

Atividades de fosfolipase A₂ secretada e glutathione peroxidase em filés PSE (Pale, Soft, Exudative) de frango

Secreted phospholipase A₂ and glutathione peroxidase activities in chicken PSE (Pale, Soft, Exudative) meat

Gleice Rocha dos Santos¹; Denis Fabricio Marchi²; Juliana Nunes de Almeida¹; Fernanda Jéssica Mendonça³; Massami Shimokomaki⁴; Adriana Lourenço Soares^{5*}

Resumo

A liberação excessiva de cálcio do retículo sarcoplasmático durante a instalação de carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*) leva a um aumento da atividade da fosfolipase A₂ (PLA2), promovendo uma maior oxidação lipídica. Por outro lado, a glutathione peroxidase (GSH-Px) é uma enzima antioxidante selênio dependente, prevenindo danos oxidativos. O objetivo deste trabalho foi investigar as atividades da PLA2 secretada (sPLA2) e da GSH-PX em filés PSE de frango. Filés de frango (*Pectoralis major m.*) (n=24) foram obtidos de um frigorífico comercial. As amostras foram classificadas em PSE e Controle, com base nos valores de pH e L*, filés com pH_{1h30} ≤ 6,0 e L_{24h}* ≥ 53,0 como PSE e filés com pH_{1h30} > 6,0 e L_{24h}* < 53,0 como Controle. A atividade da sPLA2 foi determinada por kit enzimático e a atividade da GSH-Px foi determinada pela oxidação do NADPH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido). A atividade média da sPLA2 foi de 0,295 U.mg⁻¹ de proteína para os filés PSE e de 0,380 U.mg⁻¹ de proteína para os filés do Controle, não apresentando diferenças significativas (p > 0,05). A atividade da GSH-Px foi aproximadamente 24,4% maior (p ≤ 0,05) para os filés Controle quando comparado com filés PSE. A atividade da sPLA2 em filés PSE não foi alterada, entretanto filés PSE apresentam o sistema enzimático de defesa antioxidante comprometido com menor atividade de GSH-Px.

Palavras-chave: Enzimas, pH, qualidade de carne

Abstract

The excessive release of calcium from the sarcoplasmic reticulum during the installation of PSE (*Pale, Soft, Exudative*) meat, leads to increase of phospholipase A₂ (PLA2) activity and consequently causes a higher lipid oxidation. In contrast, glutathione peroxidase (GSH-Px) is a selenium-dependent antioxidant enzyme that prevents the oxidative damage. The aim of this work was to investigate the secreted PLA2 (sPLA2) and GSH-PX activities in PSE poultry meat. Breast meat samples (*Pectoralis major m.*) (n=24) were obtained from commercial slaughterhouse. Samples were classified as PSE and Control Meat based on pH and L* values, fillets with pH_{1h30} ≤ 6.0 and L_{24h}* ≥ 53.0 as PSE and fillets with pH_{1h30} > 6.0 and L_{24h}* < 53.0 with Control. sPLA2 was analyzed using enzymatic assay kit and GSH-Px was measured a coupled assay procedure recording the NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide

¹ Discente(s) Mestrado(s) do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR. E-mail: gleice_quimica@hotmail.com; juh.nunes@gmail.com

² Discente de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, UEL, Londrina, PR. E-mail: dfmarchi@yahoo.com.br

³ Discente em Química, Bolsista de Iniciação Científica da UEL, Londrina, PR. E-mail: fernandaquimuel@gmail.com

⁴ Prof. Dr. da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, UTFPR, Campus Londrina, Londrina, PR. E-mail: mshimo@sercomtel.com.br

⁵ Prof^ª Dr^ª do Dept^º de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UEL, Londrina, PR. E-mail: adri.soares@uel.br

* Autor para correspondência

phosphate reduced) oxidation. The sPLA2 average was 0.295 U.mg⁻¹ of protein for PSE meat and 0.380 U.mg⁻¹ of protein for Control meat, did not differ significantly ($p > 0.05$). The GSH-Px activity was approximately 24,4% higher ($p \leq 0.05$) for Control meat when compared to PSE meat. The sPLA2 activity of PSE fillets did not changed, however PSE fillets present the enzymatic system of antioxidant defense compromised with lower GSH-PX activity.

Key words: Enzymes, pH, meat quality

Introdução

A condição PSE em aves, assim como em suínos, é caracterizada pelo processo de *rigor mortis* acelerado, com pH baixo ($< 5,80$) e uma temperatura muscular elevada (acima de 35°C) (SOSNICKI et al., 1998). A combinação destes fatores resulta na desnaturação das proteínas sarcoplasmáticas e miofibrilares, comprometendo assim, as propriedades funcionais (OLIVO et al., 2001) tecnológicas (BARBUT, 2002; KISSEL et al., 2009) e sensoriais da carne (DROVAL et al., 2012a).

A predisposição genética a anomalia PSE relaciona-se com uma mutação na Proteína Receptora de Rianodiana (RYR), que controla o fluxo de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático, em suínos predispostos ocorre a liberação excessiva de Ca²⁺ para o sarcoplasma, conduzindo a contração muscular, ao aumento do metabolismo glicolítico e ao aumento na produção de ácido láctico, desenvolvendo consequentemente carnes PSE (CHEAH ; CHEAH, 1981; MICKELSON ; LOUIS, 1996). Essa mutação ainda não foi detectada em aves (STRASSBURG; CHIANG, 2009, DROVAL et al., 2012b).

A excessiva concentração de Ca²⁺ durante a instalação de carne PSE promove o aumento da atividade de enzimas cálcio-dependente como a fosfolipase A₂ (PLA₂) (CHEAH; CHEAH; KRAUSGRILL, 1995; SOARES et al., 2003) e calpaínas (SANTOS et al., 2008; WILHELM et al., 2010).

A PLA₂ compreende uma família de enzimas que catalisam a hidrólise da posição sn-2 dos glicerofosfolípidios das membranas para liberar

ácidos graxos livres e lisofosfolípidios. As PLA₂ participam da liberação do ácido araquidônico (20:4) das membranas das células, conduzindo aos vários tipos de precursores de mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas e leucotrienos. As PLA₂ têm sido caracterizadas e classificadas, de acordo com as suas características bioquímicas em três grandes grupos: a fosfolipase A₂ secretada (sPLA₂), a fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂) e a fosfolipase A₂ independente de Ca²⁺ (iPLA₂) (MURAKAMI; KUDO, 2002). A cPLA₂ está envolvida diretamente nos mecanismos de processos inflamatórios, no entanto a participação das outras PLA₂ ainda não está bem definida (EVANS et al., 2001).

A cPLA₂ é considerada enzima chave no desencadeamento da formação de carnes PSE em suínos (CHEAH; CHEAH, 1981; CHEAH; CHEAH; KRAUSGRILL, 1995) e frangos (SOARES et al., 2003). Esta enzima é ativada pelo Ca²⁺ e hidrolisa os fosfolípidios da membrana, liberando ácidos graxos insaturados de cadeia longa que induzem o retículo sarcoplasmático a liberar mais Ca²⁺, ocasionando então, a perda de controle da glicólise e a elevada formação de ácido láctico (CHEAH ; CHEAH, 1981). Entretanto, ainda não se sabe sobre a atividade da sPLA₂ no desenvolvimento de carnes PSE.

A glutathione peroxidase (GSH-Px) é uma enzima antioxidante selênio dependente, responsável pela redução de hidroperóxidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio em álcool e água, respectivamente, a partir da glutathione reduzida (GSH) (COMINETTI et al., 2011). Esta enzima atua de maneira importante na proteção celular quanto a mudanças oxidativas, sendo este um dos mecanismos de defesa antioxidante mais importante do sistema biológico (JORDÃO et al., 1998). Assim, o objetivo

deste trabalho foi investigar as atividades da PLA₂ secretada (sPLA₂) e da GSH-Px em filés PSE de frango.

Material e Métodos

Animais

As amostras de filés de peito de frango (*Pectoralis major*) foram cedidas por um frigorífico de grande porte localizado na região oeste do Paraná. Os frangos de linhagem comercial foram abatidos aos 42 dias seguindo as práticas comerciais: insensibilização elétrica, sangria, escaldagem, depenagem, evisceração, pré-chiller, chiller, gotejamento e desossa. O tempo decorrido do abate até a coleta de amostra foi de aproximadamente 1h e 30min.

Classificação das amostras

Amostras de filés de peito de frango foram classificadas em PSE e Controle baseado nos valores de pH e L*. O pH foi determinado 1h e 30min. (pH_{1h30}) *post-mortem* utilizando um potenciômetro de contato (Texto 205) (OLIVO et al., 2001; SOARES et al., 2003; WILHELM et al., 2010). Filés com valores de pH_{1h30} ≤ 6,0 foram classificados como PSE e filés com pH_{1h30} > 6,0 como Controle. O valor de L* 24h *post-mortem* (L_{24h}*) foi determinado utilizando o colorímetro Minolta CR400 (Sistema de cor CIELAB), conforme descrito por Soares et al. (2003) para confirmação da classificação. Assim, filés que obtiveram valores de pH_{1h30} ≤ 6,0 e L_{24h}* ≥ 53,0 foram classificados como PSE e filés com valores de pH_{1h30} > 6,0 e L_{24h}* < 53,0 como Controle. Após a classificação, doze amostras de cada tratamento foram embaladas em sacos plásticos hermeticamente fechadas, envoltas em papel alumínio e armazenadas em freezer a -80 °C até análise das atividades enzimáticas de sPLA₂ e GSH-Px.

Atividade da Fosfolipase A₂ secretada (sPLA₂)

A atividade da sPLA₂ foi realizada utilizando kit produzido pela Cayman Chemical Company conforme procedimento descrito por Chen et al. (2010). Basicamente, 5,0 g de amostra foram homogeneizadas em ultra-turrax na velocidade máxima em banho de gelo, com 25 mL de tampão pH 7,4 contendo 50 mmol.L⁻¹ de fosfato, 1 mmol.L⁻¹ de EDTA e centrifugados por 15 minutos a 10.000 g a 4 °C. A atividade de sPLA₂ foi expressa em 1 U.mg⁻¹ proteína, sendo 1 U definido como 1 μmol de arachidonoyl Thio-PC hidrolisado.min⁻¹ a 25 °C. A determinação de proteína foi realizada conforme metodologia descrita por Lowry et al. (1951).

Atividade da Glutaciona peroxidase (GSH-Px)

A atividade da GSH-Px foi realizada através da medida de oxidação do NADPH, acompanhada pela diminuição da absorvância a 340 nm (CHEN; LINDMARK-MANSSON; AKESSON, 2000). 5,0 g de amostra foram homogeneizadas com tampão fosfato 0,25 mol.L⁻¹ (pH=7,6) em ultra-turrax em velocidade máxima em banho de gelo, sendo posteriormente centrifugada por 20 minutos a 10.000 g e filtrada. Uma alíquota de 100μL do filtrado reagiu com 200 μL de tampão fosfato pH 7,4 e 25 mmol.L⁻¹ de EDTA, 11,1 μL de glutaciona redutase (5 U) e 50 μL de glutaiona reduzida (40 mmol.L⁻¹) e foram incubados por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, 10 μL de NADPH (de 20 mmol.L⁻¹) e 620 μL de tampão fosfato pH 7,4 foram adicionados. A reação iniciou-se pela adição 20 μL de terc-butilhidroperóxido (15 mmol.L⁻¹) e a absorvância foi acompanhada por 5 minutos, em intervalos de 1 minuto. Um branco foi preparado sem a adição de GSH-Px. A atividade de GSH-Px foi expressa em 1 U.g⁻¹ de amostra, sendo 1U definido como 1 μmol de NADPH oxidado.min⁻¹.

Análise estatística

O teste *t-Student* a 5% de probabilidade foi aplicado para comparação dos resultados entre os filés PSE e Controle utilizando o programa *STATISTICA for Windows* versão 7.0.

Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta as atividades das enzimas fosfolipase A₂ secretada (sPLA₂) e da glutaiona peroxidase (GSH-Px). A sPLA₂ não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre os filés PSE e Controle. Resultado semelhante foi observado por Chen et al. (2010), que também não encontraram diferença significativa em carnes suínas PSE e Normal. Entretanto, estes mesmos autores constataram maior atividade da PLA₂ total para carne suína PSE. A atividade de PLA₂ total

compreende a soma das frações de cPLA₂, sPLA₂ e iPLA₂. Apesar da sPLA₂ ser dependente de Ca²⁺ para sua atividade, os resultados obtidos apontam que ela não está relacionada com o desenvolvimento de carnes PSE. Soares et al. (2003) demonstraram que o estresse térmico pré-abate em frangos promove maior atividade da cPLA₂ devido a alta concentração de Ca²⁺ e consideraram esta enzima como indutora das reações bioquímicas e fisiológicas que ocasionam carnes com anomalia PSE. O papel das PLA₂ na formação de carnes PSE pode estar relacionado com início do desenvolvimento de processos inflamatórios nos animais em resposta ao estresse fisiológico pré-abate e como apenas a cPLA₂ tem papel definido nos mecanismos de processos inflamatórios, entende-se o porquê da sPLA₂ não ter apresentado diferenças significativas (EVANS et al., 2001).

Tabela 1. Atividade das enzimas fosfolipase A₂ secretada (sPLA₂) e de glutatona peroxidase (GSH-Px) em filés de frango PSE e Controle.

	sPLA ₂ (U.mg ⁻¹ de proteína)	GSH-PX (U.g ⁻¹ de amostra)
PSE (n=12)	0,295 ^a ± 0,081	0,258 ^b ± 0,035
CONTROLE (n=12)	0,380 ^a ± 0,133	0,321 ^a ± 0,041

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste *t-student* a 5,0% de probabilidade.

Fonte: Elaboração dos autores.

A maior atividade da cPLA₂ em filés PSE ocasiona liberação de ácido araquidônico aumentando a suscetibilidade a oxidação lipídica, fato este observado por Soares et al. (2009) que encontraram que os filés PSE apresentaram 38,6% mais ácido araquidônico do que filés normais e mostraram-se 27% mais oxidados que filés normais.

A atividade da GSH-Px foi aproximadamente 24,4% maior ($p \leq 0,05$) para os filés Controle quando comparado com filés PSE (Tabela 1), corroborando com resultados obtidos por Chen, Lindmark-Mansson e Akesson (2010) que observaram menor atividade desta enzima para carne suína

PSE comparada à carne normal. A enzima GSH-Px tem papel fundamental no mecanismo de defesa antioxidante animal (JORDÃO et al, 1998). Possivelmente, a enzima GSH-Px estava mais ativa no animal durante o pré-abate em resposta ao estresse e a possíveis processos inflamatórios desencadeados pela cPLA₂, o que levou a diminuição de sua atividade *post-mortem* observada nos filés PSE.

Em conclusão, a atividade da sPLA₂ em filés PSE não foi alterada, entretanto estes filés apresentam o sistema enzimático de defesa antioxidante comprometido com menor atividade de GSH-Px.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPEs/MEC pela bolsa de Mestrado.

Referências

- BARBUT, S. Problem of pale soft exudative meat in broiler chicken. *British Poultry Science*, Edinburgh, v. 38, n. 4, p. 355-358, 2002.
- CHEAH, K. S.; CHEAH, A. M. Mitochondrial calcium transport and calcium-activated phospholipase in porcine malignant hyperthermia. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 634, p. 70-84, 1981.
- CHEAH, K. S.; CHEAH, A. M.; KRAUSGRILL, D. I. Effect of dietary supplementation of vitamin E on pig meat quality. *Meat Science*, Barking, v. 39, n. 2, p. 255-264, 1995.
- CHEN, T.; ZHOU, G-H.; XU, X-L.; ZHAO, G-M.; LI, C. Phospholipase A₂ and antioxidant enzyme activities in normal and PSE pork. *Meat Science*, Barking, v. 84, n. 1, p. 143-146, 2010.
- CHEN, J.; LINDMARK-MANSSON, H.; AKESSON, B. Optimisation of a coupled enzymatic assay of glutathione peroxidase activity in bovine milk and whey. *International Dairy Journal*, Barking, v. 10, n. 5-6, p. 347-351, 2000.
- COMINETTI, C.; BORTOLI, M. C.; ABDALLA, D. S.; COZZOLINO, S. M. Estresse oxidativo, selênio e nutrigenética. *Nutrire: Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, v. 36, n. 3, p. 131-153, 2011.
- DROVAL, A. A.; BINNECK, E.; MARIN, S. R. R.; PAIÃO, F.G.; OBA, A.; NEPOMUCENO, A.L.; SHIMOKOMAKI, M. Identification of a single nucleotide polymorphism in the chicken skeletal muscle ryanodine gene. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 11 n. 2, p. 821-829, 2012b.
- DROVAL, A. A.; BENASSI, V. T.; ROSSA, A.; PRUDENCIO, S. H.; PAIÃO, F. G.; SHIMOKOMAKI, M. Consumer attitudes and preferences regarding broiler breast PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. *Journal of Applied Poultry Research*, Champaign, v. 21, n. 3, p. 502-507, 2012a.
- EVANS, J. H.; SPENCER, D. M.; ZWEIFACH, A.; LESLIE, C. C. Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A₂ translocation to internal membranes. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 276, p. 30150-30160, 2001.
- JORDÃO, A. A. J.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDE, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina*, Ribeirão Preto, v. 31, p. 434-449, 1998.
- KISSEL, C.; SOARES, A. L.; ROSSA, A.; SHIMOKOMAKI, M. Broiler PSE (Pale, Soft, Exudative) meat functional properties in the mortadella production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 52, p. 213-217, 2009. Especial.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 19, p. 265-275, 1951.
- MICKELSON, J. R.; LOUIS, C. F. Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca²⁺ regulation defects. *Physiological Review*, Baltimore, v. 76, n. 2, p. 537-592, 1996.
- MURAKAMI, M.; KUDO, I. Phospholipase A₂. *Journal. Biochemistry*, Tokyo, v. 131, n. 3, p. 285-292, 2002.
- OLIVO, R.; SOARES, A. L.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Dietary vitamin E inhibits poultry PSE and improves meat functional properties. *Journal of Food Biochemistry*, Trumbull, v. 25, n. 4, p. 271-283, 2001.
- SANTOS, C. C.; DELGADO, E. F.; MENTEN, J. F. M.; PEDREIRA, A. C. M.; CASTILHO, C. J. C.; MOURÃO, G. B.; BROSSI, C.; SILVA, I. J. O. Sarcoplasmic and myofibrillar protein changes caused by acute heat stress in broiler chicken. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 65, n. 5 p. 453-458, 2008.
- SOARES, A., L.; IDA, E. I.; MIYAMOTO, S.; BLAZQUEZ, F. J. H.; OLIVO, R.; PINHEIRO, J.W.; SHIMOKOMAKI, M. Phospholipase A₂ activity in poultry PSE, Pale, Soft, Exudative. *Journal of Food Biochemistry*, Trumbull, v. 27, n. 4, p. 309-319, 2003.
- SOARES, A. L.; MARCHI, D. F.; MATSUSHITA, M.; GUARNIERI, P. D.; DROVAL, A. A.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Lipid oxidation and fatty acid profile related to broiler breast meat color abnormalities. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba v. 52, n. 6, p. 1513-1518, 2009.
- SOSNICKI, A. A.; GREASER, M. L.; PIETRZAK, M.; POSPIECH, E.; SANTE, V. Pse-like syndrome in breast muscle of domestic turkeys: a review. *Journal of Muscle Foods*, Trumbull, v. 9, n. 1, p. 13-23, 1998.
- STRASSBURG, W.; CHIANG, M. Pale, soft, exudative turkey – the role of ryanodine receptor variation in meat quality. *Journal of Poultry Science*, Honduras, v. 88, n. 7, p. 1497-1505, 2009.
- WILHELM, A. E.; MAGANHINI, M. B.; HERNÁNDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Protease activity and the ultrastructure of broiler chicken PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. *Food Chemistry*, London, v. 119, n. 3, p. 1201-1204, 2010.

