

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS ELETROFORÉTICAS EM AMOSTRAS
DE MÚSCULOS DE AVES DE INTERESSE COMERCIAL E DE
TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*)

FERNANDO HENRIQUE RODRIGUES BORIN

BOTUCATU – SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

APLICAÇÃO DE TÉCNICAS ELETROFORÉTICAS EM AMOSTRAS
DE MÚSCULOS DE AVES DE INTERESSE COMERCIAL E DE
TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*)

FERNANDO HENRIQUE RODRIGUES BORIN

Relatório de Conclusão de Curso
apresentado junto ao Instituto de
Biociências de Botucatu como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Bacharel em Física Médica.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto
Rodrigues Ramos

BOTUCATU – SP

2012

Nome do Autor: Fernando Henrique Rodrigues Borin

Título: APLICAÇÃO DE TÉCNICAS ELETROFORÉTICAS EM AMOSTRAS DE
MÚSCULOS DE AVES DE INTERESSE COMERCIAL E DE TILÁPIAS

(*Oreochromis niloticus*)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos

Supervisor e Orientador:

Departamento de Física e Biofísica

IBB – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Helton Carlos Delício

Relator:

Departamento de Fisiologia

IBB – UNESP – Botucatu

Dedico este trabalho aos meus pais Fernando e Rosana, por todo o apoio em cada instante e pela compreensão. Vocês sempre foram muito importantes em minha vida.

Dedico em especial ao meu filho Kaio, por todo o tempo distante, mas por toda a presença sentida. Você é a razão máxima desta conquista.

"Não devemos ter medo dos confrontos. Até os planetas se chocam e do caos nascem às estrelas."

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

A Deus por conceder forças e paz nos momentos em que mais precisei.

Aos meus pais Fernando Cesar Borin e Rosana Mara Rodrigues Borin e a minha irmã, Melina Mara Rodrigues Borin, por serem apenas eles nos momentos mais difíceis, concedendo-me exemplo de como lutar para continuar, sem olhar para trás.

Ao meu filho Kaio Henrique Prado Borin, agradeço de forma especial pelos momentos de inspiração que me moveram a chegar até aqui.

A minha namorada Fernanda Alves Taveira, pelos momentos compartilhados.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos, pelos momentos bons e difíceis que passamos, por ter acreditado em mim, pelos ensinamentos, pela experiência, paciência e amizade. Muito obrigado.

A todos os amigos do Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu, pelo convívio.

Ao Médico Veterinário Prof. Paulo Tadeu Figueira, PUC-PR Toledo, pelo apoio, auxílio e pela amizade.

A todos os meus amigos que fiz na faculdade e que sempre me trouxeram força quando precisei.

Por fim, a todos os que de forma direta ou indireta cooperaram para que chegasse esse momento, obrigado por tudo!

SUMÁRIO

1.RESUMO	1
2.INTRODUÇÃO.....	1
2.1. Aves de Interesse Comercial.....	1
2.2. Peixes.....	3
3. METODOLOGIA.....	4
3.1. Local.....	4
3.2. Colheita das amostras.....	4
3.3. Preparo das amostras para as análises eletroforéticas.....	5
3.4. Eletroforese Nativa em Gel de Poliacrilamida, eletroforese CELM-GEL® (Filme de Agarose Geral).....	6
3.5. Preparação para as corridas eletroforéticas.....	6
3.6. Coloração e descoloração	7
3.7. Análises das Imagens.....	8
3.8. Análise Estatística.....	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
4.1. Eletroforese em Géis de Agarose e de Poliacrilamida de Proteínas Musculares de Frangos de Corte	8
4.2. Padrões Eletroforéticos em Gel de Agarose de Proteínas Musculares de Frangos, Perus e Avestruzes	11
4.3. Eletroforese em Gel de Agarose e Possíveis Alterações no Padrão Eletroforético ou Degradação em Proteínas Musculares de Tilápias	12
5. CONCLUSÕES	14
6. BIBLIOGRAFIA	15

1.RESUMO

Junto ao Laboratório de Fracionamento de Proteínas, desenvolveu atividades aplicando técnicas eletroforéticas (gel de agarose, eletroforese nativa em gel de poliacrilamida) em amostras de músculos de aves de interesse comercial (frangos, perus e avestruzes), tendo como co-orientador o Prof. Paulo Tadeu Figueira da Faculdade de Medicina Veterinária, PUC/PR - Toledo, onde desenvolveu atividades de análise de géis de eletroforese. Aplicou as técnicas de eletroforeses citadas em amostras de músculos e soro sanguíneo (em andamento) de tilápias (*Oreochromis niloticus*), bem como desenvolveu atividades de análises computacionais (VDS – PHARMACIA) e estatísticas (ASSISTAT) nos dados obtidos, resultando na participação em 7 congressos com apresentação de trabalhos. Cursou a disciplina de Genética, como aluno especial, junto à turma de Licenciatura em Ciências Biológicas, num total de 8 créditos, sendo aprovado com média 7,2.

2.INTRODUÇÃO

2.1. Aves de Interesse Comercial

Na demanda de alimentos de origem animal, a carne de aves é ainda a mais consumida do mundo. A crescente receptividade do mercado externo ao produto nacional exerce influência no sistema de produção e de qualidade, aumentando a eficiência da cadeia produtiva, principalmente a industrial. Nesse sentido, o Brasil conta com a produção de frangos, perus e mais recentemente, avestruzes. A eletroforese de proteínas pode ser empregada como ferramenta na identificação do produto, desde que não haja alteração na constituição protéica devido ao pós-morte.

Mundialmente, encontramos mais de 300 raças de galinhas domésticas, divididas em 3 categorias: aves de postura, aves de corte (aves pesadas, ditas Frangos de corte) e com dupla aptidão (SARCINELLI et al., 2007).

A produção de frangos de corte brasileira tem representado uma das mais importantes fontes de proteína animal para consumo humano. Uma série de fatores está relacionada com esta representação, e sua evolução nos últimos anos ocorreu principalmente pela aquisição de novos conhecimentos específicos nas áreas de nutrição, genética, manejo e bem-estar das aves (DAMASCENO et al., 2010).

O início desta cultura remete ao final da década de 50, principalmente nos Estados do Sudeste evoluindo na década de 70 com intensa reorganização do complexo

de produção de proteínas animais, se deslocando para a região Sul. Transcrevendo esta evolução em valores, vê-se que em 2001 as exportações ultrapassaram a casa do bilhão de toneladas produzidas (GIROTTTO; AVILA, 2003).

Segundo dados do IBGE (2011), no 1º trimestre de 2011, o abate de 1,306 bilhões de frangos ultrapassou pela primeira vez o patamar dos 1,3 bilhões desde o início da Pesquisa Trimestral do Abate de Animais em 1997. Realizando uma comparação com o correspondente trimestre de 2010, a variação é positiva em 8,2% e, na comparação com o 4º trimestre de 2010, há aumento de 3,4% no volume abatido. Analisando a série histórica produtiva desde 2006, nota-se um aumento de mais de 300 milhões de aves abatidas.

A produção de perus vem tendo um crescimento acentuado no segmento avícola de corte brasileiro. Na década compreendida entre os anos 1993-2003, a produção em toneladas saltou em quase dez vezes, o que consolidou o Brasil como o terceiro maior produtor mundial (MENDES et al., 2005).

Segundo Pulici et al. (2008) foram abatidos 36,9 milhões de perus em 2005, representando um crescimento de 5,61% em relação a 2004, além do que, a produção atingiu 359,2 mil toneladas, o que representa um crescimento de 14,21%.

Neste período notou-se um acréscimo no consumo de subprodutos pelo mercado nacional, durante todo o ano, e não apenas em épocas de sazonalidade. Em relação à industrialização da carne de peru, com aumento da oferta de produtos atraentes e práticos e com maior participação na elaboração de produtos prontos, muito solicitados pelo consumidor brasileiro, como as lasanhas, patês e pizzas, a tecnificação e busca por qualidade tornou-se consequência (MENDES et al., 2005).

Em 2010, as exportações totalizaram quase 160 mil toneladas de carne, sendo quase 50% em industrializados, com o principal mercado consumidor sendo o europeu (UBABEF, 2011).

No Brasil a criação de avestruzes é uma cultura relativamente nova, com aproximadamente 16 anos de existência. Entre os anos de 2004 e 2005, o plantel brasileiro evoluiu mais de 90%, levando o total do plantel para quase 335 mil aves. Em 2006, a mudança embora menor, ainda foi significativa, com aumento de quase 30%, elevando o total para 426 mil animais, e em 2007, a marca de 450 mil animais foi superada (MUNIZ, 2007). O abate teve um pico em 2007, com 13.870 aves, com resultado superior a 150 toneladas, entretanto entrou em queda e segundo estimativas dos criadores, o abate de 2010 atingiu próximo de 100 toneladas (PATRÍCIA, 2010).

Segundo Gameiro; Suzan (2007), a cadeia produtiva do avestruz está, portanto, em ampla expansão no país, apresentando como principal característica uma subdivisão em pelo menos três grandes nichos de mercado com elevado valor agregado, sendo eles as plumas, o couro e a carne. Esta, quando *in natura* é classificada e comercializada de acordo com seu tamanho, maciez e posição das peças na musculatura.

A principal característica sensorial, no ponto de vista do consumidor, é a cor, pois embora seja carne de ave, é fortemente avermelhada, podendo assumir colorações mais arroxeadas, dependendo da alimentação e do procedimento de abate. A tonalidade vermelha mais acentuada se deve ao fato da mesma possuir um teor elevado de ferro em sua composição, mais até que a carne bovina (CARRER, et al., 2004).

2.2. Peixes

A piscicultura no Brasil teve um desenvolvimento considerável nos últimos anos. Isto é fato, pois tanto instituições públicas, como privadas, mostraram grande interesse no cultivo de peixes. São criações de fácil manejo e muito lucrativas. Destaca-se ainda que os peixes brasileiros possuem excelente sabor, carne apreciável e apresentam vantagens na aclimação quando de seu emprego em piscicultura comercial (SERODIO, 1997).

Sendo a carne do peixe uma rica fonte de proteínas a baixo custo de produção, bem como ser de fácil aquisição pela população, muitos pesquisadores dedicaram-se ao estudo do manejo e criação de peixes. A musculatura esquelética é a principal reserva de proteínas no organismo, este tecido é altamente ativo no desdobramento de certos aminoácidos, bem como na síntese de outros (SCHRÖDER, et al, 1973).

Constatando-se o grande avanço da piscicultura, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de melhorar geneticamente algumas espécies de peixes através do processo de hibridação, explorando o vigor de híbrido ou heterose (SERODIO, 1997).

Portanto, a introdução de espécies exóticas tem demonstrado excelentes resultados na produção de carne de pescado. Dentre elas, as tilápias tiveram uma produção mundial superior a 2 milhões de toneladas, motivando o aumento de sua produção no Brasil.

Na área nutricional a eletroforese vem sendo usada para comparação e identificação tanto de carnes frescas, como congeladas e cozidas, visando o controle de qualidade e de pureza de origem em diferentes espécies animais (FIGUEIRA, 2011).

Para algumas espécies de peixes pode ocorrer polimorfismo das proteínas do músculo esquelético, mas em outras espécies, estas proteínas podem se apresentar monomórficas, além de serem espécies-específicas, sendo assim muito utilizadas tanto na identificação de espécies quanto em estudos evolutivos (HARPER et al, 1982).

Até o momento, não se encontraram trabalhos relacionando o comportamento de proteínas musculares durante a transformação de musculatura em carne, conhecido como período pós-morte. Fica a dúvida se o padrão eletroforético obtido de fragmentos de músculos permanece inalterado ou pode passar por alterações decorrentes do tempo de armazenamento.

O presente trabalho teve como objetivos:

1. Comparar técnicas eletroforéticas de Géis de Agarose e de Poliacrilamida a fim de avaliar sua aplicabilidade na identificação e quantificação das proteínas musculares de frangos de corte e, empregando Eletroforese em Gel de Agarose, obter de um padrão eletroforético de proteínas musculares de frango, peru e avestruz, bem como buscar uma possível correlação entre os referidos padrões e os comportamentos relacionados à expressão protéica através da densitometria.
2. Empregar Eletroforese em Gel de Agarose, para se investigar possíveis alterações no padrão eletroforético ou degradação em proteínas musculares de tilápias no decorrer do tempo, relacionando-as entre si.

3. METODOLOGIA

3.1. Local

As análises para determinação dos padrões eletroforéticos e densitométricos foram realizadas no Laboratório de Fracionamento de Proteínas, localizado no Departamento de Física e Biofísica do Instituto de Biociências, da Universidade Estadual Paulista, em Botucatu, São Paulo.

3.2. Colheita das amostras

Foram utilizadas 10 amostras do músculo peitoral de cada espécie (frango, peru e avestruz). As amostras de frangos de corte foram obtidas em frigorífico localizado na região centro-oeste do Paraná, em sequência da linha de abate, e inseridas em embalagens plásticas individuais, sendo transportadas até freezers com set point em -18°C para congelamento. Da mesma forma, as amostras de perus, foram obtidas de

frigorífico localizado no centro-sul do Paraná, realizando a retirada manual com a separação do peito completo do animal, inseridas em embalagens plásticas individuais, sendo transportadas até freezers com set point em -18°C para congelamento. As amostras de avestruz foram colhidas logo após o abate dos animais, ainda na linha frigorífica de frigorífico localizado no sul do estado de São Paulo, com retirada de porções de aproximadamente 5 cm^2 , de 3 porções diferentes do peito de cada um dos 10 animais e inseridas em embalagens plásticas individuais, sendo transportadas até freezers com set point em -18°C . As alterações *post-mortem* dos fragmentos colhidos não foram levadas em consideração uma vez que as características proteicas avaliadas serão as mesmas encontradas em produtos cárneos disponíveis diretamente no mercado consumidor.

As amostras de músculos de tilápias foram obtidas de exemplares cedidos pelo Departamento de Produção Animal – FMVZ – UNESP – Botucatu. De três exemplares, foram empregadas dez amostras seriadas de fragmentos musculares expostas à temperatura ambiente, com intervalo de tempo de dez minutos. Dos exemplares restantes coletaram-se 10 amostras de músculos, seriadas, a cada sessenta minutos, sendo a última coletada após 24 horas de exposição. As amostras foram obtidas mediante uso de bisturi, maceradas em água deionizada e inibidores de proteases, (2/1 V/M) e centrifugadas sob refrigeração. Uma vez obtidas, foram transportadas até freezers com set point em -18°C . O sobrenadante foi dosado quanto a proteínas totais pelo Método de Biureto sendo padronizada a diluição de 5 ug/uL .

3.3. Preparo das amostras para as análises eletroforéticas

Para a extração das proteínas musculares foram utilizadas amostras de $500\text{ }\mu\text{g}$ de músculo peitoral imersas em nitrogênio líquido. Após o congelamento, os músculos foram macerados em 2 ml de água destilada deionizada em almofariz e devidamente identificados em frascos tipo Eppendorf, segundo descrito por Lemos; Moraes (1992). As amostras resultantes foram centrifugadas em refrigeração à 4°C , com 7500 RPM por 15 minutos . O precipitado foi descartado e o sobrenadante, diluído em solução de aplicação na proporção $1:3\text{ (v/v)}$, sendo armazenado em frascos tipo Eppendorf, devidamente identificados e congelados para diluição e utilização nas corridas eletroforéticas.

3.4. Eletroforese Nativa em Gel de Poliacrilamida, eletroforese CELM-GEL® (Filme de Agarose Geral)

Para a determinação dos padrões eletroforéticos das amostras foram utilizadas as técnicas de eletroforese Nativa em Gel de Poliacrilamida vertical alcalina (pH 8,3) em sistema de tampões descontínuos descrita por Hames; Rickwood (1990), com algumas alterações descritas por Ramos (1992). A técnica de eletroforese CELM-GEL® (Filme de Agarose Geral) de acordo com protocolo do fabricante (CELM-GEL, 2003) com algumas alterações.

Na eletroforese Nativa em Gel de Poliacrilamida Vertical alcalina foram utilizados géis de empilhamento na concentração de 4% e géis de separação na concentração de 10% (Tabela 1). Em relação à CELM-GEL® (Filme de Agarose Geral) foram empregados de acordo com as especificações dos fabricantes.

3.5. Preparação para as corridas eletroforéticas

Para a execução da Eletroforese Nativa Vertical foi empregado o conjunto mini-PROTEAN 3 (BIORAD®) conforme instruções do fabricante. As quantidades das soluções utilizadas na elaboração dos géis, bem como seus componentes estão descritos na Tabela 1.

No conjunto mini-PROTEAN 3 (BIORAD®) foram preparados e aplicados os géis na seguinte forma: foram dispensados 3,5 ml do gel separador, através de seringa, no conjunto de placas e cobertos com isopropanol até sua total polimerização. Após, foi removido o isopropanol através de capilaridade de papel filtro até secagem. Posteriormente, se adicionou 1,0 ml de gel empilhador e, em seguida, o encaixe do molde tipo pente para formação dos poços de aplicação. Em cada poço, foi aplicada a alíquota de 13 µl de amostra. Finalizada a aplicação, a cuba foi conectada à fonte estabilizadora mantendo o seguinte protocolo: 100 V de corrente inicial por 10 minutos seguido de 300 V por 150 minutos, mantendo a amperagem livre.

Para a elaboração CELM-GEL® (Filme de Agarose Geral) foi empregado um filme de agarose, 90 ml de tampão TRIS pH 9,5 refrigerado e 1 µl de amostra em cada poço, e o seguinte protocolo de fonte estabilizadora: 100V de corrente por 20 minutos, com amperagem livre.

Tabela 1 – Soluções Utilizadas para preparação de Gel de poliacrilamida.

Soluções	Volumes de soluções para dois géis	
	Gel de empilhamento a 4%	Gel de separação a 10 %
Bis-Acrilamida (30:0,8)		
- Bis - 30g		
- Acrilamida – 0,8g	665 µl	3,33 ml
- H ₂ O deionizada - 100 mL (q.s.p)		
Tris-HCl pH 6,8		
- Tris – 6,0g		
- HCl (1N) – 48mL	500 µl	----
- H ₂ O deionizada - 100 mL (q.s.p)		
Tris-HCl pH 8,8		
- Tris – 36,3g		
- HCl (1N) – 48mL	----	500 µl
- H ₂ O deionizada - 100 mL (q.s.p)		
Persulfato de amônio (PSA)		
- PSA – 1,5g	34 µl	67 µl
- H ₂ O deionizada - 100 mL (q.s.p)		
TEMED	5 µl	10 µl
Água	3,8 ml	5,6 ml
Volume final	5 ml	10 ml

3.6. Coloração e descoloração

Após a remoção das placas de vidro, os géis foram imersos no corante (Coomasie Brilliant Blue em solução de ácido acético conforme instruções do fabricante) por 4 horas. Após a coloração o gel foi acondicionado em solução descorante do Coomasie (água/metanol/ácido acético 1:3:6, v/v) até a revelação das

bandas proteicas no gel. Os géis de agarose foram corados com Negro de Amido a 1% numa solução de ácido acético a 5%. A descoloração foi feita empregando-se a submersão em ácido acético a 5% por 5 minutos. Acompanhada por desidratação por calor. Posteriormente os géis foram imersos novamente em ácido acético a 5% até sua transparentização.

3.7. Análises das Imagens

A captação das imagens das bandas foi realizada por meio de equipamento de foto-documentação (Image Máster VDS Pharmacia) para identificação das mobilidades relativas bem como na quantificação das mesmas.

Para a análise dos géis da eletroforese Nativa, foram calculadas as medidas das mobilidades relativas (R_f) de cada banda de proteína. Para os mini-géis, os pontos isoeletricos foram avaliados através do programa de computador Image Master VDS (GE HEALTH-CARE). O referido programa também foi empregado nas análises densitométricas para a avaliação quantitativa de cada banda proteica, separadas nas diferentes técnicas eletroforéticas.

3.8. Análise Estatística

Para a análise estatística das variáveis Mobilidade Relativa (R_f) e Densitometria (%) foi utilizado o programa Assistat Statistical (SILVA; AZEVEDO, 2009) que reproduz a estatística descritiva dos dados calculando a média, limites de confiança inferior e superior da média (95%), desvio padrão (s) e variância (s^2) para a amostragem. O mesmo programa foi aplicado para análise de variância e de comparação de médias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Eletroforese em Géis de Agarose e de Poliacrilamida de Proteínas Musculares de Frangos de Corte

As bandas proteicas tiveram suas mobilidades relativas estimadas e quantificadas pelo método densitométrico, com o emprego do fotodocumentador VDS – Pharmacia® (Image Master). Os dados quantitativos apresentados na tabela 2 e 3 foram analisados com estatística descritiva segundo BERQUÓ et al. (1980).

Tabela 2 – Estatística descritiva, medidas de tendência central e de posição das mobilidades relativas (rf) e valores densitométricos, das proteínas musculares hidrossolúveis de peito de frango de corte em eletroforese em gel de Agarose.

Banda	Mobilidade Relativa (rf)				Densitometria (%)			
	Media	Desvpad	Var	Intcon0.5	Media	Desvpad	Var	Intcon0.5
r1	0,110	$1,03 \times 10^{-02}$	$1,05 \times 10^{-04}$	$1,55 \times 10^{-03}$	30,255	5,00	25,01	0,75
r2	0,190	$1,03 \times 10^{-02}$	$1,05 \times 10^{-04}$	$1,55 \times 10^{-03}$	13,043	3,38	11,46	0,51
r3	0,260	$1,03 \times 10^{-02}$	$1,05 \times 10^{-04}$	$1,55 \times 10^{-03}$	5,720	1,65	2,71	0,25
r4	0,295	$5,13 \times 10^{-03}$	$2,63 \times 10^{-05}$	$7,74 \times 10^{-04}$	8,748	1,77	3,15	0,27
r5	0,345	$5,13 \times 10^{-03}$	$2,63 \times 10^{-05}$	$7,74 \times 10^{-04}$	2,240	0,69	0,48	0,10
r6	0,790	$1,03 \times 10^{-03}$	$1,05 \times 10^{-04}$	$1,55 \times 10^{-03}$	0,342	0,38	0,14	0,06

Tabela 3 - Estatística descritiva, medidas de tendência central e de posição das mobilidades relativas (rf) e valores densitométricos das proteínas musculares hidrossolúveis de peito de frango de corte separadas por eletroforese em Gel de Poliacrilamida a 10% de concentração no gel de separação num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

Banda	Mobilidade Relativa (rf)				Densitometria (%)			
	Media	Desvpad	Var	Intcon0.5	Media	Desvpad	Var	Intcon0.5
r1	0,036	$1,13 \times 10^{-2}$	$1,27 \times 10^{-4}$	$1,70 \times 10^{-3}$	8,608	3,17	10,04	0,48
r2	0,310	$1,03 \times 10^{-2}$	$1,05 \times 10^{-4}$	$1,55 \times 10^{-3}$	3,837	0,72	0,52	0,11
r3	0,525	$1,54 \times 10^{-2}$	$2,37 \times 10^{-4}$	$2,32 \times 10^{-3}$	10,438	1,74	3,03	0,26
r4	0,860	$3,08 \times 10^{-2}$	$9,47 \times 10^{-4}$	$4,64 \times 10^{-3}$	4,538	0,94	0,89	0,14
r5	0,905	$2,56 \times 10^{-1}$	$6,58 \times 10^{-4}$	$3,87 \times 10^{-3}$	4,405	0,86	0,74	0,13
r6	0,945	$2,56 \times 10^{-2}$	$6,58 \times 10^{-4}$	$3,87 \times 10^{-3}$	3,511	1,04	1,08	0,16

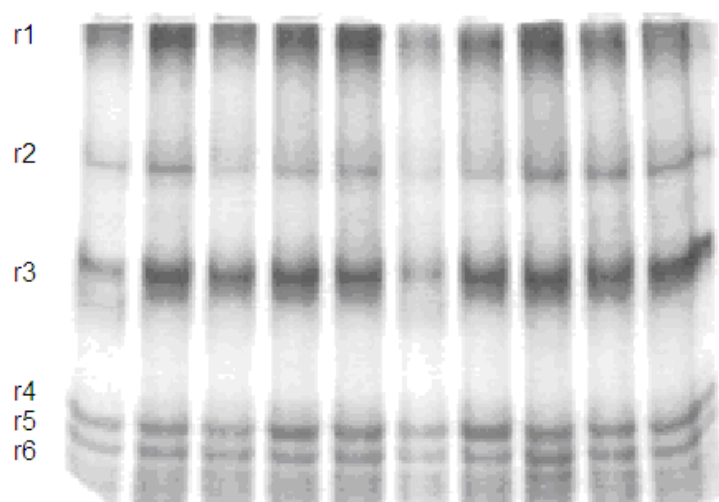
Na tabela 2 são identificados seis diferentes bandas protéicas com mobilidades relativas variando de 0,11 a 0,79 com reduzida variação individual e pequenas alterações nas medidas de desvio padrão, variância e intervalo de confiança. Os resultados densitométricos tiveram médias variando de 30,255 a 0,342, o que pode ser representado pela intensidade da coloração das bandas. As bandas com maior intensidade de coloração foram r1, r2 e r4, sendo que as bandas r3 e r5 encontravam-se muito próximas a r4, e r6 encontrava-se mais distante e com intensidade de coloração muito baixa. Também em relação à densitometria encontrou-se certa variabilidade tendo relação provavelmente com a expressão dessas proteínas.

Para análise da eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 1), os dados foram apresentados na Tabela 3, com a presença de seis diferentes bandas protéicas com mobilidades relativas variando de 0,036 a 0,945. As médias de rf de r1 e r2 foram

relativamente menores que as demais, e médias de r4, r5 e r6 ficaram muito próximas. Notaram-se pequenas variações nas medidas de desvio padrão, variância e intervalo de confiança. Os resultados densitométricos apresentaram médias variando de 8,608 a 3,511. Foram identificadas com maior intensidade de coloração as bandas r1 e r3, sendo que as bandas r4 a r6 apresentaram-se próximas e de difícil distinção. As bandas r4, r5 e r6 apresentaram-se com uma intensidade de coloração menor e com certa difusão.

Foi encontrada variabilidade por conta da provável expressão diferenciada das proteínas separadas. As pequenas variações de rf encontradas nas técnicas demonstram que ambas têm repetibilidade e acurácia na análise pretendida, entretanto o gel de poliacrilamida apresentou maior diferença entre os valores de rf o que facilita a identificação das mesmas além de ter apresentado melhor resolução. As diferenças de quantificação densitométrica entre as técnicas podem ser explicadas pela forma de separação diferencial entre os tipos de gel, pois a agarose é separada pela formação de túneis helicoidais enquanto que a poliacrilamida forma poros propriamente ditos promovendo a separação por cargas, massas molares e configuração espacial. Até o momento não se encontraram artigos empregando as técnicas aqui apresentadas para a caracterização do proteinograma de proteínas musculares de francos sendo que a maioria dos trabalhos utiliza a técnica de SDS-PAGE onde as proteínas são separadas em seus monômeros e fracionadas apenas em função da massa molecular.

Figura 1 - Eletroforese de Proteínas musculares hidrossolúveis de peito de frangos de corte em Gel de Poliacrilamida a 10% de concentração no gel de separação num sistema descontínuo de tampões alcalinos.

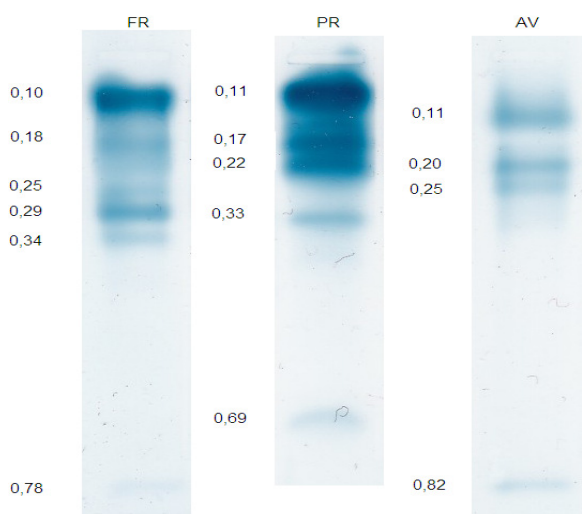


Com os dados aqui apresentados, ambas as técnicas são passíveis de uso na determinação do proteinograma de mioproteínas em frangos sendo que a eletroforese em gel de poliacrilamida mostra uma resolução superior. Considerando-se que os géis de agarose apresentam maior facilidade de manuseio e maior rapidez na obtenção dos resultados, provavelmente teriam maior aplicação na necessidade de verificar a composição protéica de possíveis produtos quanto à pureza (uma vez que podem ocorrer misturas de espécies na elaboração de derivados). Novos trabalhos devem ser desenvolvidos empregando-se a SDS-PAGE e a focalização isoeétrica para uma melhor comparação de métodos.

4.2. Padrões Eletroforéticos em Gel de Agarose de Proteínas Musculares de Frangos, Perus e Avestruzes

Foram obtidos os seguintes padrões: frango (FR), seis bandas, peru (PR), cinco bandas e avestruz (AV), quatro bandas cujos rfs médios podem ser vistos na Figura 2.

Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de músculos de Frangos (FR), Perus (PR) e Avestruzes (AV) com os correspondentes Rfs médios.



Observou-se maior proximidade de rfs nas bandas r1, r2 e r3 entre as espécies estudadas. Seus resultados densitométricos são apresentados na Tabela 4. As bandas r1 entre as espécies tiveram coeficientes de FRxAV 95,68%; FRxPR 96,27% e AVxPR 90,93%, todas com $p < 0,01$ (Tabela 5). As bandas r2 e r3 não apresentaram correlações significativas. A análise destas bandas pelo teste Tukey mostrou diferenças significativas entre as espécies ($F=12,63$ $p < 0,01$), e na interação espécies e bandas ($F=65,14$ $p < 0,01$) (Tabela 6).

Tabela 4 – Resultados densitométricos médios das bandas r1, r2 e r3 separadas por eletroforese em gel de agarose, de fragmentos de músculos de frangos (FR), Perus (PR) e Avestruzes (AV).

DENSITOMETRIA			
BANDAS	FR	PR	AV
R1	28,43	23,51	29,50
R2	12,24	16,59	15,45
R3	4,39	13,80	11,67

Tabela 5 – Teste de Correlação entre os resultados densitométricos da banda R1 entre Frangos (FR), (PR) Perus e Avestruzes (AV).

CORRELAÇÃO	COEFICIENTE (r)	SIGNIFICÂNCIA
FR X AV	0,9568	**
FR X PR	0,9627	**
AV X PR	0,9093	**

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

Tabela 6 - Análise de Variâncias dos resultados densitométricos obtidos em eletroforese em gel de agarose de proteínas musculares de aves de interesse comercial.

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTO	2	298,85	149,42	12,63 **
BLOCOS	1	1,35	1,35	0,11 ns
TRAT. X BLOC	2	1540,82	770,41	65,14 **
RESÍDUO	54	638,65	11,82	
TOTAL	59	2479,68		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

ns não significativo ($p \geq .05$)

4.3. Eletroforese em Gel de Agarose e Possíveis Alterações no Padrão Eletroforético ou Degradação em Proteínas Musculares de Tilápias

Encontrou-se um padrão eletroforético de 3 bandas com rfs de: r1 0,19; r2 0,38 e r3 0,86 (Figura 3) o qual não se alterou no decorrer do tempo. Foram encontradas

concentrações de: r1 19,14%; r2 36,11%; r3 16,34%. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações relativas das bandas protéicas em relação ao tempo de exposição ($F=1,61$).

Houve diferença estatística entre as concentrações das bandas ($r2>r1=r3$) com $F=91,30$ $p<0,01$ (Tabela 7). Os dados concordam com resultados obtidos por Figueira 2011 que empregou metodologia semelhante, obtendo padrões para músculos de aves de interesse zootécnico. Daguer et al., 2009 informou que técnicas eletroforéticas podem ser empregadas na análise de misturas protéicas na identificação de fraudes comerciais de produtos de origem animal, o que é corroborado pelo presente trabalho.

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose de fragmentos de músculo de tilápia, com Rfs médios correspondentes.

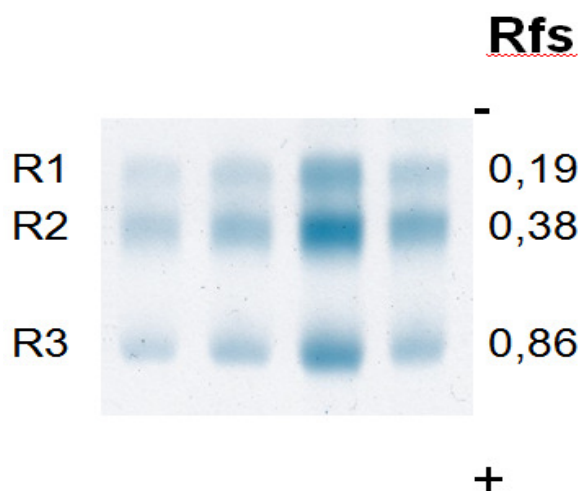


Tabela 7 - Análise de Variâncias dos resultados densitométricos das bandas r1, r2 e r3, detectadas por eletroforese em gel de agarose de amostras de fragmentos musculares de tilápias.

FV	GL	SQ	QM	F
TRATAMENTOS	9	362,81	40,31	1,61 ns
BLOCOS	2	4575,12	2287,56	91,30 **
TRAT. X BLOC	18	459,67	25,54	1,02 ns
RESÍDUO	30	751,64	25,05	
TOTAL	59	6149,24		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

($R2>R1=R3$)

O Teste de Correlação mostrou que existe correlação significativa entre as bandas R1 e R3 coletadas nos intervalos de 10 minutos conforme mostrado na Tabela 8. Não se observou correlação significativa entre os dados densitométricos das amostras colhidas a cada sessenta minutos. A diferença da concentração superior da banda r2 que se manteve durante todo o processo, é uma característica da espécie. A Regressão na Análise de Variâncias entre as variáveis r1 e r3 resultou em valor significativo, ao nível de 1% de probabilidade, gerando uma regressão de quarto grau com a seguinte equação:

$$Y = 16,71 - 0,0032x + 0,0016x^2 - 0,00002x^3 + 0,0000001x^4$$

Tabela 8 - Teste de correlação dos resultados densitométricos das bandas r1, r2 e r3, detectadas por eletroforese em gel de agarose de amostras de fragmentos musculares de Tilápias.

BANDAS	MOB. REL.	%	CORREL.	COEF. CORR. (R)	SIG
R1	0,19	15,22	R1 x R2	0,1379	p>0,05
R2	0,38	45,19	R1 X R3	-0,6530	P<0,05
R3	0,84	19,35	R2 x R3	0,3143	p>0,05

5. CONCLUSÕES

Considerando as espécies de aves estudadas, pode-se concluir que a expressão protéica da banda r1 é igual para as três espécies, ocorrendo variações nas bandas r2 e r3. Este dado mostra uma possível conservação de proteína interespecífica, denotando um provável compartilhamento genético. As variações podem significar sinais evolutivos e de melhoramento genético entre as espécies testadas. A eletroforese nativa de proteínas em gel de poliacrilamida revelou padrões bem estabelecidos entre as espécies, também podendo ser empregada para a caracterização de padrões eletroforéticos de proteínas musculares.

Quanto à musculatura de tilápias, considerando a metodologia empregada, constatou-se que não ocorrem alterações no padrão eletroforético decorrentes de possíveis alterações bioquímicas pós-mortem na transformação do músculo em carne, passíveis de serem identificadas pela eletroforese em agarose.

Os dados aqui apresentados demonstram que mesmo a exposição à temperatura ambiente por tempo prolongado, não é suficiente para provocar alterações bioquímicas nos padrões eletroforéticos detectados com a eletroforese em gel de agarose. A exposição à temperatura ambiente a cada 10 minutos demonstrou pequenas alterações nos resultados densitométricos, envolvendo principalmente as bandas R1 e R3. A correlação (-0,6530) informa que possíveis processos de alterações bioquímicas do pós-morte, resultem num comportamento inverso das bandas citadas. Isto pode estar ocorrendo pela degradação de uma fração protéica com conseqüente acúmulo de produtos na outra. O teste de regressão resultou numa equação de quarta ordem que pode ser considerada preditora do comportamento das variáveis analisadas.

6. BIBLIOGRAFIA

ABEF (Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos). **Exportações Brasileiras de Carne de Frango 2009**. Disponível em: <http://www.abef.com.br/Historico.php>. Acesso em: 19 aug. 2011.

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

CARRER C. C., ELMÔR, R. A., KORNFELD, M. E., CARVALHO, M. C. **A criação do avestruz: guia completo de A a Z**. 1ed. Pirassununga, SP: C. C. Carrer, 2004. 255p.

CELMGEL, Filme de Agarose Geral, 2003. **CELM – Cia Equipadora de Laboratórios Modernos**. Disponível em: <http://e-pronto.magicsite.com.br/UserFiles/Celm/Arquivos/Filme-agarose-geral.pdf>. Acesso em 12 ago. 2011.

DAGUER, H., STEPHAN, M. P., BERSOT, L. S. Perfil eletroforético de lombo suíno adicionado de proteínas não cárneas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.2, p.434-440, 2009.

DAMASCENO, F. A., YANAGI JUNIOR, T., LIMA, R. R. de, GOMES, R. C. C., MORAES, S. R. P. de. Avaliação do bem estar de frangos de corte e, dois galpões comerciais climatizados. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.34, n.4, p.1031-1038, 2010.

FIGUEIRA, P. T. **Caracterização eletroforética de proteínas musculares de aves de interesse comercial**, . Dissertação de Mestrado. FMVZ. UNESP. Botucatu. **2011**, 82p

GAMEIRO, A. H., SUZAN, E. Perspectivas e desafios do sistema agroindustrial do avestruz no Brasil. **Informações Econômicas, SP**, v.37, n.10, p. 44-59, 2007.

GIROTTTO, A. F., AVILA, V. S. Aspectos da produção, exportação, consumo e custos de produção e implantação de aviários. **Sistemas de Produção de Frangos de Corte**.

Versão eletrônica. p. [s.n], 2003. Disponível em:< <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/ProducaoodeFrangodeCorte/Importancia-economica.html>>. Acesso em: 12 set. 2011.

HAMES, B.D. & RICKWOOD, D. **Gel Electrophoresis of Proteins**. 2a ed. New York, 1990.

HARPER, H.A., RODWELF, V.W. & MAYES, P.A. **Manual de Química Fisiológica**. 5ª ed. São Paulo. Editora Atheneu, 1982.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária**. Comissão Especial de Planejamento, Controle e Avaliação das Estatísticas Agropecuárias (CEPAGRO), Brasília, DF, 2011. 32p.

LEMOES, A.L.S.C., MORAES, M. A. C. Identificação eletroforética de peixes de água doce (Família *Pimelodidae*) de valor comercial. **Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v.4, p.57-63,1992.

MAFRA, I., FERREIRA, I. M. P. L. V. O., OLIVEIRA, M. B. P. P. **Food authentication by PCRbased methods. European food research and technology**, v. 227, Issue 3, p. 649-665, 2008.

MENDES, A. S., MOURA, D. J., NAAS, I. A. Produção industrial de perus: características e exigências. **Avisite – Ciência e Tecnologia – Trabalhos e Artigos**, p. [s.n], 2005. Disponível em:< <http://www.avisite.com.br/cet/trabalhos.asp?codigo=71>>. Acesso em: 12 ago. 2011.

MUNIZ, L. R. Problemas vieram para o bem da cadeia produtiva. **Associação dos criadores de avestruzes do Brasil**, p. [s.n], 2007. Disponível em:< <http://www.acab.org.br/?ac=ler&id=627>>. Acesso em: 11 out. 2011.

NAOUM, P.C. **Eletroforese – Técnicas e Diagnósticos**. 2a ed. São Paulo - Livraria Santos Editora, 1999.

PATRÍCIA, T. Avestruz como opção de investimento. **Acrítica.com**, Manaus, p.[s.n], 21 jun. 2010. Disponível em:< http://acritica.uol.com.br/manaus/economia_avestruz_criacao_mercado_0_284371564.html>. Acesso em: 9 out. 2011.

PULICI, R., ALVES, F. R., GAMEIRO, A. H. Aceitação e segmentação do mercado de produtos derivados de peru. In: XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008, Rio Branco – Acre, Brasil. **Apresentação Oral...** Rio Branco, 2008.

RAMOS, P. R. R. **Polimorfismo bioquímico de proteínas séricas do leite de vacas da raça holandês, puras por cruzamento, variedade malhada de preto**. Botucatu, 1992. 131p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Instituto de Biociências, UNESP.

RODRIGUES, A. C. A., PINTO, P. S. de A., VANETTI, M. C. D. et al. **Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos**. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n. 7, p.1948-1953, 2008.

SARCINELLI, M. F., VENTURINI, K. S., SILVA, L. C. Produção de Frangos de Corte. **Boletim Técnico - PIE-UFES:00107**, p. [s.n], 2007. Disponível em:<http://www.agais.com/telomc/b00107_carne_frangodecorte.pdf>. Acesso em: 17 abr. 2011.

SCHRÖDER, J.H. **Genetics and Mutagenesis of Fish**, Springer-Verlag Berling, Heidelberg, New York, 1973.

SERÔDIO, M. de L. S. **Identificação e padronização eletroforética das proteínas nativas do músculo esquelético de pacu (*Piaractus mesopotamicus* - Holberg, 1887), tambaqui (*Colossoma macroporum* - Curvier, 1818) e seu híbrido tambacu**. 1997. Dissertação (Ciências Biológicas (Genética)) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 95pp.

SILVA, F. A. S. E., AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistant-Statistical Attendance. In: 7th World Congress on Computers in Agriculture Conference Proceedings, 22-24 June 2009, Reno – Nevada – EUA. **Conference proceedings...** American Society of Agricultura and Biological Engineers, 2009.

UBA (**União Brasileira de Avicultura**). **Relatório anual 2009**. Disponível em: <http://www.abef.com.br/uba/exibenoticiauba.php?notcodigo=2041>. Acesso em: 19 ago. 2011.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). **Relatório anual 2011: Anuário da Avicultura Brasileira**, 2011. 72p. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>>. Acesso em: 14 ago. 2011.