostatzado a diferentes temperaturas, durante un período de tiempo equivalente al tiempo de vida media  $t_{1/2}$  calculado para cada transición. Para frenar el tratamiento isotérmico instantáneamente al tiempo preciso, se sumergieron las cápsulas rápidamente en un baño agua-hielo. Las cápsulas tratadas isotérmicamente fueron luego calentadas en el equipo DSC desde 20°C hasta 100°C a una velocidad de barrido  $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ . Bajo las mismas condiciones de calentamiento se hicieron corridas con cápsulas de muestra sin tratamiento isotérmico. Se midieron luego las áreas de las endotermas registradas, y por comparación con las áreas teóricas calculadas a partir de los  $t_{1/2}$  y las constantes de velocidad  $k$  de cada transición, se confirmaron las constantes cinéticas halladas.

## 2.14 Tratamiento estadístico

Los resultados fueron evaluados estadísticamente por un análisis de

varianza (ANAVA) para un nivel de confianza del 95%. Las medias calculadas para un número mínimo de 3 ensayos, se compararon por medio de un test LSD (menor diferencia significativa) a un nivel de significación del 0.05. Cada media se expresó con su correspondiente desviación standard ( $\sigma$ ). Para analizar la influencia de la velocidad de congelación y de la temperatura y el tiempo de almacenamiento, como de sus interacciones, se llevó a cabo un análisis factorial (ANAVA, 95%) de tres factores con réplicas (Volk, 1958)

RESULTADOS  
Y  
DISCUSION

DESNATURALIZACION DE PROTEINAS  
EN MUSCULO BOVINO:  
EFECTO DE LA CONGELACION

### **3. DESNATURALIZACION DE PROTEINAS EN MUSCULO BOVINO:**

#### **EFEECTO DE LA CONGELACION**

Si bien el proceso de obtención de carne congelada en la industria frigorífica consta siempre de dos etapas consecutivas: congelación de la pieza de carne seguida de su almacenamiento en estado congelado (Jasper y Placzek, 1978), es importante distinguir entre los efectos debidos únicamente a la congelación y aquellos atribuidos al almacenamiento congelado posterior.

En la etapa de congelación es necesario saber en primer lugar si hay o no algún cambio detectable en las características del músculo y de qué manera influyen las distintas velocidades de congelación utilizadas. Recién después es factible estudiar los efectos que ejercen la temperatura y el tiempo de almacenamiento y su interacción con la velocidad de congelación.

Con el objeto de estudiar los efectos de la congelación se centró la atención en las proteínas del músculo, que constituyen (excluyendo el agua) el componente mayoritario de las fibras musculares, jugando además un rol importante en la calidad de la carne (Fennema et al, 1973).

#### **3.1 Caracterización de las muestras**

##### **Condiciones iniciales**

Sobre cada músculo fresco empleado se determinaron parámetros de control con el fin de asegurar la homogeneidad de las muestras. Esos mismos parámetros se midieron sobre muestras congeladas a distintas velocidades, obteniéndose resultados significativamente iguales a los del músculo fresco.

Los valores medios entre muestras frescas y congeladas expresados con su respectiva desviación típica, que caracterizan a la muestra de carne empleada, son los siguientes:

Tabla 1: Características del músculo bovino fresco y congelado

pH:  $5.60 \pm 0.15$

% humedad:  $75.3 \pm 0.8$

% Proteína bruta (N x 6.25):  $21.0 \pm 0.4$

% Miofibrillas totales (%  $M_T$ ):  $11.5 \pm 1.0$

% Proteínas sarcoplásmicas (%  $S_T$ ):  $5.7 \pm 0.5$

% Tejido conectivo:  $2.2 \pm 0.6$

Los porcentajes están expresados sobre total de muestra húmeda (músculo entero) y son el resultado de promediar al menos 8 valores para músculo fresco y 6 valores para cada velocidad de congelación. Estos datos se tomaron como control durante el almacenamiento congelado, ya que la aparición de diferencias significativas respecto a estas medias estaría indicando un deterioro de las muestras más allá del ocasionado por la temperatura y por el tiempo de almacenamiento en sí. Por ejemplo, un pH mayor que 5.75 nos advertiría respecto de una posible degradación proteica como resultado de crecimiento bacteriano o acción enzimática. Asimismo, la disminución del porcentaje de la humedad en las muestras almacenadas nos estaría indicando un proceso de deshidratación parcial y por lo tanto un envasado ineficiente, el cual se sumaría como un factor más de deterioro. En cuanto al contenido de miofibrillas totales, era esperable un valor constante pues por el método de aislación utilizado se extraen juntas proteínas miofibrilares nativas y desnaturalizadas, cuya sumatoria es siempre constante.

### 3.2 Propiedades de solubilidad de las proteínas del músculo

La clasificación universalmente aceptada de las proteínas musculares en sarcoplásmicas, miofibrilares y conectivas está basada en la marcada diferencia de solubilidad de estas proteínas frente a soluciones acuosas salinas (Ockerman, 1974). Así, las proteínas sarcoplásmicas son solubles en soluciones salinas diluídas (0.1 M KCl), constituyendo aproximadamente el 25-30% del total proteico del músculo (Scopes, 1970; Hultin, 1976). Las proteínas miofibrilares no son extraíbles por solución salina diluída pero sí son solubles en soluciones de fuerza iónica igual o mayor a 0.6 (0.6 M KCl ó

5% NaCl). Representan aproximadamente el 55% de las proteínas totales y constituyen las denominadas miofibrillas de la fibra muscular (Lawrie, 1974; Bodwell y Mc Clain, 1976; Ockerman, 1977). El tejido conectivo, formado principalmente por colágeno, elastina y reticulina, es insoluble aún en soluciones salinas concentradas ( $\geq 0.6$  M KCl) a temperatura ambiente y comprende tan sólo el 10% de la proteína total (Cheftel y Cheftel, 1976; Ockerman, 1977). En base a estas propiedades de solubilidad se separaron las tres fracciones proteicas como se detalló en materiales y métodos (ver inc. 2.6) resultando los valores mostrados en la Tabla 1 para proteínas miofibrilares, sarcoplásmicas y tejido conectivo.

Como la congelación del músculo es un proceso en el cual se transforma en hielo un alto porcentaje del agua tisular, es de esperar un efecto desnaturalizante sobre las proteínas como consecuencia del incremento de la fuerza iónica en la fracción de agua no congelada (Love, 1966; Fennema et al, 1973; Taborsky, 1978). También la velocidad a la cual se congeló el músculo, factor que gobierna el tamaño y la localización de los cristales de hielo formados y por consiguiente los sitios de alta concentración salina (Love, 1968; Bevilacqua et al, 1979) estaría asociada a las alteraciones proteicas.

Con el objeto de estudiar la posible desnaturalización ocasionada por la congelación, una de las primeras propiedades analizadas fue la solubilidad de las proteínas del músculo, estimando que cualquier alteración en la conformación de las moléculas proteicas se vería reflejada en un cambio de solubilidad. Estudios previos efectuados con distintos sistemas proteicos, que incluían desde enzimas y membranas hasta proteínas musculares, mostraron a ambos fenómenos, desnaturalización e insolubilización, estrechamente vinculados (Hamm, 1977; Levitt, 1978; Matsumoto, 1980; Fennema, 1982).

Se estudió entonces la solubilidad de proteínas totales y miofibrilares, en solución 0.6 M KCl, 0.03 M Tris-HCl, pH 7.6 (solución 4) sobre muestras de músculo fresco y de músculo congelado a tres velocidades ( $t_c < 5$  minutos,  $t_c = 20-25$  minutos y  $t_c > 60$  minutos; velocidades de congelación rápida, intermedia y lenta, respectivamente). Aquí es oportuno aclarar que aunque se

trabajó con tres velocidades de congelación bastante diferentes, todas las muestras congeladas se llevaron hasta la misma temperatura (-25°C) para no incluir una nueva fuente de variación, ya que de ser distintas las temperaturas finales de congelación, serían también diferentes los porcentajes de hielo formado dentro del tejido.

La Tabla 2 muestra los porcentajes de proteínas totales solubles (% T<sub>S</sub>) y de miofibrillas solubles (% M<sub>S</sub>) en solución 4 para músculo fresco y congelado, no observándose diferencias significativas debidas a la congelación a ninguna de las tres velocidades ensayadas. Debido a que las proteínas totales solubles son la suma de las proteínas sarcoplásmicas solubles y las proteínas miofibrilares solubles (% T<sub>S</sub> = % S<sub>S</sub> + % M<sub>S</sub>), los resultados obtenidos nos estarían indicando que las proteínas sarcoplásmicas tampoco son afectadas en su solubilidad por la congelación (como se vió en la Tabla 1).

Tabla 2: Solubilidad de proteínas totales y miofibrilares en solución 0.6 M KCl-0.03 M Tris - HCl a pH 7.6, para músculo fresco y congelado.

Músculo	% T <sub>S</sub>	% M <sub>S</sub>	
fresco	15.2 ± 1.1	81.0 ± 5.8	
Congelado	rápido (t <sub>c</sub> < 5 min)	15.3 ± 1.2	79.6 ± 10.5
	intermedio (t <sub>c</sub> = 20-25 min)	15.1 ± 1.8	80.2 ± 6.2
	lento (t <sub>c</sub> > 60 min)	15.2 ± 1.3	79.1 ± 8.0

% T<sub>S</sub> : valores porcentuales de proteínas totales solubles respecto al músculo entero.

% M<sub>S</sub> : valores porcentuales de proteínas miofibrilares solubles respecto a las miofibrillas aisladas. (Número mínimo de ensayos 9)

Es importante señalar que la determinación de %  $T_s$  en músculo entero tiene la ventaja sobre la determinación de %  $M_s$  en miofibrillas aisladas, en que estas últimas pudieron haber sido afectadas durante el procedimiento de aislación. Sin embargo, al comparar los valores de las Tablas 1 y 2 vemos que hay una buena correlación. Si asumimos que %  $S_s = \% S_T = 5.7$  (ya que el total de proteínas sarcoplásmicas en músculo fresco y congelado es soluble) y %  $M_s$  (sobre músculo entero) = %  $M_T \times 0.80$ , resulta que las proteínas totales toman el valor %  $T_s \cong 15$ , que es coincidente con el porcentaje de proteínas totales solubles obtenido por extracción. De esta manera confirmamos que el método por el cual se aislaron las miofibrillas totales no incluyó modificaciones que afecten su solubilidad.

La invariabilidad de la solubilidad de las proteínas del músculo bovino con la congelación, aún a diferentes velocidades, es un resultado que concuerda con informes previos aportados por otras investigaciones, para la congelación de músculo de distintas especies animales, principalmente de pescado. Piskarev et al. (1960), Suzuki et al. (1964), Love (1967), informaron que la congelación rápida (con formación de cristales intracelulares) de músculo de pescado en nitrógeno líquido a  $-195^\circ\text{C}$ , seguida de descongelación inmediata, no ocasionaba cambios significativos en la solubilidad de las proteínas musculares. Otros autores como Love y Ironside (1958), Connell (1962) y Anderson y Ravesi (1970) trabajando con músculo de bacalao congelado a distintas velocidades de congelación, obtuvieron valores de solubilidad proteica comparativamente iguales cuando los músculos se descongelaron sin almacenamiento. Por su parte, Khan (1966) y Khan y Berg (1967) tampoco encontraron diferencias en la solubilidad de proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas de carne de aves de corral, después de ser ésta congelada a velocidad rápida o lenta. Contrariamente, en un trabajo de Huber y Stadelman (1970) se informó que la solubilidad de proteínas de músculo de pollo congelado e inmediatamente descongelado, fue mayor a  $-10^\circ\text{C}$  en aire que por inmersión en nitrógeno líquido a  $-195^\circ\text{C}$ , diferencia que suponen debido a la insolubilización parcial de la fracción miofibrilar durante este último tratamiento. Las investigacio-

nes sobre carne vacuna son comparativamente menores en número y poco esclarecedoras, motivo por el cual es importante aportar más datos. Mientras Deatherage y Hamm (1960) informaron que no hay diferencias en la solubilidad de proteínas entre músculo vacuno fresco y congelado, Awad et al (1968) observaron una disminución de la solubilidad de las proteínas sarcoplásmicas en músculo bovino congelado a  $-4^{\circ}\text{C}$  (semicongelado lento), en tanto que las proteínas miofibrilares no sufrieron cambios. En un trabajo más reciente, Petrović y Rahelić (1981) no registraron cambios significativos de la solubilidad miofibrilar en músculo bovino congelado a  $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-30^{\circ}\text{C}$ , pero sí observaron aumentos de solubilidad a  $-78^{\circ}\text{C}$  y  $-196^{\circ}\text{C}$ , que podrían atribuirse fundamentalmente al elevado porcentaje de hielo formado ( $>90\%$  del agua del tejido) más que a la velocidad de congelación.

En base al conjunto de estos resultados y al informado en este trabajo sobre músculo bovino, es válido aseverar que la congelación de la carne hasta temperaturas no inferiores a  $-30^{\circ}\text{C}$  y bajo distintas velocidades de congelación, no afecta significativamente la solubilidad de las proteínas miofibrilares ni de las sarcoplásmicas aunque como veremos posteriormente, esto no significa una ausencia de desnaturalización proteica.

### 3.3 Modificaciones estructurales de las proteínas miofibrilares

Después de verificar que la solubilidad de las miofibrillas no era modificada por efecto de la congelación, resolvimos estudiar alguna propiedad que pudiera reflejar cambios conformacionales a nivel funcional. Resultaba probable que tales cambios, de involucrar sólo una zona relativamente reducida de la molécula proteica, pudieran repercutir sobre su comportamiento bioquímico sin alterar la solubilidad. Elegimos como propiedad bioquímica de las miofibrillas, la actividad ATPásica: acción enzimática sobre la molécula de ATP (adenosina trifosfato) que produce su hidrólisis con liberación de fósforo inorgánico (ortofosfato) y ADP (adenosina difosfato).

Simultáneamente a la determinación de la solubilidad, se midió sobre las miofibrillas aisladas de músculo fresco y congelado, la actividad

ATPásica en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  como activadores (ver inc. 2.8). Estas mediciones nos proveerían información acerca de la desnaturalización de la molécula de miosina (constituyente de las miofibrillas), a la cual se atribuye la actividad enzimática (Hotta, 1961; Goll y Robson, 1967). Para medir esta actividad, las miofibrillas del músculo fueron cuidadosamente purificadas como se explicó en materiales y métodos (ver inc. 2.6) a fin de evitar la contaminación con proteínas sarcoplásmicas, algunas de las cuales poseen también la facultad de hidrolizar el ATP. (Actividad ATPásica sarcoplásmica) (Martonosi, 1969; Scopes, 1970; Lawrie, 1974).

En la figura 5 se observan los valores obtenidos de actividad ATPásica miofibrilar en función de la velocidad de congelación expresada como el logaritmo decimal del tiempo característico ( $\text{Log } t_c$ ). Estos resultados nos muestran una disminución de la actividad ATPásica tanto con  $\text{Mg}^{2+}$  como con  $\text{Ca}^{2+}$ , como consecuencia de la congelación, observando mayores pérdidas de actividad cuanto mayor es el valor de  $t_c$  (menor velocidad de congelación). Los valores de actividad ATPásica para miofibrillas de músculo fresco fueron  $0.124 \pm 0.025$  y  $0.187 \pm 0.010$  para  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  como activadores respectivamente y decrecen a  $0.117 \pm 0.012$  y  $0.164 \pm 0.005$  con la congelación rápida ( $t_c < 5$  min). El análisis estadístico de la varianza de estos valores dió diferencias no significativas ( $\text{LSD}_{0.05} = 0.032$ ) entre músculo fresco y músculo congelado a velocidad rápida, implicando que la velocidad rápida no afecta la actividad ATPásica miofibrilar.

A velocidad intermedia ( $t_c = 20-25$  min), las actividades ATPásica con  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  decrecieron a  $0.089 \pm 0.014$  y  $0.116 \pm 0.004$  respectivamente; mientras que a velocidad lenta ( $t_c > 60$  min) se obtuvieron valores aún menores,  $0.070 \pm 0.010$  y  $0.099 \pm 0.020$  para  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  respectivamente. A ambas velocidades de congelación, los valores de actividad resultaron significativamente diferentes ( $\text{LSD}_{0.05} = 0.022$ ) a aquellos correspondientes a miofibrillas aisladas de músculo fresco y congelado rápido. Estos resultados indican un efecto desnaturalizante de las congelaciones intermedia y lenta sobre las proteínas miofibrilares. En la misma Figura 5 se muestran las pérdidas por-

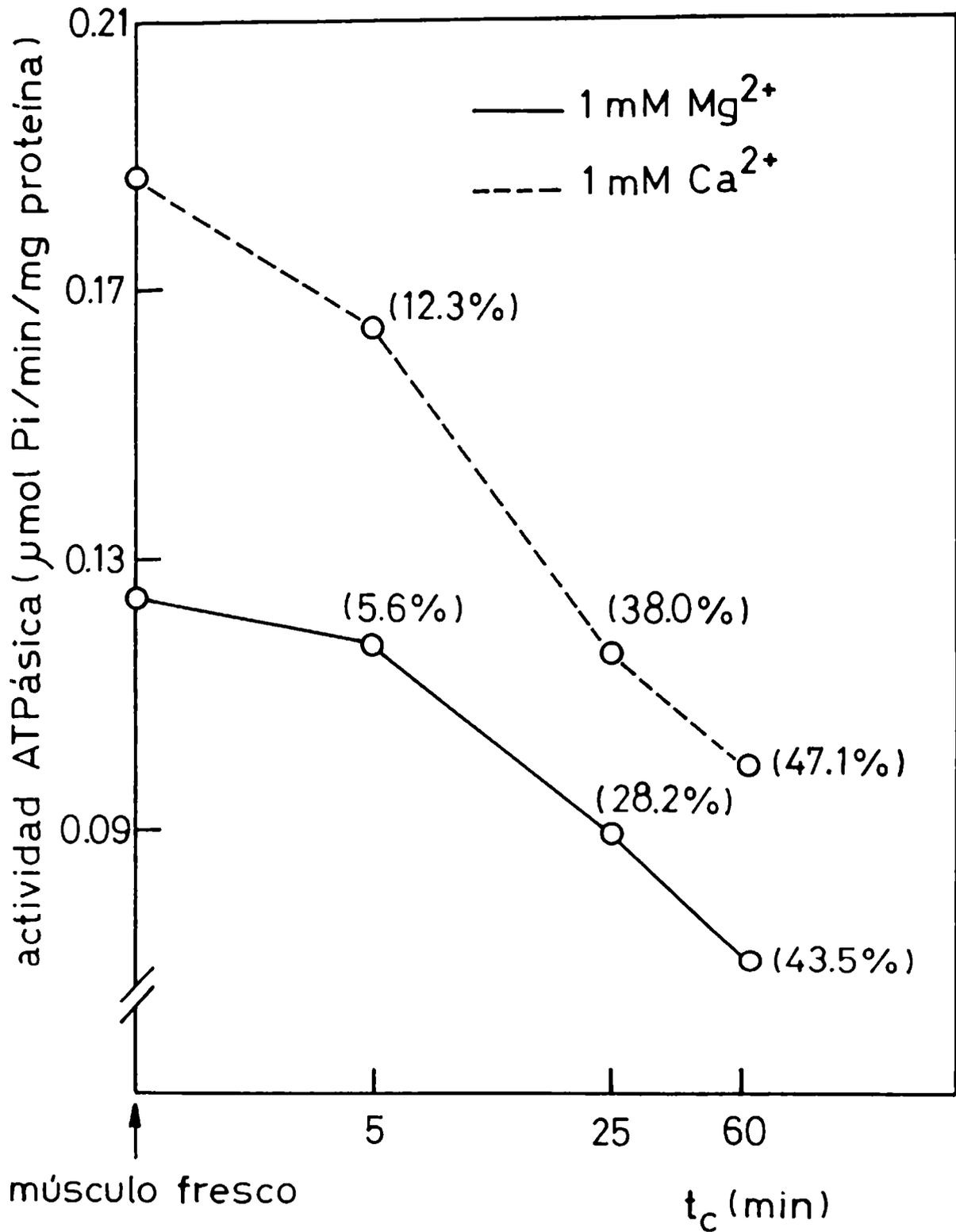


Figura 5: Actividad ATPásica de miofibrillas aisladas de músculo bovino, en función de la velocidad de congelación. La abscisa está en escala logarítmica. Los porcentajes indican la pérdida de actividad respecto a miofibrillas provenientes de músculo fresco. Número mínimo de ensayos: ocho por cada muestra.

centuales de actividad ATPásica, que llegan con la congelación lenta al 43.5% y 47.1% del valor en músculo fresco, para  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  respectivamente; estos porcentajes reflejan un alto grado de desnaturalización.

La disminución de actividad ATPásica miofibrilar en presencia de  $Mg^{2+}$  se atribuye a la pérdida parcial de afinidad en la interacción actina-miosina y/o a una alteración de las propiedades enzimáticas de actomiosina (Herring et al, 1969a; Arakawa et al, 1976; Ito et al, 1978); por otro lado, el decrecimiento de la actividad ATPásica en presencia de  $Ca^{2+}$  indicaría una alteración en la estructura de miosina libre (Bodwell y Mc Clain, 1976). De esto resulta, que la congelación del músculo, principalmente a velocidad lenta, está acompañada por desnaturalización de la cabeza de miosina, en la cual residen ambos sitios activos, el de la enzima (sitio de unión y de hidrólisis de ATP) y el de la interacción con actina (Ockerman, 1977; Harrington y Rodgers, 1984).

En el músculo vivo, el ión  $Ca^{2+}$  es activador de la actividad ATPásica de miosina, en cambio el  $Mg^{2+}$  inhibe esta actividad y activa la del complejo actomiosina (Bodwell y Mc Clain, 1976; Lawrie, 1974). Desde este punto de vista, los resultados de la Figura 5, indican una mayor estabilidad frente a la congelación, de miosina unida a actina que de miosina libre. La actina ejercería así un efecto protector sobre miosina. Un comportamiento similar fue informado por otros investigadores en estudios sobre la estabilidad térmica de miosina (Hamm, 1977). Según Penny (1967a) y Kako (1968), la miosina unida a actina es más resistente al calor que la miosina libre. También Yasui et al. (1968, 1973) y Jacobson y Henderson (1973) reportaron que la unión de actina a miosina, le provee a esta última algún grado de estabilización, fundamentalmente a nivel de su sitio activo. Aparentemente, el complejo actomiosina- $Mg^{2+}$  es más estable al calor que la miosina no complejada o el complejo actomiosina- $Ca^{2+}$  (Young, 1974).

Muy pocas son las investigaciones hechas por otros autores que traten sobre el efecto de la congelación y la influencia de la velocidad sobre la modificación de la actividad ATPásica en el músculo congelado. Aún así,

hay algunos trabajos cuyos resultados son coincidentes con los nuestros. Deatherage y Hamm (1960) informaron que la congelación rápida de músculo longissimus dorsi bovino con inmediata descongelación, no ocasionaba cambios significativos en la actividad ATPásica ni en el número de grupos ácidos y básicos en las proteínas musculares. En cambio, Khan y Berg (1967) investigando sobre el efecto de la congelación de músculo de aves de corral, reportaron pérdidas en la actividad ATPásica miofibrilar tanto con la congelación rápida como con la lenta, aunque mayores con esta última.

### 3.4 Estabilidad de miosina y actina

El estudio sobre la actividad ATPásica de las miofibrillas nos permite acceder tan sólo a una zona de la molécula de miosina, la cabeza; más concretamente a una parte muy reducida de ésta, el sitio activo. La actividad ATPásica nada nos dice respecto de los cambios que pueden llegar a ocurrir en otras zonas de la misma molécula. De esta manera, la información brindada por los datos de actividad ATPásica miofibrilar debe ser complementada con algún estudio que permita conocer la estabilidad global de la miosina frente a la congelación. Era importante además que dicho estudio se pudiera realizar sin la previa aislación de las miofibrillas, procedimiento éste que puede estar incluyendo cambios en la estructura de las moléculas proteicas, y ser luego equivocadamente interpretados como debidos al efecto mismo de la congelación. Uno de los métodos que mejor se ajusta a estos requerimientos, es la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Por medio de esta técnica es posible analizar las transiciones térmicas de las proteínas en músculo "in situ" y con ellas su estabilidad. Esta particularidad le confiere la ventaja de prescindir del aislamiento previo de las proteínas a analizar. El calor o entalpía asociado a cada transición así como las respectivas temperaturas de desnaturalización térmica, son datos que permiten evaluar el efecto de la congelación sobre las proteínas responsables de la endoterma.

Aplicando la calorimetría diferencial de barrido a las muestras de músculo fresco y congelado a las tres velocidades: rápida, intermedia y len-

ta, se registraron los termogramas (gráficos  $\partial H/\partial t$  vs temperatura) característicos del músculo, siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (ver inc. 2.13).

Los termogramas DSC de músculo semitendinoso bovino entero (pH:  $5.6 \pm 0.15$ , % H =  $75.3 \pm 0.8$ ) en estado fresco, a una velocidad de calentamiento  $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ , presentan tres picos, denominados I, II y III, netamente definidos, que corresponden a las transiciones térmicas cooperativas de la desnaturalización por calor de las proteínas musculares (Figura 6). Por su complejidad se adoptó al igual que otros investigadores (Wright et al, 1977; Stabursvik y Martens, 1980; Wu et al, 1985) la descripción de estas endotermas en término de sus temperaturas de pico, denominadas  $T_{\text{max}}$ . Los valores de  $T_{\text{max}}$  son dependientes de la velocidad de barrido empleada, pudiéndose determinar por extrapolación, (de tener termogramas a distintas velocidades) el valor de la temperatura de desnaturalización reversible a  $\beta = 0^\circ\text{C}/\text{min}$  (Karmas y Dimarco, 1970).

En el presente estudio, para hacer comparables los termogramas y simplificar el análisis de los resultados, realizamos las corridas calorimétricas a una velocidad constante de calentamiento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , tomando las  $T_{\text{max}}$  de cada pico como las temperaturas medias de desnaturalización (temperatura que se alcanza al ser desnaturalizado el 50% de las proteínas correspondientes a esa transición).

De acuerdo a trabajos realizados por Martens y Vold (1976); Wright et al. (1977); Stabursvik y Martens (1979, 1980), el pico I correspondería a la desnaturalización de miosina, el pico III a la de actina y el pico II al efecto aditivo de las transiciones térmicas debidas a miosina, proteínas sarcoplásmicas y tejido conectivo.

Entre termogramas del mismo músculo fresco, se pudieron observar algunas variaciones atribuidas probablemente a diferencias en el pH, en el contenido de humedad (Baardseth, 1977; Wright, 1982; Arntfield et al, 1985) o en la inclusión de distintas cantidades de tejido conectivo al preparar las cápsulas con las muestras. Sin embargo, los  $T_{\text{max}}$  de cada pico son signi-

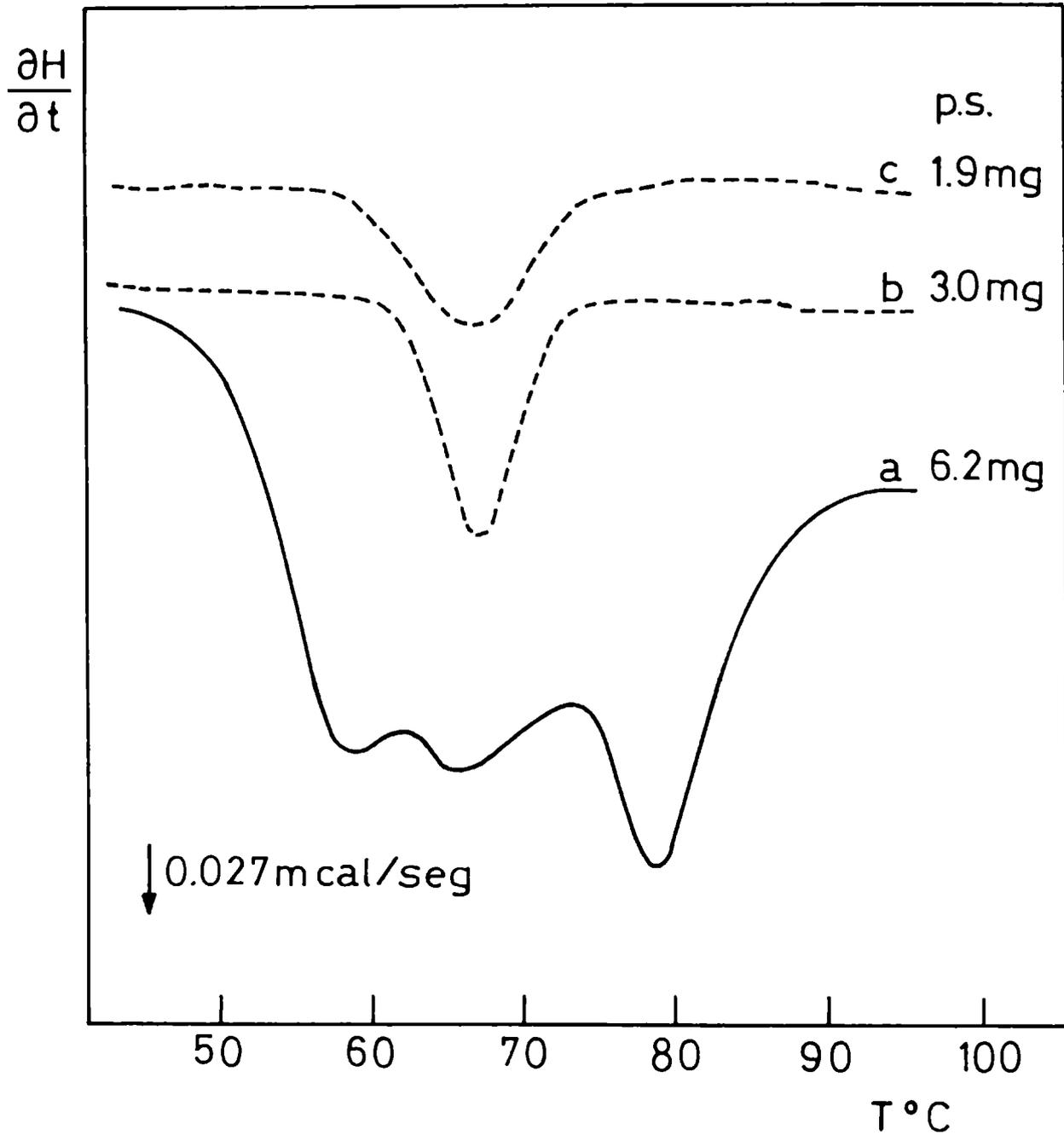


Figura 6: Termograma DSC de: (a) músculo bovino entero en estado fresco, pH: 5.6; (b) tejido conectivo; y (c) proteínas sarcoplásmicas. Velocidad de calentamiento  $\beta = 10^{\circ}C/min$ . P.S. = peso seco.

ficativamente iguales entre sí, para distintos termogramas de músculo fresco, dando los siguientes valores medios con su desviación típica:

Pico I	Pico II	Pico III
Tmax (°C) 58.9 ± 0.4	67.2 ± 1.3	80.2 ± 0.7

(número de ensayos mínimo, ocho; peso seco = 4-6.2 mg)

En la misma Figura 6 también se pueden ver las endotermas de desnaturalización de b) proteínas sarcoplásmicas y c) tejido conectivo, obtenidas respectivamente a partir de exudado de músculo y de tejido conectivo aislado según la técnica descrita en Materiales y Métodos (ver inc. 2.6). En ambos casos son transiciones térmicas simples, con un Tmax cercano a 67°C, valor coincidente con el del pico II, lo cual corrobora la contribución al área de este pico, de las proteínas sarcoplásmicas y conectivas. Además, siendo las proteínas sarcoplásmicas la suma de numerosas proteínas (principalmente enzimas glucolíticas) (Scopes, 1970) en concentraciones comparables, no pudiéndose por lo tanto hablar de una o dos proteínas sarcoplásmicas principales, es esperable y justificable que el pico II sea el menos agudo (cubre un mayor rango de temperaturas de desnaturalización) y que tenga una mayor dispersión del valor medio.

Con la finalidad de estudiar el efecto de la congelación sobre las proteínas musculares se realizaron corridas DSC de músculo congelado a las tres velocidades mencionadas (rápida, intermedia y lenta). Si la congelación afecta a la estructura de algunas de las proteínas que componen al músculo y consecuentemente modifican el número y/o tipo de uniones involucradas en dicha estructura, los termogramas van a permitir observar esos cambios, ya que tanto las áreas como las temperaturas asociadas a cada pico, son función del número y tipo de uniones rotas en la desnaturalización térmica (Privalov y Pfeil, 1979; Arntfield y Murray, 1981).

En la Figura 7 se muestran los termogramas de músculo entero congelado a velocidad rápida, intermedia y lenta, los cuales poseen tres picos, al igual que para el músculo fresco. La principal diferencia entre ellos, es

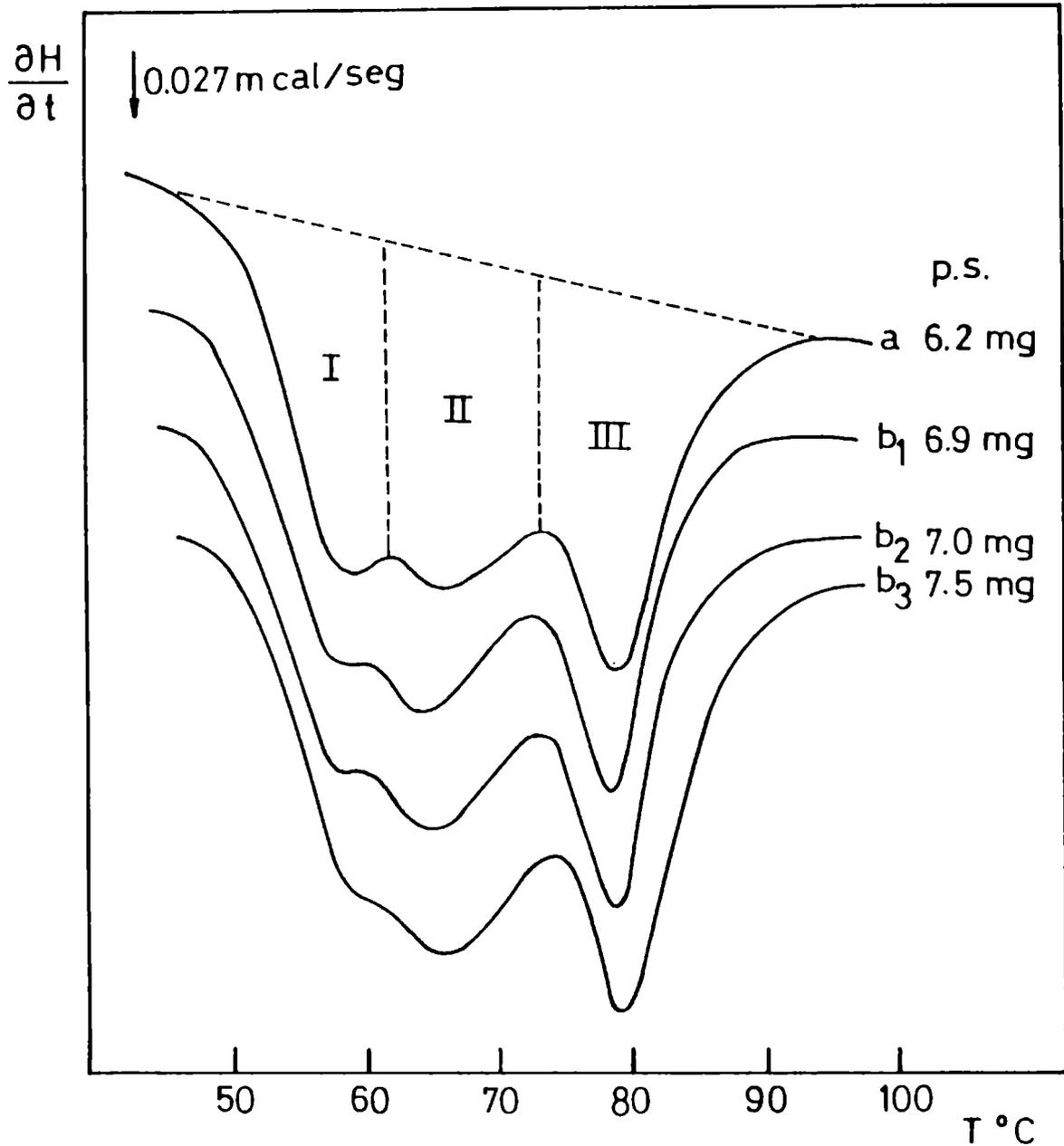


Figura 7: Termogramas DSC de músculo bovino entero a pH 5.6, obtenidos a una velocidad de calentamiento  $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ . (a) músculo fresco; (b) músculo congelado.  $b_1$ ,  $b_2$  y  $b_3$  indican la velocidad de congelación como sigue:  $b_1$ :  $t_c < 5 \text{ min}$ . (congelación rápida);  $b_2$ :  $t_c = 20\text{--}25 \text{ min}$  (congelación intermedia);  $b_3$ :  $t_c > 60 \text{ min}$ . (congelación lenta). P.S.: peso seco.

tá localizada en la región correspondiente al pico I, atribuído a miosina, cuya área se ve disminuída por efecto de la congelación, principalmente de la congelación lenta.

En la Tabla 3a se muestran los valores Tmax de los picos I, II y III, calculados a partir de las endotermas de músculos frescos y congelados (Figura 7), no registrándose entre ellos diferencias significativas. Lo cual significa, que el proceso de la congelación no modifica las temperaturas de desnaturalización de las proteínas del músculo bovino.

Tabla 3: Valores de Tmax de los picos I, II y III en termogramas DSC de músculos bovinos frescos y congelados.

a) corridas realizadas con músculos enteros.

b) corridas realizadas con muestras de músculo desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y tejido conectivo (tratamiento con solución Ringer a pH controlado).

(a) muestra	Tmax (°C)			
	I	II	III	
músculo fresco	58.9 ± 0.4	67.2 ± 1.3	80.2 ± 0.7	
músculo congelado	rápido	58.9 ± 0.6	67.5 ± 0.8	80.2 ± 1.0
	intermedio	58.3 ± 0.3	68.0 ± 0.8	80.5 ± 0.7
	lento	59.4 ± 0.2	66.1 ± 0.9	79.7 ± 0.2
(b) muestra				
músculo fresco	57.7 ± 0.6	63.9 ± 0.7	74.0 ± 0.4	
músculo congelado	rápido	57.6 ± 0.4	64.2 ± 0.6	73.8 ± 0.6
	intermedio	57.5 ± 0.3	64.0 ± 0.5	73.7 ± 0.5
	lento	58.0 ± 0.5	63.7 ± 0.6	73.8 ± 0.4

Los valores  $T_{max}$  son promedios de un mínimo de 6 corridas por muestra ( $\bar{x}$  + desviación standard). Condiciones de corrida: (a)  $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; pH = 5.6 ± 0.12; peso seco = 5.5 - 8.0 mg; % H = 75.3 ± 1.0. (b)  $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ ; pH = 5.6; fuerza iónica  $\mu = 0.16$ ; peso seco = 3-7 mg; % H = 73.4 ± 1.2

Sin embargo si medimos las áreas de cada endoterma y calculamos las entalpías ( $\Delta H$ ) asociadas, valores graficados en la Figura 8, vemos que la congelación provoca alteraciones en las proteínas del músculo, que conducen a la disminución de la entalpía total. La variación del valor  $\Delta H$  implicaría un cambio en el término asociado a la entalpía de desnaturalización  $\Delta H_d$  y/o al de agregación,  $\Delta H_a$  (Privalov y Khechinashvili, 1974). El término  $\Delta H_d$  se vería reducido por el hecho que parte de la desnaturalización ya es producida durante la congelación. En cambio, no podemos saber si las proteínas desnaturalizadas por la congelación, modifican también su capacidad de agregación por calor, afectando al término  $\Delta H_a$ .

Los valores  $\Delta H$  resultantes fueron:  $4.50 \pm 0.15$  cal/g para el músculo fresco y  $4.10 \pm 0.10$ ,  $3.90 \pm 0.09$  y  $3.84 \pm 0.10$  cal/g para músculo congelado a velocidad rápida, intermedia y lenta, respectivamente. El análisis estadístico dió como resultado diferencias significativas ( $LSD_{0.05} = 0.24$ ) entre el músculo fresco y los congelados, mostrando una tendencia a dar menores valores de  $\Delta H$ , cuanto más lenta es la velocidad de congelación.

Aunque resulta evidente por observación de la Figura 7, que es el pico I el más disminuído por la congelación, se quiso saber qué contribución y significación tenía cada pico en la disminución de la entalpía total. Para ello, los termogramas se dividieron, según se explicó en Materiales y Métodos (ver inc. 2.13) en tres áreas parciales, correspondientes a los picos I, II y III y se calcularon las áreas específicas expresadas como la relación entre el área parcial de cada pico (en  $cm^2$ ) y el peso seco de la muestra empleada en la corrida (en mg). Debemos aclarar que las áreas específicas son tan sólo estimaciones de las entalpías de cada transición térmica, pues como se puede ver en la Figura 7, en la endoterma compleja hay superposición de los picos I, II y III. Aún así, la variación de las áreas específicas sirve para evaluar los cambios en cada transición individual.

La Figura 9 muestra, para el pico I y la endoterma total, diferencias significativas entre músculo fresco y congelado, en tanto que los picos II y III permanecen constantes con la congelación. El efecto de la velocidad

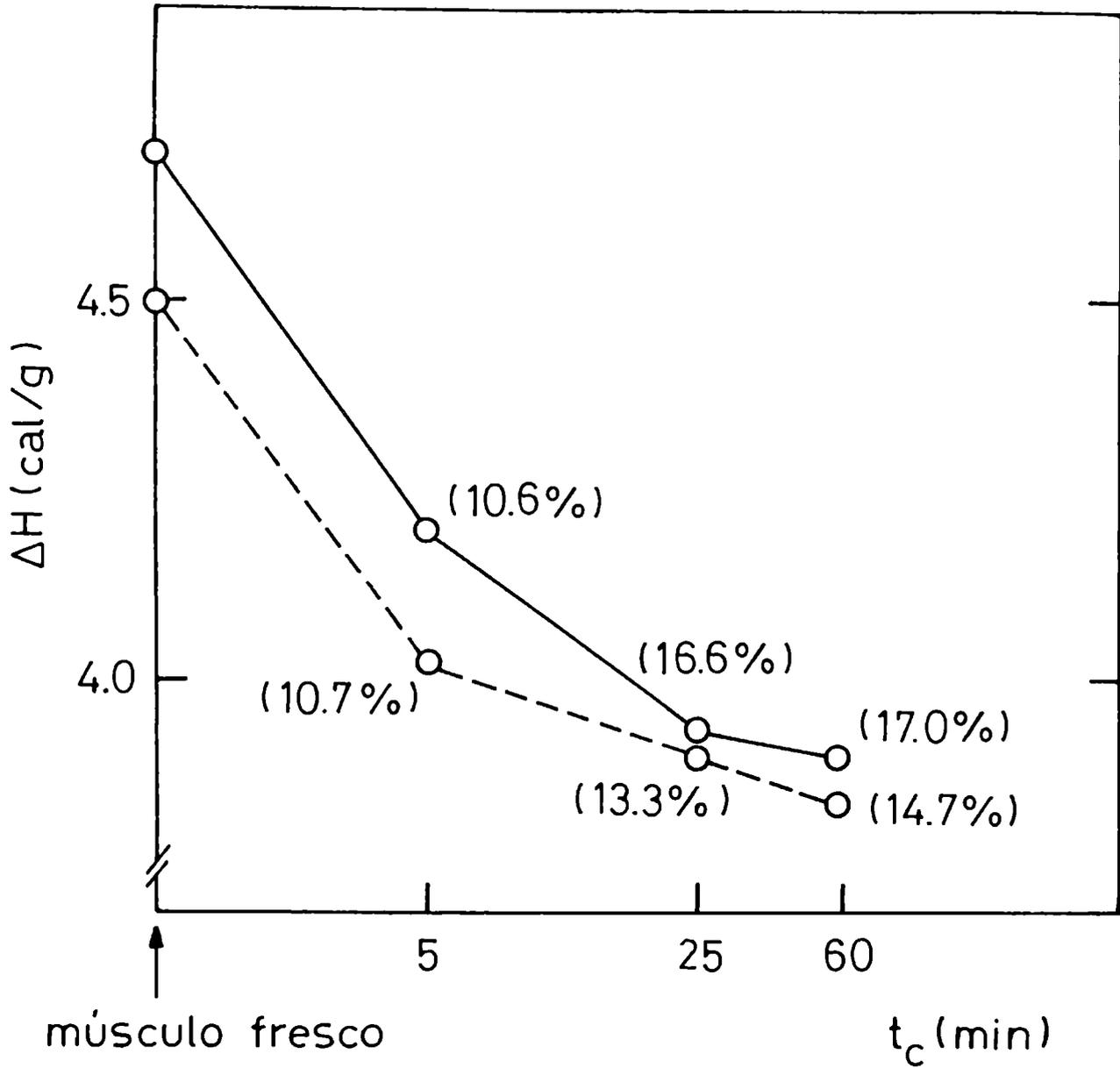
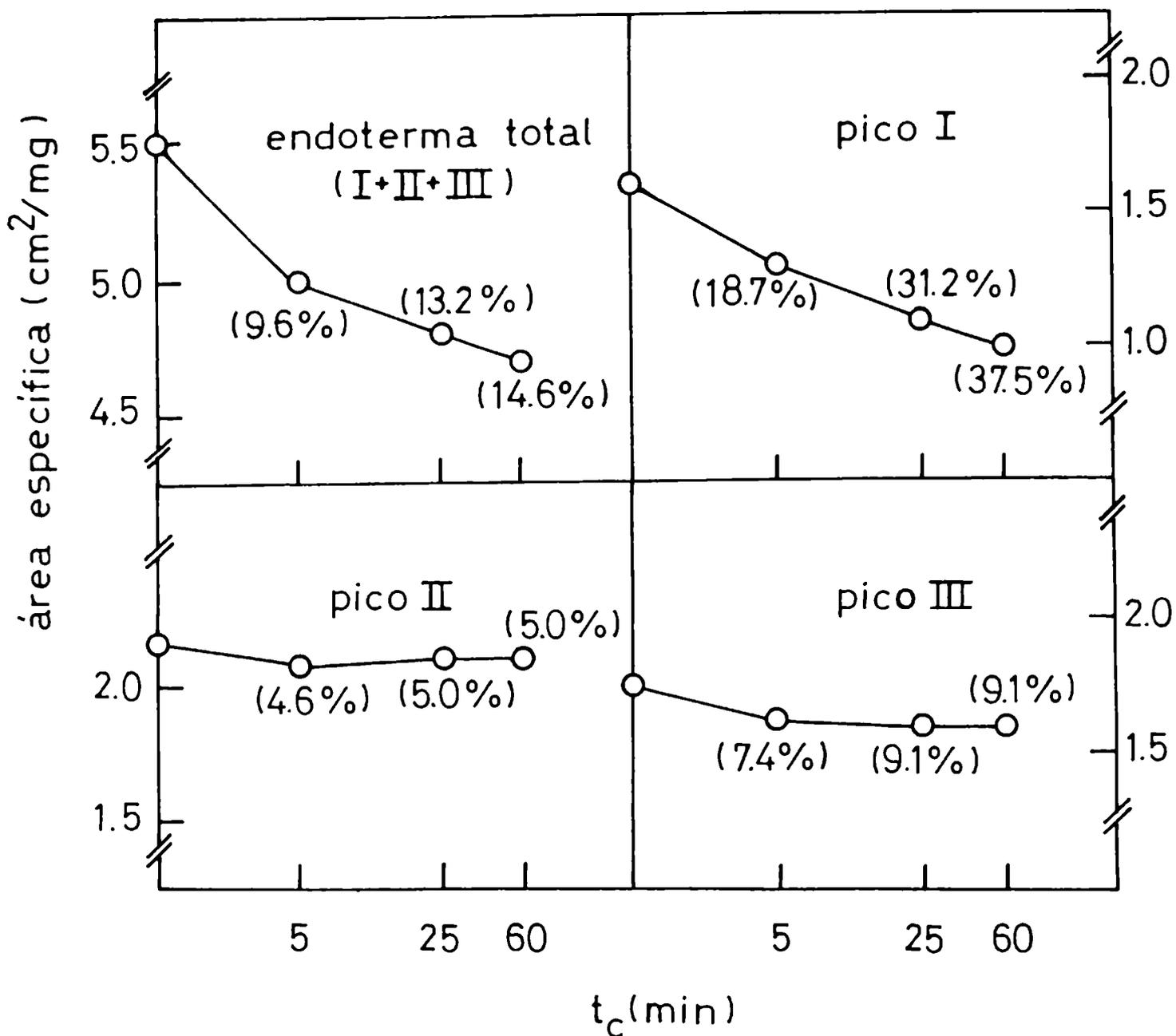


Figura 8: Entalpía de desnaturalización de músculo bovino pH: 5.6, en función de la velocidad de congelación. La abscisa está en escala logarítmica. Los valores porcentuales indican las pérdidas de entalpía respecto al músculo en estado fresco. Número mínimo de ensayos: seis por cada muestra.

(-----) Músculo bovino entero.

(——) Músculo bovino desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y tejido conectivo.



**Figura 9:** Efecto de la velocidad de congelación sobre las áreas específicas de los picos DSC de músculo bovino entero. La abscisa está en escala logarítmica. Velocidad de calentamiento  $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ . Los valores  $\text{LSD}_{0.05}$  (menor diferencia significativa a un nivel de confianza del 95%), calculados para el área específica de cada pico fueron los siguientes: endoterma total, 0.24; pico I, 0.18; pico II, 0.20 y pico III, 0.25. Los valores porcentuales son las pérdidas debidas a la congelación, referidas al músculo fresco. Número mínimo de ensayos: seis por cada muestra.

de congelación se ve reflejado en los porcentajes de disminución del área del pico I, que tomó los valores: 18.7%, 31.2% y 37.5% para congelación rápida, intermedia y lenta, respectivamente. De estos resultados surge que miosina, a la cual se atribuye el pico I, es la proteína muscular más afectada por el proceso de congelación-descongelación y en forma más pronunciada en la congelación lenta, coincidentemente con la disminución de la actividad ATPásica miofibrilar (Figura 5).

La constancia del área del pico III nos diría en principio que la congelación del músculo no tiene efectos importantes sobre la molécula de actina, a la cual se atribuye dicho pico (Martens y Vold, 1976; Martens et al, 1982); en tanto que, la no alteración del pico II, estaría indicando que el conjunto de proteínas que contribuyen a esta transición (proteínas sarcoplásmicas, tejido conectivo y parte de la molécula de miosina no desnaturalizada en el pico I) no modifica significativamente su entalpía total con la congelación; lo cual no descarta la posibilidad de que hayan cambios individuales de algunas proteínas, no observables por enmascaramiento de las no afectadas. Para sortear este inconveniente, es que fue de utilidad realizar corridas DSC de músculo bovino desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y conectivas. Siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (ver inc. 2.13) se trataron muestras de músculo fresco y congelado, con solución Ringer a pH 5.6. Los músculos así tratados están constituidos por la misma microestructura miofibrilar pero sustituido el contenido sarcoplásmico que rodea a las miofibrillas por la solución isotónica Ringer a un pH definido y constante. En la Figura 10 se pueden observar los termogramas de músculo fresco y congelado, desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y de tejido conectivo, por tratamiento con solución Ringer pH 5.6. Vemos que al igual que los termogramas de músculo entero, hay tres picos, los cuales son ahora atribuibles exclusivamente a las transiciones térmicas de las proteínas miofibrilares. Es decir, que los picos I y II corresponderían únicamente a miosina, (Wright y Wilding, 1984) y el pico III, de mayor estabilidad térmica, a actina (Kako, 1968; Chrystall, 1971; Hoffmann, 1973). Sin embargo es importante considerar

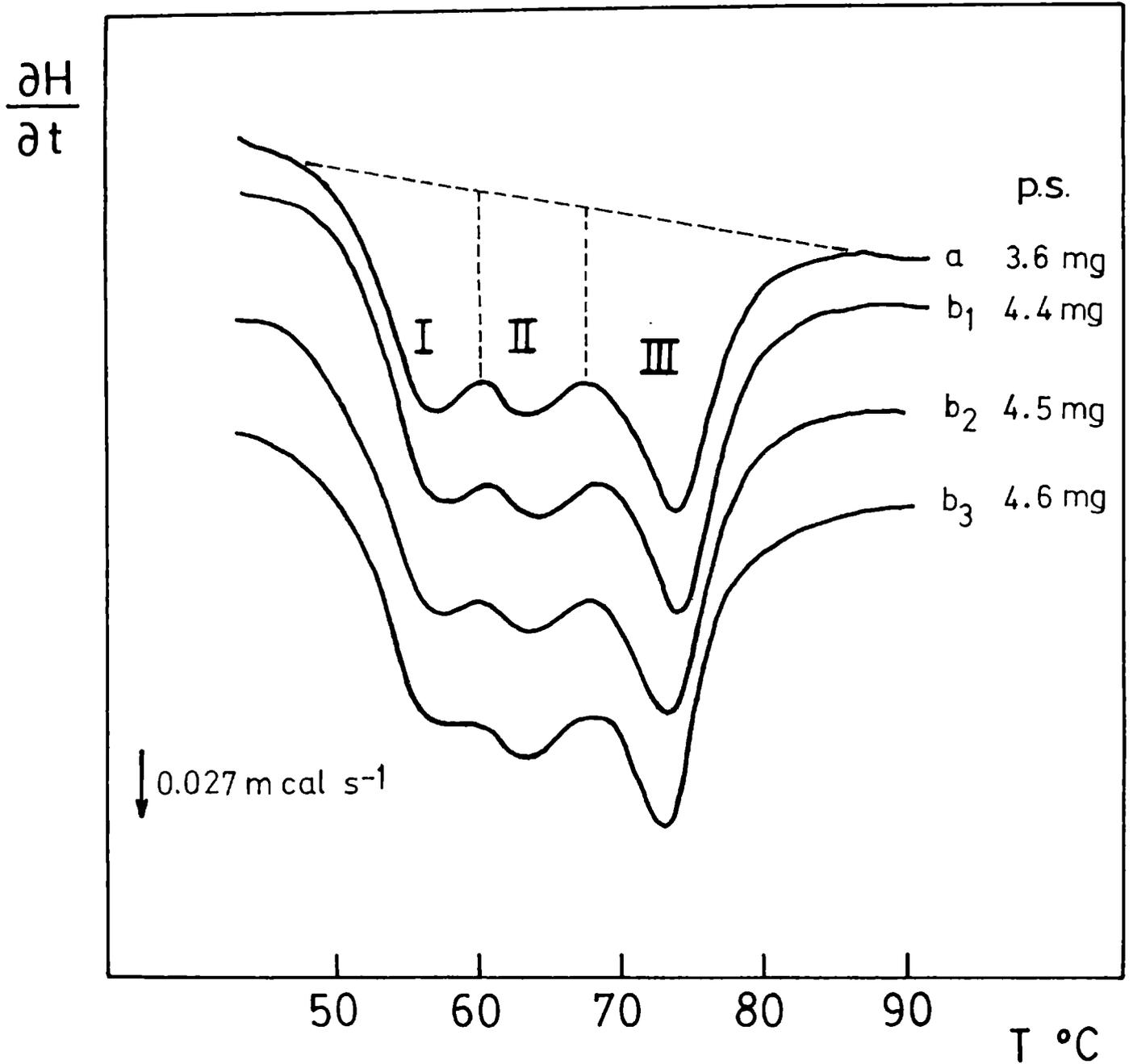


Figura 10: Termogramas DSC de músculo bovino tratado con solución Ringer a pH 5.6 (desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y tejido conectivo). Velocidad de calentamiento  $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ . (a) músculo fresco; b<sub>1</sub>), b<sub>2</sub>) y b<sub>3</sub>) músculos congelados a velocidades rápida, intermedia y lenta, respectivamente. P.S. = peso seco.

que aún siendo miosina y actina, las proteínas miofibrilares principales, otras proteínas menores (tropomiosina, troponina, actininas) que representan cerca del 17% del contenido proteico del músculo (Ockerman, 1977), pueden estar contribuyendo a la endoterma total.

Comparando a un mismo pH los termogramas de músculo entero (Figuras 6 y 7) con los correspondientes al músculo desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y conectivas (Figura 10) se ve que estos últimos presentan valores menores de T<sub>max</sub> (Tabla 3), mostrándose la importancia del ambiente químico sobre la estabilidad térmica de las proteínas. La remoción de proteínas sarcoplásmicas y de otros compuestos solubles del tejido muscular (como creatina, ATP, aminoácidos y péptidos) junto con la adición de iones Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> desde la solución Ringer, parecería conducir a una desprotección de las proteínas miofibrilares y en consecuencia a una mayor labilidad térmica. Se observa además que al remover las proteínas sarcoplásmicas y conectivas y al ajustar el pH a un valor definido, el T<sub>max</sub> del pico II presenta una menor desviación del valor medio y su área es menor y más aguda (ver Figura 10) por ser ahora la transición térmica de un menor número de proteínas.

Respecto al efecto de la congelación, se ve que ésta no modifica los T<sub>max</sub> de los picos I, II y III (Tabla 3b) pero sí sus áreas. En la Figura 10 vemos al igual que para músculo entero (Figura 7), que la diferencia más marcada entre los termogramas de músculos frescos y congelados, es la disminución del pico I, especialmente con la congelación lenta.

En la Figura 8 antes descripta están graficados también los valores  $\Delta H$  para la desnaturalización térmica de músculos desprovistos de tejido conectivo y proteínas sarcoplásmicas y ajustados a pH 5.6. El análisis de varianza dió diferencias significativas ( $LSD_{0.05} = 0.26$ ) entre músculo fresco y músculo congelado, como también para la congelación rápida respecto a la intermedia y lenta, que son las de mayor disminución de entalpía.

Los valores de las áreas específicas de cada pico, figuran en la Tabla 4. Se ven pérdidas significativas debidas a la congelación tanto para el pico I como para la endoterma total y a diferencia del resultado con mús-

culo entero, también para el pico III (únicamente para congelación intermedia y lenta). Es decir, que la congelación afectaría no sólo a miosina, sino también a actina, aunque en mucho menor grado.

Tabla 4: Efecto de la velocidad de congelación sobre las áreas específicas de los picos DSC de músculo bovino tratado con solución Ringer a pH 5.6 (desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y conectivas).

músculo	Area específica (cm <sup>2</sup> / mg )			
	endoterma total	Pico I	Pico II	Pico III
fresco	5.78 <sub>±</sub> 0.27	2.20 <sub>±</sub> 0.22	1.42 <sub>±</sub> 0.27	2.16 <sub>±</sub> 0.16
CONGELADO	rápido	5.13 <sub>±</sub> 0.19	1.77 <sub>±</sub> 0.14	1.40 <sub>±</sub> 0.20
	intermedio	4.81 <sub>±</sub> 0.28	1.59 <sub>±</sub> 0.17	1.37 <sub>±</sub> 0.11
	lento	4.87 <sub>±</sub> 0.17	1.50 <sub>±</sub> 0.15	1.46 <sub>±</sub> 0.16
LSD 0.05	0.26	0.21	0.23	0.21

Los valores mostrados son las medias con su correspondiente desviación standard, para un mínimo de seis ensayos.

LSD 0.05 es la menor diferencia significativa a un nivel de confianza del 95%.

El hecho de que el pico II no esté alterado, implicaría que la congelación no afecta una zona de la molécula de miosina, que suponemos en principio, sin relación con la actividad ATPásica, ya que ésta disminuye notablemente durante la congelación.

Entonces si la correlación entre los resultados de actividad ATPásica y DSC es lícita, el pico II deberá corresponder a la cola y/o cue-

llo de la miosina y el pico I, a la zona de la cabeza.

Algunos investigadores, entre ellos Burjanadze et al (1966); Goodno et al (1976); Wright et al (1977) y Stabursvik y Martens (1980), habían encontrado que miosina presenta un diagrama complejo en su comportamiento térmico. Observaron transiciones térmicas múltiples relacionadas a distintas regiones de la molécula de miosina, siendo afectadas por el pH y la fuerza iónica. Bajo las condiciones de ensayo del presente estudio (pH 5.6 y  $\mu = 0.16$ ) según Wright y Wilding (1984) el pico I puede interpretarse como la desnaturalización de la cabeza de miosina, HMM S-1 (Heavy Meromyosin S-1), en tanto que el pico II, a la de LMM (Light Meromyosin). Anteriormente Goodno y Swenson, (1975 a, b) y Goodno et al, (1976) estudiaron los  $T_m$  (melting temperature) de miosina y sus fragmentos. Vieron que a pH 5.5 la miosina pesada (HMM) tenía el menor  $T_m$ , mientras que los demás fragmentos, incluida la miosina liviana (LMM) tenían un  $T_m$  más elevado. Coincidentemente, Burjanadze et al (1966) habían ya informado que miosina en solución 0.6 M KCl a pH 8.4, posee dos transiciones térmicas con  $T_{max}$  de 43°C y 53°C aproximadamente, atribuyéndolas a las zonas HMM y LMM, respectivamente. Chrystall (1971) y Ziegler y Acton (1984) coinciden también en que LMM es más estable al calor que HMM. En base a éstos resultados convenimos entonces en considerar por el momento, que en los termogramas de músculo tratado con solución Ringer pH 5.6 (sin proteínas sarcoplásmicas) y desprovistos manualmente de tejido conectivo, los picos I y II son las transiciones térmicas correspondientes a la cabeza globular y a la cola fibrosa de miosina respectivamente y que el pico III de mayor  $T_{max}$  es la transición térmica de actina.

Con el objeto de reafirmar los conceptos anteriores y de adquirir además un mayor conocimiento respecto de las proteínas miofibrilares, desde el punto de vista de su comportamiento térmico, se realizó un estudio por calorimetría diferencial de barrido de la cinética de desnaturalización por calor de las miofibrillas en músculo bovino (Apéndices I y II). Dicho estudio nos llevó a la conclusión de que los picos I y II del termograma DSC, corresponden a la transición térmica del filamento grueso (constituído

casi totalmente por miosina) y que el pico III es la transición del filamento fino, formado por actina y proteínas menores (troponinas, tropomiosina y actininas). Si aplicamos este nuevo conocimiento al resultado del estudio del efecto de la congelación sobre las proteínas miofibrilares en músculo bovino, resulta que la congelación (en mayor grado la lenta) afecta principalmente al filamento grueso, el cuál manifiesta análogamente una mayor labilidad térmica que el filamento fino (pico III).

Haciendo uso de la misma técnica DSC, se quiso ver si las miofibrillas en estado aislado y purificado (a las cuáles se les midió la actividad ATPásica) presentaban diferencias en su entalpía de desnaturalización, cuando procedían de músculo fresco o congelado.

De la misma manera como se procedió con músculo entero y músculo tratado con solución Ringer (ver inc. 2.13), se realizaron corridas DSC a  $10^{\circ}\text{C} / \text{min}$ , utilizando muestras de miofibrillas aisladas de músculos fresco y congelados a las tres velocidades de congelación: rápida, intermedia y lenta. Se observa en la Figura 11 que el termograma de miofibrillas aisladas de músculo fresco y luego lavadas con solución Ringer a pH 5.6 (por tres suspensiones y centrifugaciones sucesivas), también presenta tres picos: picos I y II, atribuibles al filamento grueso y pico III, al filamento fino.

En comparación con los termogramas de músculo entero y músculo desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y conectivas (Figuras 6 y 10), los  $T_{\text{max}}$  para miofibrillas aisladas son bastante menores, lo que sugiere que el tratamiento de extracción produce una mayor desprotección y en consecuencia, mayor labilidad térmica de las proteínas miofibrilares (Tabla 5); lo cual no implica desnaturalización, ya que la entalpía  $\Delta H$  de las miofibrillas en estado aislado no es menor que en la fibra intacta. Por el contrario, se observa un incremento entálpico, atribuible al mayor contenido acuoso en las muestras de miofibrillas aisladas (>76%) (Baardseth, 1977). En la misma Figura 11 se observa el termograma de miofibrillas aisladas igualmente tratadas con solución Ringer pero a pH 6.0. Aparece un único pico para la tran

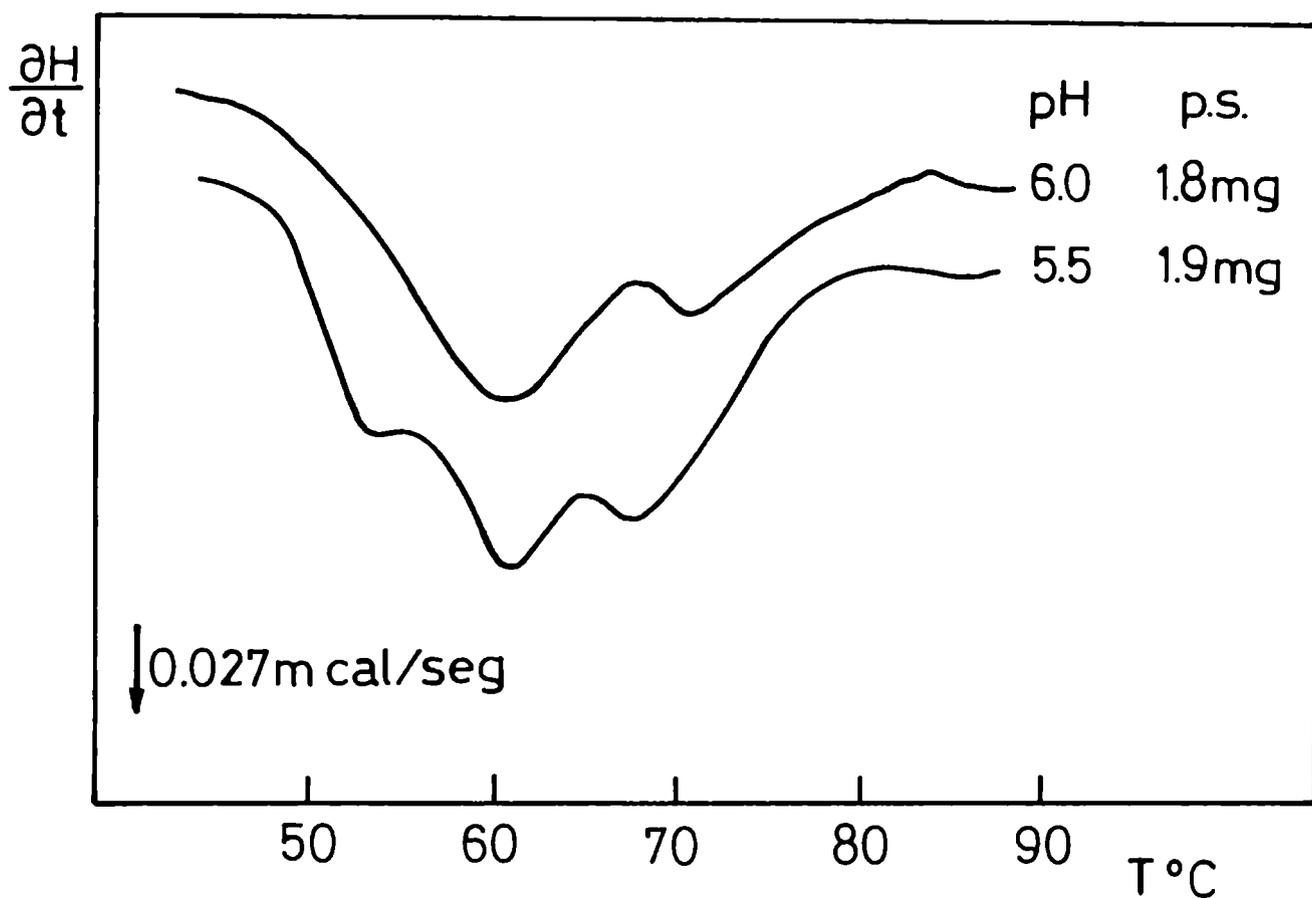


Figura 11: Termogramas DSC de miofibrillas aisladas de músculo bovino fresco y posteriormente tratadas con solución Ringer a dos valores de pH: 5.5 y 6.0. Velocidad de calentamiento  $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . P.S. = peso seco.

sición del filamento grueso, resultado que está de acuerdo con los estudios sobre la influencia del pH, en las transiciones térmicas de miosina (Apéndice I).

Tabla 5: Tmax de los termogramas DSC obtenidos para muestras frescas de:

- a) músculo entero
- b) músculo libre de proteínas sarcoplásmicas y tejido conectivo.
- c) miofibrillas aisladas

muestra	Tmax (°C)		
	pico I	pico II	pico III
a	58.9 ± 0.4	67.2 ± 1.3	80.2 ± 0.7
b	57.7 ± 0.6	63.9 ± 0.7	74.0 ± 0.4
c	54.8 ± 0.5	60.6 ± 0.5	67.5 ± 0.5

Condiciones de corrida: pH 5.6; fuerza iónica  $\mu = 0.16$ ; velocidad de calentamiento  $\beta = 10^\circ\text{C} / \text{min}$ ; Peso seco = 3-8 mg para muestras a) y b) y 1.6-30 mg para muestras c); % H = 75.3 ± 1.0, 73.4 ± 1.2 y 86.0 ± 2.0 para muestras a) b) y c) respectivamente.

Número mínimo de corridas: seis por muestra.

En la Tabla 6 se muestran los valores de  $\Delta H$  obtenidos a partir de los termogramas DSC de miofibrillas aisladas de músculo fresco y congelado. El análisis estadístico de estos valores nos dió por resultado diferencias significativas (LSD<sub>0.05</sub> = 0.35) entre los músculos frescos y los congelados intermedio y lento, no así con el rápido. Las pérdidas porcentuales

de entalpía que figuran en la Tabla 6 nos dicen que a mayores valores de  $t_c$  (menor velocidad de congelación) son mayores los efectos desnaturalizantes de la congelación.

Tabla 6: Valores  $\Delta H$  (entalpía de transición térmica) obtenidos de los termogramas DSC correspondientes a miofibrillas aisladas de músculo fresco y congelado.

Miofibrillas de músculo bovino	$\Delta H$ (cal/g Peso seco)	Pérdida Porcentual
fresco	5.51 $\pm$ 0.10	0.0 %
congelado	rápido	5.33 $\pm$ 0.06
	intermedio	5.06 $\pm$ 0.05
	lento	5.01 $\pm$ 0.06

Condiciones de corrida: pH = 5.6;  $\mu$  = 0.16;  $\beta$  = 10°C/min ; Peso seco = 1.6 - 3.0 mg; % H = 86.0  $\pm$  2.0.

Los valores son promedios de un número mínimo de seis corridas por muestra ( $\bar{x}$   $\pm$  desviación standard).

### 3.5 Cambios en la interacción actina - miosina

Es sabido que la molécula de miosina posee dos sitios activos en la zona de su cabeza globular (HMM - S1), uno que le confiere la actividad ATPásica y otro con el cual se puede unir a actina para formar el complejo actomiosina (Seidel, 1969; Harrington y Rodgers, 1984). Esta interacción con actina, modifica la actividad ATPásica de miosina, de manera que mientras la actividad ATPásica de miosina libre es activada por  $Ca^{2+}$  e inhibida por  $Mg^{2+}$ ; la de miosina modificada por actina (actomiosina) es en cambio activada por  $Mg^{2+}$  y presenta una actividad residual con  $Ca^{2+}$  (Bodwell y Mc Clain, 1976; Ockerman,

1977). Esta propiedad de miosina respecto a su interacción con actina, es la responsable del fenómeno de contracción-relajación en el músculo vivo, y en el músculo post-mortem puede tener incidencia en las características texturales de la carne (Herring et al, 1969 a y b; Fennema et al, 1973; Stanley, 1976). De aquí la importancia de conocer si la congelación modifica la afinidad en la interacción actina-miosina.

Vimos que la actividad ATPásica miofibrilar en presencia de iones  $Mg^{2+}$ , disminuye por efecto de la congelación, llegando a una pérdida del 43% cuando la velocidad es lenta (ver inc. 3.3). Este resultado sugería cambios en la interacción actina-miosina. Para corroborarlos se recurrió a un estudio electroforético que permitiera observar directamente las unidades monoméricas de actina y proteínas menores, y de las cadenas pesadas y livianas de miosina.

Las miofibrillas aisladas de músculo fresco y músculo congelado a velocidad rápida y lenta, fueron estudiadas por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, después de haber sido tratadas con SDS o con SDS + ME. La Figura 12 muestra los diagramas electroforéticos obtenidos de miofibrillas de músculo bovino fresco (a, b), de músculo congelado rápido (c, d) y lento (e, f), tratados con SDS y con SDS + ME, respectivamente. En la misma Figura están señaladas las bandas principales con sus respectivos pesos moleculares. Según éstos se asignó cada pico a la correspondiente proteína miofibrilar, basándonos en los trabajos de Hay et al (1973 b) y Porzio y Pearson (1977).

El tratamiento con SDS, rompe las uniones hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas entre cadenas polipeptídicas, permitiendo el ingreso al gel de unidades monoméricas de actina (G-actina), cadenas pesadas y livianas de miosina y proteínas menores. El SDS además tiene como función, cargar negativamente a las cadenas proteicas, en una relación carga-masa constante, con lo cual migran hacia el ánodo recorriendo distancias proporcionales al peso molecular.

El tratamiento con ME, provoca la ruptura de puentes disulfuro en la estructura proteica, de manera que la aparición de bandas de menor PM en

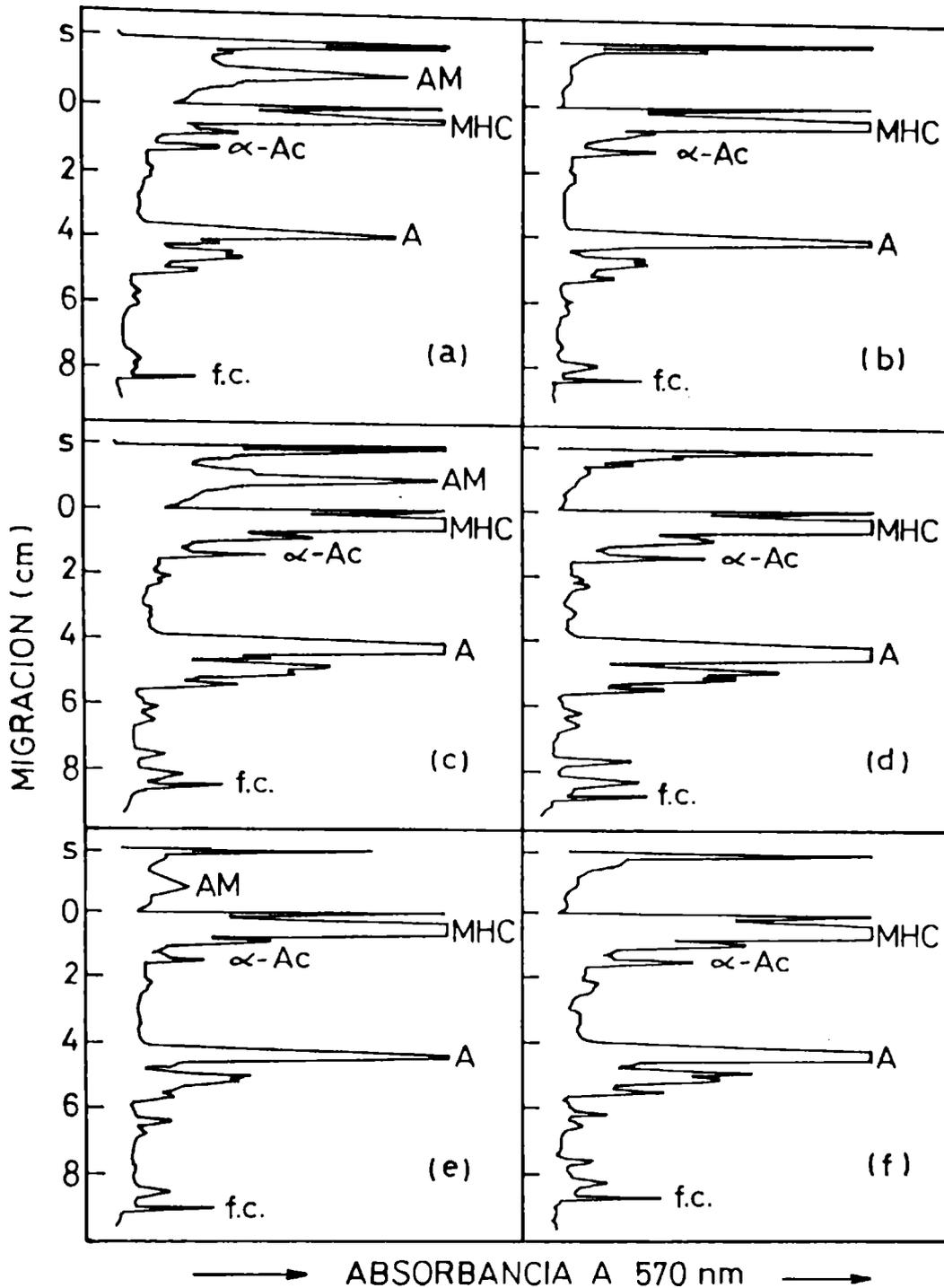


Figura 12: Densitogramas de las electroforesis en geles de poliacrilamida - SDS de miofibrillas suspendidas en solución 0.6M KCl, 0.03M Tris -HCl, pH 7.6. Las muestras a, c y e fueron tratadas con SDS y las muestras b, d y f con SDS+ME. S: punto de siembra; f.c.: frente del colorante; S  $\rightarrow$  0: gel de "stacking"; AM, filamentos de actomiosina; MHC, cadena pesada de miosina (PM = 200000);  $\alpha$ -Ac,  $\alpha$ - actinina (PM = 100000); y A, actina (PM = 45000). a, b: músculo fresco; c, d: músculo congelado rápido; e, f: músculo congelado lento.

los geles de muestras tratadas con SDS + ME (respecto a las tratadas solamente con SDS), nos estaría indicando la existencia de uniones disulfuro (S-S) entre cadenas.

La comparación en la Figura 12 de los diagramas electroforéticos de miofibrillas tratadas con SDS sólo (a, c, e) respecto de los tratados con SDS + ME (b, d, f) nos muestran que no hay uniones S-S involucradas en la estructura de los filamentos finos, dado que tanto las bandas de actina y de proteínas menores, aparecen tanto en los geles con SDS como en los tratados además con ME, sin la aparición de nuevas bandas de bajo PM (entonces la actina polimerizada, llamada F-actina, no contiene puentes S-S).

Si en cambio centramos la atención en el pico correspondiente a la cadena pesada de miosina (pico MHC,  $PM = 2.10^5$ ) observamos que en las muestras tratadas con SDS + ME (Figura 12 b, d y f), el área de este pico es mayor que la correspondiente a las muestras tratadas con SDS (a, c y e). En forma simultánea se ve que el área del pico AM (complejo actomiosina), que aparece en la zona del gel de Stacking, disminuye en las muestras tratadas con SDS + ME. Esto tiene su explicación si recordamos que en la gelificación de miosina nativa inducida por calor en presencia de actina, en medio 0.6 M KCl, se forma el complejo actomiosina (AM), a través de la formación de puentes disulfuro (Samejima et al.1980). También Matsumoto (1980) informó de la formación de filamentos de actomiosina cuando se ponen juntas actina y miosina en solución 0.6 M KCl. Lo mismo ocurre durante el calentamiento de las miofibrillas en la preparación de las muestras con SDS; con la única diferencia que la presencia de este reactivo rompe las uniones hidrógeno que mantienen unidas las cadenas pesadas de miosina, entre sí y con las cadenas livianas, quedando formado el complejo actina-cadena pesada de miosina, por puentes disulfuro. En las muestras tratadas además con ME, se rompen también dichos puentes S-S, liberándose la cadena pesada de miosina y la actina, que pueden entonces entrar en el gel separador. Como es fácil de ver, sólo una parte del total de las moléculas de miosina presentes, son capaces de formar en estas condiciones el complejo actomiosina.

La relación entre las áreas de pico MHC con y sin ME para la misma muestra, nos brindó información acerca de la afinidad actina-miosina. Los valores de esta relación fueron 1.37, 1.15 y 0.93 para miofibrillas de músculo fresco, congelado rápido y lento, respectivamente; lo cual significa una mayor pérdida de afinidad actina-miosina en la congelación lenta que en la rápida (notar que el pico AM en la Figura 12 a, c y e, en el gel de Stacking, es mucho menor para el congelado lento).

Una información adicional aportada por estos geles, es la relación con la que interactúan actina y miosina, dada por el cociente entre las diferencias de las áreas MHC y actina, con y sin ME ( $r_{\Delta} = \frac{\Delta_{\text{MHC}}}{\Delta_{\text{A}}}$  con  $\Delta_{\text{MHC}} =$  = área MHC con ME - área MHC sin ME y  $\Delta_{\text{A}} =$  = área actina con ME - área actina sin ME). Para miofibrillas de músculo fresco,  $r_{\Delta}$  dió aproximadamente 4, que coincidentemente es igual a la relación de PM entre MHC y actina. Esto está de acuerdo con la relación estequiométrica 1:2 observada en músculo fresco entre miosina y actina, para formar durante la contracción el complejo acto-miosina (Harrington y Rodgers, 1984). Con la congelación rápida y lenta, la relación  $r_{\Delta}$  dió 3.3 y 2.3, respectivamente; las cuales reflejan la mencionada modificación en la interacción actina-miosina debido a la congelación.

Este estudio electroforético de las proteínas miofibrilares, además de brindar información sobre el efecto de la congelación en las miofibrillas, aporta datos adicionales respecto a la estructura miofibrilar. Pudimos comprobar que no hay puentes disulfuro en las proteínas miofibrilares, por comparación entre geles con y sin ME, aunque sí hay formación de puentes disulfuros en la interacción de miosina con actina. Respecto al pico resultante de esta interacción (AM), pudimos ver que no desaparece aún habiendo tratado térmicamente la muestra con SDS durante 5 minutos a 100°C; pero que sí desaparece al tratarla con ME. Este resultado es una prueba de que el simple calentamiento, y menos aún a temperaturas menores a 100°C, no puede romper uniones S-S sin la presencia de un reactivo como ME o DTT (Ditiotreitol). Entonces, los picos de los termogramas DSC de músculo, no pueden incluir la ruptura de puen

tes disulfuro; conclusión a la que habíamos arribado en el Apéndice I.

### 3.6 Viscosidad, comportamiento reológico y capacidad de absorción de agua de miofibrillas aisladas

Habiendo observado que el proceso de congelación del músculo ofrece un efecto desnaturalizante sobre las proteínas miofibrilares (principalmente sobre miosina) era deseable conocer si estos cambios estructurales repercutían en algunas de sus propiedades reológicas como son la viscosidad y la capacidad de absorción de agua (también llamada hinchamiento, Swelling).

En la tabla 7 presentamos los resultados obtenidos por medición de la viscosidad reducida ( $\eta_{red}$ ) y de la capacidad de absorción de agua de miofibrillas aisladas de músculo fresco sin congelar y de músculos congelados a velocidades rápida y lenta.

Tabla 7: Efecto de la congelación rápida y lenta del músculo bovino, sobre la viscosidad reducida ( $\eta_r$ ) y la capacidad de absorción de agua (WAC) de miofibrillas aisladas.

músculo	$\eta_r$	WAC <sub>2</sub>	WAC <sub>1</sub>
fresco	3.45 ± 0.10	118.8 ± 6.6	18.3 ± 0.6
congelado rápido	3.32 ± 0.16	107.7 ± 5.9	17.3 ± 1.3
congelado lento	3.27 ± 0.21	101.4 ± 12.0	16.9 ± 1.6
LSD <sub>0.05</sub>	0.32	16.5	1.8

$\eta_r$ : viscosidad reducida de las miofibrillas en solución 0.6 M KCl, 0.03 M Tris-HCl, pH 7.6

WAC<sub>2</sub> y WAC<sub>1</sub>: capacidad de absorción de agua de miofibrillas en agua y en solución 0.15 M KCl, 0.03 M Tris-HCl, pH 7.6, respectivamente.

LSD<sub>0.05</sub>: menor diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%. Número mínimo de ensayos: cuatro por muestra.

Al igual que lo obtenido para la solubilidad miofibrilar (ver Tabla 2), los valores de la viscosidad reducida de miofibrillas en solución 0.6 M KCl, aunque tienden a ser ligeramente menores con la congelación, no son significativamente diferentes al valor correspondiente para músculo fresco. En la Tabla 7 se observa además, que tanto la congelación rápida como la lenta, provocan una notable disminución en la capacidad de absorción de agua de las miofibrillas, medida en agua ( $WAC_2$ ) o en solución 0.15 M KCl, 0.03 M Tris-HCl pH 7.6 ( $WAC_1$ ). Sin embargo el tratamiento estadístico de estos resultados (ANAVA con 95% de confianza), nos permite reconocer como significativa únicamente la diferencia debida a la congelación lenta sobre el valor  $WAC_2$ . De este modo aún habiendo visto a través de otros parámetros ( $\Delta H$  de desnaturalización) que las miofibrillas también son afectadas, pero en menor grado, por la congelación rápida, desde el punto de vista de la capacidad de hinchamiento, sólo se detectan diferencias para la congelación lenta.

En la interpretación de estos resultados, debemos tener en cuenta los diferentes medios de ensayo empleados; así, mientras que la viscosidad se midió sobre una solución miofibrilar en 0.6 M KCl, la capacidad de absorción de agua se determinó con suspensiones de miofibrillas en 0.15 M KCl. Esto nos advierte sobre la necesidad de interpretar correctamente cada resultado de acuerdo a los fenómenos que ocurren en cada medio.

En solución 0.6 M KCl las miofibrillas de músculo fresco o congelado, se solubilizan ( $\approx 80\%$ ) y las moléculas de miosina y actina se combinan para formar filamentos de actomiosina, dando soluciones altamente viscosas (Matsumoto, 1980). La forma alargada de la molécula de miosina, con su zona fibrosa insoluble y su cabeza globular soluble, así como su alto peso molecular, determinan la elevada viscosidad de sus soluciones (Lee y Rha, 1979). Según Offer y Trinick (1983) y Harrington y Rodgers (1984), en solución 0.6 M KCl las moléculas de miosina en el filamento grueso, se cargan negativamente en la zona de sus colas, debido a la alta concentración de iones  $Cl^-$ , provocando la separación por repulsión de las moléculas de miosina, que conducen a un aumento de hidratación del filamento y por consiguiente de viscosi-

dad. Además del agua retenida por la matriz proteica, está el agua de hidratación de cada molécula de proteína en forma individual, lo cual le confiere un determinado volumen hidrodinámico, que está relacionado con el número de grupos ionizables e hidrofílicos en la molécula.

Las miofibrillas suspendidas en agua, están insolubles pero fuertemente hidratadas, lo que le otorga al medio un aspecto lechoso y textura gelatinosa. Al no haber presentes aniones  $\text{Cl}^-$ , los grupos cargados positivamente deben ser saturados con moléculas de agua, aumentando considerablemente las multicapas de hidratación (alto volumen hidrodinámico). En agua no se produce la separación por repulsión de las moléculas de miosina en el filamento grueso, como sí ocurre en solución 0.6 M KCl; ni se espera que sea importante la interacción actina-miosina. Entonces, el agua retenida por las proteínas miofibrilares después de la centrifugación es una suma del agua ligada a la proteína (agua constitucional y vecinal, unida a la proteína por interacción con grupos iónicos, polares y no polares), más el agua de la multicapa (agua unida por puentes hidrógeno al agua vecinal; está incluida en la unidad cinética en solución y relacionada con el volumen hidrodinámico) y el agua atrapada (agua físicamente retenida, en el caso de las miofibrillas dentro de la estructura de los filamentos gruesos y finos y entre ellos) (Hamm, 1975; Fennema, 1977).

En el caso de las miofibrillas suspendidas en solución 0.15 M KCl, su capacidad de hidratación es mucho menor que la que presentan cuando son suspendidas en agua, perdiendo en consecuencia la capacidad de formar soluciones viscosas. Esto podría deberse a que al haber KCl en el medio, parte de los grupos ionizables interactúan con los iones  $\text{Cl}^-$  o  $\text{K}^+$ , liberando moléculas de agua.

Entonces, la información que nos brindan los valores de viscosidad en solución 0.6 M KCl, no es la misma y no tiene porqué estar directamente relacionada con la que surge de los valores de hinchamiento de miofibrillas en  $\text{H}_2\text{O}$ . Es evidente que la desnaturalización sufrida por la miosina en la zona globular de su cabeza, así como la leve desnaturalización de actina, que

es también globular, no afecta la viscosidad ni la solubilidad de miofibrillas en solución 0.6 M KCl pero en cambio sí provoca una considerable disminución de la capacidad de absorción de agua de las proteínas miofibrilares.

Respecto a las características reológicas de las miofibrillas, ya sea en el caso de músculo fresco o congelado, se comportan como un líquido pseudoplástico y tixotrópico (Figura 13). Por pseudoplasticidad se entiende la disminución de la viscosidad aparente con el esfuerzo de corte, en tanto que tixotropía es la disminución de la viscosidad aparente con el tiempo de aplicación de una fuerza de corte constante (Bourne, 1982). La congelación no introdujo ninguna modificación detectable sobre dichas propiedades de flujo, en forma coincidente con los resultados de viscosidad; lo cual sugiere que los cambios operados en las proteínas miofibrilares, aún en miosina que es la más afectada, se limitan a una zona reducida de sus moléculas y no al total de su estructura. Además, según Lee and Rha (1979), el que los comportamientos pseudoplástico y tixotrópico no estén modificados, significa que no hubieron alteraciones importantes en la forma y tamaño molecular, como tampoco en la estructura e interacción de las proteínas entre sí y con el solvente.

### **3.7 Implicancias generales del efecto de la congelación sobre la desnaturalización proteica**

Los estudios realizados con músculo bovino congelado a distintas velocidades, dieron como resultado que la congelación e inmediata descongelación del tejido muscular, está acompañada por la desnaturalización selectiva de algunas de las proteínas del complejo miofibrilar.

Indicativa de dicha desnaturalización es la disminución de parámetros tales como la actividad ATPásica y la entalpía de desnaturalización térmica de las miofibrillas en músculo congelado, respecto al músculo fresco (Figuras 5 y 8).

De las proteínas miofibrilares, resultó ser la miosina, principal

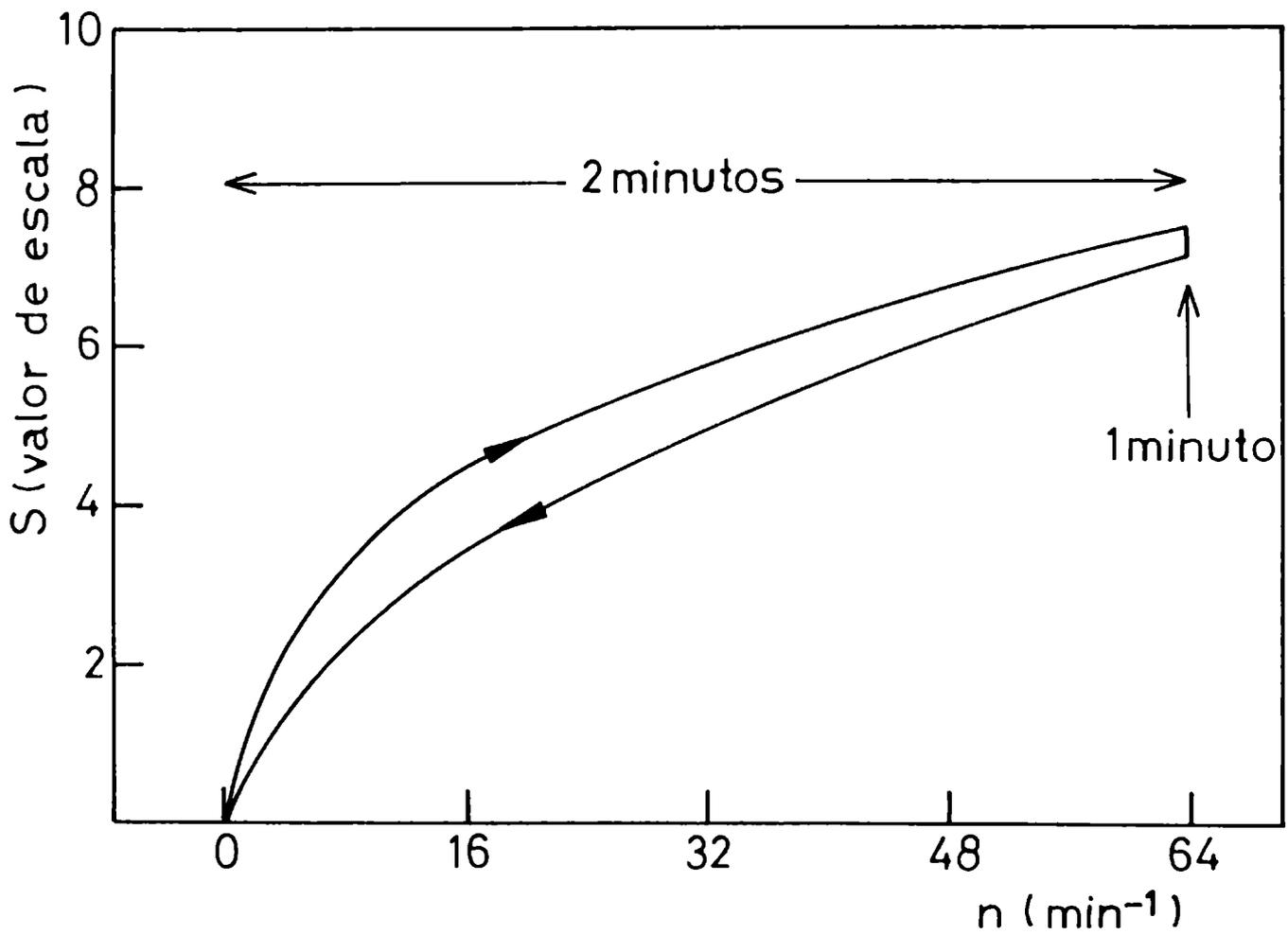


Figura 13: Curva de flujo obtenida con miofibrillas de músculos fresco y congelado, suspendidas en solución 0.6M KCl, 0.03M Tris-HCl, pH 7.6. Concentración de miofibrillas: 10-12 mg/ml. S: valor de escala proporcional a la tensión de empuje ( $\tau$ ), n: velocidad del rotor proporcional al gradiente de velocidad ( $D$ ).

constituyente de los filamentos gruesos, la más afectada por el proceso de congelación. Prueba de ello se tuvo en la caída de los valores de actividad ATPásica miofibrilar en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , lo cual indica una alteración en la zona de la cabeza globular de miosina (Figura 5). Los estudios por calorimetría diferencial de barrido también aportaron información al respecto; la disminución del área del primer pico en los termogramas DSC de músculo bovino congelado, implica un cambio estructural en el filamento grueso, a nivel de la cabeza de miosina (Figura 9 y Tabla 4). El mismo estudio mostró que la zona de la cola de miosina (segundo pico en el termograma DSC del músculo), no se altera durante la congelación, en tanto que el filamento fino, integrado por actina (en importancia, la segunda proteína muscular) y proteínas menores (tropomiosina, troponina y actinas), está levemente afectado (Figura 9 y Tabla 4). De manera que, prácticamente los mayores cambios recaen sobre la molécula de miosina.

Por otra parte, tanto los estudios por electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas miofibrilares (Figura 12) como las determinaciones de la actividad ATPásica miofibrilar en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (Figura 5) señalaron además que hay modificaciones en la interacción de miosina con actina. Esta pérdida de afinidad actina-miosina es una consecuencia de ambos efectos: el de la desnaturalización parcial de la cabeza de miosina, y en menor grado, la alteración de actina.

En base a los valores porcentuales de pérdida de actividad ATPásica con  $\text{Ca}^{2+}$  y con  $\text{Mg}^{2+}$  durante la congelación, se deduce una mayor resistencia a la desnaturalización de la miosina asociada a actina (complejo actomiosina) que la miosina libre. Este resultado está de acuerdo con lo informado por Matsumoto (1980) respecto a la congelación de soluciones de miosina y actomiosina de músculo de pescado, donde miosina era desnaturalizada más rápidamente. La disminución de la afinidad actina-miosina se puede interpretar también como que la congelación del músculo, produce la disociación parcial del complejo actomiosina en miosina y actina libres.

La desnaturalización de miosina no implica solamente la modifica-

ción de los sitios activos enzimático y de unión a actina, sino que involucra una zona extensa de la cabeza, que los incluye a ambos; ya que basándonos en la información proporcionada por los estudios calorimétricos, la pérdida de entalpía de desnaturalización térmica ( $\Delta H$  y área específica del pico I, Figuras 8 y 9 y Tabla 4), con la congelación, representaría la ruptura de un número elevado de uniones hidrógeno y/o formación de uniones del mismo tipo pero de menor energía, acompañado por una modificación en las interacciones hidrofóbicas y salinas. Esto sugiere que las partes globulares de las cadenas pesadas de miosina así como las cadenas livianas, ambas integrantes de la cabeza, se desnaturalizan por desplegamiento (unfolding) de la cadena polipeptídica, con exposición de grupos hidrofóbicos hacia el exterior, adquiriendo una estructura más desordenada capaz de formar agregados (Anglemier y Montgomery, 1976). Este desplegamiento puede ser resultado de un incremento local de la fuerza iónica en el interior de la fibra, como consecuencia de la congelación y por lo tanto, de la migración de agua desde los espacios miofibrilares hacia la zona de crecimiento del hielo, pudiéndose llegar a remover agua de hidratación de las proteínas miofibrilares (Taborsky, 1978; Shenouda, 1980). Además, si el incremento de la fuerza iónica en la solución que rodea a las miofibrillas, es suficientemente elevado, podría producirse la disociación de las cadenas pesadas y livianas de miosina (Gershman y Dreizen, 1970).

Aunque los resultados presentados constituyen una evidencia de la desnaturalización proteica con la congelación del músculo, esta desnaturalización no provocó cambios significativos en la solubilidad de las proteínas miofibrilares, como tampoco en la viscosidad y comportamiento reológico de las miofibrillas en solución. En primer lugar, la constancia en los valores de solubilidad miofibrilar, significa que el corto período de tiempo durante el cual se desarrolla la congelación-descongelación, resulta insuficiente para permitir la agregación entre moléculas de proteínas desnaturalizadas, ya que no se observa la formación de agregados insolubles o por lo menos,

que si se llegan a formar agregados, estos conservan las mismas propiedades de solubilidad que las proteínas nativas. Esta última posibilidad queda descartada, pues de haber cambios en la forma y tamaño molecular (lo que ocurriría con la formación de agregados aún solubles) se verían alterados al menos la viscosidad o el comportamiento de flujo de las miofibrillas en solución (pseudoplasticidad y tixotropía) (Figura 13 y Tabla 7). La constancia de estos parámetros después de la congelación, indica no sólo la ausencia de agregación sino además, que los cambios estructurales en miosina y actina no conducen a variaciones importantes en su volumen hidrodinámico.

Sin embargo, sí se observaron cambios en la hidratación de las miofibrillas, principalmente con la congelación lenta, en la que se produjo una significativa disminución de la capacidad de absorción de agua de las miofibrillas suspendidas en agua (Tabla 7). Este hecho puede vincularse a dos efectos: a) modificación de la capacidad de absorción de agua de las proteínas por si mismas y/o b) variación de la cantidad de agua retenida en el interior de los filamentos gruesos y finos por alteración de las interacciones proteína-proteína. Del estudio DSC, surgió la conclusión de que la zona fibrosa de miosina, no era modificada por la congelación. Sabemos además que es a través de esas zonas por donde interactúan lateralmente las cadenas pesadas de miosina para formar los filamentos gruesos (Harrington y Rodgers, 1984). Es de esperar entonces que no hayan cambios en la interacción miosina-miosina y que en consecuencia, la cantidad de agua ocluída dentro de los filamentos gruesos tampoco se vea alterada. De esta manera, la variación observada en la hidratación de las miofibrillas, tiene su origen en la menor capacidad de captación de agua de las cabezas desnaturalizadas de miosina y en la alteración de la interacción actina-miosina. Estos resultados son coincidentes con el aumento de exudado del músculo congelado-descongelado, en especial cuando las velocidades de congelación son intermedia y lenta (Añón y Calvelo, 1980; Calvelo, 1981).

El efecto de la velocidad de congelación se reflejó también en los valores de actividad ATPásica y entalpía de desnaturalización térmica, viendo

en ambos parámetros una mayor disminución cuanto menor es la velocidad de congelación (Figura 5 y 8). La congelación lenta resultó ser entonces la que más afecta las propiedades nativas de las proteínas del músculo fresco. Los cambios operados en las proteínas miofibrilares durante la congelación rápida, aunque significativas en algunos casos, no llegan a influir sobre la capacidad de hidratación del músculo, lo que concuerda con la menor exudación observada en músculos congelados rápidamente (Añón y Calvelo, 1980).

Si bien observamos que la velocidad de congelación del músculo influye sobre el grado de desnaturalización de las proteínas miofibrilares, no sabemos aún el origen de esta diferencia. Los cambios en la fase acuosa durante la congelación del músculo, modificarían el ambiente que rodea a las miofibrillas, induciendo a la desnaturalización de sus componentes proteicos. Según Shenouda (1980), las causas de estos cambios pueden ser clasificadas principalmente en tres tipos: a) formación y crecimiento del hielo, b) deshidratación y c) incremento de la concentración salina. De modo que cualquier factor que influya sobre estos tres fenómenos, afectará a su vez a la desnaturalización proteica. Love (1966, 1968) informó que la localización y tamaño de los cristales de hielo en músculo de pescado estaban regidos fundamentalmente por la velocidad de congelación. Más recientemente, Bevilacqua et al (1979), investigando sobre la congelación de músculo bovino semitendinoso, encontraron que se podían definir según sus tiempos característicos ( $t_c$ ) de congelación, tres velocidades de congelación con morfologías del hielo marcadamente diferentes: congelación rápida, intermedia y lenta (clasificación seguida en este trabajo de tesis). Con  $t_c$  mayores a 30 minutos (congelación lenta), los cortes histológicos de tejido muscular congelado, revelaron la existencia de hielo extracelular exclusivamente, en forma de grandes cristales. Con  $t_c$  menores de 5 minutos (congelación rápida) se suma la producción de hielo intracelular simultáneamente con la congelación del líquido extracelular. A diferencia de la congelación lenta, los cristales de hielo son pequeños y su número mayor. La congelación intermedia ( $t_c \approx 20$  minutos) es comparable a

la rápida en que hay tanto hielo extra como intracelular, con la diferencia que en el interior de la fibra se forma un único cristal de gran tamaño.

La formación de hielo extracelular procede a través de un mecanismo de congelación de agua, completamente diferente al hielo intracelular. El crecimiento de los cristales en el espacio extracelular requiere de fluído intracelular con lo cual hay deshidratación parcial de la fibra muscular por migración de agua desde su interior (Bevilacqua et al, 1979). Esto se debe a que la mayoría del agua en el tejido muscular se encuentra en el interior de la fibra, en los espacios entre filamentos finos y gruesos (las miofibrillas ocupan el 70% del volumen del músculo y están compuestas aproximadamente por un 80% de agua) (Offer y Trinick, 1983).

Estas diferencias entre congelación rápida, intermedia y lenta, respecto a la morfología del hielo, conducen simultáneamente a cambios en los fenómenos de deshidratación y de aumento de fuerza iónica dentro de la fibra. La formación de hielo a partir de fluído extra e intracelular, provoca un aumento de la concentración salina en la fracción de agua no congelada. En músculos congelados a diferentes velocidades pero hasta la misma temperatura final (en nuestro caso,  $-25^{\circ}\text{C}$ ), la cantidad total de sales liberadas es la misma, dependiendo su distribución del tamaño, número y ubicación de cristales de hielo formados. En tanto que en las congelaciones lenta e intermedia hay zonas de alta fuerza iónica, en la congelación rápida los componentes salinos estarían más uniformemente distribuídos. Además, hay otro factor que suponemos juega un rol importante en las diferencias atribuídas a la velocidad de congelación: el tiempo total de congelación. A medida que la congelación es más lenta, el tiempo necesario para llevar al músculo a la temperatura final prefijada, es mayor; siendo también mayor la difusión de sales desde las zonas de alta fuerza iónica (cercanas al hielo formado), hacia las zonas de baja fuerza iónica (ocupadas por las miofibrillas). De este modo, la congelación rápida, al completarse en corto tiempo, presentaría un efecto menor por aumento de concentración salina.

DESNATURALIZACION DE PROTEINAS  
EN MUSCULO BOVINO:  
EFECTO DE LAS CONDICIONES  
DE ALMACENAMIENTO

#### 4. DESNATURALIZACION DE PROTEINAS EN MUSCULO BOVINO:

##### EFFECTO DE LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Hasta ahora hemos estudiado los cambios ocurridos en las proteínas del tejido muscular, como resultado de la congelación y el papel que juegan las distintas velocidades de congelación aplicadas. Esta parte del trabajo, consiste en un análisis del efecto del tiempo de almacenamiento del músculo bovino en estado congelado a distintas temperaturas sub-cero, sobre el deterioro proteico y su interrelación con la velocidad de congelación del músculo, previa a su almacenamiento. Para ello, se estudiaron parámetros indicativos de la desnaturalización de proteínas, sobre muestras de músculo bovino semitendinoso congeladas a velocidad rápida y lenta, y posteriormente almacenadas hasta un máximo de 47 semanas a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ .

##### 4.1 Estado de conservación de las muestras durante el período de almacenamiento

Según se explicó en Materiales y Métodos (ver inc. 2.4.), se controló periódicamente el estado de conservación de las rodajas de carne almacenadas en estado congelado, registrando la variación del pH con el tiempo de almacenamiento a las distintas temperaturas.

En la Tabla 8 podemos ver que del valor inicial de pH en el músculo fresco ( $\text{pH}: 5.60 \pm 0.15$ ), hay tan solo una ligera oscilación que no supera las 0.20 unidades ( $\text{pH}$  máximo alcanzado = 5.80). La poca variabilidad del pH es un buen indicio, de que durante el prolongado período de almacenamiento, aún a temperaturas no tan bajas como  $-5^{\circ}\text{C}$ , el estado congelado controla adecuadamente los procesos de descomposición. Un avanzado desarrollo microbiano y/o la existencia de hidrólisis proteica en las muestras congeladas, estarían acompañadas por una marcada modificación del pH.

Paralelamente, con el único objeto de estimar aproximadamente el

Tabla 8: Efecto de la congelación y el almacenamiento a -5°C, -10°C y -20°C, sobre el pH del músculo semitendinoso bovino.

tiempos de almacenamiento (semanas)	pH		
	-20 °C	-10 °C	-5 °C
0	(R) 5.62 <sub>±</sub> 0.12	5.62 <sub>±</sub> 0.12	5.62 <sub>±</sub> 0.12
	(L) 5.68 <sub>±</sub> 0.08	5.68 <sub>±</sub> 0.08	5.68 <sub>±</sub> 0.08
6	(R) 5.63 <sub>±</sub> 0.10	5.65 <sub>±</sub> 0.06	5.70 <sub>±</sub> 0.02
	(L) 5.67 <sub>±</sub> 0.06	5.69 <sub>±</sub> 0.11	5.67 <sub>±</sub> 0.05
13	(R) 5.65 <sub>±</sub> 0.08	5.73 <sub>±</sub> 0.10	5.75 <sub>±</sub> 0.00
	(L) 5.70 <sub>±</sub> 0.07	5.75 <sub>±</sub> 0.10	5.75 <sub>±</sub> 0.03
20	(R) 5.72 <sub>±</sub> 0.07	5.75 <sub>±</sub> 0.14	5.76 <sub>±</sub> 0.01
	(L) 5.69 <sub>±</sub> 0.12	5.71 <sub>±</sub> 0.04	5.76 <sub>±</sub> 0.03
27	(R) 5.72 <sub>±</sub> 0.11	5.80 <sub>±</sub> 0.05	5.71 <sub>±</sub> 0.05
	(L) 5.66 <sub>±</sub> 0.16	5.78 <sub>±</sub> 0.05	5.68 <sub>±</sub> 0.11
38	(R) 5.74 <sub>±</sub> 0.07	5.78 <sub>±</sub> 0.08	5.75 <sub>±</sub> 0.10
	(L) 5.70 <sub>±</sub> 0.07	5.75 <sub>±</sub> 0.09	5.80 <sub>±</sub> 0.08

Cada valor es la media resultante de un mínimo de seis mediciones ( $\bar{X}$  <sub>±</sub> desviación standard). (R): congelación rápida; (L): congelación lenta.

número de microorganismos viables en las muestras, en relación al tiempo y temperatura de almacenamiento, se realizó un recuento en placa (utilizando el medio Plate Count Agar) del número de bacterias aeróbicas mesófilas (incubación a 32°C durante 48 hs) y del número de bacterias psicrófilas (incubación a 4°C durante 1 semana).

En la Tabla 9 se presentan los valores de dichos recuentos expresados como UFC/g (unidades formadoras de colonias/gramo de muestra de carne).

Tabla 9: Recuentos de bacterias mesófilas y psicrófilas, en rodajas de músculo bovino almacenadas durante 19 semanas a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Temperatura de almacenamiento	Bacterias mesófilas	Bacterias Psicrófilas
$-20^{\circ}\text{C}$	$2.3 \times 10^5$ UFC/g	$3.8 \times 10^3$ UFC/g
$-10^{\circ}\text{C}$	$9.7 \times 10^5$ UFC/g	$1.3 \times 10^5$ UFC/g
$-5^{\circ}\text{C}$	$8.4 \times 10^6$ UFC/g	$1.8 \times 10^5$ UFC/g

UFC/g = Unidades formadoras de colonias/g de muestra. (Datos aportados por la Lic. L. Giannuzzi, becaria del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos).

El ensayo se realizó sobre rodajas almacenadas durante 19 semanas a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-5^{\circ}\text{C}$ .

Aunque se registró un mayor número de bacterias viables a mayor temperatura, no se superó en ningún caso el valor  $10^8$ /g establecido como límite para el tiempo de vida útil de muestras de carne almacenadas en películas plásticas de polietileno (Ayres, 1960; Gill, 1982).

Este ensayo se realizó, ya que si bien el pH está poco alterado, se observaron en cambio notables modificaciones en el color superficial del músculo, principalmente a las temperaturas  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ . Se quería saber entonces si esos cambios eran atribuibles a desarrollo microbiano o únicamente a la alteración de los pigmentos de la carne por difusión superficial del oxígeno a través de la película permeable de polietileno (Bevilacqua y Zaritzky, 1986). Un análisis del tenor de metamioglobina, pigmento de color marrón resultante de la oxidación de la mioglobina arrojó los siguientes porcentajes a 21 semanas de almacenamiento:  $-20^{\circ}\text{C}$ : 20%,  $-10^{\circ}\text{C}$ : 40%,  $-5^{\circ}\text{C}$ : 45% (Datos aportados por la Ing. Bevilacqua, investigador del Centro de Investigación

y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos). Estos resultados indican que, excepto por el color de las muestras, en base a los valores de pH y al número de bacterias viables, el estado de conservación de las rodajas de músculo durante el almacenamiento congelado, es aceptable. También se realizó un control del contenido de humedad de las muestras almacenadas, registrándose un valor constante ( $\% H = 75.5 \pm 0.9$ ), lo cuál asegura que en las condiciones de almacenamiento congelado utilizadas, no hubo deshidratación del tejido. Si hubiera deshidratación superficial, se estaría sumando una nueva fuente de variación y de posible desnaturalización proteica. Como medida de precaución, en la toma de muestra, se descartó el tejido superficial de las rodajas de carne. Por otra parte, respecto a la conservación del músculo bovino desde el punto de vista lipídico, según trabajos realizados en este laboratorio (Tomás y Funes, 1986) sobre muestras de músculo bovino semitendinoso almacenadas a  $-5^{\circ}\text{C}$ , durante un período de 18 semanas, no se detectaron aumentos en la producción de rancidez oxidativa debida a autoxidación lipídica.

#### 4.2 Modificaciones en la estructura de los filamentos gruesos y finos

Vimos anteriormente, que era posible evaluar los cambios ocurridos en las proteínas miofibrilares, por medio de las modificaciones operadas en sus transiciones térmicas. Por tal razón, se continuaron los estudios por calorimetría diferencial de barrido, con el fin de evaluar esta vez los efectos del almacenamiento congelado. Se estudiaron muestras de músculo congelado a velocidad rápida y lenta, y posteriormente almacenadas a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ . Previamente a las corridas DSC, las muestras de carne fueron tratadas con solución Ringer (ver inc. 2.13) con el objeto de dejarlas desprovistas de tejido conectivo y proteínas sarcoplásmicas; de manera que los picos de los termogramas, reflejaran únicamente las transiciones térmicas de las proteínas miofibrilares.

En la Figura 14 se muestran las diferencias entre termogramas de músculo fresco y de músculo almacenado a  $-5^{\circ}\text{C}$  durante 24 semanas. Las áreas de los picos I y II correspondientes al filamento grueso (miosina) así como

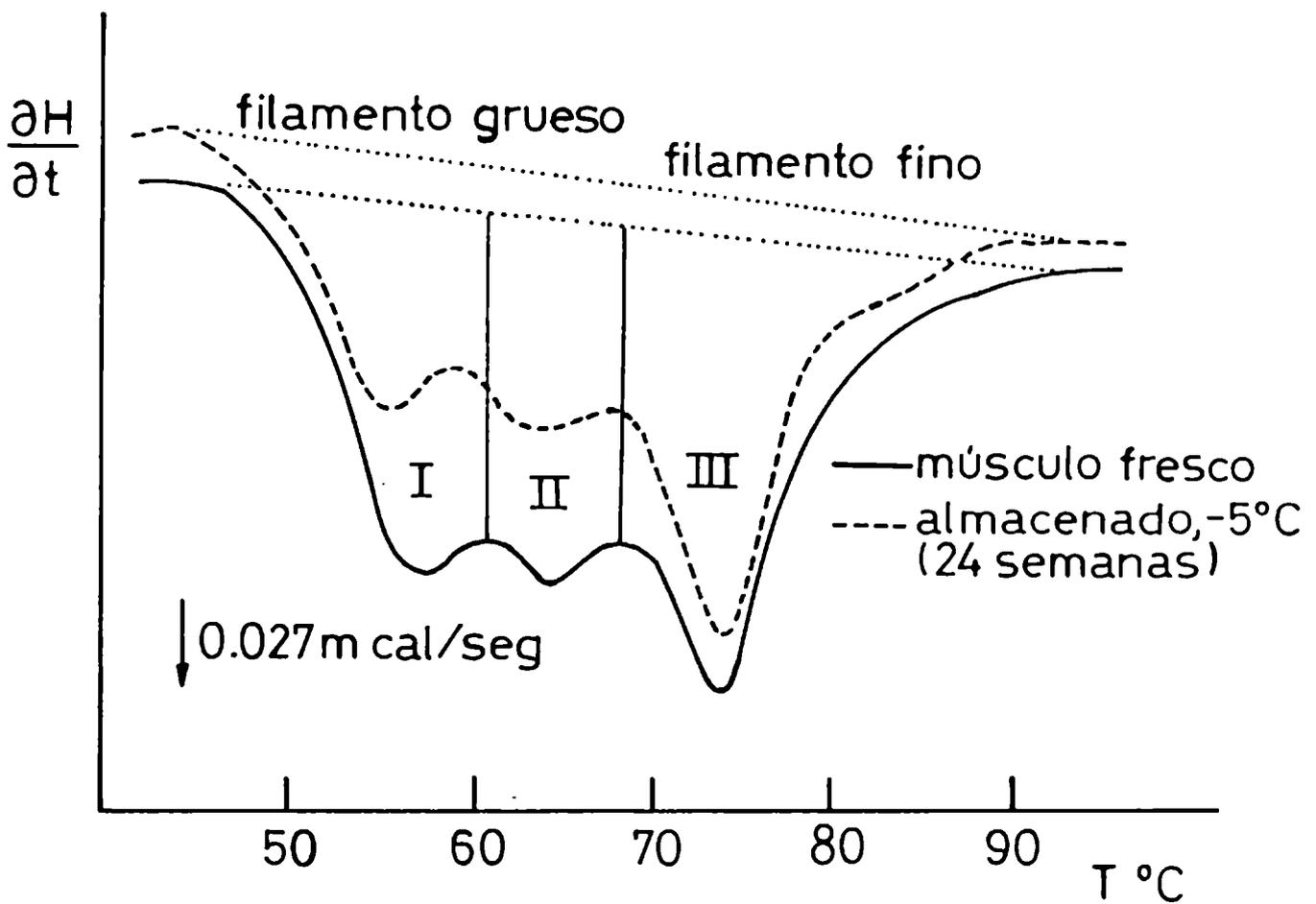


Figura 14: Termogramas DSC de músculo bovino fresco (—) y congelado-almacenado (-----), desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y conectivas y ajustado a pH 5.6.  $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ . P.S. = peso seco.

sus Tmax, son menores en el músculo congelado-almacenado que en el músculo fresco. El pico III, atribuido al filamento fino (actina y proteínas menores) mantiene prácticamente constantes el área y la temperatura Tmax.

Tabla 10: Valores Tmax de los picos I, II y III, correspondientes a los termogramas DSC de músculo bovino almacenado a -5°C, -10°C y -20°C.

Tiempos de almacenamiento (semanas)	Tmax (°C)									
	picos	-20°C			-10°C			-5°C		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	58.8	63.9	73.8	57.8	63.9	73.8	57.8	63.9	73.8	
7	57.2	64.5	74.4	57.3	63.7	73.7	56.3	64.0	74.3	
13	56.2	64.2	73.6	56.2	64.2	73.6	56.2	64.2	73.6	
18	56.3	63.5	74.2	55.7	63.1	73.8	55.4	63.1	74.8	
26	56.3	64.8	74.7	55.6	63.2	74.1	54.8	63.4	74.2	
38	55.4	64.6	74.4	54.4	63.2	74.1	54.2	63.2	74.2	

Son valores medios entre muestras de músculos congelados a velocidades rápida y lenta (máxima desviación standard: 0.9; número mínimo de ensayos: cuatro). Las corridas DSC se realizaron con muestras de músculo tratadas con solución Ringer a pH 5.6 y a una velocidad de barrido  $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ .

En la Tabla 10 se observa que las modificaciones de los valores Tmax de las transiciones térmicas de miosina, recaen fundamentalmente sobre el pico I. Siguiendo la variación de los Tmax con el tiempo, vemos la importancia de la temperatura de almacenamiento en la pérdida de estabilidad térmica; mientras que a -5°C y -10°C, a las 26 semanas, la disminución del Tmax del pico I es

3.0°C y 2.2°C respectivamente, a -20°C la diferencia se reduce a 1.5°C. La disminución de la temperatura de transición de la cabeza de miosina, implica un cambio estructural en esa zona, que la hace más sensible al calor. Según Privalov y Khechinashvili (1974) la temperatura de desnaturalización proteica está controlada principalmente por las interacciones hidrofóbicas no polares. Así, la disminución observada en el T<sub>max</sub> del pico I indica una variación del número de interacciones hidrofóbicas durante el almacenamiento congelado del músculo. Respecto a la transición térmica de la cola de miosina (pico II), los cambios en el T<sub>max</sub> no son importantes, ya que su conformación  $\alpha$ -hélice está establecida fundamentalmente por puentes hidrógeno intracatenarios, contribuyendo muy poco a su estructura las interacciones hidrofóbicas (Malher y Cordes, 1971).

A efectos de estudiar la influencia del tiempo y la temperatura de almacenamiento, se analizaron los termogramas obtenidos, dividiendo el área total de la endoterma, en áreas parciales correspondientes a cada transición (Figura 14). Así fue posible no sólo calcular la entalpía total,  $\Delta H$ , y ver sus cambios, sino también el de las áreas específicas de cada pico.

Se observó que los valores  $\Delta H$  de la endoterma total decrecen con el tiempo de almacenamiento congelado (Figura 15). Se puede ver en esta Figura el efecto combinado de la velocidad de congelación y del tiempo y la temperatura de almacenamiento. La velocidad de decrecimiento de la entalpía total con el tiempo, es visiblemente menor a -20°C, que a -5°C y -10°C, principalmente en las primeras semanas de almacenamiento.

Las áreas específicas de los picos I y II; también decrecen como consecuencia del almacenamiento congelado, mientras que el pico III se mantiene prácticamente constante (Figura 16a y b). Es decir que la cola de miosina, no afectada por la congelación (Tabla 4), recién comienza a sufrir alteraciones con el proceso de almacenamiento. Una información adicional de suma importancia, se obtiene al observar el diferente comportamiento del músculo almacenado, según haya sido congelado rápida o lentamente. La Figura 16a muestra para la congelación rápida, que la zona de la cabeza (pico I) afectada

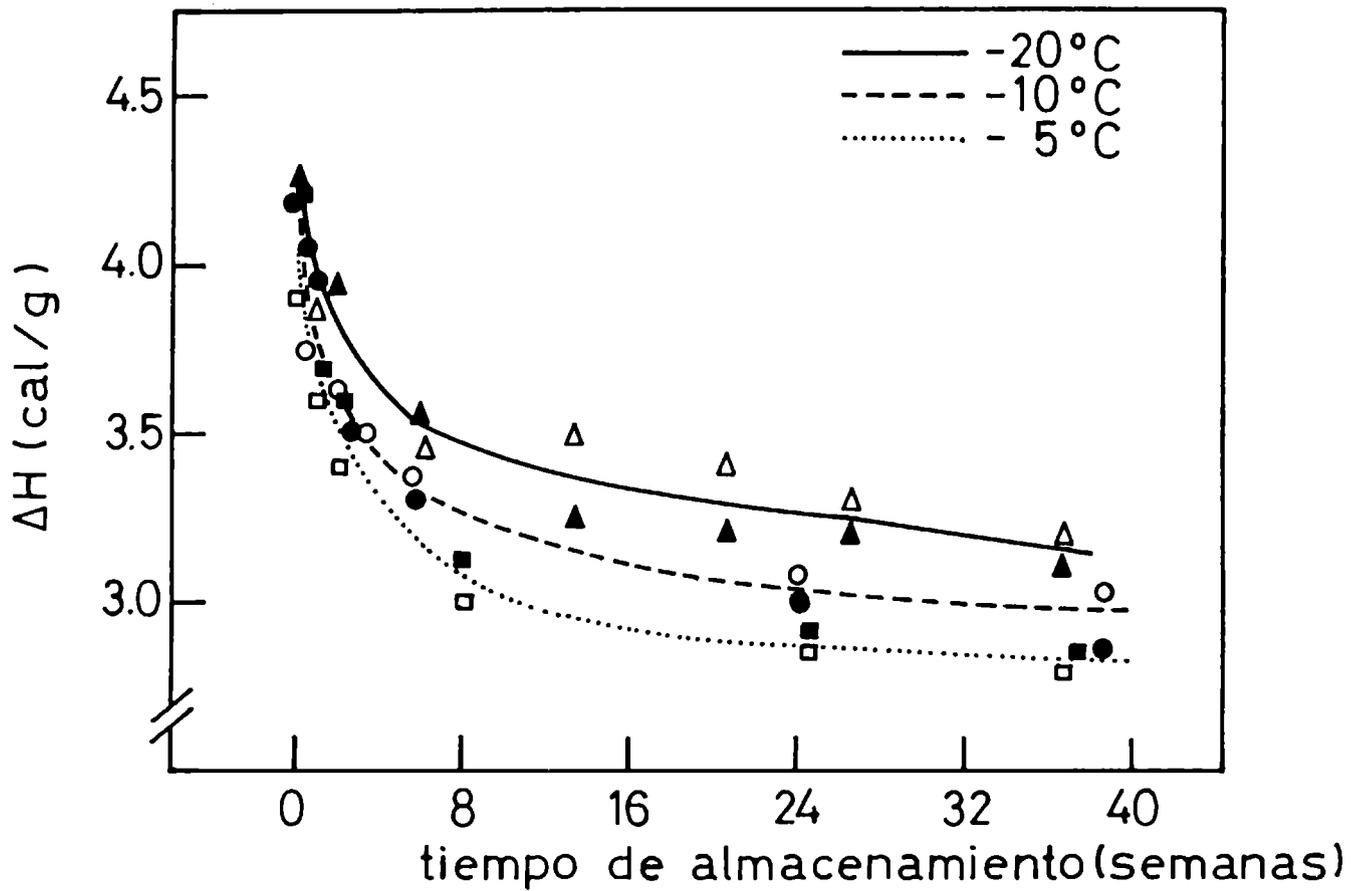


Figura 15: Efecto del almacenamiento congelado sobre la entalpía de desnaturación térmica de las proteínas miofibrilares.

Muestras empleadas: músculos congelados a velocidad rápida ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ,  $\blacksquare$ ) y lenta ( $\triangle$ ,  $\circ$ ,  $\square$ ); y posteriormente almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $\blacktriangle$ — $\triangle$ ), y  $-10^{\circ}\text{C}$  ( $\bullet$ --- $\circ$ ) y  $-5^{\circ}\text{C}$  ( $\blacksquare$ ..... $\square$ ). Cada valor es un promedio de cuatro ensayos como mínimo (máxima desviación standard: 0.2).

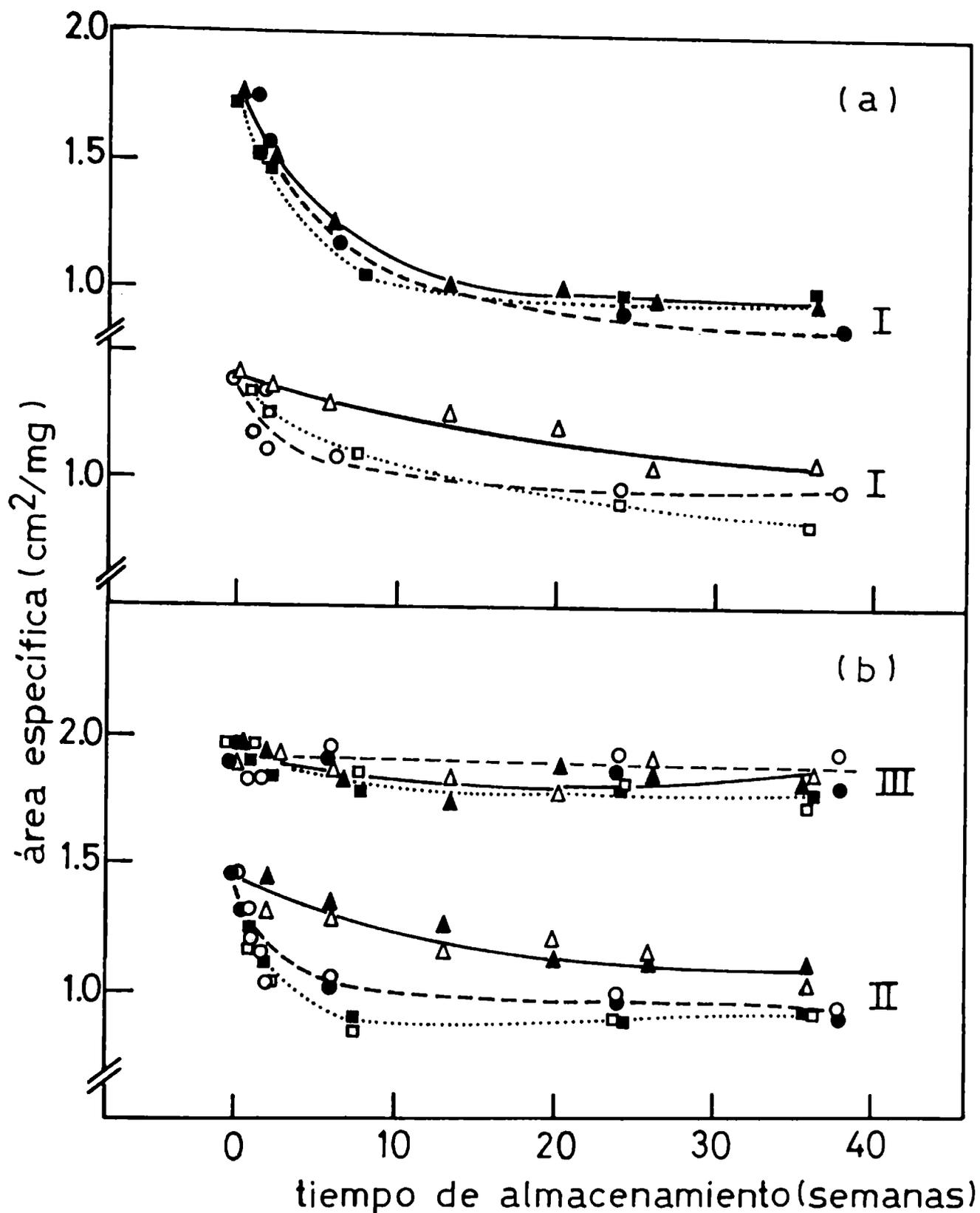


Figura 16: Efecto del almacenamiento congelado sobre las áreas específicas de los picos I, II y III, correspondientes a las endotermas DSC de músculo bovino congelado-almacenado.

(▲, ●, ■) y (Δ, ○, □): músculos congelados a velocidad rápida y lenta, respectivamente; y luego almacenados a -20°C (—), (- - -) y -5°C (.....).

(Máxima desviación standard: 0.2).

tan sólo ligeramente por el proceso de congelación (Tabla 4 y Figura 9), se desnaturaliza rápidamente con el almacenamiento, independientemente de la temperatura. Por otro lado, la misma Figura muestra que la cabeza de miosina, modificada ya en buena parte por la congelación lenta (Tabla 4 y Figura 9) se desnaturaliza lentamente con el almacenamiento, lo cual se refleja en una caída menos brusca de su área específica. A diferencia de la congelación rápida, para el músculo congelado lentamente, la velocidad de desnaturalización de la cabeza de miosina en el almacenamiento, es dependiente de la temperatura. Así, cuanto menor es la temperatura ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), menor es la velocidad de desnaturalización del subfragmento HMM-S1.

Respecto a la zona de la cola de miosina, vemos en la Figura 16b que su velocidad de desnaturalización también es menor a menor temperatura de almacenamiento, no encontrando diferencias entre las velocidades de congelación empleadas. El pico III, a diferencia del resto del termograma, mantiene prácticamente constante su área específica durante todo el período de almacenamiento; ésto nos sugiere que desde el punto de vista termodinámico no hay cambios importantes en la estructura de la actina y de las proteínas menores.

De las Figuras 15 y 16 a,b es posible obtener información adicional si se presta atención a los siguientes puntos: a) la congelación y el almacenamiento conducen siempre a valores menores de  $\Delta H$  y áreas específicas, b) la caída de estos parámetros es rápida en un primer período del almacenamiento (aproximadamente 10 semanas), luego del cual siguen disminuyendo lentamente hasta alcanzar un valor mínimo, y c) el área específica del pico I, en el músculo congelado rápido disminuye más bruscamente con el almacenamiento, que la correspondiente al congelado lento. Para analizar el punto a) debemos tener en cuenta los cambios estructurales que se producen en una molécula de proteína al ser desnaturalizada. Es sabido que la desnaturalización implica un desplegamiento de la cadena polipeptídica, con ruptura de uniones hidrógeno y exposición de grupos hidrofóbicos (para proteínas globulares) (Anglemier y Montgomery, 1976). De esta manera, la molécula de proteína, total o parcialmente desnaturalizada, involucra en su estructura un número menor de uniones

hidrógeno y una mayor probabilidad de interacción con otras proteínas, a través de grupos hidrofóbicos. Ahora bien, debido a que los cambios entálpicos están asociados con los cambios estructurales ocasionados por desenrollamiento de la molécula proteica (Delben y Crescenzi, 1969; Delben et al, 1969); si ésta se encuentra previamente desnaturalizada (por ejemplo, por efecto de la congelación o el almacenamiento) es de esperar valores entálpicos menores a los de la proteína nativa. En base a trabajos realizados por Privalov y Khechinashvili (1974) y Evans et al. (1979), la entalpía de las transiciones térmicas de una proteína es una combinación de un término endotérmico, tal como la reacción de ruptura de puentes hidrógeno y un término exotérmico, debido a la agregación de proteínas y a la ruptura de interacciones hidrofóbicas. Otra manera generalmente aceptada, es la de desglosar la entalpía  $\Delta H$  en dos términos:  $\Delta H_d$ , entalpía de desnaturalización (que incluiría la ruptura de puentes hidrógenos e interacciones hidrofóbicas) y  $\Delta H_a$ , entalpía de agregación de proteínas.

La naturaleza endotérmica de los termogramas de músculo bovino (y de cada una de sus proteínas constitutivas) significa que en sus transiciones térmicas hay una mayor contribución del término endotérmico (ruptura de un número elevado de uniones hidrógeno). El hecho de que las muestras congeladas y almacenadas de músculo, tengan valores menores de  $\Delta H$  y de áreas específicas (punto a), puede significar un decrecimiento del término endotérmico (ruptura de uniones hidrógeno) y/o un aumento del exotérmico (ruptura de interacciones hidrofóbicas y reacciones de agregación) durante las transiciones térmicas de las proteínas miofibrilares. Quiere decir que tanto la congelación como el almacenamiento provocan una alteración de la cabeza y la cola de la molécula de miosina, que lleva a un número menor de uniones hidrógeno en su estructura y/o a un aumento de las interacciones hidrofóbicas intercatenarias, a lo cual se suma una mayor probabilidad de agregación. Respecto al punto b), referido a la rápida caída de los valores entálpicos en las primeras semanas de almacenamiento, es comprensible, pues todos los cambios estructurales durante esa primera etapa se suman para dar un mismo efecto. Con el transcurso del tiempo,

la velocidad de desnaturalización es cada vez menor, ya que las posibilidades de cambio en el número de uniones hidrógeno e interacciones hidrofóbicas se van reduciendo, por un lado, porque es menor el número de proteínas en estado nativo y por otro, debido a que el aumento de interacciones hidrofóbicas conduce a la agregación. Con la formación de agregados (solubles e insolubles) se estabiliza la estructura proteica, reduciéndose a un mínimo la velocidad de desnaturalización y la contribución a la entalpía del término de agregación. Esto explica el porqué se tiende a un valor mínimo y casi constante de  $\Delta H$  y áreas específicas, justamente en el período de almacenamiento donde comienza a haber insolubilización (ver inc. 4.4).

Las diferencias entre congelado rápido y lento, respecto a la velocidad de disminución del área específica del pico I con el almacenamiento (punto c) (Figura 16a y b) se debe entonces al mayor grado de desnaturalización de la cabeza de miosina en el músculo congelado a velocidad lenta; de manera que su almacenamiento se inicia con parte de su estructura proteica modificada principalmente por ruptura de puentes hidrógeno. Se vió que los cambios en las interacciones hidrofóbicas de la cabeza son más importantes en el almacenamiento, lo que lleva a una disminución del  $T_{max}$  del pico I (Tabla 10), pues son las interacciones hidrofóbicas las que gobiernan la temperatura de desnaturalización (Privalov y Khechinashvili, 1974)

#### 4.3 Cambios en la miosina y en la interacción actina - miosina

Según vimos, la sola congelación del músculo, provoca una importante pérdida de actividad ATPásica miofibrilar, lo cual fue interpretado como la desnaturalización parcial de las proteínas miofibrilares, específicamente de miosina. Coincidentemente, en los termogramas DSC de músculo congelado, se observó la disminución del pico I, que está asociado a la cabeza de miosina, portadora del sitio activo de la enzima ATPasa. Habiéndose encontrado que el pico I también disminuye durante el almacenamiento (Figura 16a, b), era de esperar cambios similares en la actividad ATPásica.

Se estudió entonces el efecto combinado tiempo-temperatura de alma

cenamiento y velocidad de congelación sobre la actividad ATPásica miofibrilar.

La Figura 17 muestra la variación de la actividad ATPásica con el tiempo de almacenamiento a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ , para músculo congelado a velocidades rápida y lenta. Los valores de actividad ATPásica miofibrilar, expresados como un porcentaje de la actividad de las miofibrillas aisladas de músculo fresco, se graficaron agrupándolos por velocidad de congelación y activador utilizado.

En la Figura 17a, b se puede ver que después de la congelación rápida, en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , los niveles de actividad decrecen rápidamente con el tiempo de almacenamiento, a mayor velocidad cuanto mayor es la temperatura. A diferencia de la congelación rápida, en las miofibrillas aisladas de músculo congelado lentamente (Figura 17c, d), la mayor pérdida de actividad tiene lugar durante el proceso de congelación (Figura 5). La Figura 17c muestra que la actividad ATPásica en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  como activador, decrece ligeramente durante el almacenamiento a  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ ; en cambio a  $-20^{\circ}\text{C}$  hay una leve recuperación de actividad hasta las cuatro semanas, luego de lo cual declina lentamente. En presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (Figura 17d), a las tres temperaturas de almacenamiento, hay un período inicial de incremento de actividad ATPásica con el tiempo, que a  $-20^{\circ}\text{C}$  alcanza las 13 semanas.

Investigaciones realizadas por otros autores sobre músculos provenientes de diferentes especies animales, dieron resultados coincidentes. Connell (1960) informó que hay pérdidas de actividad ATPásica miofibrilar durante el almacenamiento congelado de músculo de bacalao. Resultados similares fueron informados por Matsumoto (1979, 1980) para una amplia variedad de pescados. Por su parte, Yamamoto et al. (1977) y más recientemente, Kang et al. (1983), empleando respectivamente músculos de pollo y de conejo, observaron que durante el almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , la actividad ATPásica experimenta un incremento inicial, para luego caer lentamente.

En la Figura 17, además de observarse la influencia de la temperatura de almacenamiento (a menor temperatura, menor velocidad de desnaturalización), se puede ver el efecto importante que ejerce la velocidad de congela

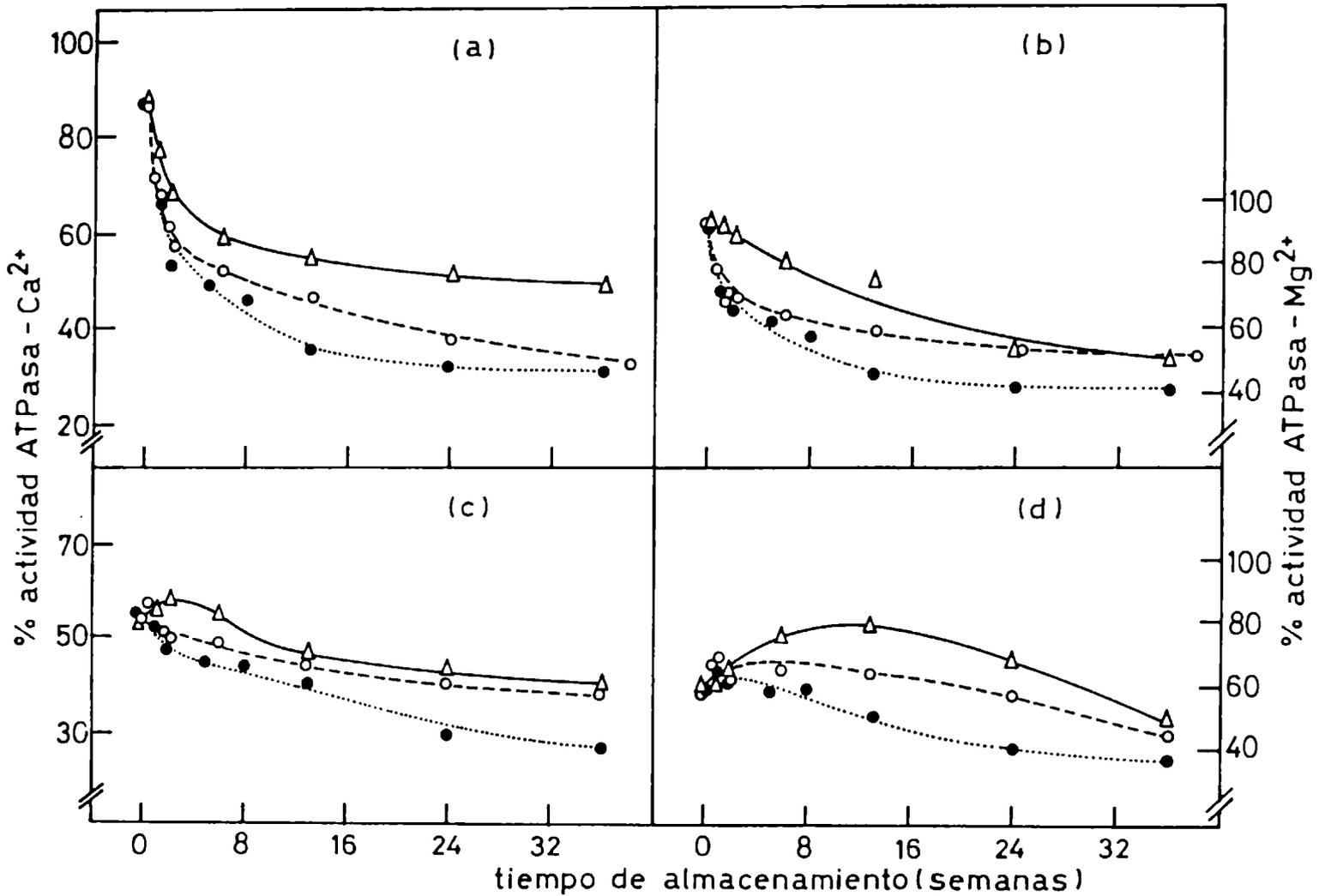


Figura 17: Efecto del almacenamiento congelado del músculo bovino sobre el porcentaje de actividad ATPásica miofibrilar (respecto al valor en miofibrillas aisladas de músculo fresco, tomado como 100%).  
 (a), (b): músculo congelado a velocidad rápida  
 (c), (d): músculo congelado a velocidad lenta  
 (a), (c): activador Ca<sup>2+</sup>  
 (b), (d): activador Mg<sup>2+</sup>  
 (Δ—Δ), -20°C; (○----○), -10°C; (●.....●), -5°C. Cada valor es la media de un número mínimo de cuatro determinaciones (máxima desviación standard: 7.5).

ción.

Una posible explicación al diferente comportamiento del músculo al macenado, según haya sido congelado rápida o lentamente, podría encontrarse en la distinta morfología y distribución de los cristales de hielo formados durante la congelación. Como se ha visto previamente, la congelación rápida conduce a la formación de pequeños cristales en el interior de la fibra (además del hielo extracelular); en cambio en la congelación lenta hay únicamente formación de grandes cristales extracelulares (Bevilacqua et al., 1979). Sería de esperar entonces que músculos congelados con diferencias morfológicas del hielo tan marcadas, respondan de manera diferente durante el almacenamiento.

Unos de los fenómenos que juegan un papel importante en el almacenamiento congelado, son la fusión y la recristalización del hielo dentro del tejido muscular. Con un almacenamiento a temperaturas superiores a la alcanzada en la congelación, hay fusión parcial del hielo formado, acompañada por recristalización, o sea crecimiento de los cristales de mayor tamaño a expensas de los más pequeños (Brook, 1976; Martino y Zaritzky, 1986). A  $-25^{\circ}\text{C}$  el porcentaje de agua congelada en el tejido muscular es de aproximadamente 90%, en tanto que a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  es del 74%, 83% y 88% respectivamente (Mascheroni y Calvelo, 1978). De esto resulta que el porcentaje de hielo fundido cuando se transfiere al músculo de  $-25^{\circ}\text{C}$  (temperatura final de congelación) a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$   $-20^{\circ}\text{C}$  (temperatura de almacenamiento), es de 16%, 7% y 2% respectivamente. Este fenómeno, junto con el efecto mismo de la temperatura, hace que el almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  sea menos nocivo para las proteínas musculares que a  $-5^{\circ}\text{C}$  o  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Sin embargo, esta explicación no da cuenta de las diferencias manifestadas entre músculo congelado rápido y lento durante el almacenamiento, ya que el porcentaje de hielo formado depende enteramente de la temperatura alcanzada en la congelación y no de la velocidad (Riedel, 1957). Entonces, las diferencias podrían estar en el mecanismo y localización de la recristalización. Después de la congelación lenta del músculo, tiene lugar la recristalización del hielo durante el almacenamiento, sólomente donde éste se encuentra, o sea

en el espacio extracelular; en cambio para la congelación rápida, puede haber además recristalización intracelular (Bevilacqua y Zaritzky, 1982), que conduciría a la formación de cristales de hielo de mayor tamaño dentro de la fibra, ocasionando simultáneamente: distorsión de la morfología celular, disminución del espacio ocupado por las miofibrillas y aparición de zonas de alta concentración salina. Pueden sumarse además, las alteraciones asociadas con aspectos dinámicos de la congelación; los fenómenos que ocurren en y cerca de la interfase agua-hielo (efecto de interfase, aún poco estudiado) pueden ejercer una acción importante sobre los cambios estructurales de las proteínas (Taborsky, 1978). La diferente localización y mecanismo de la recristalización del hielo, podría ser la causa del mayor deterioro por almacenamiento a  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ , observado en los músculos congelados rápidamente (como se podrá ver en las propiedades de solubilidad proteica mostradas más adelante, inc. 4.4).

Una posibilidad no descartable es que al exponer un músculo congelado a velocidad rápida (con temperatura final,  $-25^{\circ}\text{C}$ ) a una temperatura más alta (por ejemplo  $-5^{\circ}\text{C}$ ) se funda la totalidad de los microcristales intracelulares y por lo tanto no haya recristalización intracelular, sino sólo extracelular. De ocurrir esto último, habría que pensar en otras causas que expliquen el mayor deterioro del músculo congelado rápido y almacenado a  $-5^{\circ}\text{C}$  o  $-10^{\circ}\text{C}$ . Se prevee realizar en este laboratorio, nuevas experiencias tendientes a explicar las diferencias observadas entre las diferentes velocidades de congelación.

El decrecimiento de la actividad ATPásica miofibrilar con  $\text{Ca}^{2+}$ , indica que la alteración de la cabeza de miosina, más específicamente del sitio activo de la enzima, iniciada con la congelación, continúa en el proceso de almacenamiento (Figura 17a, c). En presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , el incremento o la disminución de la actividad ATPásica con el tiempo de almacenamiento es atribuido respectivamente, al aumento o disminución de la actividad en la interacción actina-miosina, lo cual también sugiere cambios en la zona de la cabeza de miosina, donde reside el sitio de unión con actina (Figura 17b, d).

Según muestra la Figura 17b, durante el almacenamiento de un músculo congelado rápido, la afinidad miosina-actina disminuye constantemente con el

tiempo, mientras que según se puede ver en la Figura 17d, en el músculo congelado lento, se recupera parte de la afinidad miosina-actina perdida por efecto de la congelación; fenómeno que se manifiesta en forma pronunciada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En refuerzo a estas observaciones se realizó un estudio por electroforesis en geles de poliacrilamida, sobre las proteínas miofibrilares de músculo almacenado, con el objeto de analizar no sólo los cambios en la interacción actina-miosina, sino también la posible degradación y/o formación de agregados y los tipos de uniones involucradas.

Se estudiaron las miofibrillas aisladas de músculo congelado (rápido y lento) y almacenado a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ , por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida 10%, después de haber sido tratadas las muestras con SDS o con SDS+ME. Sobre los densitogramas de los geles obtenidos, se midieron las áreas de los picos correspondientes a la cadena pesada de miosina (MHC) y a la actina (A). La Figura 18a, b y c muestra los porcentajes de variación de MHC respecto al área total del densitograma para distintos períodos de almacenamiento. Entre 4 y 13 semanas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figura 18a) hay un aumento de la diferencia entre las áreas de MHC con y sin ME, para ambas velocidades de congelación; que puede atribuirse principalmente a un incremento de la interacción entre actina y miosina (sin descartar un posible aumento de las interacciones miosina-miosina). A las 26 semanas, la afinidad actina-miosina ya comienza a disminuir, llegando a las 47 semanas, donde la pérdida de interacción es total. Los efectos del almacenamiento a  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-5^{\circ}\text{C}$  sobre esta propiedad, son significativamente diferentes a lo observado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A las 13 semanas a  $-10^{\circ}\text{C}$ , hay también un aumento en la afinidad entre actina y miosina, pero inferior que a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; y a las 26 semanas se manifiesta la total pérdida de interacción. A las 38 semanas la diferencia entre los valores de MHC con y sin ME puede deberse a la aparición de puentes disulfuro en la estructura miofibrilar (posiblemente por la formación de agregados insolubles de actomiosina, miosina y/o actina). Además, se observa una caída de los valores MHC en presencia de ME, lo cual estaría indicando la degradación de la cadena pesada de miosina, acompañada por un incremento de bandas atribuibles a polipéptidos de bajo pe-

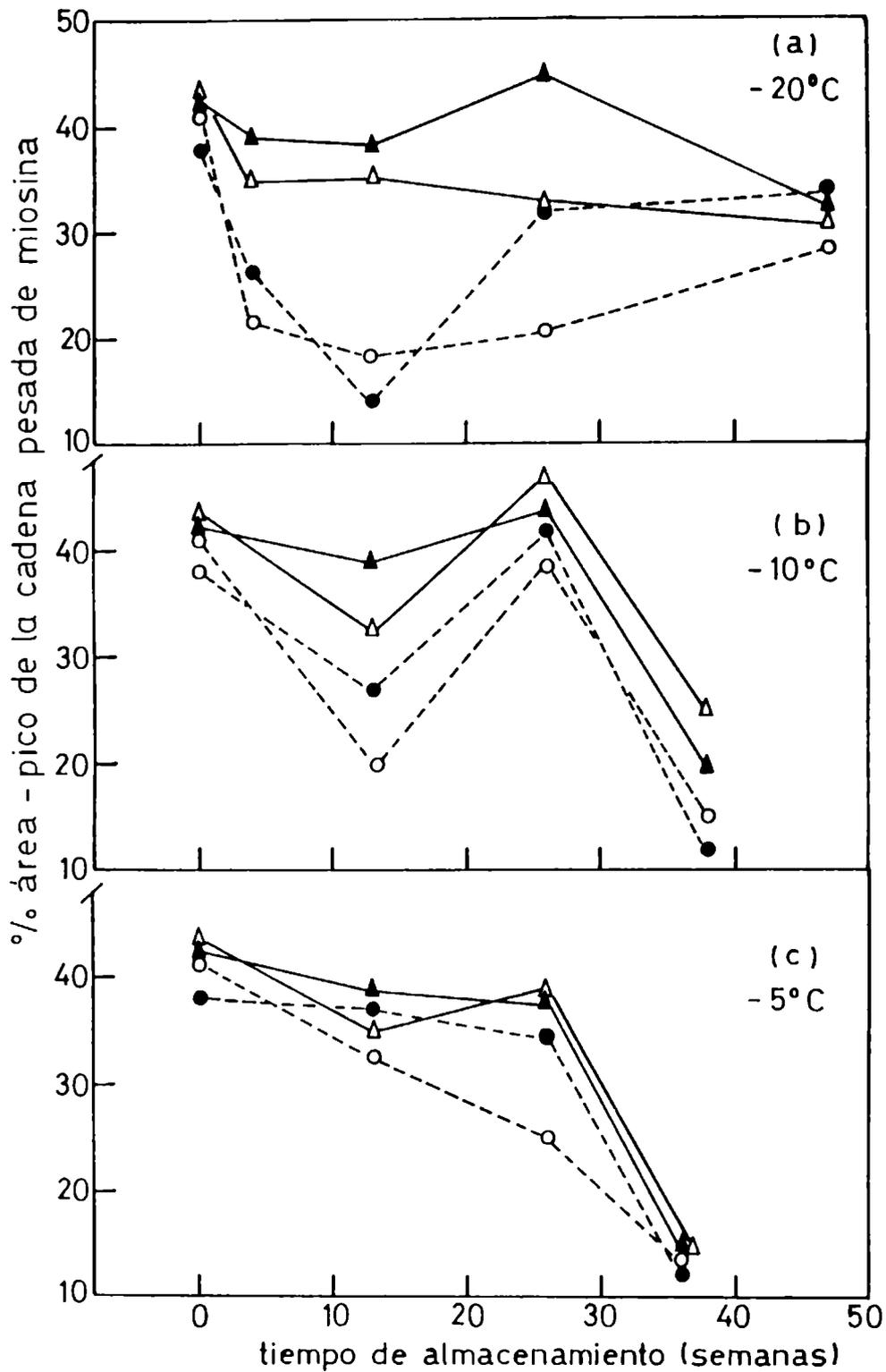


Figura 18: Efecto del almacenamiento congelado de músculo bovino a  $-20^{\circ}\text{C}$  (a),  $-10^{\circ}\text{C}$  (b) y  $-5^{\circ}\text{C}$  (c), sobre el área del pico correspondiente a la cadena pesada de miosina (MHC), en los densitogramas electroforéticos de las proteínas miofibrilares.

Muestras empleadas: miofibrillas aisladas de músculo congelado rápido (●,▲) y lento (○,△), tratadas con SDS (●, ○) y con SDS +ME (▲,△). El área del pico MHC está expresada como un porcentaje del área total del densitograma.

so molecular.

Con el almacenamiento a  $-5^{\circ}\text{C}$ , el tiempo requerido para la total desaparición de la interacción entre actina y miosina es reducido a 13 semanas. Al alcanzar las 26 semanas hay formación de puentes disulfuro y a las 36 semanas, como consecuencia de la degradación de miosina, los valores de MHC con ME decrecen, junto con un incremento de los polipéptidos de bajo peso molecular (Figura 19).

Un análisis similar de los valores del área de actina (A), con y sin ME, mostró que a  $-20^{\circ}\text{C}$  no hay cambios significativos durante el almacenamiento (Figura 20a). Sin embargo en la Figura 20b se ve que a  $-10^{\circ}\text{C}$ , hay a las 26 semanas, disminución de los valores A para las muestras sin ME, lo cual implicaría la presencia de puentes disulfuro en agregados de actina o de actina con miosina; efecto que se ve incrementado a las 38 semanas. A  $-5^{\circ}\text{C}$  (Figura 20c), observamos a las 13 semanas la mencionada pérdida de interacción actina-miosina, ya registrada al medir las áreas MHC. A las 26 y 36 semanas, los valores de A nos indican tanto la formación de puentes disulfuro como la degradación de actina.

Respecto a las proteínas sarcoplásmicas, podemos decir que si parte de ellas se hubieran insolubilizado durante el almacenamiento congelado, deberían haberse aislado junto con las miofibrillas totales. De ser así, los diagramas electroforéticos de las miofibrillas (supuestamente contaminadas con sarcoplásmicas insolubles) deberían presentar entonces picos característicos de algunas de las proteínas sarcoplásmicas; lo cual no fue observado (Figura 21). Además, los geles de proteínas sarcoplásmicas obtenidos de músculos almacenados no se diferenciaban de aquellos obtenidos con músculo fresco. De esto surge que los cambios ocurridos a nivel de proteínas sarcoplásmicas son poco importantes frente a las marcadas alteraciones de las proteínas miofibrilares.

#### **4.4 Estado de agregación de las proteínas miofibrilares:**

##### **Solubilidad de proteínas miofibrilares**

Sabiendo que durante la etapa de almacenamiento en estado congelado,

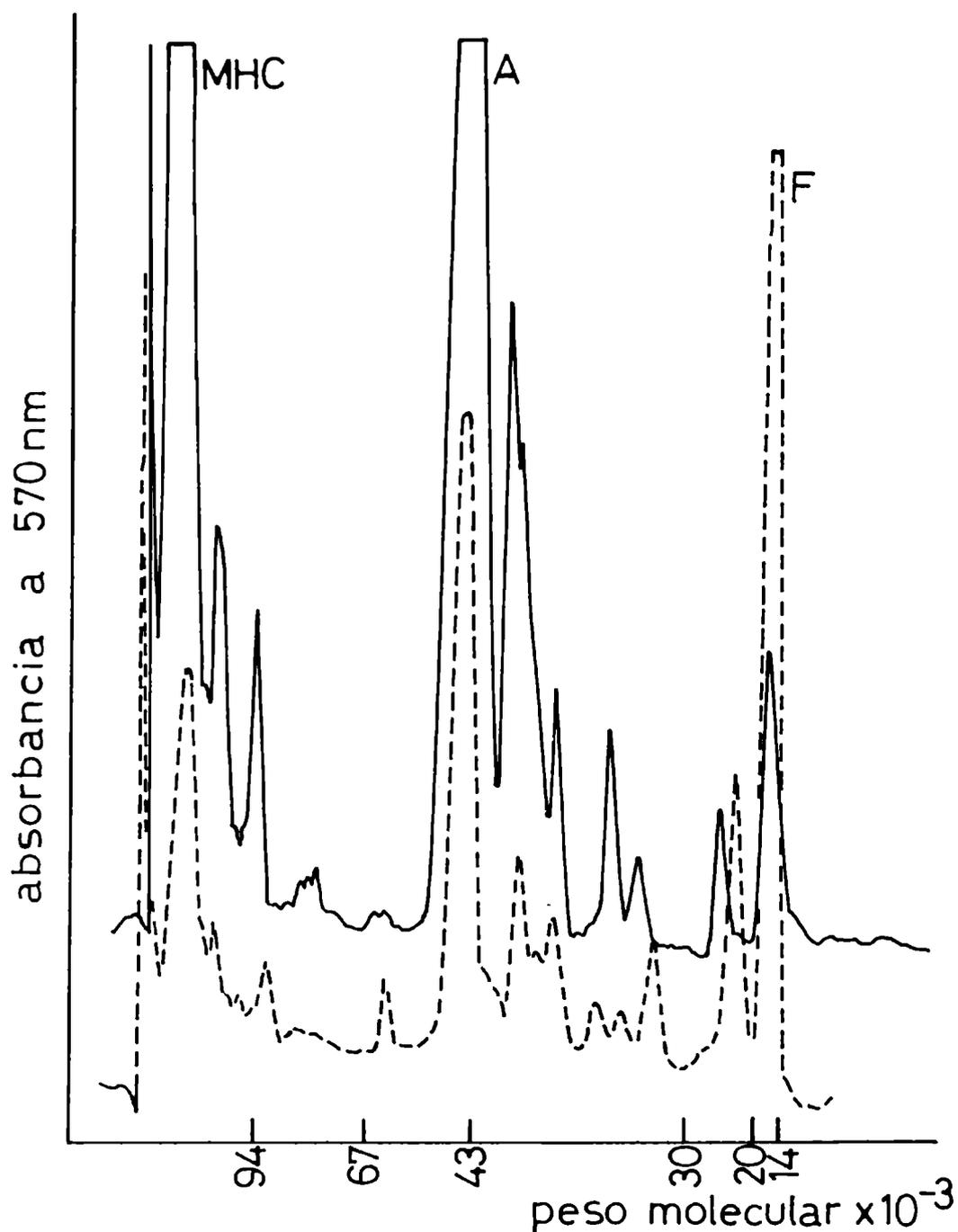


Figura 19: Densitogramas de las electroforesis en geles de poliacrilamida de miofibrillas aisladas de músculo fresco ( — ) y de músculo almacenado a  $-5^{\circ}\text{C}$  durante 36 semanas ( - - - ). Las muestras fueron tratadas con SDS + ME.

MHC: cadena pesada de miosina; A: actina; F: frente de la corrida formado por polipéptidos de bajo peso molecular.

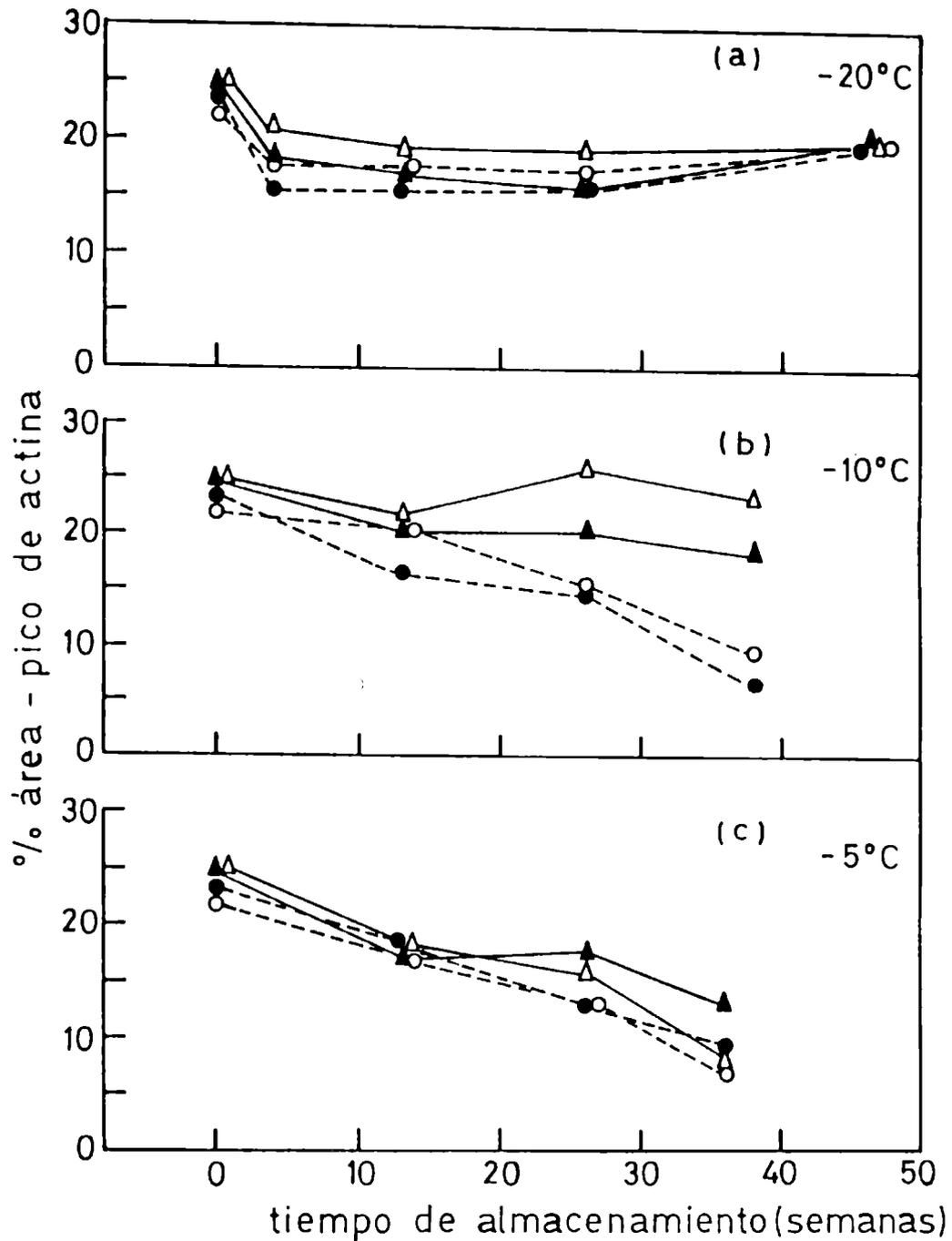


Figura 20: Efecto del almacenamiento congelado de músculo bovino a  $-20^{\circ}\text{C}$  (a),  $-10^{\circ}\text{C}$  (b), y  $-5^{\circ}\text{C}$  (c), sobre el área del pico correspondiente a actina (A) en los densitogramas electroforéticos de las proteínas miofibrilares.

Muestras empleadas: miofibrillas aisladas de músculo congelado rápido ( $\bullet, \blacktriangle$ ) y lento ( $\circ, \triangle$ ), tratadas con SDS ( $\bullet, \circ$ ) y con SDS +ME ( $\blacktriangle, \triangle$ ). El área del pico A está expresada como un porcentaje del área total del densitograma.

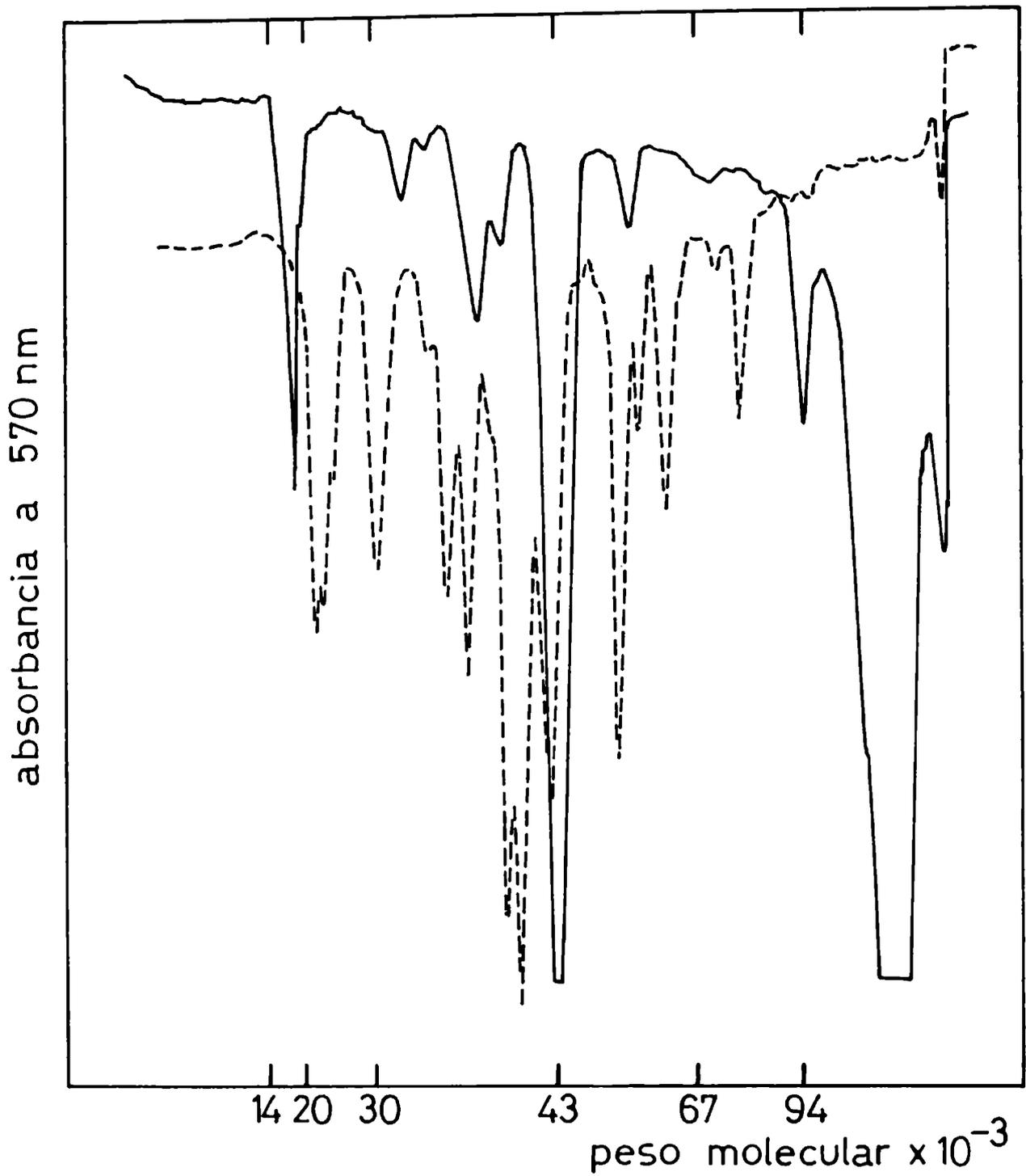


Figura 21: Densitogramas electroforéticos de miofibrillas totales (——) y de proteínas sarcoplásmicas (-----) aisladas de músculo bovino almacenado durante 26 semanas a -5°C.

se producen cambios estructurales en las proteínas miofibrilares, como son la desnaturalización de miosina y la alteración de su interacción con actina; es de interés conocer la repercusión de tales cambios sobre propiedades vinculadas más estrechamente con las características texturales del músculo. Una de dichas propiedades es la solubilidad de las proteínas miofibrilares.

Se procedió entonces a determinar la solubilidad miofibrilar en solución 0.6M KCl, 0.03M Tris-HCl a pH 7.6, sobre muestras de miofibrillas aisladas de músculos congelados-almacenados, siguiendo el mismo procedimiento empleado para estudiar el efecto de la congelación (inc. 2.9 y 3.2).

La Figura 22 muestra la variación de la solubilidad de miofibrillas con el tiempo de almacenamiento congelado del músculo a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ , para velocidad de congelación, rápida y lenta. El análisis estadístico del total de los valores se realizó con un ANAVA (95%) para tres factores de variación y sus interacciones. Se hallaron diferencias significativas debidas a la temperatura, tiempo, interacción temperatura-tiempo, e interacción temperatura-velocidad de congelación ( $\text{LSD}_{0.05} = 9.1$ ). Para estudiar el efecto de la velocidad de congelación, se hizo el ANAVA para cada temperatura en forma independiente, dando diferencias significativas entre congelado rápido y lento ( $\text{LSD}_{0.05} = 4.2$ ).

Se observó que la pérdida de solubilidad miofibrilar es mayor cuanto mayor es la temperatura de almacenamiento. A  $-5^{\circ}\text{C}$  las miofibrillas disminuyen su solubilidad desde las primeras semanas; a  $-10^{\circ}\text{C}$  lo hacen recién después de mantenerse aproximadamente constante hasta la sexta semana; mientras que a  $-20^{\circ}\text{C}$  hay inicialmente un leve aumento de solubilidad hasta las 13 semanas, luego del cual comienza a disminuir lentamente. En la misma Figura 22 se manifiesta la influencia que ejerce la velocidad de congelación sobre la solubilidad miofibrilar, a través del tiempo de almacenamiento a una misma temperatura. Así, a  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ , la pérdida de solubilidad es considerablemente mayor con la congelación rápida, en tanto que a  $-20^{\circ}\text{C}$  el efecto es inverso.

La referida disminución de la solubilidad proteica en músculos almacenados en estado congelado así como la influencia de la temperatura de alma-

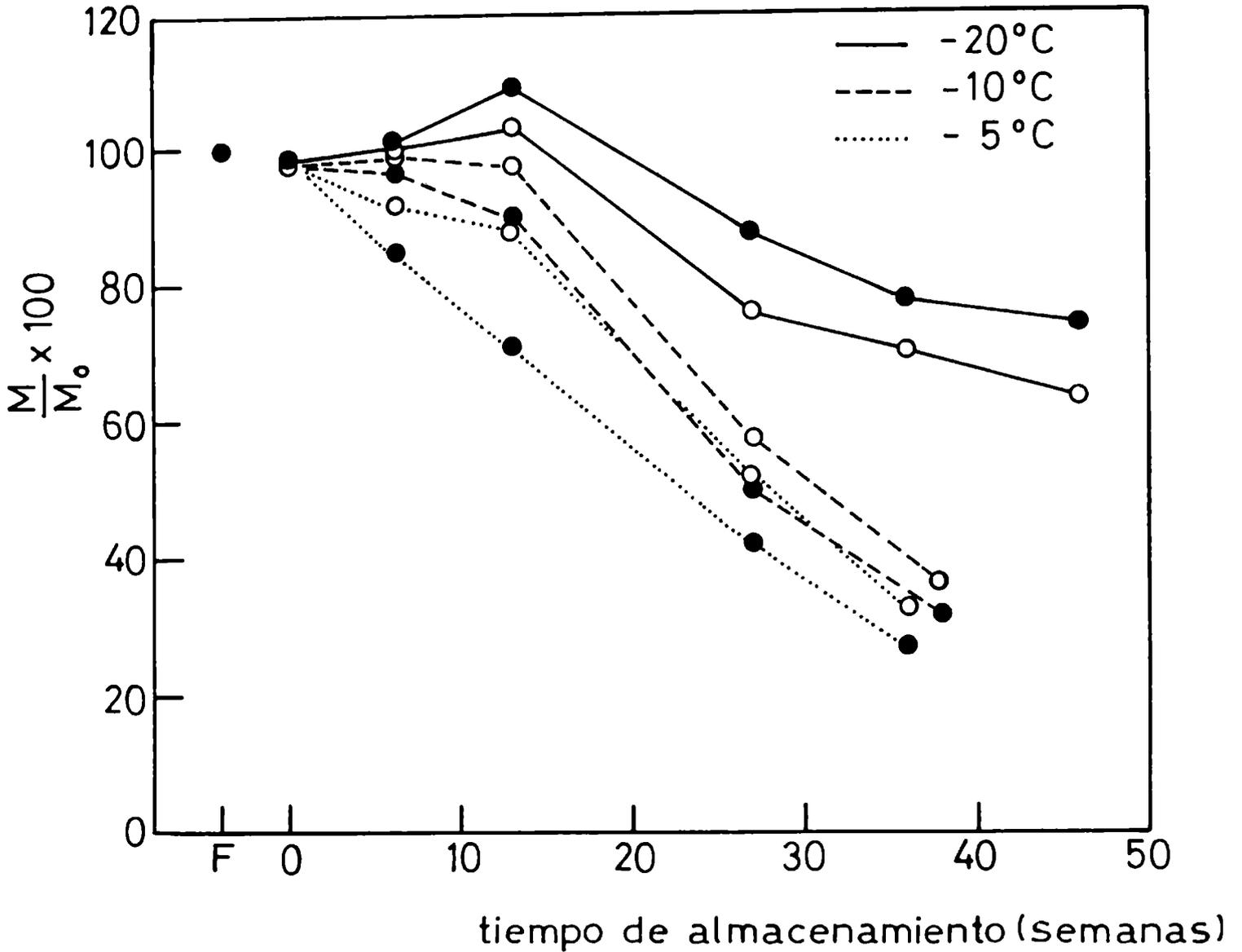


Figura 22: Efecto del tiempo de almacenamiento congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-5^{\circ}\text{C}$ , sobre la solubilidad de miofibrillas; para músculos congelados a velocidad rápida (●) y lenta (○).

Los valores  $M_0$  y  $M$  son respectivamente los porcentajes de miofibrillas solubles de músculo fresco y almacenado en estado congelado ( $M_0 = 81.0 \pm 5.8$ ). La solubilidad miofibrilar se ensayó sobre miofibrillas aisladas, con solución 0.6M KCl, 0.03M Tris-HCl, pH 7.6.

Cada valor es el promedio de un mínimo de cuatro ensayos. Máxima desviación standard: 10.5 ( $\text{LSD}_{0.05} = 9.2$ ).

cenamiento, son resultados que concuerdan con informes previos aportados por otros autores, en numerosas investigaciones realizadas en su mayoría sobre músculos de pescados (King, 1966; Connell, 1968; Anderson y Ravesi, 1970; Matsumoto, 1979, 1980; Sikorski, 1976 )

De estos estudios surgía, a diferencia de lo que observamos en músculo bovino, que la pérdida de solubilidad de las proteínas en músculo de pescado congelado, transcurre a mayor velocidad y sin el lag inicial (aún a temperaturas inferiores a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) ni la mencionada influencia de la velocidad de congelación. Esto se debe a la mayor susceptibilidad al deterioro de los músculos de pescado en comparación con los provenientes de otras especies animales tales como aves de corral y mamíferos (Khan, 1966; Awad et al, 1968; Kang et al., 1983).

#### 4.5 Comportamiento reológico y capacidad de absorción de agua de las miofibrillas aisladas de músculo almacenado

Se estudiaron los cambios en la viscosidad reducida ( $\eta_{\text{red}}$ ) de miofibrillas aisladas y suspendidas en solución 0.6M KCl, 0.03M Tris-HCl pH 7.6 en función del tiempo y la temperatura de almacenamiento del músculo bovino congelado (Figura 23). Vemos que la  $\eta_{\text{red}}$  no se modifica con la congelación (Tabla 7), pero sí por efecto del almacenamiento. Durante las primeras 13 semanas, la  $\eta_{\text{red}}$  tiende a incrementarse ligeramente con las tres temperaturas; alcanzando a  $-5^{\circ}\text{C}$  un valor máximo que representa el 9% de incremento sobre el valor inicial en músculo fresco. Después de este período de 13 semanas, la viscosidad decrece rápidamente a  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ , pero más lentamente a  $-20^{\circ}\text{C}$ . De esto resulta, que al final del almacenamiento (47 semanas) a  $-5^{\circ}\text{C}$  y a  $-10^{\circ}\text{C}$  la  $\eta_{\text{red}}$  alcance una disminución del 70% y 76% respectivamente, mientras que a  $-20^{\circ}\text{C}$  llegue tan sólo a 35% del valor inicial.

El análisis estadístico de los valores de  $\eta_{\text{red}}$  calculados, nos indicó que hay diferencias significativas debidas tanto a la temperatura y al tiempo, como también a la interacción entre ambos factores de variación. En cambio, no se encontraron diferencias entre los congelados rápido y lento, co

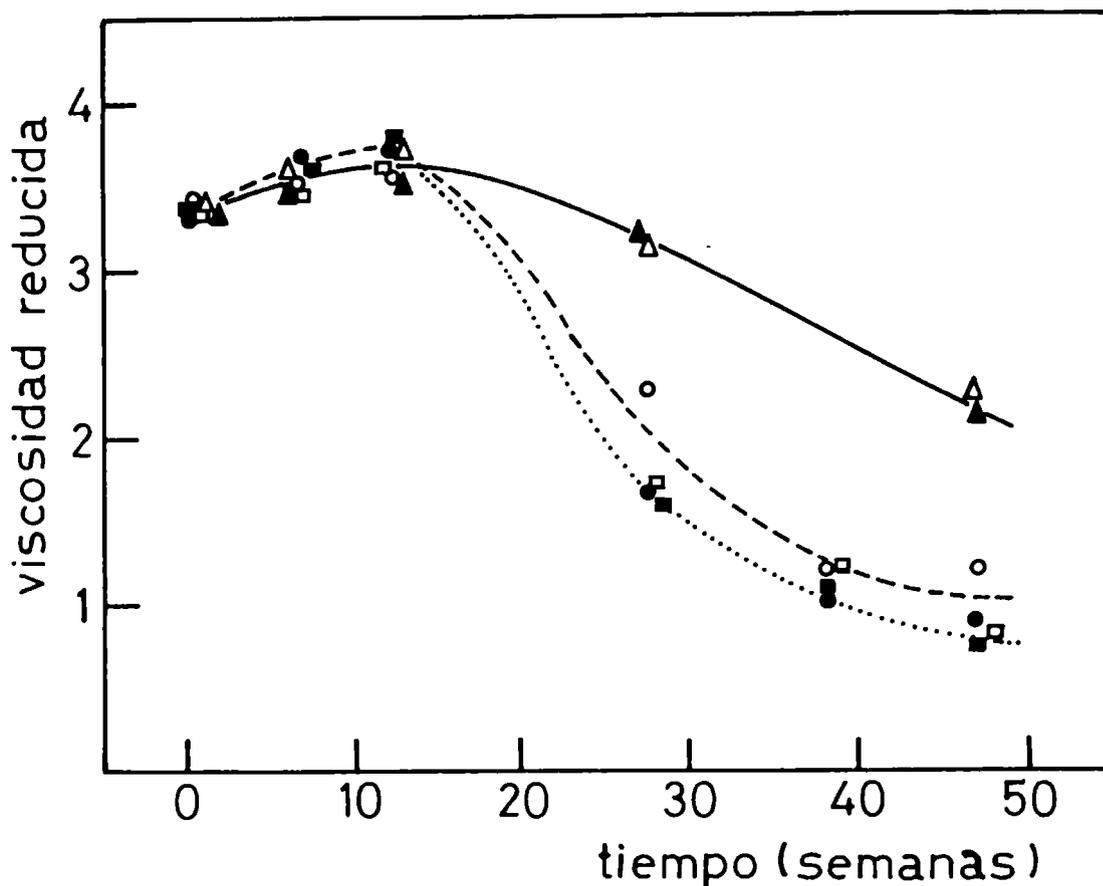


Figura 23: Efecto del almacenamiento congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  (▲—▲),  $-10^{\circ}\text{C}$  (●—●) y  $-5^{\circ}\text{C}$  (■—■), sobre la viscosidad reducida de miofibrillas aisladas de músculo bovino congelado a velocidad rápida (▲, ●, ■) y lenta (△, ○, □). La viscosidad reducida se determinó sobre una suspensión de miofibrillas en solución 0.6M KCl, 0.03M Tris-HCl, pH 7.6 (10-12 mg de miofibrillas/ml), usando el máximo valor de escala (5) alcanzado a una velocidad del rotor de 64 rpm. Cada valor es el resultado de tres ensayos como mínimo. (Máxima desviación standard: 0.31) ( $\text{LSD}_{0.05} = 0.26$ )

mo tampoco entre las temperaturas  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$  ( $\text{LSD}_{0.05} = 0.26$ ).

Desde el punto de vista del comportamiento reológico, habíamos visto que las miofibrillas aisladas de músculo congelado sin almacenamiento, tienen propiedades de flujo similares a las provenientes de músculo fresco (Figura 13), comportándose en solución 0.6M KCl, 0.03M Tris-HCl a pH 7.6, como un líquido viscoso pseudoplástico y tixotrópico.

Para poder observar la influencia de la temperatura de almacenamiento sobre el comportamiento reológico de las miofibrillas, se muestra en la Figura 24, para el caso de una congelación lenta, cómo se modifican las curvas de flujo ( $S$  vs  $n$ ) con un período de almacenamiento del músculo de 26 semanas a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-5^{\circ}\text{C}$  (curvas b, c y d, respectivamente) en comparación con la correspondiente al músculo congelado sin almacenamiento (curva a). Siendo los mismos el tiempo de almacenamiento y la velocidad de congelación, vemos el efecto importante que ejerce la temperatura sobre el mantenimiento de las propiedades nativas de las proteínas miofibrilares en el músculo. También se observa que, no sólo disminuye el valor de la viscosidad aparente ( $S/n$ ) y en mayor grado cuanto mayor es la temperatura, sino que además cambian las formas de las curvas de flujo, indicándonos la pérdida progresiva de la pseudoplasticidad y la tixotropía. La importancia de estos cambios va de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-5^{\circ}\text{C}$ ; temperatura ésta a la cual, ya a las 26 semanas, se pierden totalmente dichas propiedades, adquiriendo las características de un fluido newtoniano ( $\eta = S/n$  constante para cualquier valor de  $n$ ) y no tixotrópico (viscosidad constante a través del tiempo). Es decir que el tiempo requerido para completar el pasaje de pseudoplástico - tixotrópico a newtoniano es dependiente de la temperatura de almacenamiento ( $-5^{\circ}\text{C} < -10^{\circ}\text{C} < -20^{\circ}\text{C}$ ). Es importante entonces conocer la evolución de las propiedades de flujo con el tiempo de almacenamiento a una misma temperatura y velocidad de congelación. La Figura 25a-f presenta las curvas  $S$  vs  $n$  obtenidas a distintos períodos de almacenamiento para músculos congelados a velocidad rápida y lenta y almacenados a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ .

En todos los casos, tanto la disminución de viscosidad como de pseudoplasticidad y tixotropía con el tiempo, es mayor a  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$  que a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

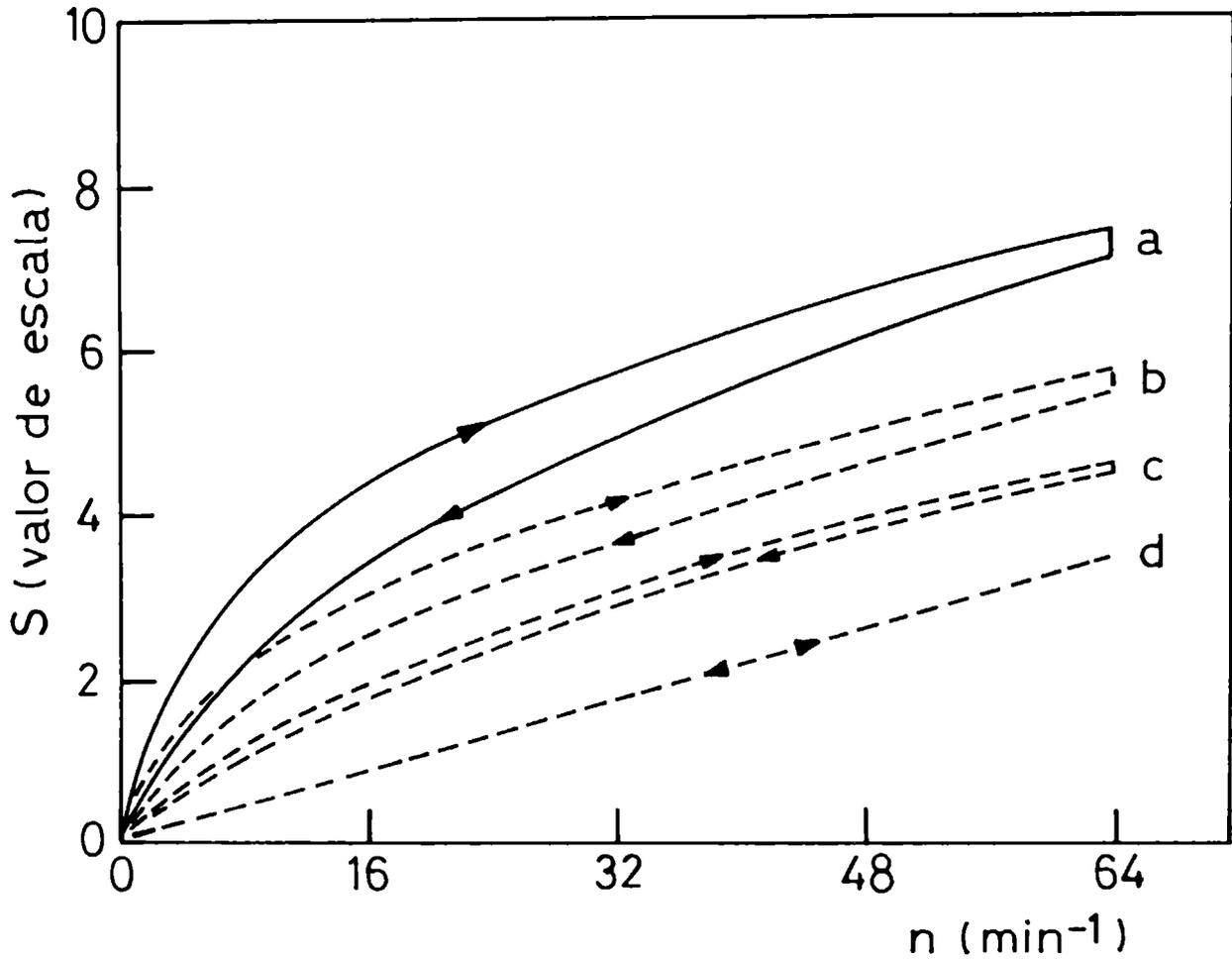


Figura 24: Curvas de flujo obtenidas con miofibrillas aisladas de músculo congelado lento sin almacenamiento (a) y con almacenamiento a  $-20^{\circ}\text{C}$  (b),  $-10^{\circ}\text{C}$  (c) y  $-5^{\circ}\text{C}$  (d), durante 26 semanas. Programa empleado: 2 minutos:  $0 \rightarrow 64$  rpm; 1 minuto: mantenimiento a 64 rpm; 2 minutos:  $64 \rightarrow 0$  rpm.

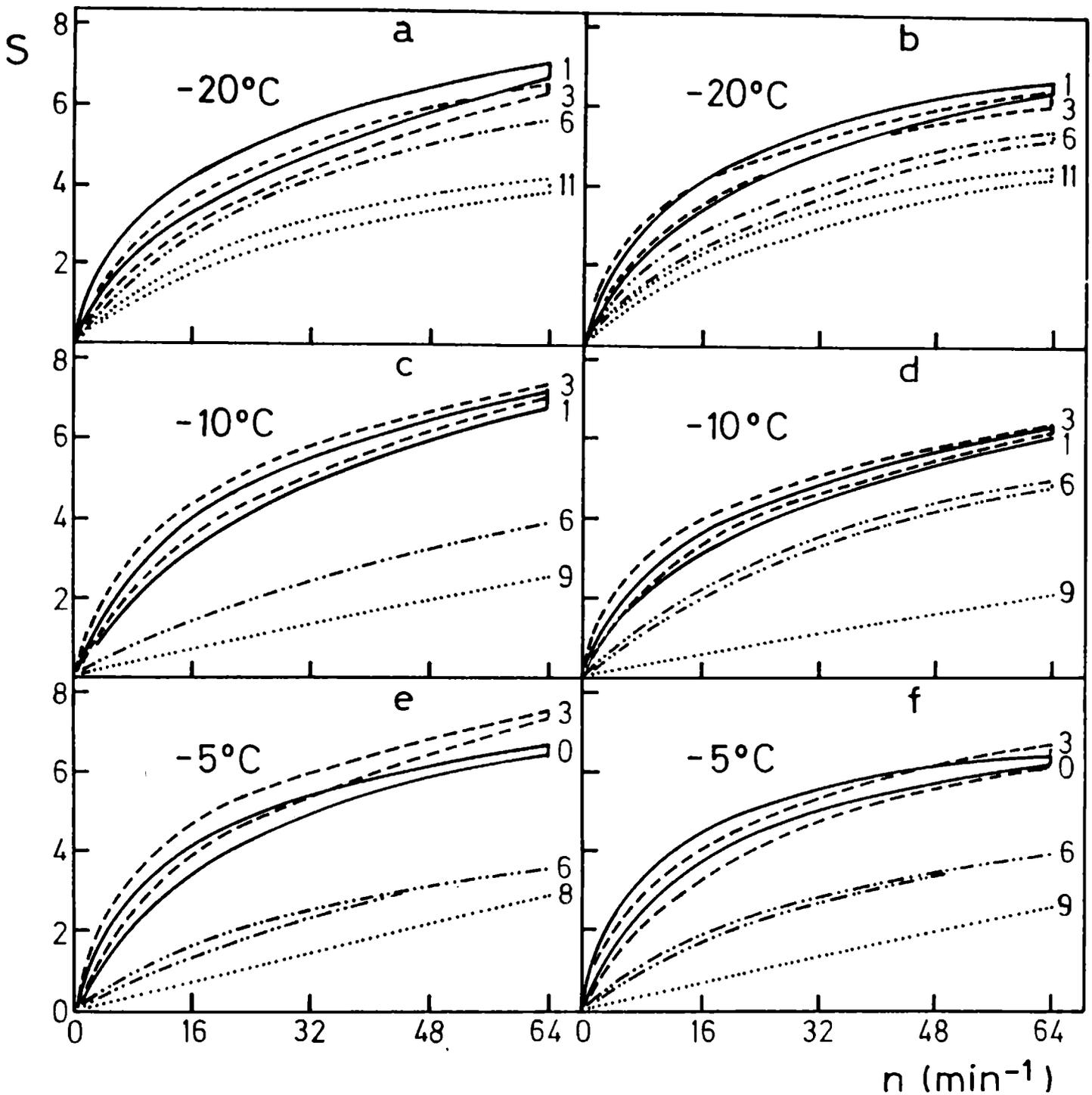


Figura 25: Efecto del tiempo de almacenamiento congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-5^{\circ}\text{C}$ , sobre las curvas de flujo de miofibrillas aisladas de músculo bovino congelado a velocidad rápida (a, c y e) y lenta (b, d y f). Las corridas se realizaron sobre suspensiones de miofibrillas en solución 0.6M KCl, 0.03M Tris-HCl, pH 7.6 (concentración de miofibrillas: 10-12 mg/ml). Programa empleado: idem a Figura 24. Al lado de cada curva figuran los tiempos de almacenamiento expresados en meses.

En la Figura 25a y b, correspondientes a  $-20^{\circ}\text{C}$ , congelado rápido y lento respectivamente, vemos que si bien va cambiando la viscosidad con el tiempo, no ocurre lo mismo con las demás propiedades reológicas; ya que aún a los 11 meses de almacenamiento se conservan ligeramente disminuídas las propiedades de flujo originales.

A  $-5^{\circ}\text{C}$ , vemos en la Figura 25e y f, para congelado rápido y lento respectivamente, que ya a los 6 meses, las miofibrillas se comportan prácticamente como un fluido newtoniano. Igual que a  $-20^{\circ}\text{C}$ , las diferencias entre congelado rápido y lento si bien existen, no son muy marcadas.

En cambio a  $-10^{\circ}\text{C}$  (Figura 25c y d) lo más notable justamente, es la diferente evolución de las muestras de miofibrillas con el tiempo, según procedan de músculo congelado a velocidad rápida o lenta. Mientras que para el congelado rápido, a los 6 meses no hay prácticamente ni pseudoplasticidad ni tixotropía, ambas propiedades se conservan aún en el congelado lento al mismo tiempo de almacenamiento. Es decir que a  $-10^{\circ}\text{C}$ , desde el punto de vista del comportamiento reológico de las miofibrillas, el músculo congelado rápido es afectado más rápidamente que el congelado lento. De manera similar que para la viscosidad reducida (Figura 23), las propiedades de flujo miofibrilar a las tres temperaturas, no se ven significativamente modificadas hasta después de los tres meses de almacenamiento. En realidad, es recién después de ese período, que podría denominarse inductivo o latente, cuando se manifiesta la mencionada caída gradual de las propiedades reológicas y las diferencias debidas a la temperatura.

Un estudio complementario para los resultados anteriores, fue la medición de la capacidad de absorción de agua o hinchamiento de las miofibrillas suspendidas en agua o en solución 0.15M KCl, 0.03M Tris-HCl a pH 7.6 (Solución 1). Durante el almacenamiento congelado, se observó que los valores de hinchamiento de las miofibrillas (suspendidas tanto en agua como en solución 1) exhibían un comportamiento similar al de la viscosidad reducida, encontrando entre ellas una correlación lineal (Figura 26). Este resultado estaría indicando que la pérdida de viscosidad está relacionada con la menor capacidad

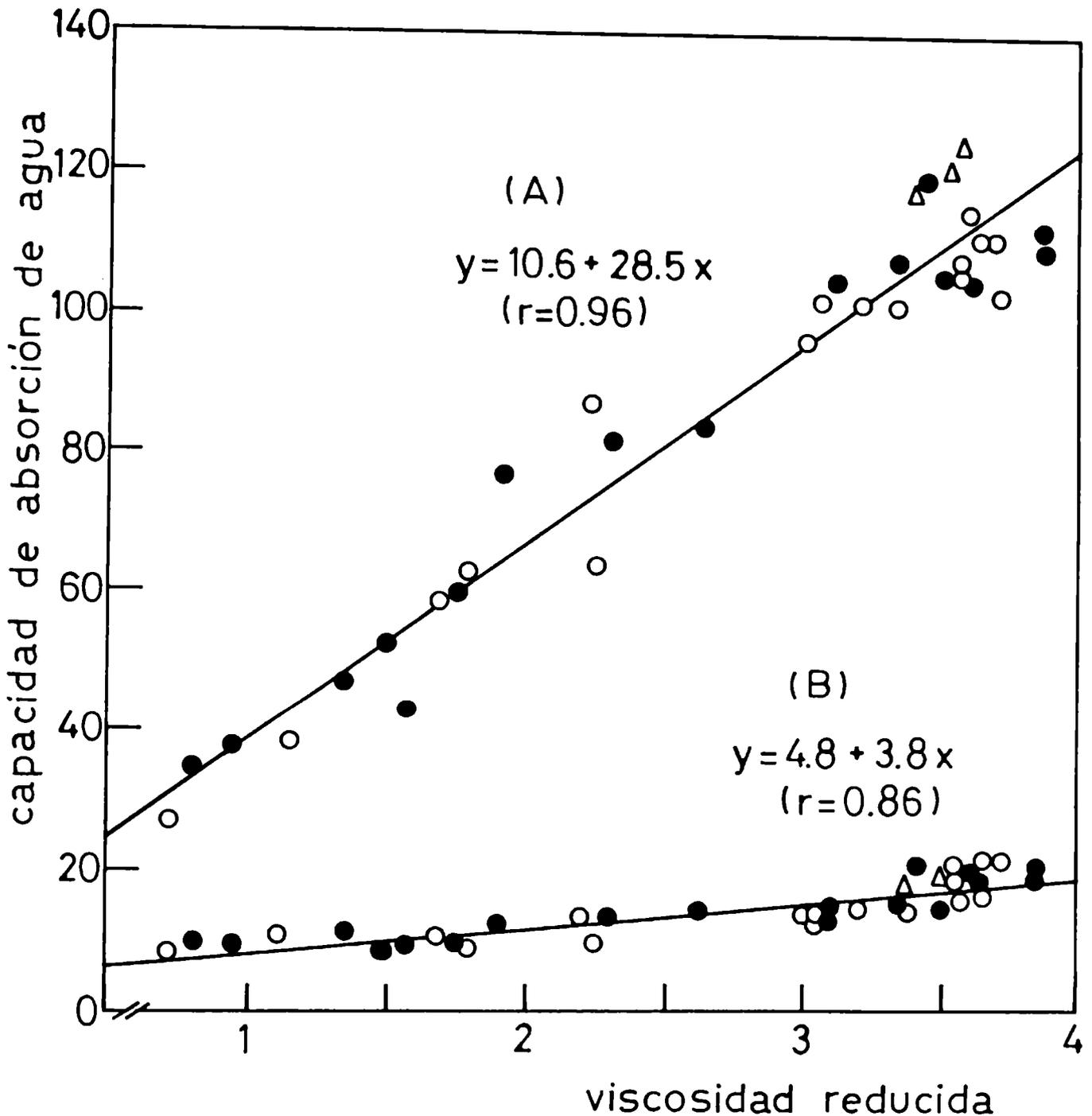


Figura 26: Relación entre la capacidad de absorción de agua y la viscosidad reducida de miofibrillas aisladas de músculo fresco ( $\Delta$ ) y almacenado (congelado rápido,  $\bullet$  y congelado lento,  $\circ$ ). La capacidad de absorción de agua se midió sobre miofibrillas suspendidas en agua (A) y en solución 0.15M KCl, 0.03M Tris-HCl, pH 7.6 (B). La viscosidad reducida se determinó sobre las miofibrillas suspendidas en solución 0.6M KCl, 0.03M Tris-HCl, pH 7.6. Cada valor es un promedio de tres ensayos como mínimo (máxima desviación standard: 8.0 (A) y 1.5 (B)). Las rectas fueron trazadas por cuadrados mínimos ( $r$ : coeficiente de correlación).

de hidratación de las proteínas miofibrilares y sus agregados.

#### 4.6 Estudio cinético del deterioro proteico en músculo bovino congelado

##### 4.6.1 Cinética de desnaturalización

Para estudiar la cinética de desnaturalización de las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento congelado, se utilizó como parámetro la actividad ATPásica miofibrilar en presencia de ión  $\text{Ca}^{2+}$ , que si bien no es indicativo de la desnaturalización del total de las proteínas miofibrilares, sí lo es de miosina, proteína que además de ser la mayoritaria en el músculo, en base a los resultados hasta ahora obtenidos, parece ser la proteína más sensible al proceso de congelación-almacenamiento congelado.

Considerando la posibilidad de una cinética de primer orden respecto al tiempo, para la reacción de desnaturalización de miosina, se graficó el logaritmo natural del porcentaje de actividad ATPásica miofibrilar activada por  $\text{Ca}^{2+}$  frente al tiempo de almacenamiento a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ , para músculo congelado a velocidad rápida y lenta (Figura 27a, b). Vemos que la reacción no procede con una cinética de orden uno en todo el período de almacenamiento, sino como una reacción de orden superior respecto al tiempo ( $n_t > 1$ ), pudiéndose aproximar a dos reacciones consecutivas de primer orden. Las rectas fueron obtenidas por cuadrados mínimos, siendo sus pendientes los valores de las constantes de velocidad  $k$  (semanas<sup>-1</sup>) de las reacciones individuales. De esta manera, según la variación de la actividad ATPásica- $\text{Ca}^{2+}$  de miofibrillas, el proceso de desnaturalización de miosina durante el almacenamiento congelado del músculo, transcurriría como mínimo en dos etapas; una etapa rápida inicial (con constantes  $k_1$ ) y una etapa posterior más lenta (con constantes  $k_2$ ). Los valores de las constantes de velocidad en cada etapa dieron: para la congelación rápida (Figura 27a), a  $-20^{\circ}\text{C}$ :  $k_1 = 0.082$ ,  $k_2 = 0.0076$ ; a  $-10^{\circ}\text{C}$ :  $k_1 = 0.190$ ,  $k_2 = 0.0157$ ; a  $-5^{\circ}\text{C}$ :  $k_1 = 0.245$ ,  $k_2 = 0.017$  y para la congelación lenta (Figura 27b) a  $-20^{\circ}\text{C}$ :  $k_1 = 0.0167$ ,  $k_2 = 0.0056$ ; a  $-10^{\circ}\text{C}$ :  $k_1 = 0.025$ ,  $k_2 = 0.0076$ ; a  $-5^{\circ}\text{C}$ :  $k_1 = 0.06$ ,  $k_2 = 0.016$ .

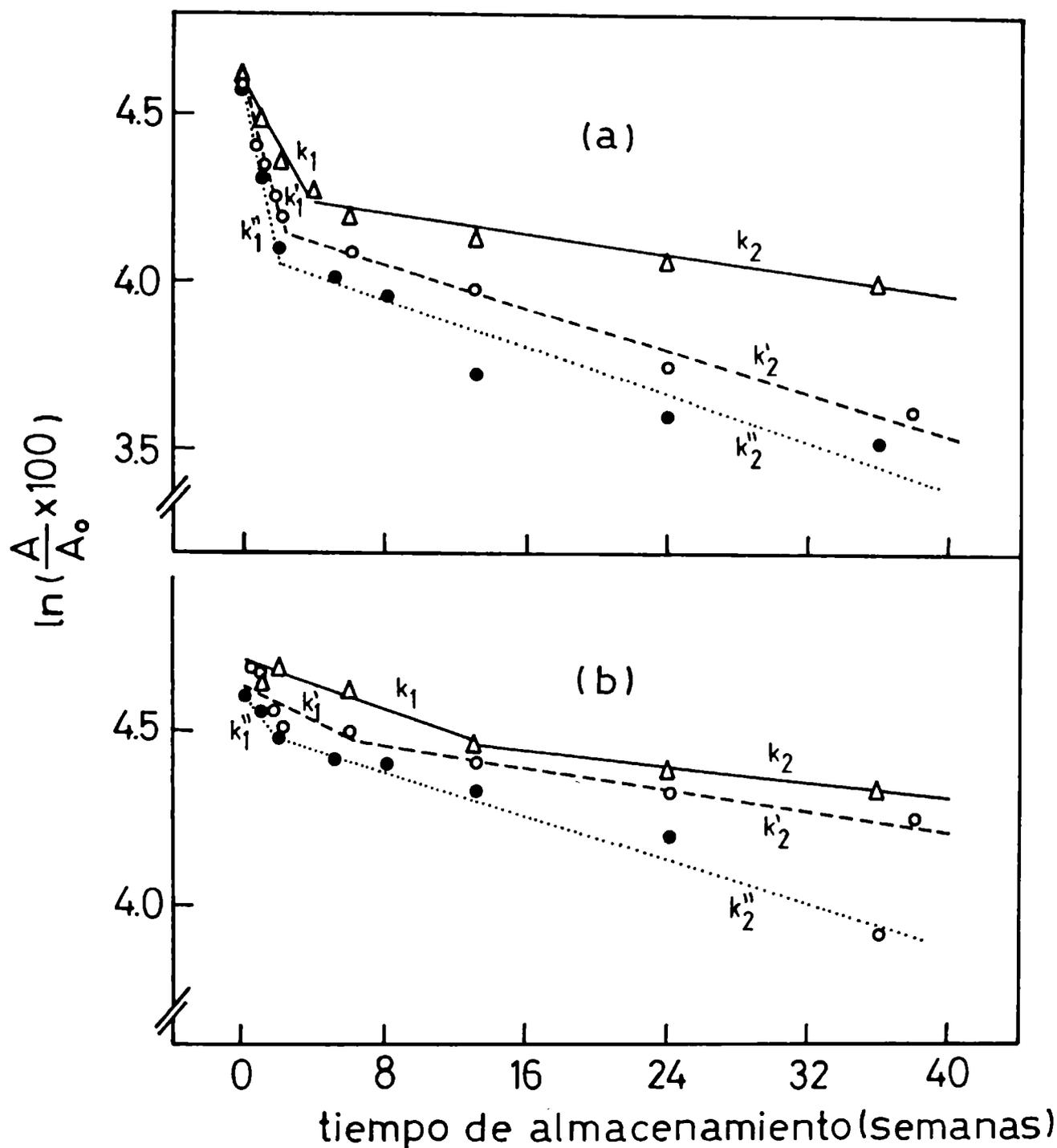


Figura 27: Estimación de la cinética de desnaturalización de miosina en músculo congelado a velocidad rápida (a) y lenta (b), almacenado a  $-5^\circ\text{C}$  ( $\bullet\text{-----}\bullet$ ),  $-10^\circ\text{C}$  ( $\circ\text{-----}\circ$ ) y  $-20^\circ\text{C}$  ( $\Delta\text{-----}\Delta$ ). A y  $A_0$  son respectivamente las actividades ATPásica miofibrilar -  $\text{Ca}^{2+}$  de músculo congelado con y sin almacenamiento. (Máxima desviación standard: 0.15).

En la misma Figura 27a, b, se puede ver además que la etapa rápida inicial tiene mayor duración a  $-20^{\circ}\text{C}$  que a  $-10^{\circ}\text{C}$  o  $-5^{\circ}\text{C}$ . Para la congelación rápida dura 4 semanas a  $-20^{\circ}\text{C}$  pero apenas 2 semanas a  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ ; siendo éstos los tiempos necesarios para llevar a la actividad ATPásica- $\text{Ca}^{2+}$  al 60-70% de su valor inicial. Para la congelación lenta la primer etapa alcanza las 13 semanas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , 6 semanas a  $-10^{\circ}\text{C}$  y tan sólo 2 semanas a  $-5^{\circ}\text{C}$ ; tiempos en que se llega a un 90% aproximadamente del valor inicial de actividad dado por el congelado lento sin almacenamiento.

Estos resultados parecieran indicar que la segunda etapa de la desnaturalización, recién tiene lugar cuando a través de la primer etapa más rápida, el número de moléculas de miosina desnaturalizadas llega a un valor crítico.

Si observamos ahora la Figura 17d (actividad ATPásica- $\text{Mg}^{2+}$  para congelación lenta), notamos que los períodos de tiempo durante los cuales se registró un aumento de la actividad ATPásica con  $\text{Mg}^{2+}$  (13, 6 y 2 semanas para  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-5^{\circ}\text{C}$  respectivamente) son coincidentes con la duración de la etapa inicial de disminución de actividad ATPásica- $\text{Ca}^{2+}$  en la congelación lenta. Esto nos sugiere que los cambios en el sitio activo de miosina, responsable de la actividad ATPásica, están acompañados por una alteración del sitio de unión con actina.

Con el objeto de calcular las energías de activación correspondientes a cada etapa, se graficó  $\ln k$  vs  $1/T$ , de acuerdo con la ecuación de Arrhenius (20), para los valores de  $k_1$  y  $k_2$  a cada temperatura de almacenamiento y velocidad de congelación. De cada recta obtenida, se calculó la pendiente por cuadrados mínimos, y con ella se estimó el valor de la energía de activación. Los valores hallados para  $E_a$  fueron: 10.14 Kcal/mol y 7.74 Kcal/mol para congelación rápida, y 10.70 Kcal/mol y 8.68 Kcal/mol para congelación lenta, correspondientes a la primera y segunda etapa de desnaturalización respectivamente.

Los valores  $E_a$  de la primer etapa son comparables a la energía de activación de recristalización del hielo en músculo bovino congelado,

$E_a = 10.4 \text{ Kcal. mol}^{-1}$  (Bevilacqua y Zaritzky, 1982), lo cual nos conduce a la idea antes sugerida, de que la recristalización durante el primer período de almacenamiento, sea una de las posibles causas de desnaturalización proteica.

A partir de los valores de  $E_a$  hallados para cada etapa, se calcularon los respectivos  $Q_{10}$  empleando la ecuación  $\log Q_{10} = \frac{E_a \times 2.189}{T (T + 10)}$  (21)

(con  $E_a$  en cal/mol y  $T$  en K), que resulta de aplicar la ecuación de Arrhenius para  $T$  y  $T + 10$ . El parámetro  $Q_{10}$  está definido como la relación entre la velocidad de reacción a una temperatura  $T + 10$  y  $T$ ; y representa por lo tanto, la variación de la velocidad con el aumento de la temperatura en  $10^\circ\text{C}$ :

$$Q_{10} = \frac{k_{T+10}}{k_T} \quad (22)$$

para  $T = -20^\circ\text{C}$ , resultaron los siguientes valores  $Q_{10}$ : 2.15 y 2.25 para congelación rápida y lenta en la primer etapa; 1.80 y 1.93 para congelación rápida y lenta en la segunda etapa. Es decir que tanto en la primera como en la segunda etapa, la velocidad de desnaturalización de miosina a  $-10^\circ\text{C}$  es prácticamente el doble que a  $-20^\circ\text{C}$ .

Habiendo visto que en cada etapa, la cinética de desnaturalización de miosina, desde el punto de vista de la actividad ATPásica miofibrilar con  $\text{Ca}^{2+}$ , respondía a una reacción de orden uno respecto al tiempo, se nos presentó la idea de plantear la ecuación global de desnaturalización en dos etapas, como una combinación lineal de dos ecuaciones de tipo Arrhenius. Haciendo uso del método de regresión de Marquardt fue posible ajustar los valores de actividad ATPásica- $\text{Ca}^{2+}$  como una función del tiempo de almacenamiento, a una expresión del tipo:

$$A = A_0 + A_1 e^{-\lambda_1 t} + A_2 e^{-\lambda_2 t} \quad (23)$$

donde  $A$  es la actividad ATPásica- $\text{Ca}^{2+}$  medida al tiempo  $t$ ,  $A_0$ ,  $A_1$  y  $A_2$  son constantes,  $t$  es el tiempo de almacenamiento congelado expresado en semanas y  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  son constantes que involucran las constantes de velocidad  $k_1$ ,  $k_2$  de las reacciones consecutivas de la primera y segunda etapa observadas.

Según Laidler y Bunting (1973), los mecanismos de desnaturalización de una proteína, pueden seguir distintos tipos de comportamiento, según sean sus órdenes de reacción respecto a la concentración ( $n_c$ ) y al tiempo ( $n_t$ ):

$$\text{tipo I: } n_c = n_t = 1$$

$$\text{tipo II: } n_c = 1 \quad n_t > 1$$

$$\text{tipo III: } n_c > 1 \quad n_t = 1$$

$$\text{tipo IV: } n_c > 1 \quad n_t > 1$$

De estos cuatro tipos de mecanismos, se debe optar por aquel que se ajuste mejor con los resultados experimentales. Los tipos I y III pueden descartarse, ya que como vimos la desnaturalización de miosina sigue una cinética de orden superior respecto al tiempo ( $n_t > 1$ ). De los tipos posibles II y IV optamos por el tipo II, con  $n_c = 1$ , si tenemos en cuenta que la pérdida de actividad ATPásica-Ca<sup>2+</sup> implica un mecanismo unimolecular, en que moléculas individuales de miosina como reactivos pasan al estado desnaturalizado sin incluir la agregación de las moléculas desnaturalizadas, que sabemos que en nuestro caso ocurre en un paso posterior. Una reacción con  $n_c > 1$  sería multimolecular, con evidencias de agregación simultánea de moléculas de proteína durante la desnaturalización. Dentro del tipo II, las posibilidades de que sea  $n_t > 1$  pueden deberse a:

a) que el proceso de desnaturalización no proceda en forma completa, alcanzando un estado de equilibrio en el cual una fracción significativa de moléculas proteicas permanece en el estado nativo.

b) Inhibición del proceso de desnaturalización por los productos de reacción; en otras palabras, la proteína desnaturalizada tiene alguna acción estabilizadora sobre la proteína nativa.

c) la proteína nativa puede consistir en un número de componentes  $N_1, N_2, N_3 \dots$ , etc y el proceso de desnaturalización envuelve entonces un número de reacciones unimoleculares simultáneas según el siguiente esquema:

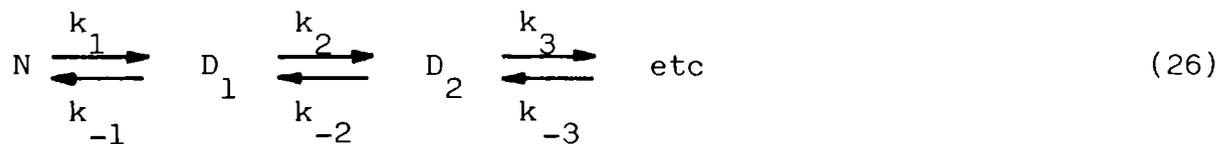


Las diferentes formas de la proteína sufren desnaturalización con las distintas constantes de velocidad  $k_1, k_2, \dots, k_n$ , siguiendo una cinética respecto al tiempo del tipo:

$$\begin{aligned}
 D = & N_1^0 (1 - e^{-k_1 t}) + N_2^0 (1 - e^{-k_2 t}) + \dots \\
 & \dots + N_n^0 (1 - e^{-k_n t})
 \end{aligned} \tag{25}$$

donde  $D$  es la concentración del producto desnaturalizado al tiempo  $t$  y  $N_1^0, N_2^0, \dots, N_n^0$  son las concentraciones iniciales de cada especie  $N_1, N_2, \dots, N_n$ .

d) la posibilidad final es probablemente una de las que tiene aplicabilidad en un mayor número de casos. La proteína se desnaturaliza a través de una serie de etapas consecutivas:



Este esquema tiene un número de variantes posibles, las cuales conducen todas al mismo resultado: que el orden respecto al tiempo sea mayor que la unidad, mientras que el orden respecto a la concentración sea igual a uno. Una de las variantes más simples es el caso en el cual una forma nativa  $N$  pasa a la forma desnaturalizada  $D$ , pasando por una especie molecular  $X$  que posee propiedades intermedias entre  $N$  y  $D$ , de lo que resulta la reacción siguiente:



Si se efectúa la medición de alguna propiedad  $Y$  en función del tiempo  $t$ , el análisis cinético de este sistema nos conduce a una ecuación que involucra términos exponenciales:

$$Y = Y_0 + Y_1 e^{-\gamma_1 t} + Y_2 e^{-\gamma_2 t} \quad (28)$$

donde  $Y_0$ ,  $Y_1$ ,  $Y_2$  son constantes y  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  son también constantes que dependen de los valores  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_{-1}$  y  $k_{-2}$ .

Decidir entre las cuatro posibilidades expuestas dentro del tipo II, no es fácil, ya que cualquiera de ellas es igualmente probable. Sin embargo, por el hecho de que es una única especie nativa, la molécula de miosina, la que sufre el proceso de desnaturalización, o lo que es lo mismo, que en el músculo fresco, la miosina se encuentra en un único estado nativo, descartamos la posibilidad c); y aunque no poseemos pruebas que descarten las posibilidades a) y b), nos inclinamos a pensar que miosina sigue una cinética del tipo II d) por haber encontrado que la disminución de su actividad enzimática responde a una expresión similar a la ecuación (28).

De esta manera, en una primera aproximación, miosina se desnaturalizaría durante el almacenamiento en dos pasos consecutivos según la reacción:



donde  $M$  es la forma nativa,  $M_{D1}$  es un estado desnaturalizado de la molécula de miosina, que conserva aunque modificada su capacidad ATPásica y su interacción con actina, en tanto  $M_{D2}$  es un estado más avanzado de desnaturalización de miosina, que incluye la pérdida de actividad ATPásica y de afinidad con actina, hasta un valor mínimo residual (en la Figura 17 se observa que la actividad ATPásica miofibrilar- $\text{Ca}^{2+}$  tiende a un mínimo a largos períodos de almacenamiento). La prueba de que existe un estado intermedio más en la desnaturalización de miosina, está en el hecho que de ocurrir dicho fenómeno en un único paso (miosina nativa a miosina desnaturalizada), la cinética de la disminución de actividad ATPásica debería haber respondido a una única reacción de primer orden, según una expresión del tipo  $Y = Y_0 + Y_1 e^{-kt}$  (30), la cual no cumple con

los resultados experimentales obtenidos. Respecto al estado  $M_{D2}$ , es el de mayor capacidad de agregación de las moléculas de miosina, para formar agregados insolubles, con la consecuente pérdida de solubilidad miofibrilar. Quizás sea este mismo fenómeno de agregación, el que estabilice a las moléculas  $M_{D2}$  (de allí su valor mínimo residual de actividad ATPásica y de entalpía de desnaturación térmica  $\Delta H$ ), otorgándoles una mayor resistencia a la desnaturación.

Si comparamos la desnaturación de miosina durante el almacenamiento congelado del músculo, con la correspondiente a temperaturas superiores a  $-1^{\circ}\text{C}$  (desnaturación por calor), llegamos a la conclusión de que a ambos rangos de temperatura se sigue un mismo mecanismo. Según los resultados del estudio de la cinética de desnaturación térmica de las proteínas miofibrilares (Apendice I) y los datos recopilados por Ziegler y Acton (1984), los cambios conformacionales en la molécula de miosina por efecto del calor, responden a las siguientes características: a) desnaturación en etapas, b) cinética de primer orden, c) la alteración de la zona de la cabeza de miosina ocurre antes y a mayor velocidad que la de la cola, d) la desnaturación implica desplegamiento y disociación de las cadenas pesadas y livianas de miosina, e) los agregados de miosina se forman a través de sus colas desnaturizadas, f) la agregación es secuenciada: primero uniones hidrógeno y salinas, luego interacciones hidrofóbicas y finalmente puentes disulfuro y g) los filamentos gruesos de miosina son más sensibles que los filamentos finos de actina y proteínas menores. En base a la similitud que estos cambios tienen con los observados durante el almacenamiento congelado, podríamos suponer que se trata del mismo efecto térmico a dos rangos de temperatura distintos. Si fuera así, las constantes de velocidad  $k_d$  de desnaturación de miosina a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$ , deberían tomar como máximo los valores  $7.1 \times 10^{-3}$ ,  $1.0 \times 10^{-3}$  y  $1.7 \times 10^{-5}$  semanas<sup>-1</sup> respectivamente (valores calculados a partir de la tabla 14) y la energía de activación  $E_a$  estar en el orden de 50-60 Kcal/mol (Apéndice I). Sin embargo, como se muestra en la Figura 28, la desnaturación responde a un sistema bifásico, en el cual por debajo de  $-1^{\circ}\text{C}$  (estado congelado) los valores de  $E_a$  son menores (8-10 Kcal/mol), y los valores de  $k_d$  son mayores a los esperados

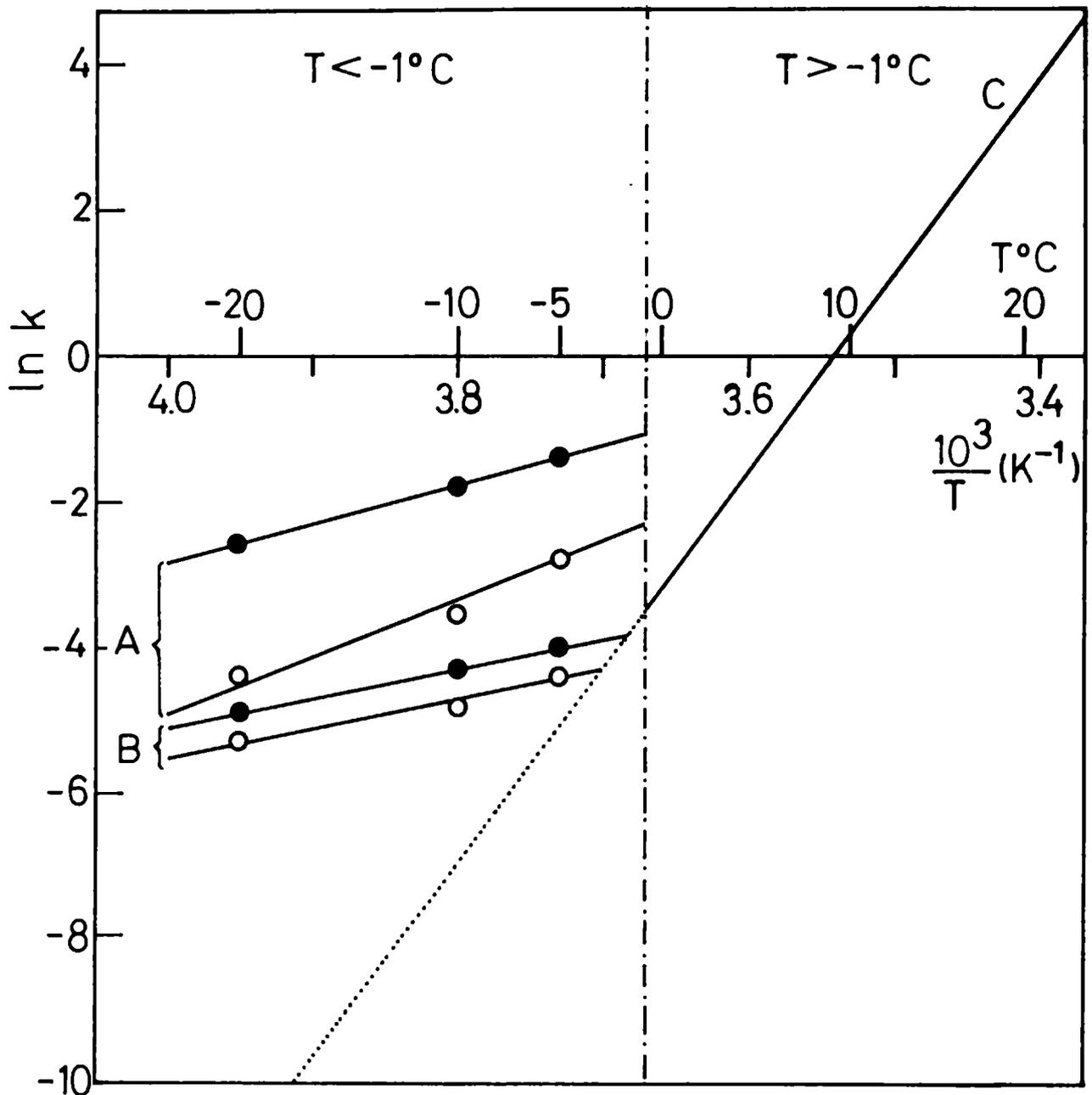


Figura 28: Representación gráfica de la desnaturalización bifásica de la cabeza de miosina, por efecto térmico (c) y por efecto del estado congelado (A y B, primera y segunda etapa de almacenamiento respectivamente), para músculo bovino congelado a velocidad rápida (●) y lenta (○). La línea punteada (.....) indica la contribución del efecto térmico en el estado congelado. La energía de activación  $E_a$  del proceso de desnaturalización (calculadas a partir de las pendientes de las rectas), son: (A)  $E_a \approx 10.5$  Kcal/mol, (B)  $E_a \approx 8$  Kcal/mol y (C)  $E_a = 54.5$  Kcal/mol.  $k$  = constante de velocidad ( $\text{min}^{-1}$ ).

si la desnaturalización se debiera solamente al efecto térmico (línea punteada). Estas alteraciones en los valores cinéticos, se deben a la menor influencia de la temperatura al verse incrementado el efecto desnaturalizante del ambiente miofibrilar en el músculo congelado (formación de hielo y aumento de la fuerza iónica). Esto explicaría el porqué las proteínas de músculos bovino y de bacalao, no son dañadas cuando éstos son subenfriados sin formación de hielo por debajo de  $-2^{\circ}\text{C}$  (las kd caerían en la línea punteada) y sin embargo se obtiene la máxima velocidad de insolubilización proteica cuando se congela a  $-3^{\circ}\text{C}$  (trabajos de Moran, 1926; Love, 1962; Love y Elerian, 1964; informados por Fennema et al, 1973). En la misma Figura 28, como era de esperar, se ve que los valores  $\Delta kd$  (diferencias entre los valores kd de congelación y subenfriamiento a una misma temperatura) son mayores para la primer etapa de almacenamiento y a menores temperaturas subcero.

#### 4.6.2 Cinética de Insolubilización

Para estimar la cinética de insolubilización de las proteínas miofibrilares del músculo bovino durante el almacenamiento congelado, se graficó el logaritmo natural del porcentaje de miofibrillas solubles (respecto al músculo fresco) en función del tiempo, suponiendo una cinética de primer orden (Figura 29). Por cuadrados mínimos se obtuvieron dos rectas para cada temperatura y velocidad de congelación, lo cual sugiere un proceso en dos etapas de orden uno: una etapa inicial de aproximadamente 13 semanas, donde la solubilidad permanece casi constante ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) o disminuye lentamente ( $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ ); y una etapa rápida posterior. Los valores de las constantes de velocidad en esta segunda etapa, surgidos de las pendientes de las rectas, fueron: con la congelación rápida,  $k$ : 0.043, 0.042 y 0.012 semanas<sup>-1</sup>, y con la congelación lenta,  $k$ : 0.042, 0.041 y 0.014 semanas<sup>-1</sup> para  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  respectivamente.

Aplicando la ecuación de Arrhenius (20) a los valores de  $k$  hallados, estimamos las energías de activación de insolubilización miofibrilar con el almacenamiento congelado, dando los valores  $E_a$ : 12.6 y 10.5 Kcal/mol, que corresponden a  $Q_{10}$  ( $-20^{\circ}\text{C}$ ): 2.6 y 2.2 para congelación rápida y lenta respectiva

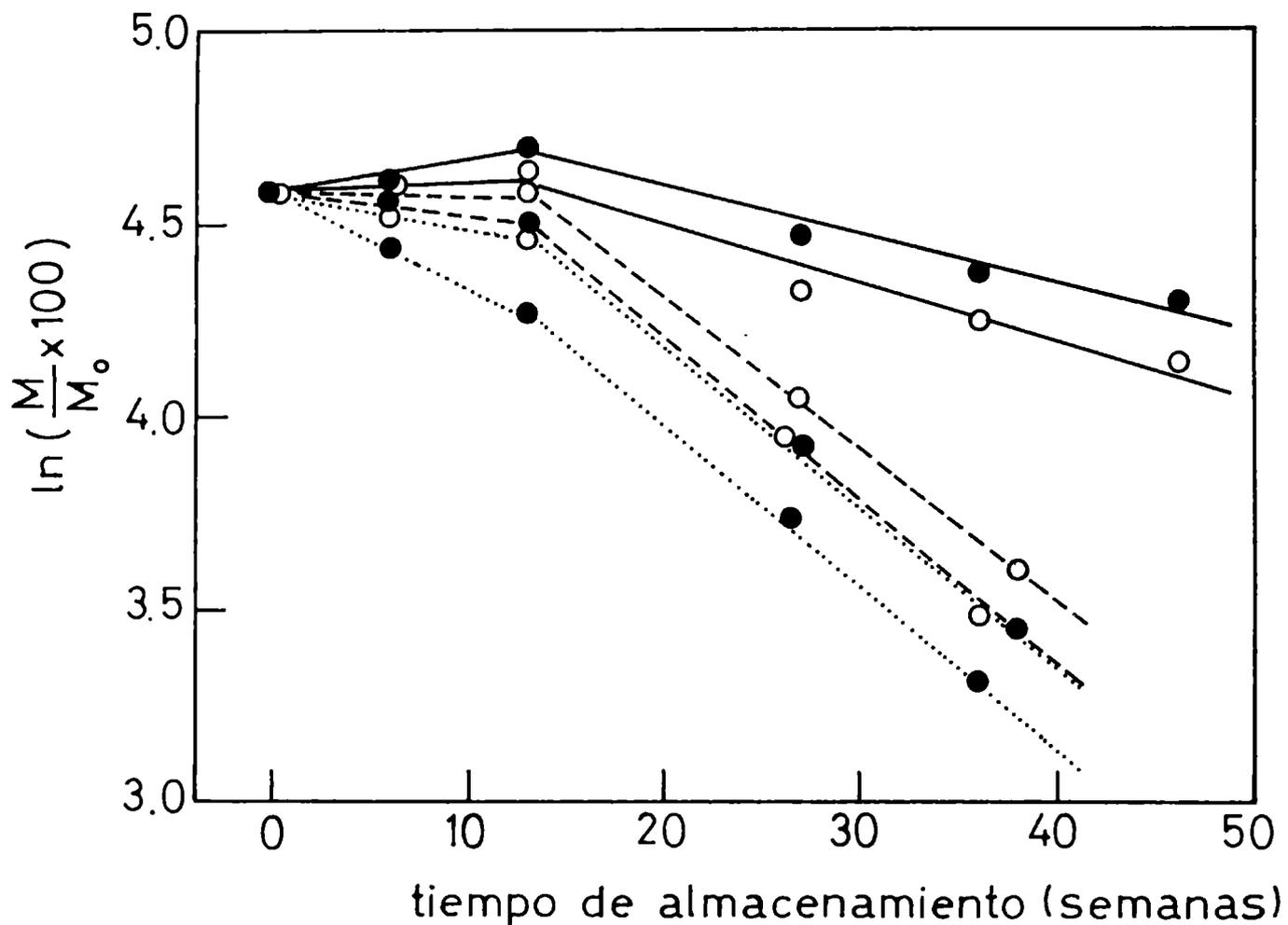


Figura 29: Estimación de la cinética de insolubilización de miofibrillas con el tiempo de almacenamiento a  $-5^{\circ}\text{C}$  (.....),  $-10^{\circ}\text{C}$  (-----) y  $-20^{\circ}\text{C}$  (—); para congelación rápida (●) y lenta (○).  $M_0$  y  $M$  son respectivamente las solubilidades de miofibrillas aisladas de músculo fresco y almacenado en estado congelado. Cada valor es el promedio de un mínimo de cuatro ensayos. Máxima desviación standard: 0.1.

mente. Es decir entonces que en esta segunda etapa de almacenamiento, la velocidad de insolubilización de las proteínas miofibrilares es a  $-10^{\circ}\text{C}$  más del doble que a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Debido a que tanto los valores de  $E_a$  como de  $k$  son semejantes para velocidad rápida y lenta, no es justamente en la segunda etapa, donde más pesa la velocidad de congelación, sino en la primera, en la cual el músculo después de congelado, inicia su proceso de almacenamiento. Como se puede ver en la Figura 29 para músculo congelado rápidamente, en las 13 semanas iniciales, la solubilidad miofibrilar es altamente dependiente de la temperatura, en tanto que para los congelados lentos lo es en menor grado. Basándonos en los valores aproximados de las constantes de velocidad, calculamos estimativamente una  $E_a$  superior a 30 Kcal/mol para ambas velocidades de congelación, que representa un  $Q_{10}(-20^{\circ}\text{C}) > 9$ . Es evidente entonces que esta primer etapa es crítica y de mayor resistencia a la insolubilización.

Habíamos mencionado anteriormente que la solubilidad miofibrilar era un parámetro relacionado con las características texturales del músculo. Esta relación queda claramente confirmada si comparamos las constantes cinéticas de la insolubilización miofibrilar para el almacenamiento congelado del músculo bovino, con datos obtenidos por evaluación organoléptica de la calidad y estabilidad de carnes congeladas. Por un lado, los gráficos de vida útil de carne comercialmente envasada (Labuza, 1982) dan para el caso de cortes de carne vacuna congelada, una  $E_a = 10.31$  Kcal/mol y un  $Q_{10} = 2.18$ , que coinciden con los hallados para la insolubilización de miofibrillas. Los mismos gráficos muestran los tiempos de vida útil a cada temperatura de almacenamiento: a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  son aproximadamente de 4, 6 y 13 meses. Por su parte, Jul (1969) también aporta datos sobre estabilidad de carne en estado congelado, en los conocidos gráficos TTT (time-temperature tolerance) que dan la vida útil de almacenamiento, estimada empíricamente en base a la experiencia práctica. Según estos gráficos, la carne bovina tendría una vida útil de 16;20 y 43 semanas a  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-20^{\circ}\text{C}$  respectivamente (valores que corresponden también a un  $Q_{10} \approx 2$ ). Si observamos la Figura 22, notamos que justamente a esos tiempos de almace-

miento, la solubilidad miofibrilar relativa alcanza el mismo valor medio (entre congelado rápido y lento) de 72%; de esta manera, la disminución de la solubilidad de miofibrillas se podría tomar como índice de calidad en carnes congeladas.

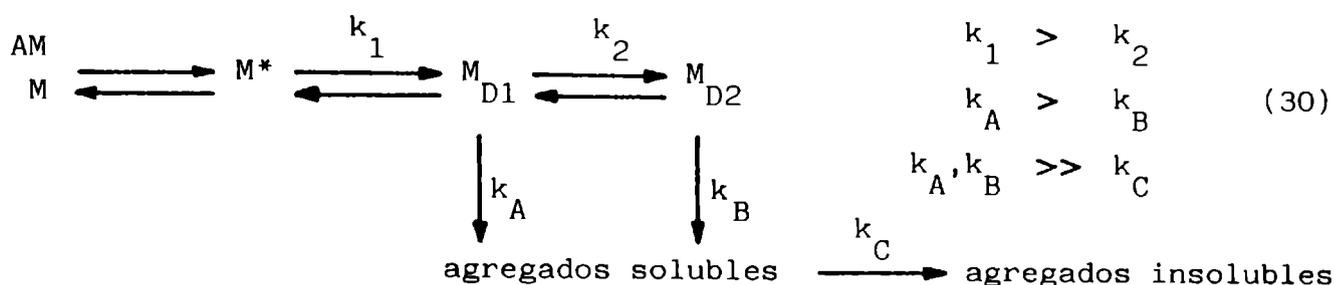
#### 4.6.3 Mecanismo de deterioro

Si relacionamos los resultados de las dos cinéticas estudiadas: la de desnaturalización y la de insolubilización de miofibrillas, podemos llegar a tener una idea del posible mecanismo de deterioro proteico en el músculo congelado-almacenado.

Según la reacción de desnaturalización, se llega a un estado  $M_{D2}$  de la molécula de miosina, capaz de sufrir agregación. Las moléculas  $M_{D1}$  también pueden formar agregados, pero a una velocidad de agregación menor que  $M_{D2}$ , por ser éste el estado de mayor desenrollamiento de la zona de la cola. Es probable que en la primer etapa de insolubilización, predominen las moléculas  $M_{D1}$ , por lo que resulta una elevada energía de activación (mayor resistencia a la agregación) y en la segunda etapa más rápida, intervengan las moléculas  $M_{D2}$ , favoreciéndose las reacciones de agregación y lentificándose las de desnaturalización.

Hay dos hechos que se deben tener en cuenta: 1º) que la desnaturalización no se inicia con el almacenamiento, sino con la congelación y 2º) que agregación e insolubilización no son el mismo fenómeno; la insolubilización de proteínas es posterior a la agregación. En un principio hay formación de agregados solubles y luego se hacen insolubles. A esto se debe que la cinética de insolubilización sea de primer orden (cada agregado soluble actúa como una única macromolécula que pasa a un estado insoluble, a una velocidad inferior a la de agregación).

Un esquema hipotético del mecanismo de desnaturalización-agregación de miosina, que conduce a la insolubilización de las miofibrillas durante el almacenamiento congelado de músculo bovino, sería el siguiente:



Congelación

Almacenamiento congelado

desnaturalización  
de la cabeza de  
miosina

etapa rápida de  
desnaturalización  
de cola y cabeza  
de miosina

etapa lenta de desnaturalización  
de cola y cabeza de miosina

No hay  
insolubilización

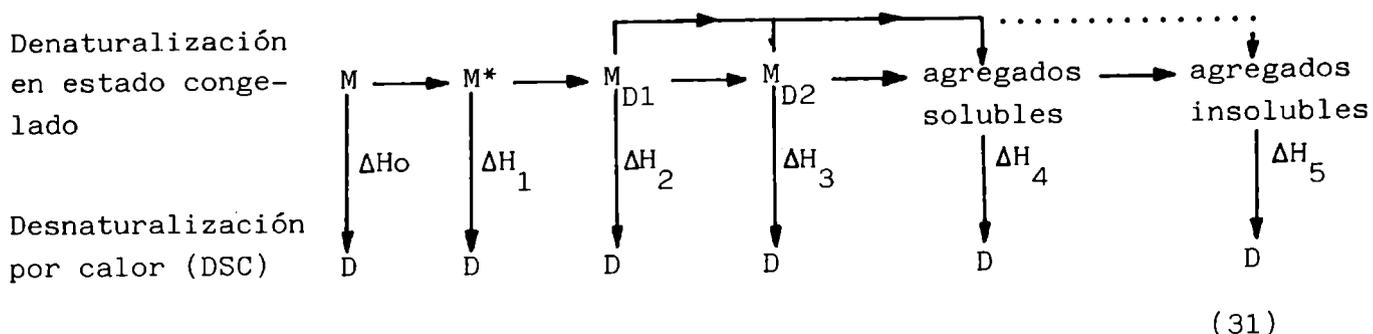
etapa lenta de  
insolubilización  
(resistente a la  
agregación)

etapa rápida de insolubilización  
(propicia para la agregación)

En este esquema el almacenamiento se inicia con parte de las moléculas de miosina, desnaturalizadas previamente en el proceso de congelación. La especie  $M^*$  corresponde entonces a miosina desnaturalizada en la zona de su cabeza, proveniente tanto de la disociación de moléculas de actomiosina como de miosina libre. Las líneas punteadas no demarcan límites precisos de tiempo, sino que dan una idea de los procesos predominantes durante dos etapas bien definidas del almacenamiento: una primer etapa, donde por no haberse alcanzado aún un grado avanzado de desnaturalización, la agregación es incipiente y una segunda etapa en la cual ya casi concluída la desnaturalización, se propicia la formación de agregados.

Este posible mecanismo de desnaturalización-agregación de proteínas miofibrilares nos puede ser útil para comprender desde un punto de vista diferente, los resultados del estudio DSC de las proteínas miofibrilares del músculo bovino.

Empleando el mismo esquema, el  $\Delta H$  total resulta ser la suma del calor absorbido en las transiciones térmicas de cada especie proteica, para pasar al estado térmicamente desnaturalizado:



Donde D es el estado desnaturalizado por calor, y  $\Delta H_i$  son las entalpías de desnaturalización térmica de las miofibrillas en los sucesivos estados de alteración (determinados por el estado de la molécula de miosina) que contribuyen al valor de la entalpía total  $\Delta H$ ; la cual puede expresarse como:

$$\Delta H = \sum_i X_i \Delta H_i \quad (32)$$
, donde  $X_i$  es la fracción con la que contribuye cada especie al peso total de la muestra.

A medida que progresamos en el tiempo de almacenamiento,  $\Delta H$  toma valores cada vez menores, tendiendo a un valor mínimo constante mayor que cero. Para que esto se cumpla, los valores  $\Delta H_i$  tienen necesariamente que cumplir la siguiente condición:

$$\Delta H_0 > \Delta H_1 > \Delta H_2 > \Delta H_3 > \Delta H_4 \gg \Delta H_5 \quad (33)$$

Basándonos en la solubilidad de las miofibrillas (determinada por la solubilidad de sus especies proteicas), los términos  $\Delta H_i$  se pueden agrupar de la siguiente manera:

$$\Delta H = X_S \Delta \bar{H}_S + X_I \Delta H_I \quad (34)$$

con,  $X_S$  y  $X_I$ , las fracciones de proteínas miofibrilares solubles e insolubles; y  $\Delta \bar{H}_S$  y  $\Delta H_I$  sus entalpías respectivas, que resultan ser:

$$\Delta \bar{H}_S = \frac{X_0 \Delta H_0 + X_1 \Delta H_1 + \dots + X_4 \Delta H_4}{X_0 + X_1 + \dots + X_4} \quad (35)$$

$$\Delta H_I = \Delta H_5 \quad (36)$$

Si fuera posible llegar a un estado de total desnaturalización por efecto del almacenamiento congelado, el término correspondiente a las miofibrillas insolubles  $\Delta H_5$  debería estar cercano a cero. Sin embargo los resultados muestran que las miofibrillas aún en estados avanzados de insolubilidad, el valor  $\Delta H$  es todavía superior a 1 cal/g. Para confirmar este resultado se realizaron corridas DSC sobre miofibrillas insolubles (obtenidas como un residuo insoluble en la determinación de la solubilidad miofibrillar) dando termogramas de 3 picos, igual que para las miofibrillas nativas pero con menores valores  $T_{max}$  en cada transición. Si bien todas las miofibrillas estudiadas eran insolubles en la misma solución (0.6M KCl, 0.03M Tris-HCl pH 7.6) y bajo idénticas condiciones de ensayo, no todas dieron el mismo valor  $\Delta H_I$ . En la Tabla 11 figuran algunos de estos valores de entalpía, determinados sobre miofibrillas insolubles provenientes de músculos almacenados en estado congelado durante diferentes períodos de tiempo. Como era de esperar,  $\Delta H_I$  es inferior en todos los casos al  $\Delta H$  total, cubriendo un rango de valores desde 3.60 a 1.30 cal/g (valor mínimo alcanzado). Este último valor  $\Delta H_I$  corresponde a miofibrillas insolubles aisladas de músculo almacenado 9 meses a  $-10^\circ\text{C}$  y luego conservadas en un freezer a  $-60^\circ\text{C}$  durante 2 meses aproximadamente. Es decir que aún llevando a las miofibrillas a un estado de extrema agregación (un único coágulo insoluble en solución 0.6M KCl, resistente y no suspendible), conserva aún una estructura capaz de modificarse por efecto térmico. Los distintos valores  $\Delta H_I$ , sugieren que las miofibrillas insolubles están integradas por proteínas en distinto grado de desnaturalización y agregación, lo cual responde al esquema propuesto. Es posible que  $\Delta H_4$  (correspondiente a agregados solubles) presente el mismo comportamiento.

Volviendo a la expresión de  $\Delta H$ , podemos ahora formularla con términos de solubilidad miofibrilar según la expresión:

$$\Delta H = \frac{\% M_S}{100} \Delta H_S + \left(1 - \frac{\% M_S}{100}\right) \Delta H_I \quad (37)$$

ya que  $100 - \% M_S = \% M_I$ . Conociendo para distintos tiempos, los términos  $\Delta H$ ,

$\Delta H_I$  y %  $M_S$ , se pudieron calcular estimativamente los valores  $\Delta H_S$  a diferentes tiempos de almacenamiento.

Tabla 11: Entalpía de desnaturalización térmica de miofibrillas insolubles en solución 0.6 M KCl, 0.03 M Tris-HCl pH 7.6, aisladas de músculo bovino almacenado en estado congelado.

Tiempo de almacenamiento del músculo a $-5^{\circ}\text{C}$ (semanas)	Tiempo de conservación de las miofibrillas insolubles en freezer (semanas) a $-60^{\circ}\text{C}$	$\Delta H_I$ (cal/g)
0	0	3.60 $\pm$ 0.12
2	0	3.10 $\pm$ 0.14
5	0	2.85 $\pm$ 0.10
8	0	2.81 $\pm$ 0.10
24	0	2.73 $\pm$ 0.15
36	0	2.65 $\pm$ 0.16
0	5	2.60 $\pm$ 0.40
2	9	1.94 $\pm$ 0.08
5	9	1.60 $\pm$ 0.30
38	9	1.30 $\pm$ 0.10

Son valores medios entre congelados rápidos y lentos, resultantes de un número mínimo de 2 ensayos.

Condiciones de corridas DSC: solución Ringer a pH 5.6; velocidad de calentamiento  $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

En la Figura 30 se observa la caída del  $\Delta H$  total como consecuencia de la disminución tanto del término  $\Delta H_I$  así como de  $\Delta H_S$ , a lo cual se suma una mayor contribución con el tiempo del término de menor entalpía, por aumento de las miofibrillas insolubles. También se puede ver que a tiempos suficientemente

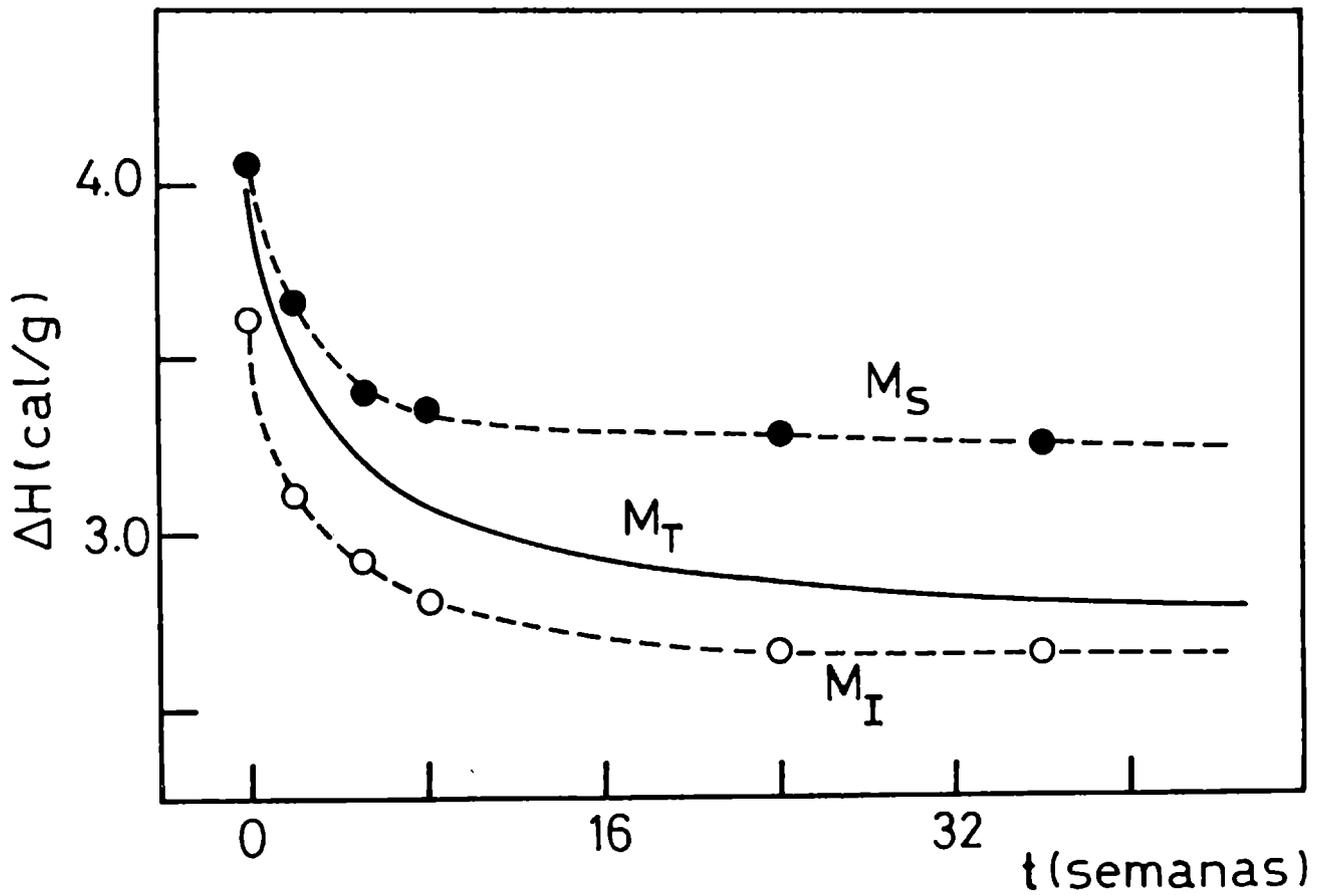


Figura 30: Variación de la entalpía  $\Delta H$  de desnaturalización térmica con el tiempo de almacenamiento congelado del músculo; para miofibrillas solubles ( $M_S$ ), insolubles ( $M_I$ ) y totales ( $M_T$ ).

prolongados, el  $\Delta H$  se acerca al valor  $\Delta H_I$  (cuando %  $M_S \longrightarrow 0$ ), debido a lo cual se llega a un valor mínimo y casi constante.

#### 4.7 Efectos globales del almacenamiento congelado sobre la desnaturalización y agregación proteica

El estudio del efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento en estado congelado, sobre las propiedades del músculo bovino, dió como resultado fundamental el conocimiento del deterioro proteico del músculo a temperaturas sub-cero, el cual incluye dos procesos simultáneos diferentes: a) desnaturalización y b) agregación de las proteínas miofibrilares. Ambos procesos se complementan para conducir a éstas a estados sucesivos de menor solubilidad.

Por medio del estudio sobre la actividad ATPásica miofibrilar en presencia de  $Ca^{2+}$ , encontramos que la desnaturalización de la cabeza de miosina, iniciada con la congelación del músculo (Figura 5), continúa durante el almacenamiento (Figura 17). Los estudios calorimétricos nos mostraron que en el almacenamiento, además de la alteración de la cabeza, se inicia la desnaturalización de la cola de miosina, zona fibrosa no afectada por la congelación (Figuras 9, 14 y 16; Tabla 4). El conjunto formado por actina y proteínas menores (filamento fino) resultó ser comparativamente el más resistente al efecto de la congelación y el almacenamiento congelado (Figuras 9, 14 y 16; Tabla 4).

La actividad ATPásica y la entalpía  $\Delta H$  de las transiciones térmicas de las miofibrillas seguían una cinética similar con el tiempo, lo que significa que se está evaluando un mismo fenómeno: la desnaturalización de miosina. Así lo muestra la correlación lineal existente entre la actividad ATPásica -  $Ca^{2+}$  y el área específica del pico I (Figura 31).

Por otro lado, los valores de actividad ATPásica miofibrilar en presencia de  $Mg^{2+}$ , así como los estudios con electroforesis en geles de poliacrilamida de las proteínas miofibrilares, revelaron modificaciones en la interacción actina-miosina con el proceso de congelación-almacenamiento (Figuras 17, 18 y 20). La velocidad de los cambios en la molécula de miosina era función de la temperatura de almacenamiento (a mayor temperatura, mayor

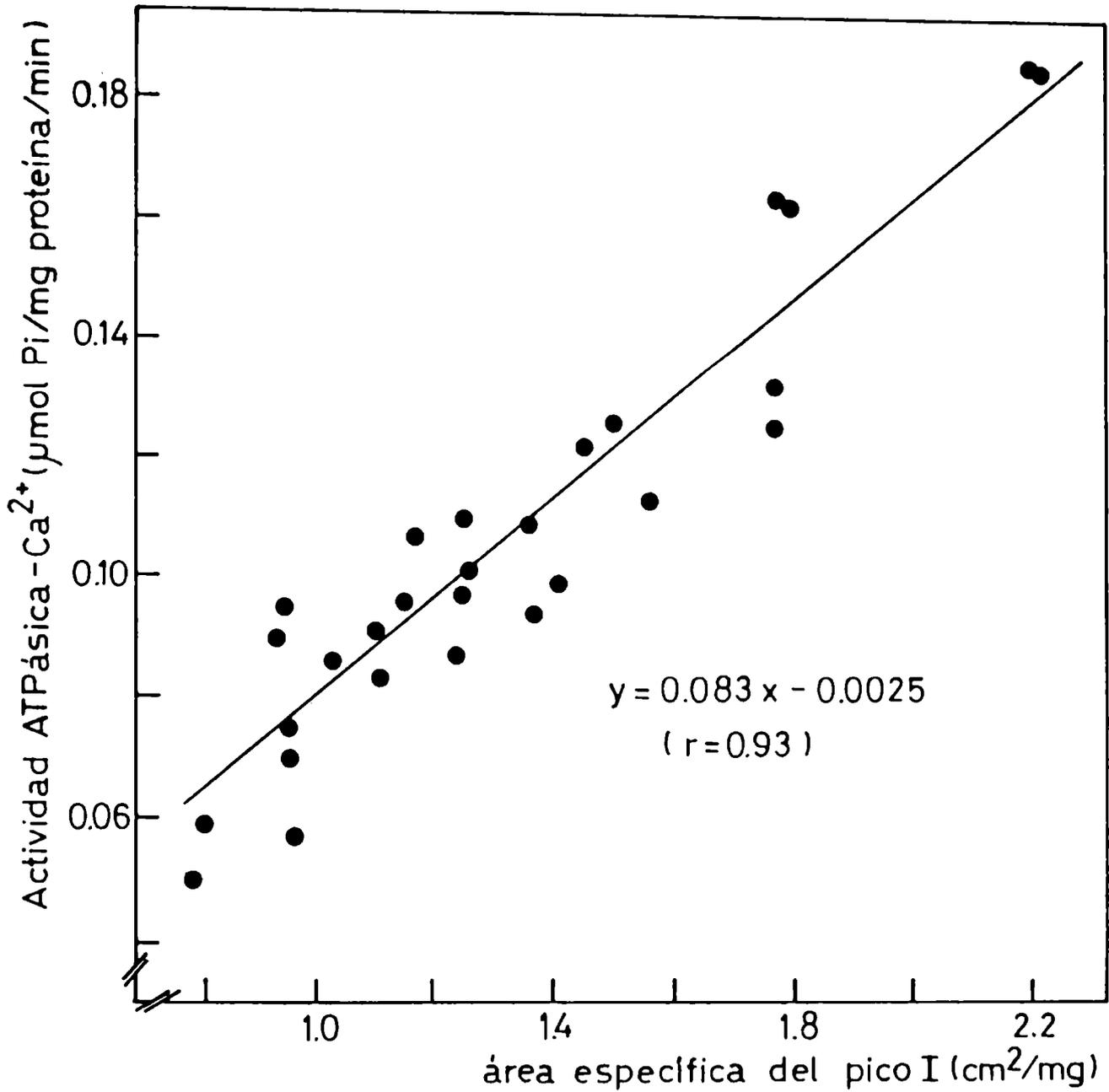


Figura 31: Correlación entre la actividad ATPásica miofibrilar en presencia de Ca<sup>2+</sup> y el área específica del pico I en los termogramas DSC de desnaturalización térmica, para músculos almacenados a -5°C, -10°C y -20°C.

velocidad de desnaturalización), principalmente en los ocurridos a nivel de la cola de miosina (Figura 16), observando además una influencia de la velocidad de congelación a la cual se congeló el músculo previamente a su almacenamiento.

La solubilidad y la viscosidad de las miofibrillas, son dos propiedades que se modifican recién después de un período de almacenamiento (Figuras 22 y 23). Este resultado sugiere que la desnaturalización de la cola de miosina es un requisito para la agregación miofibrilar. Las Figuras 22 y 29 muestran que en la variación de la solubilidad miofibrilar con el tiempo de almacenamiento, hay inicialmente un período de latencia o inducción (de aproximadamente 13 semanas) donde la solubilidad aumenta levemente o permanece casi constante ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) o decrece lentamente con el tiempo ( $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-5^{\circ}\text{C}$ ), seguido por una etapa de rápida insolubilización, a las tres temperaturas de almacenamiento estudiadas. Si consideramos a la pérdida de solubilidad como la consecuencia de la formación de agregados, específicamente de miofibrillas, debemos suponer que en la primer etapa de insolubilización hay resistencia a la agregación. Esta primer etapa de latencia también se observó con la viscosidad reducida y la capacidad de absorción de agua de las miofibrillas (Figuras 23 y 26), debiendo inferir entonces que la disminución de estos parámetros tiene su principal causa en la agregación proteica.

Tanto la actividad ATPásica miofibrilar como la entalpía  $\Delta H$  (ambos valores indicativos de desnaturalización de proteínas), seguían también un proceso en dos etapas con el tiempo de almacenamiento, pero a la inversa que en la insolubilización: había una etapa inicial de mayor velocidad de desnaturalización (con una duración de 4 a 13 semanas) y una etapa lenta posterior. Esto conduce a la idea de que la desnaturalización de las moléculas proteicas es previa a la formación de agregados (resultado coincidente con los informes de Anglemier y Montgomery, 1976, y Ziegler y Acton, 1984). Tanto el número de moléculas proteicas desnaturalizadas como el grado de desnaturalización alcanzado por las mismas, tienen que superar un determinado valor para que la agregación se inicie en forma efectiva. Una vez alcanzado dicho valor, la

velocidad de agregación y en consecuencia la de insolubilización proteica, quedan regidas fundamentalmente por la temperatura de almacenamiento. Una ilustración de este fenómeno se ve con claridad en la Figura 32, que expresa la correlación exponencial existente entre la solubilidad y la actividad ATPásica de las miofibrillas. La solubilidad miofibrilar recién comienza a decrecer después que la actividad ATPásica en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  alcanza respectivamente cerca del 58% y 70% del valor en músculo fresco.

En ambas etapas iniciales (de insolubilización y de desnaturalización) se observó una mayor influencia de la velocidad de congelación (Figuras 27 y 29), ya que según suponemos es durante este período, donde la recristalización del hielo, se manifiesta de manera diferente según sean los congelados, rápidos o lentos.

Vimos que la viscosidad y la capacidad de hidratación de las miofibrillas, tienden a aumentar levemente o a mantenerse constantes, durante las primeras 13 semanas a las tres temperaturas de almacenamiento (Figuras 23 y 26), sin embargo se registran pérdidas importantes en la solubilidad miofibrilar a  $-10^{\circ}\text{C}$  y  $-5^{\circ}\text{C}$  (Figura 22). Esto indica que en la formación de agregados insolubles en esta primera etapa, intervienen pocas uniones intermoleculares, de manera que el comportamiento reológico y la hidratación no se ven disminuidos. Después del período inicial de almacenamiento, los agregados ya formados se compactan y liberan el agua ocluída, por incluir en su estructura un alto número de uniones. Esto conduce a la modificación de las propiedades reológicas y del hinchamiento de las miofibrillas, con lo cual se entra en la segunda etapa de insolubilización. La degradación de miosina y actina, al final del almacenamiento a  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$ , indicada por la disminución de los picos correspondientes en los densitogramas electroforéticos (Figura 19), contribuye también al decrecimiento de los parámetros mencionados.

Los resultados obtenidos con geles de poliacrilamida (Figura 18 y 20), nos aportaron además información respecto del tipo de uniones involucradas en la formación de agregados solubles e insolubles. Como ya dijimos, el

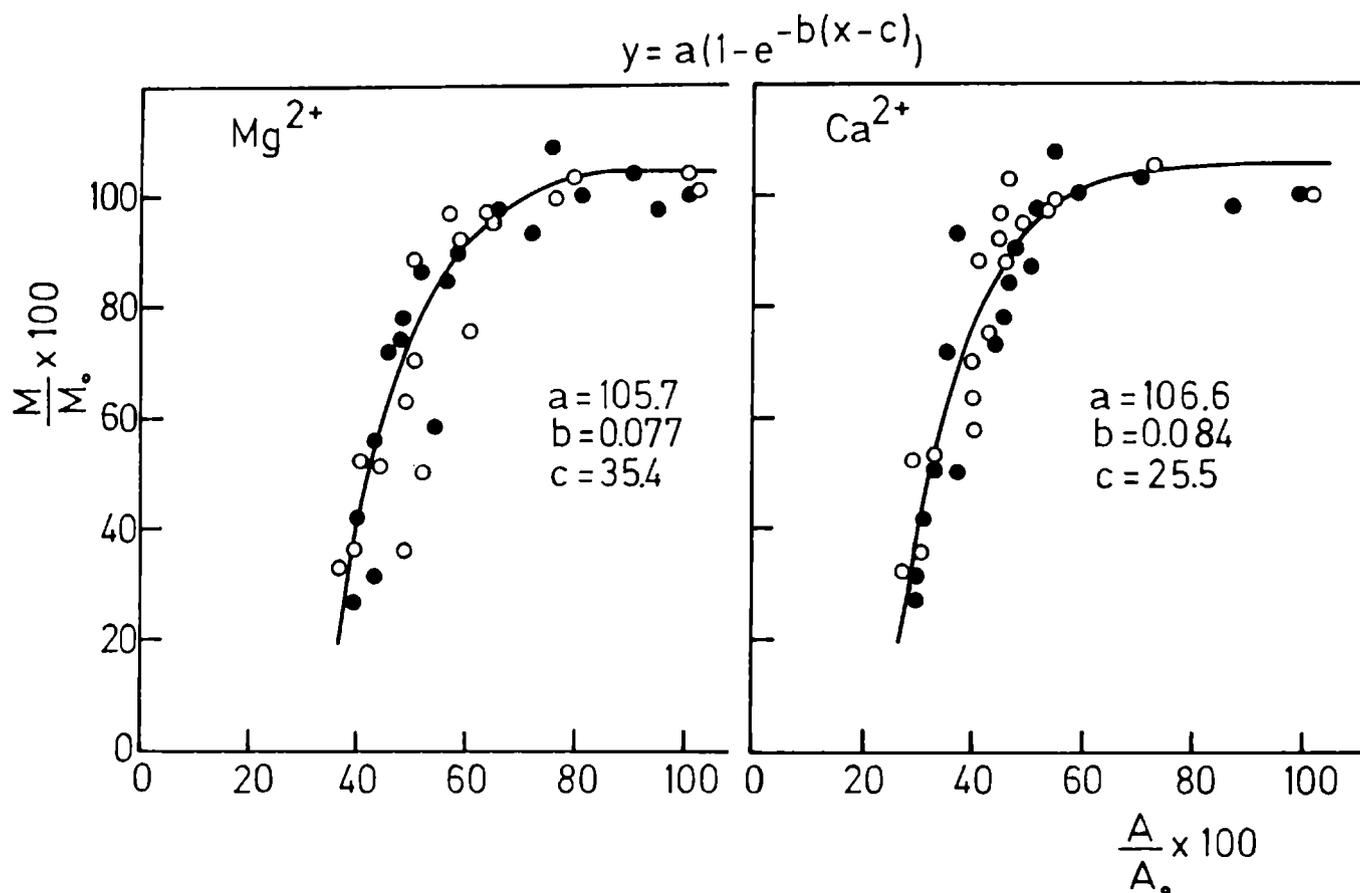


Figura 32: Relación entre la solubilidad miofibrilar ( $\frac{M}{M_o} \times 100$ ) y la actividad ATPásica miofibrilar ( $\frac{A}{A_o} \times 100$ ) en presencia de Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup>; para congelación rápida (●) y lenta (○). Cada valor es la media de un mínimo de cuatro determinaciones.

primer cambio observado en el almacenamiento, es el aumento de afinidad en la interacción actina-miosina (que coincide con la recuperación de actividad ATPásica -  $Mg^{2+}$  (Figura 17)). En adición a este fenómeno, se produce la formación de agregados, probablemente integrados por actomiosina, miosina y/o actina, a través de uniones no covalentes (del tipo de uniones hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) y más tardíamente, por medio de puentes disulfuro (únicamente a  $-10^{\circ}C$  y  $-5^{\circ}C$ ). Otros autores informaron resultados similares respecto a la formación de agregados durante el almacenamiento congelado de músculo de pescado (King, 1966; Connell, 1968 y Matsumoto, 1979, 1980). De acuerdo a Matsumoto (1980), la agregación es causada por la formación progresiva de uniones hidrógeno e iónicas, interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro entre las proteínas musculares.

Relacionando el comportamiento de los distintos parámetros analizados, se obtiene información adicional respecto al mecanismo de desnaturalización y agregación de las proteínas miofibrilares durante la congelación y el almacenamiento.

Así, sabemos ahora que la desnaturalización se inicia con un desenrollamiento en la zona globular de miosina acompañado por la disociación de las cadenas pesadas y livianas. A estas alteraciones se va sumando el desplegamiento progresivo de la cola de miosina; fenómeno que propicia la formación de agregados de miofibrillas. De esta manera, observamos un período inicial del almacenamiento durante el cual la agregación es incipiente (agregados solubles, que conservan las características reológicas de las proteínas no agregadas) y un período posterior, de rápida agregación de las cadenas disociadas y con un alto grado de desnaturalización (pérdida de solubilidad, viscosidad y capacidad de retención de agua).

En el transcurso de la primer etapa del almacenamiento congelado, aumenta considerablemente el número de moléculas libres de miosina desnaturalizadas, especialmente a  $-20^{\circ}C$ , temperatura a la cual la velocidad de agregación es baja. Debido a que la desnaturalización se extiende hasta la cola (zona de interacción de las moléculas de miosina en los filamentos gruesos),

hay un leve aumento de la capacidad de retención de agua, al aumentar el es pacio que puede incluir agua en la matriz proteica. Además, el desplegamiento de la cola, involucra la ruptura de uniones hidrógeno intracatenarias y la formación de nuevas uniones hidrógeno con agua ( $P-H \dots H_2O$ ). Esto explicaría también el aumento de solubilidad miofibrilar inicial (observable a  $-20^\circ C$ ), la rápida disminución de la entalpía de desnaturalización térmica y el leve incremento de la viscosidad reducida. Esta propiedad, además de depender del volumen hidrodinámico, está directamente relacionada con la asimetría y con el tamaño molecular; de modo que los agregados formados en el transcurso de esta primer etapa, conservan aún un alto grado de asimetría.

El proceso de agregación miofibrilar, basado fundamentalmente en interacciones miosina-miosina, miosina-actina y/o actina-actina; implicaría la formación de uniones hidrógeno intercatenarias, con la consecuente dis mi nu ción de uniones hidrógeno proteína-agua ( $2 P-H \dots H_2O \longrightarrow P-H \dots H-P + 2 H_2O$ ). La pérdida de interacción entre las proteínas miofibrilares y el agua, explicaría tanto la disminución de la tixotropía y de la pseudoplastici dad de las soluciones de miofibrillas, como también la pérdida de solubidad, de viscosidad reducida y capacidad de hidratación. A estos cambios con trib uyen además, el aumento de la densidad y de la simetría de los agregados proteicos.

Respecto a la influencia de la velocidad de congelación en los procesos ocurridos durante el almacenamiento, se observa que en los pará me tro s in dic ati vo s de desnaturalización, hay diferencias muy marcadas entre los músculos congelados a velocidad rápida y lenta; principalmente en la etapa inicial de rápida desnaturalización. En cambio, de los pará me tro s vin cu la do s con la agregación, únicamente se ve afectada por la velocidad de con gel ación, la solubilidad miofibrilar. Las diferencias en este pará me tro tam bién se generan en el transcurso de la primer etapa, donde según sea la ve loci dad de congelación, es la velocidad de insolubilización. Al alcanzar la segunda etapa, esta velocidad se hace dependiente únicamente de la tempe ra tura de almacenamiento, conservando las diferencias en el valor de solubilici dad.

dad, originadas durante la etapa inicial. Los resultados parecen indicar que en un músculo congelado rápidamente y posteriormente almacenado a  $-5^{\circ}\text{C}$  o  $-10^{\circ}\text{C}$ , las proteínas se desnaturalizan e insolubilizan con mayor velocidad, que en uno congelado lentamente. Es decir que las ventajas logradas por el empleo de una velocidad de congelación rápida, se pierden rápidamente si el almacenamiento se efectúa a temperaturas superiores a  $-10^{\circ}\text{C}$ . En cambio a temperaturas más bajas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), que de por sí retardan tanto los procesos de desnaturalización como los de agregación y degradación, permiten además conservar las ventajas iniciales de la congelación rápida.

**El Todo es algo más que la suma de las partes.**

**Teoría de la Gestalt.**

## CONCLUSIONES

## 5. CONCLUSIONES

- a) El efecto más importante de la congelación del músculo bovino es la desnaturalización de la cabeza globular de miosina y la modificación de su interacción con actina.
- b) Cuanto menor es la velocidad de congelación, mayor es el grado de desnaturalización alcanzado.
- c) La congelación no provoca modificaciones en la solubilidad, viscosidad y comportamiento reológico de las proteínas miofibrilares.
- d) La desnaturalización de la cabeza de miosina está acompañada por la disminución de la capacidad de absorción de agua de las miofibrillas, principalmente en la congelación lenta.
- e) Con el almacenamiento del músculo bovino en estado congelado, continúa la desnaturalización de la cabeza y se inicia la de la cola fibrosa de miosina.
- f) El desplegamiento de la cola de miosina propicia la formación de agregados miofibrilares.
- g) Las velocidades de desnaturalización y agregación proteica dependen de la temperatura y del tiempo de almacenamiento (a mayor tiempo y temperatura, mayor deterioro proteico) y de la velocidad de congelación.
- h) La formación de agregados conduce a la disminución de la solubilidad, la viscosidad y la capacidad de absorción de agua de las proteínas miofibrilares, y a la alteración de sus propiedades reológicas.
- i) La desnaturalización de miosina durante el almacenamiento congelado sigue un proceso en dos etapas de orden uno respecto al tiempo. Una etapa rápida inicial (cuatro a trece semanas) y una lenta posterior.
- j) La variación de la solubilidad miofibrilar con el tiempo de almacenamiento congelado, presenta inicialmente un período de inducción (aproximada-

mente trece semanas) donde la solubilidad permanece constante o varía levemente, seguido de una etapa de rápida insolubilización. Esta segunda etapa es de orden uno respecto al tiempo.

- k) La desnaturalización previamente y a mayor velocidad que la agregación de miofibrillas; en consecuencia, durante la etapa de insolubilización incipiente, transcurre la mayor parte de las reacciones de desnaturalización.
- l) Los filamentos finos son más resistentes a la desnaturalización que los filamentos gruesos. Sin embargo, la molécula de actina interviene, junto a miosina, en los procesos de agregación miofibrilar y es degradada a tiempos prolongados de almacenamiento ( a  $-5^{\circ}\text{C}$  y  $-10^{\circ}\text{C}$  ).
- m) La agregación de miofibrillas implica la formación progresiva de uniones no covalentes (uniones hidrógeno e interacciones hidrofóbicas) y más tarde, de puentes disulfuro. Primero hay formación de agregados solubles que se van insolubilizando con el tiempo de almacenamiento, al aumentar el número de uniones.
- n) Ambos procesos, desnaturalización e insolubilización, tienen un  $Q_{10}$  de aproximadamente 2.

APENDICE I

## APENDICE I

### ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE DESNATURALIZACIÓN TÉRMICA DE LAS PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DE MUSCULO BOVINO POR CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE BARRIDO

Se estudió la cinética de desnaturalización por calor de las miofibrillas musculares, empleando como muestra, músculo semitendinoso bovino libre de proteínas sarcoplásmicas y conectivas, y con ajuste del pH a un determinado valor, siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (ver inc. 2.13). En primer lugar se investigó la influencia del pH sobre la labilidad térmica de dichas proteínas, a través de la variación de las  $T_{max}$  (temperatura del pico) de los termogramas DSC, en función del pH de la solución Ringer empleada en la preparación de la muestra.

#### I.1 Influencia del pH

En los termogramas DSC de músculo bovino tratado con solución Ringer con valores de pH desde 5.4 a 6.2 y a una velocidad de calentamiento  $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$  (Figura 33), la principal diferencia observada reside en la transición térmica correspondiente a miosina. Mientras que a pH 5.4 hay dos picos bien definidos con  $T_{max}$   $57.5^\circ\text{C}$  (pico I) y  $62.8^\circ\text{C}$  (pico II); a mayores valores de pH, estos picos se van juntando hasta hacerse un único pico a pH 6.0 - 6.2 con un  $T_{max}$   $60.3^\circ\text{C}$ . El pico III (actina) en cambio, presenta una única transición a lo largo de todo el pH utilizado; a pH 5.4 dió un  $T_{max}$   $73.9^\circ\text{C}$  y a pH 6.2, un  $T_{max}$   $72.6^\circ\text{C}$ . En la Figura 34 se muestran graficados los valores de  $T_{max}$  vs. pH. Se puede ver que en el caso del pico I, el  $T_{max}$  se incrementa con el aumento del pH, mientras que para el pico II decrece hasta alcanzar el mismo valor que el pico I cerca de pH 6.0. Para el pico III, el  $T_{max}$  tiene una dependencia casi lineal y decreciente.

Según el trabajo de Goodno et al. (1976), donde determinaron la relación entre el pH y  $T^{\circ}m$  en las curvas de fusión de la miosina libre y sus fragmentos, atribuían el aumento de  $T^{\circ}m$  con el pH a una aceptación de protones por parte de dichas moléculas (excepto el subfragmento - 2) durante la transición

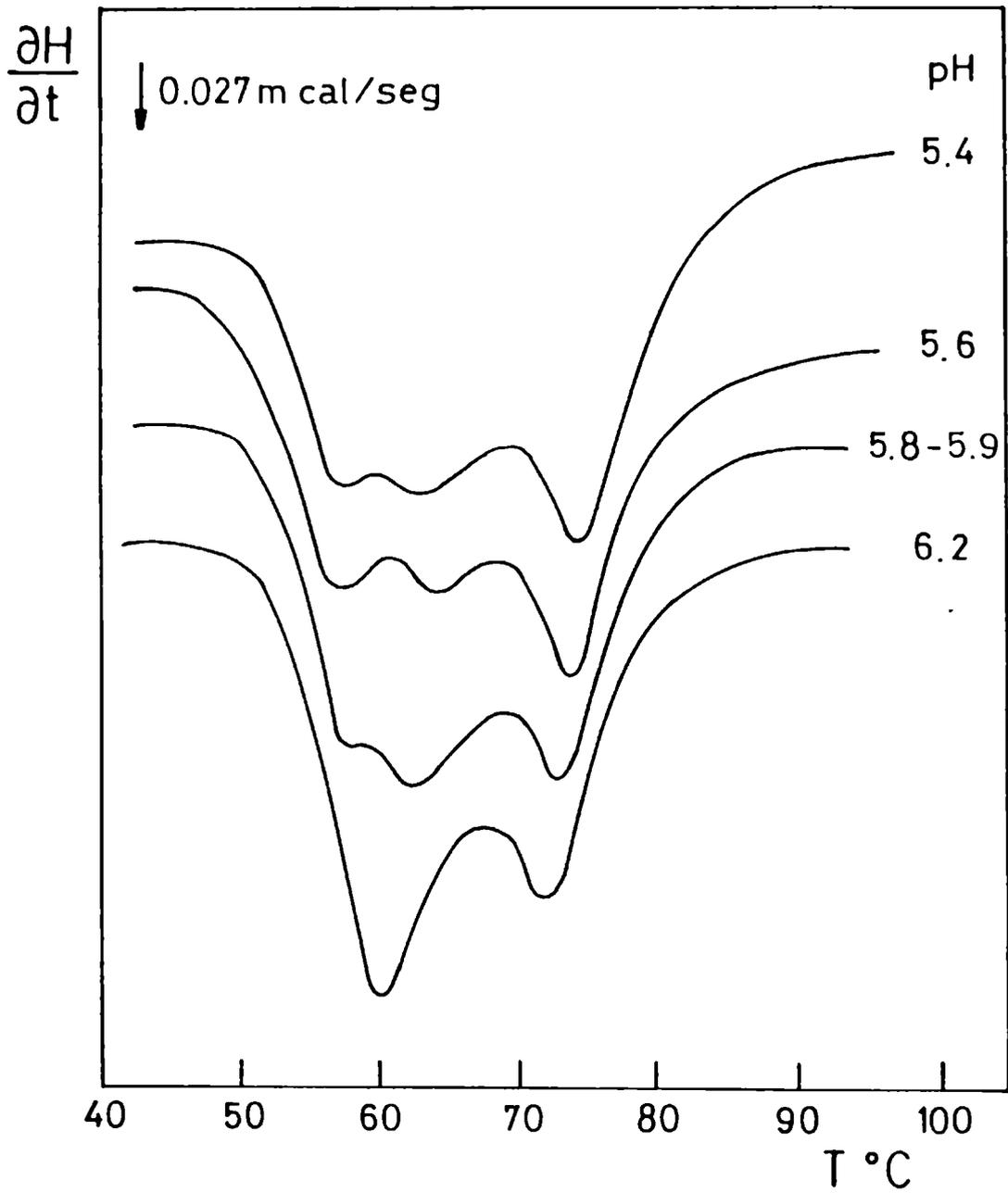


Figura 33: Termogramas DSC de músculo bovino fresco, desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y tejido conectivo, a diferentes valores de pH. Velocidad de calentamiento  $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Peso Seco: 3-5 mg.

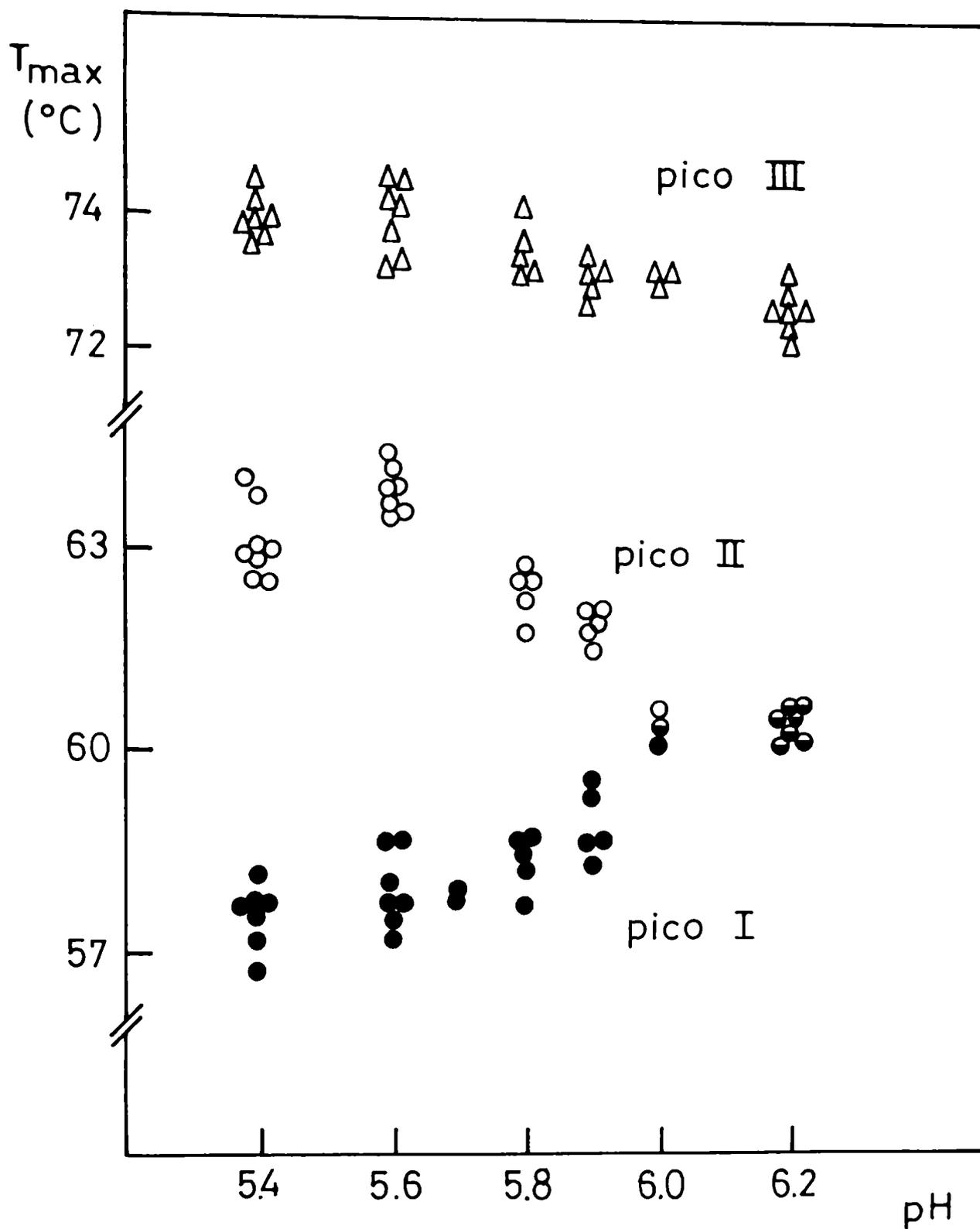
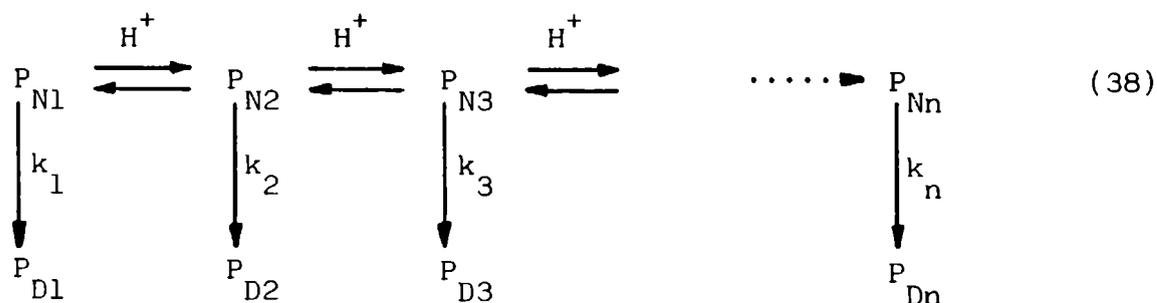


Figura 34: Influencia del pH sobre los valores  $T_{max}$  de los picos I, II, III, correspondientes a los termogramas DSC de músculo bovino fresco, desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y conectivas.  $\beta = 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

térmica. Coincidentemente con nuestros resultados, a pH 5.5, los fragmentos HMM y LMM tenían distintas temperaturas de fusión, pero al llegar a pH 6.1 las curvas de fusión se cortaban alcanzando un mismo valor ( $T^{\circ}_m = 39^{\circ}\text{C}$ ). Esto demuestra que la miosina tiene un comportamiento térmico y una dependencia con el pH similares tanto en estado aislado como formando parte de la estructura miofibrilar. Por su parte, Pelletier y Ouellet (1966), estudiando la inactivación térmica de la actividad enzimática de miosina, encontraron que el tiempo de vida media de miosina era mayor en presencia de ión  $\text{Ca}^{2+}$ . Esto sugiere que tal desnaturalización está acompañada por una toma de protones y una liberación de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Respecto al tercer pico, Stabursvik y Martens (1980) informaron que la desnaturalización de actina no tenía una dependencia marcada con el pH, sin embargo ellos mismos hallaron que en la transición térmica de actina hay toma de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (que la desestabilizan) y liberación de  $\text{H}^+$  al medio, lo que se puede traducir como una mayor labilidad térmica con aumento del pH. Goodno et al (1976) explicaban la dependencia de estas reacciones con el pH, en base a un mecanismo de transferencia de protones a lo largo del proceso de desnaturalización térmica, lo cual responde a la hipótesis de Levi y Benaglia (1950) que dice que las proteínas existen en diferentes estados de ionización para cada valor de pH, asociado cada uno a su correspondiente constante de velocidad de desnaturalización. La siguiente reacción esquematiza la desnaturalización térmica de una proteína nativa  $\text{P}_N$  hasta su estado desnaturalizado  $\text{P}_D$ :



De acuerdo a esta hipótesis, habría un valor de pH ( $\text{pH}_{\text{min}}$ ) para el cual la constante de velocidad de desnaturalización ( $k_d$ ) toma un valor mínimo. A pH menores que el  $\text{pH}_{\text{min}}$ , el proceso de desnaturalización involucra la captura de protones y por encima de  $\text{pH}_{\text{min}}$ , se produce la liberación de protones.

Si aplicamos la hipótesis de Levi y Benaglia al sistema proteico estudiado en este trabajo (las miofibrillas de músculo bovino), podemos hallar una explicación a la dependencia con el pH de las transiciones térmicas de las proteínas miofibrilares. Si consideramos que hay una relación inversa entre  $k_d$  y  $T_{max}$  (puesto que a mayor  $T_{max}$ , es mayor la resistencia térmica, y por lo tanto, es menor  $k_d$ ), es posible analizar desde el punto de vista de esta hipótesis, los valores de  $T_{max}$  de cada pico y su relación con la variación del pH. Si observamos la Figura 34, para el pico I habría un  $k_d$  mínimo (máximo  $T_{max}$ ) a pH 6.0 - 6.2. Por debajo de pH 6.0 hay entonces toma de protones y por encima de pH 6.5 (basándonos en los datos aportados por Stabursvik y Martens, 1979), hay liberación de protones. Para los picos II y III en el rango de pH estudiado habría solamente un incremento del valor  $k_d$  y por lo tanto, liberación de protones.

De esta manera, el estudio de la influencia del pH sobre la desnaturalización por calor de las proteínas miofibrilares y su concordancia con los resultados de las investigaciones citadas, nos ofrecen datos de suma importancia para un mejor conocimiento del sistema miofibrilar.

En primer término, quedaría reforzada la asignación de actina al pico III y de cabeza y cola de miosina a los picos I y II, respectivamente, en las endotermas de desnaturalización de las proteínas miofibrilares. Sabemos ahora que la zona de la cabeza de miosina es la de mayor labilidad térmica, la cuál se ve acentuada a  $pH < 5.6$ . Por el contrario, a estos valores de pH la zona de la cola de miosina y la actina, tienen mayor estabilidad.

Estos resultados son de suma utilidad para conocer las condiciones adecuadas de preservación de la carne y sus derivados a altas temperaturas, dando además una buena explicación al comportamiento observado en algunos músculos que poseen, en su estado post-rigor, un pH apartado del normal. Tal es el caso de los músculos porcinos PSE (Pale, Soft and Exudative; pálido, blando y exudado) que deben sus características de textura a la combinación de una temperatura relativamente alta y pH bajo (alrededor de 5.3) en el período post-mortem. Estudios por calorimetría diferencial de barrido de músculo porcino PSE (Stabursvik

1983; Stabursvik et al, 1984) dieron termogramas con el pico I sensiblemente disminuido (50%) en comparación con aquellos registrados para músculo porcino normal ( $\text{pH} \approx 5.5$ ), mientras que en los picos II y III las reducciones aparentes son menores (del orden de 15% y 5%, respectivamente). En investigaciones anteriores se había encontrado que las miofibrillas de músculo PSE llegan a tener menos de un 50% de la actividad ATPásica de las miofibrillas provenientes de un músculo normal (Greaser et al, 1969; Sung et al, 1976) y es bien sabido que la actividad ATPásica de miosina está asociada al subfragmento 1 (cabeza de miosina). La concordancia observada entre la disminución del área del pico I y la reducción de la actividad ATPásica en músculo PSE, está de acuerdo con la interpretación de que el pico I corresponde a la desnaturalización de la cabeza de miosina y además, de que ésta es más acentuada a bajos valores de pH ( $\text{pH} < 5.4$ ).

## I.2 Cinética de desnaturalización térmica de las proteínas miofibrilares

### I.2.1 Determinación de las constantes cinéticas por el método dinámico

Como se explicó en Materiales y Métodos (inc. 2.13.1.1) se realizaron corridas DSC a diferentes velocidades  $\beta$  de calentamiento, usando como muestra músculo semitendinoso bovino en estado fresco, tratado con solución Ringer a pH 5.6 (libre de proteínas sarcoplásmicas y tejido conectivo), de manera que los termogramas obtenidos (Figura 10) reflejan únicamente las transiciones térmicas de las proteínas miofibrilares.

Se trabajó a pH 5.6 por ser éste el pH medio del músculo fresco entero y además, por permitirnos estudiar la miosina en sus dos zonas principales, cabeza y cola; a diferencia de valores cercanos a pH 6.0 para los cuales la miosina da un único pico (Figura 34).

En la Tabla 12 figuran los valores  $T_{\text{max}}$  medios de los picos I, II y III, obtenidos de termogramas con velocidades de barrido  $\beta = 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15$  y  $20^\circ\text{C}/\text{min}$ . Cuando graficamos  $-\ln(\beta/T^2)$  vs.  $10^3/T_{\text{max}}$  (Figura 35) para cada pico, obtuvimos tres rectas, de cuyas pendientes y ordenadas al origen se pudieron calcular la energía de activación ( $E_a$ ), el factor pre-exponencial ( $Z$ )

y la constante de velocidad ( $k_d$ ) de cada transición, aplicando las ecuaciones (18), (19) y (20).

Tabla 12: Valores Tmax para los picos I, II y III, obtenidos de los termogramas DSC (con distintas velocidades de calentamiento) de músculo bovino semitendinoso en estado fresco, tratado con solución Ringer a pH 5.6.

velocidad de barrido (°C/min)	Tmax (°C)		
	I	II	III
1	51.5 $\pm$ 0.2	57.5 $\pm$ 0.1	68.1 $\pm$ 0.1
2	52.7 $\pm$ 2.2	59.7 $\pm$ 0.8	70.9 $\pm$ 0.1
3	52.8 $\pm$ 0.6	59.8 $\pm$ 2.0	71.2 $\pm$ 0.3
5	55.9 $\pm$ 1.3	62.1 $\pm$ 1.5	73.1 $\pm$ 0.6
7	56.3 $\pm$ 0.7	63.8 $\pm$ 0.2	73.5 $\pm$ 0.9
10	57.8 $\pm$ 0.7	63.9 $\pm$ 0.3	74.2 $\pm$ 0.8
15	62.1 $\pm$ 1.8	66.6 $\pm$ 1.8	76.0 $\pm$ 1.1
20	65.3 $\pm$ 1.0	68.2 $\pm$ 0.6	77.7 $\pm$ 1.1

Cada valor es la media con su desviación standard, resultante de un número mínimo de 3 corridas.

Si asumimos una cinética de desnaturalización de primer orden respecto al tiempo (Yasui et al., 1958; Blum, 1960; Pelletier y Ouellet, 1961; Penny, 1967b; Yasui et al, 1973), podemos también determinar el tiempo de vida media  $t_{1/2}$  a distintas temperaturas, de las proteínas asociadas a cada transición, aplicando la expresión:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \tag{39}$$

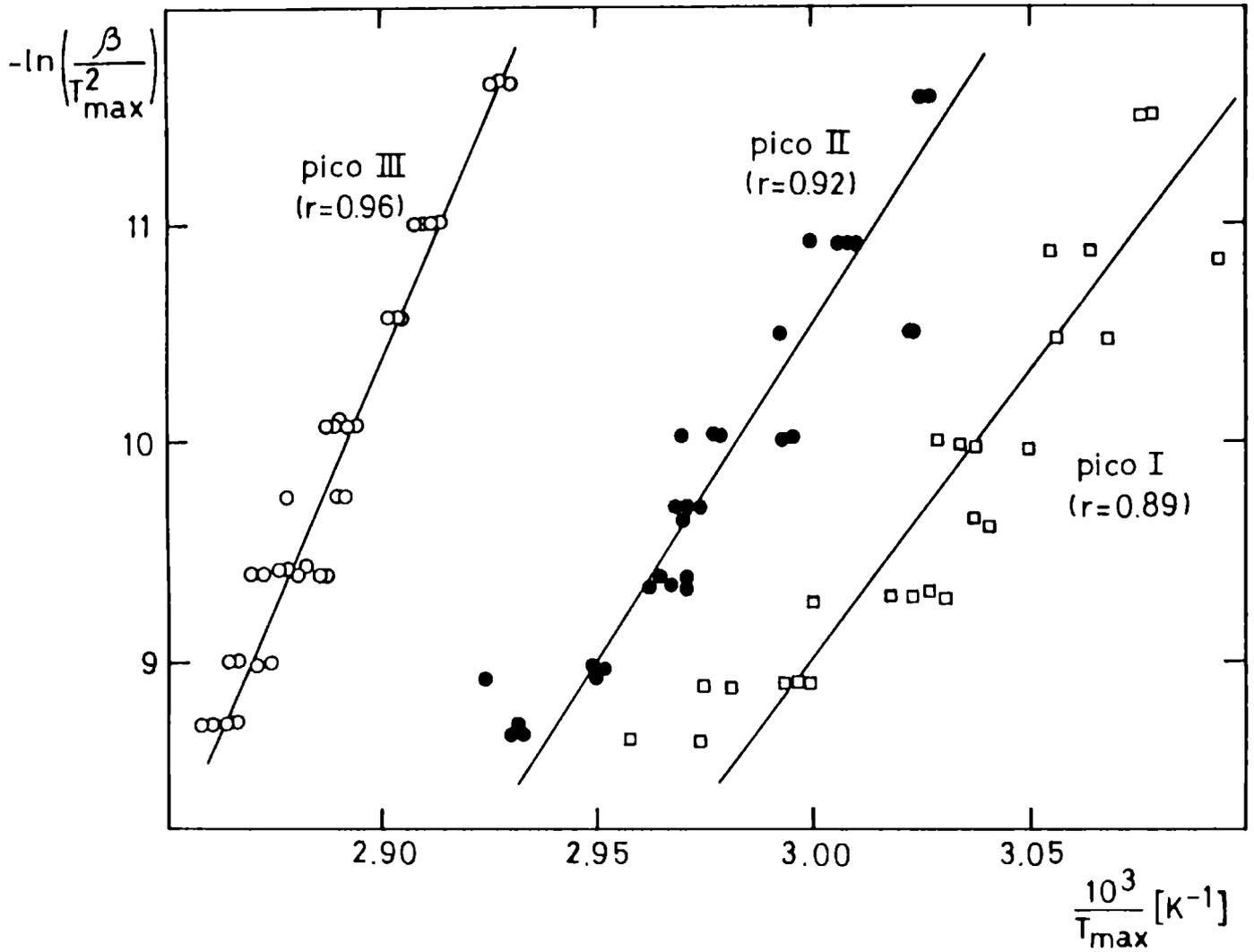


Figura 35: Cálculo de la energía de activación ( $E_a$ ) para la desnaturalización térmica de las proteínas miofibrilares en músculo bovino, según el método dinámico de Ozawa (1970). Los valores  $E_a$  de cada transición térmica se calcularon a partir de las pendientes de las rectas, trazadas por cuadrados mínimos ( $r$  = coeficiente de correlación).  $\beta$  = velocidad de calentamiento (K/min);  $T_{\max}$  : temperaturas de los picos DSC (K).

Las pendientes de las rectas se calcularon por cuadrados mínimos, usando los datos individuales, seleccionando al término de menor dispersión como variable independiente (Pravisani et al., 1985). La Tabla 13 muestra los valores calculados de  $E_a$  y  $Z$ , con los correspondientes  $k_d$  y  $t_{1/2}$  a diferentes temperaturas.

Las energías de activación calculadas resultaron comparables a aquellas reportadas por otros autores para las mismas proteínas pero bajo diferentes condiciones experimentales. Así, Pelletier y Ouellet (1961) informaron para la inactivación por calor de la actividad ATPásica de miosina de músculo de conejo (en solución 0.6M KCl, 0.01M  $\text{CaCl}_2$  y 0.1M Tris a pH 7.5), una  $E_a = 56$  Kcal/mol, la cual coincide con la correspondiente al pico I (54.5 Kcal/mol). Esto era esperable pues dicho pico corresponde a la transición térmica de la cabeza de miosina (HMM - S1) donde reside el sitio activo de la enzima ATPasa. En relación a actina, Martens et al. (1982) reportaron para músculo entero de conejo una  $E_a = 83.7$  Kcal/mol, que está en el orden de la calculada para el pico III en músculo bovino ( $E_a = 90.6$  Kcal/mol). En relación al pico II, no hay datos de otros autores, sin embargo se pudo corroborar indirectamente que el valor  $E_a$  calculado es aplicable satisfactoriamente a otros sistemas (ver Apéndice II).

En base a estos resultados, es lógico suponer que la desnaturalización térmica de miosina se produce con aproximadamente la misma energía de activación, tanto en músculo entero como en miofibrillas aisladas o en extractos de miosina purificada. Actina, aunque con una  $E_a$  ligeramente diferente, se comportaría de un modo similar. Sin embargo, de acuerdo con la Tabla 5 y según lo reportado en numerosos trabajos (Hamm, 1965, 1966, 1970; Draudt, 1972; Laakkonen, 1973), la estabilidad térmica de las proteínas miofibrilares no es la misma en estado aislado que en la fibra muscular intacta. Este comportamiento se debe a que la velocidad de desnaturalización,  $k_d$ , que da una idea de la labilidad térmica, se ve afectada por el factor pre-exponencial  $Z$ , el cual depende a su vez de la temperatura de desnaturalización  $T_{max}$  y de la velocidad de calentamiento  $\beta$ . Debido a esto, cualquier cambio que modifique los valores de  $T_{max}$ ,

Tabla 13: Constantes cinéticas de las transiciones térmicas de las proteínas miofibrilares  
en músculo bovino semitendinoso

Pico	Tmax (°C)	Ea (Kcal/mol)	Z (min <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)			
				47	53	57	
I	57.8±0.6	54.5±6.52	2.4x10 <sup>36</sup>	$k_d$ (min <sup>-1</sup> )	1.53x10 <sup>-1</sup>	7.40x10 <sup>-1</sup>	2.04
				$t_{1/2}$ (min)	4.50	0.94	0.34
II	63.9±1.0	61.0±5.85	9.5x10 <sup>39</sup>	$k_d$ (min <sup>-1</sup> )	2.21x10 <sup>-2</sup>	1.29x10 <sup>-1</sup>	4.03x10 <sup>-1</sup>
				$t_{1/2}$ (min)	31.40	5.38	1.72
III	74.2±0.4	90.6±6.82	3.9x10 <sup>57</sup>	$k_d$ (min <sup>-1</sup> )	-----	-----	4.34x10 <sup>-3</sup>
				$t_{1/2}$ (min)	-----	-----	160
						5.08x10 <sup>-2</sup>	2.51x10 <sup>-1</sup>
						13.6	2.75

Tmax = Temperatura del pico (a 10°C/min); Ea = Energía de activación; Z = factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius;  $k_d$  = constante de velocidad;  $t_{1/2}$  = tiempo de vida media; ± = desviación standard.

tal como el pH (Figura 34), la fuerza iónica del medio o la presencia de cationes divalentes, fosfatos, cloruros, etc (Wright et al., 1977; Stabursvik y Martens, 1980; Wright y Wilding, 1984), así como también la velocidad de calentamiento  $\beta$  (Tabla 12) conducirá a una alteración de la velocidad de desnaturalización térmica, aunque se mantenga constante la correspondiente energía de activación. A modo de ejemplo para visualizar este comportamiento, en la Tabla 14 se muestra el cálculo de la fracción no-desnaturalizada resultante del calentamiento isotérmico para distintas temperaturas, de muestras de músculo bovino entero (pH 5.6) y músculo bovino libre de proteínas sarcoplásmicas y conectivas por tratamiento con solución Ringer a pH 5.6. Se puede ver fácilmente cómo el músculo entero, que presenta los mayores valores de T<sub>max</sub> para cada transición, es el que ofrece mayor resistencia al efecto térmico, especialmente en el pico III (Actina). Si los mismos cálculos se realizan sobre miofibrillas aisladas, las cuales tienen valores de T<sub>max</sub> aún mejores (Tabla 5), se obtiene como resultado una mayor labilidad térmica (Tabla 15).

Tabla 14: Valores porcentuales de la fracción no-desnaturalizada de las proteínas asociadas a cada pico del termograma DSC, después de un calentamiento durante a 5 minutos a distintas temperaturas.

Muestra	Pico	Temperatura (°C)						
		47	53	57	63	67	73	77
(a)	I	47.0%	2.5%	0%				
	II	89.5%	52.5%	13.0%	0%			
	III	100.0%	100.0%	97.8%	77.6%	28.4%	0%	
(b)	I	57.0%	6.6%	0%				
	II	95.5%	76.5%	43.2%	1.2%	0%		
	III	100.0%	100.0%	99.8%	97.8%	89.6%	32.6%	0.6%

(a): músculo desprovisto de proteínas sarcoplásmicas y de tejido conectivo (tratado con solución Ringer a pH 5.6)

(b): músculo entero a pH 5.6

Tabla 15: Constantes cinéticas y fracciones no-desnaturalizadas para las transiciones térmicas de las proteínas miofibrilares en miofibrillas aisladas de músculo bovino.

Pico	T <sub>max</sub> (°C)	Z (min <sup>-1</sup> )		Temperatura (°C)				
				47	53	57	63	67
I	54.8 <sub>+0.6</sub>	3.21x10 <sup>36</sup>	k <sub>d</sub> (min <sup>-1</sup> )	1.91x10 <sup>-1</sup>	9.25x10 <sup>-1</sup>	2.56		
			(1-x).100	38.4%	0.98%	0%		
II	60.6 <sub>+0.8</sub>	1.39x10 <sup>40</sup>	k <sub>d</sub>	3.04x10 <sup>-2</sup>	1.76x10 <sup>-1</sup>	5.50x10 <sup>-1</sup>	2.89	
			(1-x).100	85.0%	41.5%	6.4%	0%	
III	67.5 <sub>+0.5</sub>	2.34x10 <sup>58</sup>	k <sub>d</sub>	3.07x10 <sup>-4</sup>	4.22x10 <sup>-3</sup>	2.30x10 <sup>-2</sup>	2.71x10 <sup>-1</sup>	1.33
			(1-x).100	99.8%	97.9%	89.1%	25.8%	0.1%

T<sub>max</sub>, Z y k<sub>d</sub> = idem a Tabla 13; (1-x).100 = porcentaje remanente de cada pico, después de un calentamiento por 5 minutos a distintas temperaturas.

Sería entonces posible en cualquier sistema cárnico modificado por un tratamiento térmico, calcular las fracciones no-desnaturalizadas de miosina y actina, con sólo poseer como datos la velocidad de calentamiento y el T<sub>max</sub> correspondiente. En el Apéndice II, se presenta un breve estudio para corroborar que los valores de E<sub>a</sub> calculados para miosina, son aplicables a otro sistema proteico que la incluya en su composición.

### I.2.2 Confirmación de las constantes cinéticas por el método isotérmico

Desde el momento que los termogramas de proteínas miofibrilares, ya sea en músculo entero o en estado aislado, tienen más de un pico, no es posible

aplicar el método isotérmico para obtener las constantes cinéticas de cada transición (Duswalt, 1974); sin embargo, es un método útil para corroborar los valores previamente hallados por el método dinámico, resolviendo a la vez la endoterma compleja por estimación del área correspondiente a cada transición individual.

En la Tabla 14 pudimos ver para músculo bovino tratado con solución Ringer a pH 5.6, que el área del pico II desaparece parcialmente cuando tratamos isotérmicamente a la muestra durante el período de tiempo equivalente a la vida media  $t_{1/2}$  del pico I. A la inversa, cuando el tratamiento térmico se realiza por un período igual al  $t_{1/2}$  del pico II, el área del pico I no desaparece totalmente. Como consecuencia de este resultado, se hace necesario para conocer el área real correspondiente a cada pico, resolver el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned} \text{i)} \quad & M = I + II \\ \text{ii)} \quad & Y = I(1 - x_1) + II(1 - x_2) + III(1 - x_3) \end{aligned} \quad (40)$$

donde: I, II y III son las respectivas áreas de los picos I, II y III; Y es el área de la endoterma total y  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  son las correspondientes fracciones desnaturalizadas de las proteínas miofibrilares atribuidas a las transiciones I, II y III. En la Figura 36 se muestran las endotermas correspondientes a muestras pretratadas isotérmicamente y luego analizadas por DSC a 10°C/min. Se determinó experimentalmente el área total Y de las endotermas (Y exper.) para cada par tiempo-temperatura y se compararon con los valores de  $Y_{\text{teórico}}$  obtenidos a partir de la expresión  $\ln(1-x) = -k_d \cdot t$ , de la cuál surgen los valores (1-x) para cada transición, conociendo  $k_d$  (calculado a partir de  $E_a$  y T) y el tiempo de tratamiento isotérmico.

La correspondencia encontrada entre los valores Y exper. e  $Y_{\text{teórico}}$  (con un error  $\leq 3\%$ ), corrobora tanto la cinética propuesta como los parámetros cinéticos calculados.

De las endotermas en las cuales los picos I y II de miosina (área M) fueron totalmente removidos (15 minutos a 57°C), se midió el área III (actina), quedando determinada simultáneamente el área M por diferencia (Figura 36). Lue

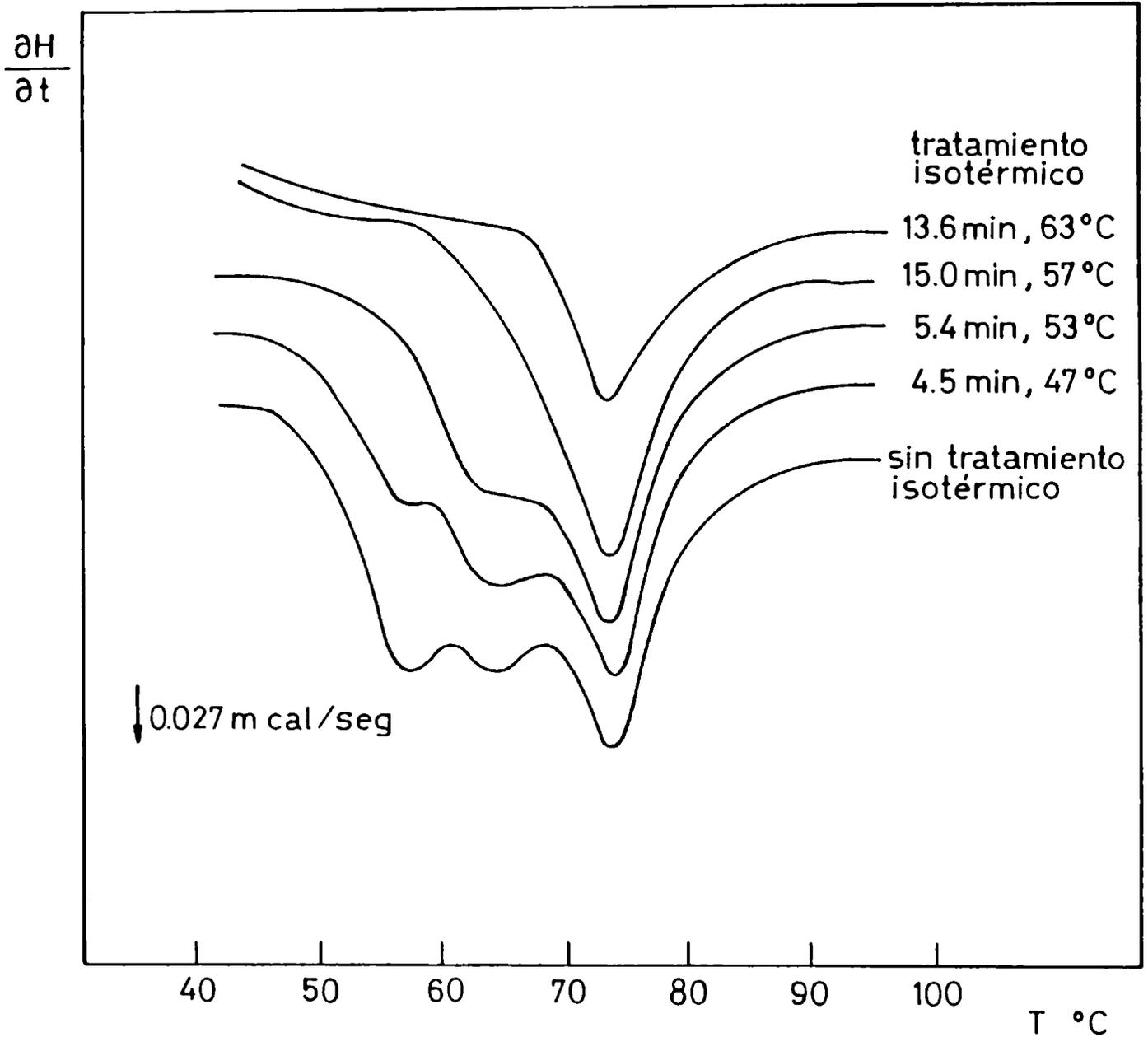


Figura 36: Termogramas DSC ( $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ ) correspondientes a músculos bovinos desprovistos de proteínas sarcoplásmicas y conectivas, pH 5.6, sin y con tratamiento isotérmico previo a diferentes temperaturas y períodos de tiempo.

go se estimaron las áreas individuales I y II por resolución del sistema 40 i) ii), de manera que por iteración, los valores experimentales (1-x) se igualen a los teóricos. La endoterma compleja quedó así resuelta de la siguiente manera:

$$\begin{array}{ll} M = 0.52 \text{ Y} & \text{III} = 0.48 \text{ Y} \\ I = 0.45 \text{ M} & \text{II} = 0.55 \text{ M} \end{array} \quad (41)$$

### I.3 Estimación de la entalpía de las transiciones individuales

Teniendo en cuenta la fracción de área total que ocupa cada pico (ec. 41) y los correspondientes porcentajes del peso seco de la muestra empleada en la corrida DSC, se pudieron calcular los valores de entalpía  $\Delta H_d$  individuales, haciendo uso de las expresiones:

$$\Delta H_{\text{Miosina}} = \frac{M}{m_M} \cdot f \quad (42)$$

$$\Delta H_{\text{Actina}} = \frac{\text{III}}{m_A} \cdot f \quad (43)$$

las cuales son una simplificación de la ecuación 16 que permite calcular la entalpía de la endoterma total (ver inc. 2.13). Los valores M y III están dados por la expresión (41), son las áreas (en  $\text{cm}^2$ ) atribuidas a la desnaturalización de miosina (picos I + II) y de actina, respectivamente;  $m_M$  y  $m_A$ , son las respectivas fracciones con que contribuyen miosina y actina al peso seco total de la muestra (mg) y f es un factor ( $\text{mcal/cm}^2$ ) que incluye la constante de la celda DSC, las sensibilidades empleadas en abscisas y ordenadas y la velocidad de barrido.

Sin embargo, las expresiones (42) y (43) no tienen en cuenta que las miofibrillas están constituidas no sólo por miosina y actina (proteínas mayores), sino que hay un porcentaje de proteínas menores (actininas, tropomiosina, troponina) que contribuye al peso total de la muestra. Las miofibrillas están formadas aproximadamente, por un 25% de actina, un 58% de miosina y un 17% res

tante de proteínas menores (Ockerman, 1977; datos similares a los determinados en este trabajo por electroforesis en geles de poliacrilamida). De acuerdo con estos porcentajes se debería cumplir que:

$$\Delta H_{\text{total}} = 0.58 \Delta H_{\text{miosina}} + 0.25 \Delta H_{\text{actina}} + 0.17 \Delta H_{\text{proteínas menores}} \quad (44)$$

Debido a que en los termogramas no aparece un pico adicional atribuible a las proteínas menores, su calor de desnaturalización asociado tiene necesariamente que contribuir a la endoterma total, formando parte de una o de ambas transiciones principales, miosina o actina.

Analizando únicamente las dos posibilidades extremas:

caso a) En que las proteínas menores contribuyen al área de los picos de miosina (I + II), quedando actina como la única proteína que forma parte del pico III. Entonces resulta:

$$\Delta H_{\text{total}} = (0.58 + 0.17) \Delta H'_{\text{miosina}} + 0.25 \Delta H_{\text{actina}}$$

donde ahora  $\Delta H'_{\text{miosina}}$  incluye la contribución de las proteínas menores. Resulta un valor de  $\Delta H_{\text{actina}} \approx 9 \text{ cal/g}$  y  $\Delta H'_{\text{miosina}} = 3.3 \text{ cal/g}$

caso b) En que las proteínas menores contribuyen al área del pico III. La expresión (44) queda:

$$\Delta H_{\text{total}} = 0.58 \Delta H_{\text{miosina}} + (0.25 + 0.17) \Delta H'_{\text{actina}}$$

donde  $\Delta H'_{\text{actina}}$  incluye la contribución de las proteínas menores. Dando ahora los siguientes valores:

$$\Delta H_{\text{miosina}} = 4.2 \text{ cal/g}$$

$$\Delta H'_{\text{actina}} = 5.4 \text{ cal/g}$$

Las entalpías de las transiciones de miosina y actina calculadas para el caso b) se acercan más a los valores de bibliografía, reportados para la desnaturalización por calor de miosina y actina aisladas (Wright et al., 1977). Resulta entonces, que el pico III representaría las transiciones térmicas del conjunto formado por actina y proteínas menores; es decir, la desnaturalización

del filamento fino. En tanto, los picos I y II corresponderían a la desnaturación del filamento grueso, formado casi íntegramente por miosina. En apoyo a esta conclusión, Chrystall (1971) había informado que tropomiosina (una de las proteínas menores de mayor concentración en el filamento fino), es la proteína miofibrilar de mayor termoestabilidad.

#### I.4 Estimación de las funciones termodinámicas de cada transición

Según las teorías de las velocidades absolutas, la constante de velocidad  $k$  de una reacción, puede expresarse en términos de sus funciones termodinámicas (Laidler y Bunting, 1973; Laidler, 1977). Si tenemos en cuenta que la desnaturación de una proteína es una reacción unimolecular, que cumple la teoría del estado activado (pasaje de la molécula nativa a una molécula activada), es posible aplicar las conocidas relaciones de Eyring (1937) a fin de calcular las funciones termodinámicas de activación de cada transición térmica. La relación fundamental es la dada por Wynne - Jones y Eyring (1935), en la cual  $k$  queda expresada como:

$$k = \frac{\bar{k} \cdot T}{h} K^* = \frac{\bar{k} \cdot T}{h} e^{S^*/R} e^{-H^*/RT} \quad (45)$$

donde  $\bar{k}$  = constante de Boltzmann

$h$  = constante de Planck

$K^*$  = constante de equilibrio entre la forma nativa y la activada

$T$  = temperatura en K

$\Delta S^*$  = entropía de activación (cal/mol/K)

$\Delta H^*$  = entalpía de activación (cal/mol)

y  $R$  = constante universal de los gases = 1.986 cal/K/mol.

Para reacciones unimoleculares y en solución, en las cuales no varía el número de moléculas al pasar al estado de activación (no hay variación del volumen de activación,  $\Delta V^* = 0$ ), se cumple que:

$$\Delta H^* = E_a - RT \quad (46)$$

donde  $E_a$  es la energía de activación experimental, determinada a partir de la expresión de Arrhenius (20)

$$k = Z \cdot e^{-E_a/RT} \quad (20)$$

entonces, de la ecuación (45) surge que:

$$k = e \frac{\bar{k} \cdot T}{h} \cdot e^{\Delta S^*/R} \cdot e^{-E_a/RT} \quad (47)$$

Si comparamos las últimas dos relaciones entre sí, vemos que el factor pre-exponencial  $Z$  resulta:

$$Z = \frac{\bar{k} T}{h} \cdot e^{\Delta S^*/R} \quad (48)$$

como podemos conocer el valor  $Z$  de cada transición, es entonces posible calcular  $\Delta S^*$ . Con el valor de la energía de activación y aplicando la expresión (46), surge el valor  $\Delta H^*$ . Luego se calcula  $\Delta G^*$  (energía libre de activación) a partir de la conocida relación termodinámica:

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (49)$$

En la Tabla 16 se muestran los valores de las funciones termodinámicas para las transiciones I, II y III de las proteínas miofibrilares, calculadas a partir de los valores de  $k$ ,  $Z$  y  $E_a$  a la temperatura  $T_{max}$  de cada pico y a una temperatura arbitraria,  $60^\circ\text{C}$  (considerada por Multon (1970) como la temperatura crítica en la desnaturalización térmica de las proteínas). Los altos valores de entalpía y entropía de activación obtenidos son normales para la inactivación de enzimas y la desnaturalización de proteínas (Laidler y Bunting, 1973). Además  $\Delta S^*$  y  $\Delta H^*$  son prácticamente independientes de la temperatura y se puede verificar que cumplen con la relación lineal encontrada por Multon (1970) que es válida para la desnaturalización de proteínas en medios acuosos o en estado sólido:

$$\Delta S^* = 0.0030 \Delta H^* - 0.075 \quad (50)$$

La Tabla 16 nos indica también que tanto  $\Delta H^*$  como  $\Delta S^*$  se incrementan desde la transición I a la III, lo cual puede interpretarse como un aumento

del número de uniones rotas durante el proceso de desnaturalización (dado por  $\Delta H^*$ ) y un incremento del desorden molecular originado en la molécula proteica y su ambiente químico inmediato (dado por  $\Delta S^*$ ) para alcanzar el estado activado. Si nos basamos en los elevados valores de  $\Delta S^*$  hallados, la desnaturalización incluiría un proceso de ruptura de un número elevado de uniones de baja energía, posiblemente acompañada por deshidratación. Respecto al valor  $\Delta G^*$  vemos que es comparativamente igual para las tres transiciones a sus respectivos  $T_{max}$ ; esto puede significar que a esas temperaturas las probabilidades de alcanzar el estado activado son similares. En cambio a 60°C, la transición del pico I (cuyo  $T_{max}$  es 58°C) tiene un  $\Delta G^*$  significativamente menor al de las transiciones II y III. Es decir que las proteínas involucradas en la primer transición tienen a 60°C una mayor probabilidad de pasar al estado activado que las moléculas proteicas de las restantes transiciones.

Tabla 16: Valores  $\Delta S^*$ ,  $\Delta H^*$  y  $\Delta G^*$  para las transiciones térmicas de las proteínas miofibrilares en músculo bovino libre de proteínas sarcoplásmicas y tejido conectivo (Solución Ringer pH 5.6).

Pico		$\Delta S^*$ (Kcal/mol/K)	$\Delta H^*$ (Kcal/mol)	$\Delta G^*$ (Kcal/mol)
I	a $T_{max}$	0.098	53.84	21.35
	a 60°C	0.098	53.83	21.14
II	a $T_{max}$	0.115	60.33	21.66
	a 60°C	0.115	60.33	21.11
III	a $T_{max}$	0.196	89.90	21.92
	a 60°C	0.196	89.93	24.70

$T_{max}$ : temperatura del pico;  $\Delta S^*$ : entropía de activación;  $\Delta H^*$ : entalpía de activación;  $\Delta G^*$ : energía libre de activado.

Con el objeto de estimar el número probable de uniones que intervienen en la formación del estado activado, recurrimos al trabajo de Eyring y Stearn (1939) que trata sobre la aplicabilidad de la teoría de las velocidades absolutas a la desnaturalización de proteínas. Ellos propusieron, que en toda desnaturalización térmica de una proteína cualquiera, se ve involucrada la ruptura de un puente disulfuro (el cuál contribuye con un  $\Delta H^* = 25$  Kcal/mol y una  $\Delta S^* \approx 0$ ) y de  $n$  uniones hidrógeno (cada una de las cuales posee un  $\Delta H^* = 4$  Kcal/mol y  $\Delta S^* = 0.012$  Kcal/mol.K) por molécula de proteína. Así, quedan formuladas las siguientes ecuaciones:

$$n = \frac{\Delta S^*}{0.012} \quad \text{y} \quad n = \frac{\Delta H^* - 25}{4} \quad (51)$$

que una vez igualadas conducen a una expresión similar a la ecuación (50), coincidiendo con la hipótesis de Multon (1970). Aplicando las ecuaciones (51), fue posible calcular el número  $n$  de uniones hidrógeno rotas en cada transición, usando los valores  $\Delta S^*$  y  $\Delta H^*$  calculados previamente (Tabla 16):

$$n_I \approx 8 \quad n_{II} \approx 10 \quad n_{III} \approx 16$$

Si bien esta hipótesis ofrece una muy buena explicación para la relación (50) entre  $\Delta H^*$  y  $\Delta S^*$ , debemos tener en cuenta sin embargo que no hay pruebas de la existencia de uniones disulfuro en las proteínas miofibrilares al estado nativo (Buttkus, 1970; Hamm, 1977; Matthews et al, 1980; Harrington y Rodgers, 1984).

Los resultados de nuestros estudios de electroforesis en geles de poliacrilamida sobre proteínas miofibrilares (inc. 3.5) tampoco detectaron la presencia de puentes disulfuro en miosina, actina o proteínas menores, con la excepción de un único S-S en la interacción actina-miosina, que está demostrado (Wright y Wilding, 1984) no tener participación en las transiciones térmicas del músculo post-rigor. O sea que, los filamentos gruesos formados por moléculas de miosina, así como los filamentos finos compuestos de un polímero de actina y proteínas menores (troponina, tropomiosina y actininas) están estructurados en base principalmente a puentes hidrógeno, interacciones hidrofóbicas

y uniones de tipo iónico, sin la intervención de puentes disulfuro.

Si suponemos el caso en que el proceso de desnaturalización de las proteínas miofibrilares, signifique únicamente la escisión de puentes hidrógeno; el número  $n$  en cada transición, estará dado por el valor  $\Delta H^*$  respectivo, resultando:

$$n_I \approx 13 \quad n_{II} \approx 15 \quad \text{y} \quad n_{III} \approx 22$$

Sin embargo no se puede pensar en un cambio conformacional de una molécula proteica provocado exclusivamente por ruptura de uniones hidrógeno, ya que éstas estarían acompañadas inevitablemente por cambios en las interacciones hidrofóbicas e iónicas y/o en uniones de más baja energía. La variación de la labilidad térmica con el pH y con la presencia o no, de iones  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , sugiere también la intervención de mecanismos de captura y liberación de  $\text{H}^+$  y cationes divalentes en la desnaturalización térmica. Luego, el conjunto de todas estas reacciones estaría comprendido en los términos  $\Delta H^*$  y  $\Delta S^*$  de las transiciones térmicas de las proteínas miofibrilares.

### I.5 Conclusiones del estudio cinético

a) El filamento grueso, formado casi íntegramente por moléculas de miosina, es el responsable de la aparición de los picos I y II en los termogramas DSC de miofibrillas en músculo bovino. El pico III corresponde a la transición térmica del filamento fino constituido por actina y proteínas menores. De esto resulta, que el filamento grueso es más lábil al efecto térmico que el filamento fino.

b) A pH 5.6 la miosina presenta dos transiciones térmicas que dan origen: al pico I, relacionado con la cabeza de miosina (HMM S-1) y al pico II, atribuido a la cola de miosina (LMM).

Sabemos ahora, que la desnaturalización térmica de la cabeza, ocurre más fácilmente a valores bajos de pH (<5.6). Lo contrario ocurre con la zona de la cola de miosina y el filamento fino, que son más termolábiles a pH > 5.6.

- c) Conocemos las constantes cinéticas de las tres transiciones térmicas observadas en la endoterma compleja. Se empleó para el cálculo de dichas constantes, un método dinámico, que consiste en el barrido de la temperatura a distintas velocidades. Los valores de energía de activación ( $E_a$ ) hallados fueron: 54.5, 61.0 y 90.6 Kcal/mol para las transiciones I, II y III, respectivamente. Los valores de  $k$ ,  $Z$  y  $t_{1/2}$  calculados y el orden uno de reacción propuesto para cada transición fueron confirmados isotérmicamente.
- d) Se resolvió la endoterma compleja de la desnaturalización térmica de miofibrillas, estimando la contribución de cada transición al área total. Los filamentos gruesos contribuyen con un 52% (de los cuales el 45% corresponde a la cabeza y el 55% a la cola de miosina) y los filamentos finos con el 48% restante de la endoterma total.
- e) Se estimaron además las funciones termodinámicas y con ellas, el número y tipo de uniones involucradas para alcanzar el estado activado en las transiciones térmicas de las proteínas miofibrilares de músculo bovino.

## APENDICE II

## APENDICE II

Con el objeto de corroborar que los valores calculados de  $E_a$  para la desnaturalización por calor de miosina, son aplicables a otro sistema que también contenga miosina pero en distintas condiciones de ensayo; se eligió el trabajo de Burjanadze et al (1966) sobre la desnaturalización térmica de miosina en solución. En sus experiencias, registraron el calor absorbido en un microcalorímetro adiabático, al calentar una solución de miosina al 0.5% en 0.6M KCl con Buffer fosfato 0.15M a pH 8.4. La velocidad media de calentamiento era de 7°C/hora o sea  $\beta = 0.12^\circ\text{C}/\text{min}$ . Obtuvieron dos picos con  $T_{\text{max}}$  43°C y 53°C, atribuyéndolos a IIMM y LMM, respectivamente.

Si aplicamos a nuestros valores de  $T_{\text{max}}$  para los picos I y II, el método iterativo dado por la norma ASTM E698-79, en el cual se grafica  $\log \beta$  vs.  $1/T_{\text{max}}$  y que da una pendiente  $a \approx \frac{-E_a}{2.19R}$  ( $R \approx 2 \text{ cal/K/mol}$ ;  $T_{\text{max}}$  en K); teniendo en cuenta que:

$$\log \beta = a \cdot \frac{1}{T_{\text{max}}} + b \quad (52);$$
 es posible calcular para cada par  $\beta$ ,  $T_{\text{max}}$  (Tabla 12) el valor  $b$ , usando como dato la  $E_a$  calculada por el método dinámico en nuestro sistema. Se calculó luego una  $b$  media ( $\bar{b}$ ) para los picos I y II, dando los siguientes valores:

	<u>Método Dinámico</u>	<u>Método Iterativo</u>
Pico I	$E_a = 54.5 \times 10^3 \text{ cal/mol}$	$\bar{b}_I = 38.46$
Pico II	$E_a = 61.0 \times 10^3 \text{ cal/mol}$	$\bar{b}_{II} = 42.21$

Aplicando la ecuación (52) para  $\beta = 0.12^\circ\text{C}/\text{min}$  (que es la velocidad de calentamiento empleada en el trabajo de Burjanadze et al (1966)), surgen los siguientes valores de  $T_{\text{max}}$ :

$$T_{\text{max}} (\text{Pico I}) = 42.96^\circ\text{C}$$

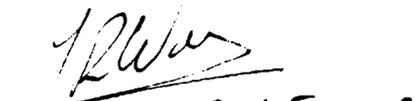
$$T_{\text{max}} (\text{Pico II}) = 49.90^\circ\text{C}$$

Ambas temperaturas son comparables con las obtenidas experimentalmente al calentar miosina a una velocidad de  $0.12^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Resulta entonces aplicable la hipótesis propuesta, de que la energía de activación de la reacción de desnaturalización es aproximadamente la misma, independiente del sistema, con tal que éste incluya a las mismas proteínas en estado nativo.

Estos resultados son un aporte más, respecto a la asignación de HMM al pico I y LMM al pico II.

  
P. CAÑON

  
Jorge R. Wagner

FACT.	ISS
*	*
700 - 199172	

Desde hace mil años me pregunto ¿Qué haré ahora? Y aún no necesito responderme.

Voces, Antonio Porchia.

## REFERENCIAS

## 6. REFERENCIAS

- Anderson, M.L. y Ravesi, E.M. (1970) On the nature of the association of protein in frozen - stored cod muscle. J. Food Sci., 35, 551.
- Anglemier, A.F. y Montgomery, M.W. (1976). Aminoacids, Peptides, and Proteins. In "Principles of Food Science, Part 1: Food Chemistry" (Ed. O.R. Fennema) Pag. 238. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Añón, M.C. y Calvelo, A. (1980). Freezing rate effects on the drip loss of frozen beef. Meat Science, 4, 1
- AOAC, Official Methods of Analysis (1945). 6 th Edition. "Meat and Meat Products" Pag. 27.
- AOAC, Official Methods of Analysis (1980). 13 th Edition. "Meat and Meat Products". Pag. 376.
- Arakawa, N.; Inagaki, C.; Kitamura, T.; Fugiki, S. y Fujimaki, M. (1976). Some possible evidence for an alteration in the actin - myosin interaction in stored muscle. Agr. Biol. Chem., 40, 1445.
- Arntfield, S.D. y Murray, E.D. (1981). The influence of processing parameters on food protein functionality. I. Differential scanning calorimetry as an indicator of protein denaturation. Can. Inst. Food Sci. Technol., 14, 289.
- Arntfield, S.D.; Murray, E.D. e Ismond, M.A.H. (1985). The influence of processing parameters on food protein functionality III. Effect of moisture content on the thermal stability of fababean protein. Can. Inst. Food Sci. Technol. 18, 227.
- ASTM E 698 (1979). Standard test method for: Arrhenius kinetic constants for thermally unstable materials.

- Awad, A.; Powrie, W.D. y Fennema, O. (1968). Chemical deterioration of frozen bovine muscle at  $-4^{\circ}\text{C}$ . J. Food Sci., 33, 227.
- Ayres, J.C. (1960). Temperature relationships and some other characteristics of the microbial flora developing on refrigerated beef. Food Res. 25, 1.
- Baardseth, P. (1977). Meat Products and Vegetables. In "Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing. (Eds. T. Høyem y O. Kvåle) Pag. 280. The Norwegian Food Research Institute, Ås, Norway. Applied Science Publishers Limited. London.
- Bendall, J. R. (1969). Muscles, molecules and movement. American Elsevier Publishing Co., New York. (citado por Ockerman, 1977)
- Bevilacqua, A.E.; Zaritzky, N.E. y Calvelo, A. (1979). Histological measurements of ice in frozen beef. J. Food Technol., 14, 237.
- Bevilacqua, A.E. y Zaritzky, N.E. (1982). Ice recrystallization in frozen beef. J. Food Sci., 47, 1410.
- Bevilacqua, A.E. y Zaritzky, N.E. (1986). Rate of pigment modifications in packaged refrigerated beef using reflectance spectrophotometry. J. Food Proces. Presev., 10, 1.
- Blum, J.J. (1960). Interaction between myosin and its substrates. Arch. Biochem. Biophys., 87, 104.
- Bodwell, C.E. y Mc Clain, P.E. (1976). Composición química de los tejidos animales. Proteínas. En "Ciencia de la carne y de los productos cárnicos" (Eds. J. F. Price y B. S. Schweigert). Pag. 80. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Bourne, M.C. (1982). Viscosity and Consistency. In "Food texture and viscosity: Concept and measurement". Pag. 199. Academic Press, Inc. London.

- Briskey, E.J. y Fukazawa, T. (1971). Myofibrillar proteins of skeletal muscle. In "Advances in Food Research" Vol. 19. (Eds. C.O. Chichester, E.M. Mrak, y G.F. Stewart). Academic Press, New York.
- Briskey, E.J.; Kastenschmidt, L.L.; Forrest, J.C.; Beecher, G.R.; Judge, M.D.; Cassens, R.G. y Hoekstra, W.G. (1966). Biochemical aspects of postmortem changes in porcine muscle. J. Agr. Food Chem., 14, 201.
- Briskey, E.J.; Seraydarian, K. y Mommaerts, W.F.H.M. (1967). The modification of actomyosin by  $\alpha$ -actinin. II. The interaction between  $\alpha$ -actinin and actin. Biochim. Biophys. Acta., 133, 424.
- Brook, R.J. (1976). Controlled grain growth. In "Treatise on materials science and technology". Vol. 9. (Ed. F.F.Y. Wang). Pag. 331. Academic Press. London.
- Burjanadze, M.V.; Vepkhoadze, L.K.; Kisiriya, E.L.; Monaselidze, D.R.; Privalov, P.L. y Charkmani, G.G. (1966). Heat denaturation of myosin, heavy and light meromyosin. Biofiz. Myshech. Sokrashcheniya. 218
- Buttkus, H. (1970). Accelerated denaturation of myosin in frozen solution. J. Food Sci., 35, 558.
- Calvelo, A. (1981). Recent studies on meat freezing. In "Developments in Meat Science - 2" (Ed. R. Lawrie). Pag. 125. Applied Science Publishers LTD. Essex, England.
- Carroll, R.J.; Cavanaugh, J.R. y Rorer, F.P. (1981). Effects of frozen storage on the ultrastructure of bovine muscle. J. Food Sci., 46, 1091.
- Cassens, R.G. y Cooper, C.C. (1971). Red and white muscle. In "Advances in Food Research". Vol. 19 (Eds. C.O. Chichester, E.M. Mrak, y G.F. Stewart). Academic Press, New York.

- Cheftel, J.C. y Cheftel, H. (1976). Carne y Pescado. En " Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos ". Vol. I. Pag. 65. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Chen, P.S.; Toribara, T.Y. y Warner, H. (1956). Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry*, 28, 1756.
- Chrystall, B.B. (1971). Macroscopic, microscopic and physico-chemical studies of the influence of heating on muscle tissues and proteins. *Dissertation Abstr., Internat. Sect. B, Sci. and Engng.*, 31, 6050.
- Connell, J.J. (1960). Changes in the ATP-ase activity and sulfhydryl groups of cod flesh during frozen storage. *J. Sci. Food Agric.*, 11, 245.
- Connell, J.J. (1962). Changes in amount of myofibrillar extractable from cod flesh during storage at -14°C. *J. Sci. Food Agric.*, 13, 607.
- Connell, J.J. (1968). The effect of freezing and frozen storage on the proteins of fish muscle. In "Low Temperature Biology of Foodstuffs". (Hawthorne, J.; Rolfe, E.J. Eds.) Pag. 333. Pergamon Press. Oxford.
- Davey, C.L. (1983). The structure of muscle and its properties as meat. In "Recent Advances in the Chemistry of Meat". (Ed. Allen J. Bailey). Pag. 1. The Royal Society of Chemistry. Burlington House, London.
- Delben, F.; Crescenzi, V. y Quadrifoglio, F. (1969). A study of thermal denaturation of ribonuclease by differential scanning calorimetry. *Int. J. Proteins Res.*, 1, 145.
- Delben, F. y Crescenzi, B. (1969). Thermal denaturation of lisozyme. A Differential scanning calorimetry investigation. *Biochim. Biophys. Acta*, 194, 615.
- Deatherage, F.E. y Hamm, R. (1960). Influence of freezing and thawing on hydration and charges of the muscle proteins. *Food Research*, 25, 623.

- Desrosier, N.W. y Desrosier, J.N. (1977). The Technology of Food Preservation. Pags. 110 y 457. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut.
- Draudt, K.N. (1972). Changes in meat during cooking Proc. 25 th. Ann. Reciprocal Meat Confer., Amer. Meat Science Assoc., Ames. Jowa. Pag. 243.
- Duswalt, A.A. (1974). The practice of obtaining kinetics data by differential scanning calorimetry. *Thermochimica Acta.*, 8, 57.
- Evans, M.T.A.; Phillips, M.C. y Jones, M.N. (1979). The conformation and aggregation of bovine  $\beta$ -casein A. II. Thermodynamics of thermal association and the effects of changes in polar and apolar interactions on micellization. *Biopolymers*, 18, 1123.
- Eyring, H. (1937). Deduction of reaction mechanisms from the theory of absolute rates. *J. Chem. Phys.*, 5, 113.
- Eyring, H. y Stearn, A.E. (1939). The application of the theory of absolute reaction rates to proteins. *Chem. Rev.* 24, 253.
- Fennema, O.R., Powrie, W.D. y Marth, E.L. (1973). Characteristics of food myosystems and their behaviour during freeze-preservation. In "Low Temperature Preservation of Foods and Living Matter". Pag. 282. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Fennema, O.R. (1977). Water and protein hydration. In "Food Proteins". Pag. 50. Westport, Connecticut. Avi Publishing Co.
- Fennema, O. (1982). Behavior of proteins at low temperatures. In "Food Protein Deterioration. Mechanisms and fuctionality (Ed. J.P. Cherry). Pag. 109. ACS Symposium Series 206. American Chemical Society. Wash. D.C.

- Gershman, L.C. y Dreizen, P. (1970). Relationship of structure to function in myosin. I. Subunit dissociation in concentrated salt solutions. *Biochemistry*, 9, 1677.
- Gill, C.O. (1982). Microbial interaction with meats. In "Meat Microbiology". (Ed. M.H. Brown). Pag. 25. Applied Science Publishers, London.
- Goll, D.E. y Robson, R.M. (1967). Molecular properties of post mortem muscle. 1 Myofibrillar nucleoside triphosphatase activity of bovine muscle. *J. Food Sci.*, 32, 323.
- Goodno, C.C.; Harris, T.A. y Swenson, C.A. (1976). Thermal transitions of myosin and its helical fragments. Regions of structural instability in the myosin molecule. *Biochemistry*, 15, 5157.
- Goodno, C.C. y Swenson, C.A. (1975a). Thermal transitions of myosin and its helical fragments. I. Shifts in proton equilibria accompanying unfolding. *Biochemistry*, 14, 867.
- Goodno, C.C. y Swenson, C.A. (1975b). Thermal transitions of myosin and its helical fragments. I. Solvent-induced variations in conformational stability. *Biochemistry*, 14, 873.
- Gornall, A.G.; Bardawil, C.J. y David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reagent. *J. Biol. Chem.*, 177, 751.
- Greaser, M.L.; Cassens, R.G.; Briskey, E.J. y Hoekstra, W.G. (1969). Post-mortem changes in subcellular fraction from normal and pale, soft and exudative porcine muscle. 1. Calcium accumulation and adenosine triphosphate activities. *J. Food Sci.* 34, 120.
- Hamm, R. (1965). Influence of heating on animal tissues (German). *Dechema Monograph*, 56, 159.

- Hamm, R. (1966). Heating of muscle systems. In "The Physiology and biochemistry of muscle as a food. (Ed. E.J. Briskey, R.G. Cassens y J.C. Trautman). University of Wisconsin Press. Madison.
- Hamm, R. (1970). Properties of meat proteins. In "Proteins as Human Food". (Ed. R.A. Lawrie). Pag. 167. Butterworths, London.
- Hamm, R. (1975). Water-holding capacity of meat. In "Meat (Ed. D.A.J. Cole y R.A. Lawrie). Pag. 321. The AVI Publishing Company Inc. Wesport. Connecticut.
- Hamm, R. (1977). Changes of muscle proteins during heating of meat. In "Physical, chemical and biological changes in food caused by thermal processing". (Ed. T. Høyem y O. Dvåle). Pag. 101. Applied Sci. Publ., London.
- Hay, J.D.; Currie, R.W. y Wolfe, F.H. (1973a). Effect of post mortem aging on chicken muscle fibrils. J. Food Sci., 38, 981.
- Hay, J.D.; Currie, R.W. y Wolfe, F.H. (1973b). Polyacrylamide disc gel electrophoresis of fresh and aged chicken muscle proteins in sodium dodecylsulfate. J. Food Sci., 38, 987.
- Harrington, W.F. y Rodgers, M.E. (1984). Myosin. In "Annual Review of Biochemistry". Vol. 53. (Eds. C.C. Richardson, P.D. Boyer y A. Meister). Pag. 35. Annual Reviews Inc. California. USA.
- Hasegawa, T.; Pearson, A.M.; Price, J.F. y Lechowich, R.V. (1970). Action of bacterial growth on sarcoplasmic and urea-soluble proteins from muscle. 1. Effects of Clostridium Perfringens, Salmonella Enteritidis, Achromobacter Liquefaciens, Streptococcus Faecalis and Kurthia Zopfü. Appl. Microbiol. 20, 117.

- Herring, H.K.; Cassens, R.G. y Briskey, E.J. (1969a). Studies on bovine natural actomyosin. 1. Relation of ATPase and contractibility to tenderness of muscle. J. Food Sci., 34, 389.
- Herring, H.K.; Cassens, R.G. y Briskey, E.J. (1969b). Studies on bovine natural actomyosin. 2. Physicochemical properties and tenderness of muscle. J. Food Sci., 34, 571.
- Hofmann, K. (1973). Identification and determination of meat proteins and added proteins by the sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. (German) Z. Analyt. Chem., 267, 355.
- Hotta, K. (1961). A model for the myosin ATPase active site. J. Biochem., 50, 218.
- Huber, C.S. y Stadelman, W.J. (1970). Effect of freezing rate and freeze drying on the soluble proteins of muscle. 1. Chicken muscle. J. Food Sci., 35, 229.
- Hultin, H.O. (1976). Characteristics of muscle tissue. In "Principles of Food Science". Part I. Food Chemistry. (Ed. Owen R. Fennema). Pag. 577. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Ito, T.; Sung, S.K. y Fukazawa, T. (1978). Changes of acto-heavy meromyosin ATPase of rabbit skeletal muscle during post mortem storage. J. Agric. Food Chem., 26, 324.
- Jacobson, A.J. y Henderson, J. (1973). Temperature sensitivity of myosin and actomyosin. Canad. J. Biochem., 51, 71.
- Jasper, W. y Placzek, R. (1978). Congelación, depósito congelado y descongelación de canales. En " Conservación de la carne por el frío " Pag. 60. Editorial Acribia, Zaragoza. España.

- Jul, M. (1969). Quality and stability of frozen meats. In "Quality and Stability of Frozen Foods. Time-Temperature Tolerance and its Significance". (Eds. W.B. Van Arsdel, M.J. Copley y R.L. Olson). Pag. 191. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Kako, Y. (1968). Studies on muscle proteins: II. Changes of beef, pork and chicken protein during the meat product manufacturing processes. Mem. Fac. Agric. Kagashima University, 6, 175.
- Kang, J.O.; Ito, T. y Fukazawa, T. (1983). Effect of frozen storage on the structure and enzymatic activities of myofibrillar proteins of rabbit skeletal muscle. Meat Science, 9, 131.
- Karmas, E. y Dimarco, G.R. (1970). Denaturation thermoprofiles of some proteins. J. Food Sci., 35, 725.
- Katz, B. (1966). Nerve, muscle and synapse. Mc Graw-Hill y Co., New York.
- Khan, A.W. (1966). Cryochemistry of animal tissue. Biochemical changes in poultry muscle during freezing and storage. Cryobiology, 3, 224.
- Khan, A.W. y Berg, L. van den. (1967). Biochemical and quality changes occurring during freezing of poultry meat. J. Food Sci., 32, 148.
- King, F.J. (1966). Ultrastructural analysis of changes in the composition of myofibrillar protein extracts obtained from fresh and frozen cod muscle. J. Food Sci., 31, 649.
- Laakkonen, E. (1973). Factors affecting tenderness during heating of meat. Adv. Food Res., 20. 257.
- Labuza, T.P. (1982). Shelf-life of frozen meat and seafood. In "Shelf-life dating of foods". Pag. 439. Food & Nutrition Press, Inc. Westport, Connecticut. USA.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227, 680.
- Laemmli, U.K. y Favre, M. (1973). Maturation of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *J. Mol. Biol.*, 80, 575.
- Laidler, K.J. y Bunting, P.S. (1973). The denaturation of proteins. In "The chemical kinetics of enzyme action". Pag. 413. Clarendon Press, Oxford.
- Laidler, K.J. (1977). Cinética de reacciones. Tomo I. Reacciones homogéneas en fase gaseosa. Pag. 41. Editorial Alhambra. Zaragoza, España.
- Lawrie, R.A. (1974). Ciencia de la carne. Editorial Acribia 2º Edición. Zaragoza, España.
- Layne, E. (1957). Spectrometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In "Methods in Enzymology". (Eds. S.P. Colowick y N.O. Kaplan). Vol. III. Pag. 450. Academic Press, New York.
- Lee, C. y Rha, C. (1979). Rheological properties of proteins in solution. In "Food texture and rheology". (Ed. P. Sherman). Pag. 245. Academic Press. Inc., London. LTD.
- Levitt, J. (1978). The role of proteins in the freezing injury and resistance of biological material. In "Proteins at low temperatures". (Ed. O. Fennema) Pag. 141. Advances in Chemistry Series 180. American Chemical Society. Washington. D.C.
- Levy, M. y Benaglia, A.E. (1950). The influence of temperature and pH upon the rate of denaturation of ricin. *J. Biol. Chem.*, 186, 829.
- Lillevik, H.A. (1970). The determination of total organic nitrogen. In "Methods in Food Analysis. Physical, chemical and instrumental methods of analysis. 2nd. Edition (Ed. M.A. Joslyn). Academic Press. New York.

- Love, R.M. y Ironside, J.I.M. (1958). Studies on protein denaturation in frozen fish. II. Preliminary freezing experiments. *J. Sci. Food Agric.*, 9, 604.
- Love, R.M. (1966). The freezing of animal tissue. In "Cryobiology". (Ed. H. T. Meryman). Pag. 317. Academic Press, London.
- Love, R.M. (1967). Effect of ultra-rapid freezing on the muscle of cod. *Chem. Ind.*, 23, 2151..
- Love, R.M. (1968). Ice formation in frozen muscle. In "Low temperature biology of foodstuffs" (Eds. J. Hawthorn and E.J. Rolfe). Pag. 105. Pergamon. Oxford.
- Lowey, S.; Goldstein, L. y Luck, S. (1966). Isolation and characterization of a helical sub-unit from heavy meromyosin. *Biochem. Z.* 345, 248.
- Lowry, O.H.; Rosebroug, H.J.; Lewis, A. y Randall, K.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Mahler, H.R. y Cordes, E.H. (1971). Structural organization of protein. In "Biological Chemistry" 2nd. Editon (Eds. H.R. Mahler y E.H. Cordes). Pag. 110. Harper y Row. Publishers. New York.
- Martens, H.; Stabursvik, E. y Martens, M. (1982). Texture during cooking related to thermal denaturation of muscle proteins. *J. Texture Studies*, 13, 291.
- Martens, H. y Vold, E. (1976). DSC Studies of muscle protein denaturation. Proceedings 22nd European Meeting, Meat Research Workers, Malmö, Sweden, J.9.
- Martino, M.M. y Zaritzky, N.E. (1986). Efectos de la temperatura en el crecimiento de grano en hielo policristalino. Publicación Interna N° 41. CIDCA.

- Martonosi, A. (1969). Protein composition of sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36, 1039.
- Mascheroni, R.H. (1977). Transferencia de calor con simultáneo cambio de fase en tejidos cárneos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. UNLP.
- Mascheroni, R.H. y Calvelo, A. (1978). Modelo de descenso crioscópico en tejidos cárneos. *La Alimentación Latinoamericana*, 12, 34.
- Matsumoto, J.J. (1979). Denaturation of fish muscle proteins during frozen storage. In "Proteins at low temperatures". (Ed. O. Fennema). Pag. 205. American Chemical Society. Washington. D.C.
- Matsumoto, J.J. (1980). Chemical deterioration of muscle proteins during frozen storage. In "Chemical Deterioration of Proteins" (Eds. J. Whitaker y M. Fujmaki). ACS Symposium Series, N° 123, 95. American Chemical Society, Washington. D.C.
- Matthews, A.D.; Park, G.R. y Anderson, E.M. (1980). Evidence for the formation of covalent cross-linkend myosin in frozen-stored cod minces. In "Advances in Fish Science and Technology". Pag. 438. Fishing News Books. Ltd. Aberdeen. U.K.
- Multon, J.L. (1970). Sur quelques aspects thermodynamiques de la denaturation thermique des proteines en milieu solide peu hydraté. *C.R. Acad. Sc. París.* t. 271, 601.
- Murray, J.M. y Weber, A. (1974). The cooperative action of muscle proteins. *Sci. Am.* 230, 58.
- Ockerman, H.W. (1974). Chemistry of muscle and major organs. In "Meat Higiene" (Ed. J.A. Libby). Pag. 232. Lea y Febiger, Philadelphia.

- Ockerman, H.W. (1977). Meat Proteins. In "Food Colloids. (Ed. H.D. Graham).  
Pag. 240. The AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut.
- Offer, G. y Trinick, J. (1983). On the mechanism of water holding in meat: The  
swelling and shrinking of myofibrils. *Meat Science*, 8, 245.
- Ozawa, T. (1970). Kinetic analysis of derivative curves in thermal analysis.  
*J. Thermal Anal.*, 2, 301.
- Pearson, A.M. (1976). Función del músculo y cambios post-mortem. En "Ciencia  
de la carne y de los productos cárnicos". (Eds. J.F. Price y B.S. Schweigert)  
Pag. 212. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Pelletier, G.E. y Ouellet, L. (1961). Influence of pH and temperature on  
myosin inactivation. *Can. J. Chem.* 39, 265.
- Penny, I.F. (1967a). The effect of post-mortem conditions on the extractability  
and adenosine triphosphatase activity of myofibrillar proteins of rabbit  
muscle. *J. Food Technol.*, 2, 325.
- Penny, I.F. (1967b). The influence of pH and temperature on the properties of  
myosin. *Biochem. J.*, 104, 609.
- Petrović, L. y Rahelić, S. (1981). Influence of different freezing temperature  
on some characteristics of fibrillar proteins of bovine longissimus dorsi  
muscle. 27. Europaischer Fleischforscher Kongress. Wien, Austria. Pag.  
108.
- Piskarev, A.I.; Kaminarskaya, A.K. y Lukanitsa, L.G. (1960). Quantitative  
changes in fish on freezing. (Ed. A.I. Mikoyan). *Sci. Res. Inst. USSR.  
Refrig. Ind.*, Moscow.

- Porzio, M.A. y Pearson, A.M. (1977) . Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta*, 490, 27.
- Pravisani, C.I.; Califano, A.N. y Calvelo, A. (1985). Kinetics of starch gelatinization in potato. *J. Food Sci.*, 50, 657.
- Price, J.F. y Schweigert, B.S. (1971). *The Science of Meat and Meat Products*. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- Privalov, P.L. y Khechinashvili, N.N. (1974). A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J. Mol. Biol.*, 86, 665.
- Privalov, P.L. y Pfeil, W. (1979). Thermodynamics of protein folding. *Proc. FEBS Meeting*, 52, 159.
- Riedel, L. (1957). Kalorimetrische Untersuchungen über das Gefrieren von Fleisch. *Kältetechnik*, 9, 38.
- Robson, R.M.; Goll, D.E. y Temple, M.J. (1968). Determination of protein in "tris" buffer by the biuret reaction. *Anal. Biochem.*, 24, 339.
- Samejima, K.; Takahashi, K. y Yasui, T. (1976). Heat-induced denaturation of myosin total rod. *Agric. Biol. Chem.*, 40, 2455.
- Samejima, K.; Ishioroshi, M., y Yasui, T. (1980). Effect of myosin-actin interaction on the heat-induced gelation of myosin in the presence of F-actin. *Abstr. A-12, 26 th. Ann. Meeting, European Meat Res. Workers, Colorado. Springs, Co.*
- Scopes , R.K. (1970). Characterization and study of sarcoplasmic proteins. In *"Physiology and Biochemistry of muscle as a food"*. 2nd Edition (E.J. Briskey, R.G. Cassens, and B.B. Marsh. Eds.). Pag. 471. Univer. of Winconsin Press, Madison.

- Seidel, J.C. (1969). Similar effects on enzymic activity due to chemical modification of either of two sulfhydryl groups of myosin. *Biochim. Biophys. Acta*, 180, 216.
- Shenouda, S.Y.K. (1980). Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. *Adv. Food Res.*, 26, 275.
- Sikorski, Z.E.; Olley, J. y Kostuch, S. (1976). Protein changes in frozen fish. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.*, 8, (1), 97.
- Stabursvik, E. y Martens, H. (1979). Proteins in white and red muscle compared by differential scanning calorimetry (DSC). 25 th Eur. Meet. Meat Res. Work. Budapest, 5.21, 383.
- Stabursvik, E. y Martens, H. (1980). Thermal denaturation of proteins in post rigor muscle tissue as studied by DSC. *J. Sci. Food Agric.*, 31, 1034.
- Stabursvik, E. (1983). Myosin denaturation in pale, soft and exudative pork. *Proceedings of the 6 th. International Congress of Food Science and Technology*, 2, 45.
- Stabursvik, E.; Fretheim, K. y Frøystein, T. (1984). Myosin denaturation in pale, soft and exudative (PSE) porcine muscle tissue as studied by differential scanning calorimetry. *J. Sci. Food Agric.*, 35, 240.
- Stanley, D.W. (1976). The texture of meat and its measurement. In "Rheology and Texture in Food Quality. (Eds. J.M. de Man, P.W. Voisey, V.F. Rasper, y D.W. Stanley) Pag.405. Wesport, Connecticut. The AVI Publishing Company. Inc.
- Sung, S.K.; Ito, T. y Fukazawa, T. (1976). Relationship between contractility and some biochemical properties of myofibrils prepared from normal and PSE Porcine muscle. *J. Food Sci.*, 41, 102.

- Suzuki, T.; Kanna, K. y Tanaka, T. (1964). Studies on protein denaturation of frozen fish. Comparison between super rapid freezing by liquid nitrogen (-196°C) and air (-20°C) freezing. Bull. Jan. Soc. Sci. Fish., 30, 1022.
- Taborsky, G. (1978). Protein alterations at low temperatures: An Overview. In "Protein at Low Temperatures" (Ed. O. Fennema). Pag. 1. Advances in Chemistry Series 180. American Chemical Society. Washington. D.C.
- Tomás, M. y Funes, J. (1986). Aplicación del test del ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) sobre exudados de carnes congeladas y enfriadas. Publicación interna. CIDCA.
- Urbain, W.M. (1976). Conservación de la carne. En "Ciencia de la Carne y de los Productos Cárnicos". (Eds. J.F. Price y B.S. Schweigert). Pág. 413. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
- Volk, W. (1958). Analysis of variance. In "Applied Statistics for Engineers" Pag. 136. Mc. Graw-Hill Book Company, Inc. New York.
- Wright, D.J.; Leach, I.B. y Wilding, P. (1977). Differential scanning calorimetric studies of muscle and its constituent proteins. J. Sci. Food Agric., 28, 557.
- Wright, D.J. (1982). Application of scanning calorimetry to the study of protein behaviour in foods. In "Developments in Food Proteins-1 (Ed. B. J.F. Hudson). Applied Science Publishers. LTD.
- Wright, D.J. y Wilding, P. (1984). Differential scanning calorimetry study of muscle and its proteins: Myosin and its subfragments. J. Sci. Food Agric., 35, 357.
- Wu, Y.V. y Inglett, G.E. (1974). Denaturation of plant proteins related to functionality and food applications. A review. J. Food Sci., 39, 218.

- Wu, M.C.; Akahane, T.; Lanier, T.C. y Hamann, D.D. (1985). Thermal transitions of Actomyosin and Surimi prepared from Atlantic Craaker as studied by Differential Scanning Calorimetry. *J. Food Sci.*, 50, 10.
- Wynne-Jones, W.F.K. y Eyring, H. (1935). Absolute rate of reactions in condensed phases. *J. Chem. Physics*, 3, 492.
- Yamamoto, K.; Samejima, K. y Yasui, T. (1977). A comparative study of the changes in hen pectoral muscle during storage at 4°C and -20°C. *J. Food Sci.*, 42, 1642.
- Yasui, T.; Fukazawa, T.; Hashimoto, Y.; Kitagawa, S. y Sasaki, A. (1958). Denaturation of Myosin B. *J. Biochem. (Tokyo)*, 45, 717.
- Yasui, T.; Kawakami, H. y Morita, F. (1968). Thermal inactivation of myosin A-ATPase in the presence of F-actin. *Agric. Biol. Chem.*, 32, 225.
- Yasui, T.; Gotoh, T. y Morita, J. (1973). Influence of pH and temperature on properties of myosin A in glycerol treated fiber bundles. *J. Agric. Food Chem.*, 21, 241.
- Young, L.L. (1974). Heat stability of chicken actomyosin. *J. Food Sci.*, 39, 389.
- Ziegler, G.R. y Acton, J.C. (1984). Mechanisms of gel formation by proteins of muscle tissue. *Food Technol.*, 38, 77.

Acto no 682

En el día de la fecha se reunió el Jurado designado oportunamente para dictaminar sobre el trabajo de tesis presentado por el Lic. en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires Jorge Ricardo Wagner para optar el grado académico de Doctor en Ciencias Químicas (Orientación Tecnología Química) titulado "Desnaturalización de proteínas de músculo bovino durante la congelación y el almacenamiento en estado congelado", que oportunamente aprobó el acto seguido se procede a discutir la parte que el mismo merece, resolviéndose por unanimidad del jurado aprobarlo y calificarlo en sobresaliente diez (10)

Se Plata, 20 de noviembre de 1986

Presentes: D<sup>as</sup>. Sorgentini, Anon, Zeritzky y D<sup>as</sup> Trucco y Chirife -

