

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Câmpus de Botucatu

**ANÁLISE DE ALGUMAS PROTEINAS MIOFIBRILARES
ENVOLVIDAS NA MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DE
CORTE.**

ANDRÉ RODRIGUES ABRAHÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Área de Concentração: Nutrição e Produção Animal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

Botucatu – São Paulo
Novembro – 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Câmpus de Botucatu

**ANÁLISE DE ALGUMAS PROTEINAS MIOFIBRILARES
ENVOLVIDAS NA MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DE
CORTE.**

ANDRÉ RODRIGUES ABRAHÃO

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos

Co-orientadora: Dra. Helen Julie Laure

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Área de Concentração: Nutrição e Produção Animal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

Botucatu – São Paulo
Novembro - 2007

Dedico...

*À minha amada tia Suely, pois seu apoio foi fundamental em toda
minha vida.*

Aos meus pais Nagib e Sonia, por estarem sempre presentes.

*À minha irmã Adriana, a minha sobrinha Gabriela e aos meus
irmãos de coração Roberto e Danísio, pela amizade, cumplicidade,
apoio, confiança e paciência.*

À Binha e o Ricão pela companhia, amor incondicional e fidelidade.

À Samia pela alegria, carinho, dedicação e atenção.

*A Regina, Vanessa, Clarice e Hélien Julie por todo apoio, carinho e
amizade.*

*Ao Dr. Greene que com confiança, amizade e dedicação, tornou
tudo isso possível.*

*E em especial ao Dino (in memoriam), que sempre esteve
comigo, mesmo longe, e que deixou memórias que me dão força,
alegria e fé para continuar sempre em frente.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos pela orientação, confiança e amizade.

Ao Dr. Lewis Joel Greene por todo conhecimento, apoio, ajuda e disposição em tornar possível a conclusão desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira pelas valiosas sugestões, pelo apoio, atenção, amizade, confiança e muitos momentos divertidos.

A Dra. Hélen Julie Laure pela amizade, companheirismo, crescimento técnico e pessoal, pelos conselhos e por momentos memoráveis que passamos juntos.

Ao Prof. Dr. José Cesar Rosa pelos valiosos ensinamentos.

Ao Prof. Luis Arthur Loyola Chardulo pelo apoio e por disponibilizar o laboratório.

A Vanessa Cristina, Regina e Clarice por compartilharem o conhecimento, a amizade e as brincadeiras.

Aos amigos Renatão, Ednalva, Solange e Cilene pela amizade, apoio e companheirismo.

Aos colegas e funcionários do Centro de Química de Proteínas, pela amizade, companheirismo e aprendizado proporcionado.

Aos amigos que dividiram muitos momentos de alegria e tristeza Liliane, Janaina C. Hadlich, Daniela Morales, Margarida, Marisa, Priscila e Solange (as japinhas) e Raphael Haddad pela amizade e companheirismo.

À Neusa e Marum, pelo apoio e paciência, carinho e amizade nos momentos de desespero.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, agradeço pela atenção.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Tabelas	v
Lista de Figuras	v
Resumo	vi
Summary	vii
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS	2
Referências Bibliográficas	11
CAPÍTULO 2- CORRELAÇÕES ENTRE A FORÇA DE CISALHAMENTO E O ÍNDICE DE FRAGMENTAÇÃO MIOFIBRILAR EM ANÁLISE DA MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DE CORTE, CRIADOS NO MODELO BIOLÓGICO SUPERPRECOCE E EM REBANHOS COMERCIAIS	16
Resumo	16
Introdução	17
Materiais e Método	18
Resultados e discussão	20
Conclusões	23
Agradecimentos.....	23
Referências Bibliográficas	24
CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DO MÚSCULO LONGÍSSIMUS DORSI RELACIONADAS À MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DE CORTE	29
Resumo	30
Introdução	32
Materiais e Método	33
Resultados e discussão	36
Conclusões	39
Agradecimentos.....	40
Referências Bibliográficas	40
CAPÍTULO 4 - IMPLICAÇÕES	46

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO 2	
Tabela 1 - Valores médios da força de cisalhamento dos animais Nelore e ½ Nelore x ½ Aberdeen Angus aos 12 e 24 meses de idade, sem maturação e maturadas por 7 e 14 dias	28
Tabela 2 - Valores médios do índice de fragmentação miofibrilar dos animais Nelore e ½ Nelore x ½ Aberdeen Angus aos 12 e 24 meses de idade, sem maturação e maturadas por 7 e 14 dias	28
Tabela 3. Correlações lineares simples de Pearson entre os resíduos do índice de fragmentação miofibrilar e a Força de cisalhamento de acordo com o tempo de maturação	28
CAPÍTULO 3	
Tabela 1 - Lista das proteínas músculo esquelético de bovinos identificadas em espectrômetro do tipo eletrospray triplo/quadrupolo, com suas funções, número de acesso na base de dados NCBI, ponto isoelétrico e peso molecular.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 3	
Figura 1- Análise de espectrometria de massas em MS e MS/MS no ESI-3Q-MS. (a) Espectro de varredura obtido dos peptídeos tripsínicos da banda de 30 kDa. A imagem inserida é um zoom do íon $m/z = 782,5$, duplamente carregado, mostrando sua distribuição isotópica natural. (b) Espectro de massas obtido por meio da fragmentação do íon $m/z = 782,5[M+2H^+]$ por CID-MS/MS. O perfil apresenta íons da série y, cuja seqüência pode ser deduzida como ALSSMGANYSSYLAK, correspondente à proteína Troponina T do músculo esquelético de contração lenta do <i>Bos taurus</i> (Q8MKH6).....	42
Figura 2 – Eletroforese de gel SDS-PAGE com cinco animais em cada tratamento. (a) Animais da raça Nelore com 12 meses de idade com amostras não maturadas e submetidas a 7 e 14 dias de maturação. (b) Animais da raça Nelore com 24 meses de idade com amostras não maturadas e submetidas a 7 e 14 dias de maturação. (c) Animais da raça Aberdeen Angus com 12 meses de idade com amostras não maturadas e submetidas a 7 e 14 dias de maturação. (d) Animais da raça Aberdeen Angus com 24 meses de idade com amostras não maturadas e submetidas a 7 e 14 dias de maturação.	43

RESUMO

O presente estudo teve como objetivos: 1) Estabelecer possíveis correlações entre as técnicas de força de cisalhamento e o índice de fragmentação miofibrilar para análise da maciez da carne 2) Identificar as proteínas miofibrilares do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de corte, associado à maciez da carne; 3) Estudar o efeito da raça, idade do abate e tempo de maturação, sobre a força de cisalhamento, o índice de fragmentação miofibrilar e as proteínas Miofibrilares. Foram utilizados 30 animais da raça Nelore e 30 animais ½ Nelore ½ Aberdeen Angus, criados no modelo biológico Superprecoce abatidos nas idades de 12 meses, e de rebanhos comerciais abatidos com 24 meses de idade. As amostras foram submetidas à análise da força de cisalhamento em um *Warner-Bratzler Shear Force* mecânico e a determinação do MFI. A separação das proteínas foi realizada em eletroforese 1D. Para avaliar os efeitos de grupos genéticos, período de maturação e de idade ao abate sobre a Força de cisalhamento, Índice de fragmentação miofibrilar e intensidade das bandas proteicas, foi utilizado o procedimento GLM (SAS), e posteriormente obtidas às correlações lineares simples de Pearson utilizando-se o procedimento CORR (SAS). Os valores de intensidade das bandas foram submetidas à hidrólise tripsínica e à espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro do tipo eletrospray triplo/quadrupolo. A composição genética não influenciou a maciez da carne, para as diferentes idades para a força de cisalhamento e o índice de fragmentação miofibrilar. O período de maturação só influenciou na maciez da carne até os 7 dias de maturação. A força de cisalhamento e o índice de fragmentação miofibrilar apresentaram correlações significativas. Não foi observada diferença entre idade e grupo racial tanto para maciez como para a degradação das proteínas miofibrilares. Somente a banda de 30kDa apresentou correlação alta ($r=0,60$) com período de maturação de 14 dias em ambas as raças. Esta banda foi submetida à análise por ESI-3Q-MS. O espectro de fragmentação do peptídeo $m/z=782,5$, cuja seqüência de aminoácidos foi deduzida como sendo ALSSMGANYSSYLAK, corresponde ao espectro dos fragmentos de peptídeos da proteína troponina T do músculo esquelético de contração lenta de *Bos taurus*.

Palavras-chave: Bovino de corte, Eletroforese, Espectrometria de massa, Proteína miofibrilar.

SUMMARY

This study has the objective to: 1) Establish possible correlations between the shear force techniques and the index of myofibril fragmentation to analyze the meat tenderness 2) Identify the myofibrillar proteins of Longissimus dorsi muscle in bovines of cut related to meat tenderness; 3) Study the effect of race, slaughter age and time of maturation in the shear force, the index of myofibrillar fragmentation and myofibrillar proteins. We used 30 animals Nelore breed and 30 animals $\frac{1}{2}$ Nelore $\frac{1}{2}$ Aberdeen Angus, raised in the biological Superprecoce production system that was slaughter with 12 months and commercial animals slaughtered with 24 months of age. The samples was submitted to mechanic Warner-Bratzler mechanical Shear Force and MFI determination. The separation of the proteins was held in eletroforese 1D. To evaluate the effect of genetic groups, period of maturation and slaughtering age in the Shear Force, the index of myofibrillar fragmentation and the intensity of band proteins, it was used the GLM(SAS) procedure, and after that the simple linear correlations of Pearson with CORR (SAS) procedure. The values of band intensity were submitted to trypsinic hydrolysis and mass spectrometry, using eletrospray/quadrupole spectrometer. The genetic composition did not influence the meat tenderness, to the different ages to the shear force and myofibrillar fragmentation index. The maturation period only influenced in the meat tenderness 7 days of maturation. The shear force and myofibril fragmentation index had significant correlations. It was not observed difference between age and racial group in tenderness and in degradation of myofibrillar proteins. Only the 30kDa band presented high correlation ($r=0,60$) with 14 days of maturation period in both the races. This band was submitted to ESI-3Q-MS analysis. The peptide of fragmentation specter $m/z= 782,5$, whose amino acid sequence was deduced as ALSSMGANYSSYLAK, corresponds to the specter of the fragmentation of peptide of troponin T protein skeletal muscle of slow contraction of *Bos taurus*.

Key-word: Bovine of cut, electrophoresis, Spectrometry of mass, myofibrillar proteins..

CAPÍTULO 1

Considerações iniciais

O Brasil vem se consolidando, ano a ano, como grande produtor de carne bovina. É o segundo maior rebanho de bovinos do mundo e, sendo o segundo maior produtor mundial de carne bovina (11% da produção mundial), vem se firmando como o maior exportador, principalmente após o controle da febre aftosa em grande parte do território nacional, o que possibilitou a abertura de novos mercados. Muitos estudos têm sido feitos com o objetivo de se oferecer um produto de melhor qualidade e competitividade nos mercados nacional e internacional. A intensificação na velocidade de crescimento muscular, aliada a uma boa terminação da carcaça parece ser efetiva neste propósito (Chardulo, 2000).

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

Os consumidores vêm cada vez mais procurando qualidade no produto a ser consumido e a maciez está entre os fatores mais importantes quanto à qualidade da carne. Desta maneira, conhecer os mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de amaciamento da carne podem fornecer potenciais marcadores de qualidade, os quais poderiam ser utilizados e testados para prever possíveis variações na qualidade da carne (Casserly, 2000).

O grande problema enfrentado hoje pela indústria da carne é a obtenção de maciez e qualidade, visto que o processo de amaciamento da carne durante o *post-mortem* é variável entre as carcaças (Thompson, 2002). A maciez da carne é o atributo mais importante para o consumidor (Therkildsen *et al.*, 2002), existindo uma relação entre o preço do corte e esta característica (Koohmaraie *et al.*, 2002).

Vários fatores *ante-mortem* (genótipo, sexo, idade, nutrição, exercício, estresse antes do abate, presença de tecido conjuntivo, espessura e comprimento de sarcômero) e *post-mortem* (estimulação elétrica, *rigor mortis*, esfriamento da carcaça, maturação, método e temperatura de cozimento e pH final) influenciam a maciez da carne. Diante disso, é necessário conhecer os mecanismos bioquímicos envolvidos neste processo

para que se possa reduzir a variação apresentada pela maciez. Várias técnicas têm sido empregadas neste sentido.

Em músculos de tamanho insuficiente para a determinação de valores da força de cisalhamento ou análise sensorial, o Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) torna-se uma ferramenta muito útil como indicador de maciez da carne (Veiseth, 2001). Esta técnica apresenta-se altamente correlacionado com os valores obtidos pelo força de cisalhamento e “painel sensorial” (Olson, 1976).

Como a miosina e suas isoformas têm sido relacionadas com características de qualidade de carne e crescimento animal (Chang, 2003), identificar essas isoformas em animais Nelore (*Bos indicus*) e estabelecer possíveis correlações destas com a taxa de crescimento e a qualidade medida por métodos convencionais pode ser um novo caminho para o estudo da qualidade da carne bovina. A análise proteômica é uma abordagem promissora que vem sendo empregada no estudo do processo de maciez da carne *post-mortem* (Kajaersgard & Jessen, 2003). Definida como o estudo das proteínas que são expressas por um genoma, esta abordagem permite, entre outras coisas, caracterizar os padrões complexos de expressão e as transformações sofridas pelas proteínas celulares.

MACIEZ DA CARNE

A falta de padronização da maciez da carne bovina tem se mostrado o maior problema enfrentado pelo elo da cadeia produtiva de carne atualmente (Hadlich, 2004). A satisfação do consumidor em relação à carne bovina é embasada na interação entre maciez, suculência e sabor. No entanto, há pouca variação na suculência e sabor da carne, portanto se for reduzida ou eliminada a variação na maciez da carne, conseqüentemente, os problemas também seriam minimizados (Wheeler *et al.*, 1993; Koohmaraie *et al.*, 1994 e Koohmaraie *et al.*, 2002).

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

O comprimento do sarcômero, a quantidade de tecido conectivo e a proteólise das proteínas miofibrilares explicam boa parte da variação da maciez entre diferentes músculos submetidos ao processo de maturação. Contudo, a contribuição relativa de cada componente para a maciez é dependente do músculo avaliado. Por exemplo,

enquanto no músculo *Psoas major* o comprimento do sarcômero é o maior determinante da maciez, no músculo *Longissimus dorsi* a proteólise é o fator mais importante. Já nos músculos *Bíceps femoris* e *Semimenbranosus* a quantidade de tecido conectivo é que mais contribui para a maciez (Koochmaraie, 2002).

EFEITO DE GRUPO GENÉTICO

Dentre os fatores *ante mortem*, a raça é um dos que estão mais correlacionados com a maciez (Silva, 2004). O principal efeito da raça na maciez da carne é observado quando se comparam animais *Bos indicus* e *Bos taurus*. Vários estudos têm demonstrado que, à medida que a porcentagem de *Bos indicus* aumenta, a maciez tende a decrescer e a variabilidade a aumentar (Whipple *et al.*, 1990a). O gado Zebu (*Bos indicus*) é a sub-espécie predominante no território brasileiro, devido à sua adaptação as condições do Brasil central (Rubensam & Monteiro, 2000), possuindo sua carne denominada dura, se comparados com animais europeus (*Bos taurus*). Essa menor maciez está correlacionada com a idade de abate e o aumento do número de ligações cruzadas termoestáveis do colágeno dos músculos (que tende a torná-la mais dura), e ainda à menor deposição de gordura subcutânea nas carcaças, o que favorece o resfriamento mais rápido das massas musculares, provocando o encurtamento dos sarcômeros e, conseqüente, endurecimento da carne.

Wheeler *et al.* (1990) descreveram que animais *Bos indicus* apresentam níveis mais baixos de calpaína e níveis mais elevados de calpastatina, resultando no decréscimo da maciez da carne. Assim, pelo fato dos animais *Bos indicus* possuírem melhor adaptabilidade que os *Bos taurus*, e com o *Bos taurus* possuindo carne mais macia, começou-se a utilizar os animais europeus em cruzamentos com os zebus para assim melhorar a heterose para maciez da carne.

EFEITO DO SEXO

O efeito dos hormônios androgênicos sobre as características de carcaça e da carne é mais marcante em animais abatidos em idade mais avançada (Restle *et al.*, 1994; Restle & Vaz, 1997).

A castração dos machos foi um manejo tradicionalmente usado pelos produtores de bovinos de corte, visando evitar o efeito dos hormônios androgênicos sobre as características de carcaça e da carne (Restle et al., 1999b), pois animais inteiros apresentam carcaça mais magra, carne mais escura, mais dura e de pior palatabilidade que os castrados (Muller & Restle, 1983; Restle et al., 1994, Restle et al., 1996a).

EFEITO DA IDADE

O maior crescimento da pecuária de corte brasileira passa por uma redução na idade de abate dos machos (Vaz & Restle, 1998). Com isso, cada vez mais os produtores vêm buscando animais que atinjam a terminação com idade variando entre 12 e 15 meses, como preconizado no sistema biológico do novilho super precoce. Assim, esta prática, além de aumentar o desfrute do rebanho e o giro de capital, propicia o retorno do crescimento do consumo da carne bovina (Vaz et al., 1999b), pois é incontestável a melhor qualidade desse produto, quando originada de animais abatidos com aproximadamente um ano de idade (Restle et al., 1999a). Outros estudos têm demonstrado que características musculares e atributos da carne estão intimamente ligados com a idade dos animais, sendo que, com o aumento da idade de 15 para 19 meses, encontrou-se uma diminuição na maciez da carne (Renand et al., 2001).

Hadlich (2004), estudando animais da raça Nelore e mestiços ½ Aberdeen Angus ½ Nelore abatidos aos 12 e 24 meses, encontrou características de qualidade de carne semelhante entre os animais de 12 e 24 meses, indiferentemente do grupo genético. Entretanto os que apresentaram menor índice de maciez foram os animais Nelores abatidos aos 24 meses de idade.

EFEITO DOS FATORES POST-MORTEM

Os processos biológicos e químicos do sistema muscular não cessam no momento da morte do animal. As modificações bioquímicas e estruturais, que ocorrem após o sacrifício, são denominadas de "conversão do músculo em carne". Essas modificações ocorrem simultaneamente e são dependentes dos tratamentos *ante-mortem*, do processo de abate e das técnicas de armazenamento da carne (Roça, 2004).

Após a morte, vários fenômenos enzimáticos ocorrem na estrutura miofibrilar ocasionando inicialmente endurecimento (*Onset rigor*) e posteriormente amaciamento (maturação) (Lepetit *et al.*, 1986). O amaciamento durante a maturação é devido a alterações dos componentes fibrosos do músculo. Ocorre disjunção e provavelmente degradação do material da linha Z, ocasionando enfraquecimento das interligações miofibrilares (Davey & Gilbert, 1969). O período de estocagem *post-mortem* influencia a atividade de proteases cálcio-dependentes e a conseqüente fragmentação miofibrilar (Koochmaraie *et al.*, 1987), assim como baixos níveis de cálcio livre podem regular a destruição indiscriminada da linha Z por calpaínas (Whipple *et al.*, 1990). Segundo Koochmaraie *et al.* (1991), o maior aumento de maciez ocorre nos primeiros sete dias de maturação.

Assim, produzir carne macia e com a qualidade que satisfaça os desejos dos consumidores é um dos maiores problemas da indústria, uma vez que o processo de maciez durante o *post-mortem* é variável entre as carcaças (Thompson, 2002).

MATURAÇÃO DA CARNE BOVINA

O processo de maturação vem sendo empregado amplamente pela indústria de abate e processamento de animais, principalmente de bovinos, pois ao permitir melhorar as características organolépticas e sensoriais de carnes, como a maciez, implica em maior aceitação do produto, permitindo agregar-lhe valor diferencial.

A maturação da carne tem como objetivo melhorar a sua textura e pode ser realizada mantendo a carne, logo após o abate, em embalagem a vácuo, sob temperatura de 0 a 1°C por um período de 10 a 21 dias, ou através da aplicação de cloreto de cálcio, imediatamente após o abate, em cortes ou peças de carne, ou ainda imersão das peças em cloreto de cálcio por 48 horas. Também pode ser realizada imersão em solução de ácido acético ou láctico (Roça, 2004).

A maciez final será resultante da ação efetiva foi a degradação enzimática para desestruturar as miofibrilas compactadas durante o processo de *rigor mortis*. A efetividade da degradação enzimática depende do tempo de maturação e do nível de compactação.

Cerca de 80 % da variação encontrada na maciez da carne está relacionada com o enfraquecimento da estrutura miofibrilar (Koohmaraie, 1992). O sistema enzimático das calpaínas é responsável pelas mudanças que resultam no amaciamento da carne (Koohmaraie *et al.*, 1998) e tem participação superior a 90% no processo de amaciamento da carne maturada.

EFEITOS DA TEMPERATURA E DO TEMPO NA MATURAÇÃO DA CARNE

A manutenção de carcaças após abate por 8 a 14 dias sob temperaturas de 0 a 21°C tem sido praticada durante muitos anos e permanece como importante procedimento na produção de carne macia (Koohmaraie *et al.*, 1984, 1987; Dransfield, 1994). Muitas pesquisas têm sido realizadas para que se entenda o ou os mecanismos responsáveis por esse aumento de maciez da carne no período *post-mortem* (Koohmaraie *et al.*, 1987, 1991), embora a temperatura seja o fator mais importante na maturação (Dransfield, 1994). A temperatura e o tempo são as únicas variáveis que afetam a maturação e podem ser controladas. O aumento da temperatura de estocagem durante a maturação resultam em uma aceleração na intensidade da ação enzimática natural na carne fresca (Lee *et al.* 1996) e, conseqüentemente, a extensão do amaciamento (Dransfield, 1994). Acredita-se que o pH e a temperatura *post-mortem* têm grande efeito nas propriedades musculares e na maciez final da carne (Yu & Lee, 1986).

PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA MACIEZ DA CARNE

Os fatores *ante mortem* atuam de maneira direta ou indireta sobre sistemas enzimáticos existentes no próprio músculo, os quais têm papel importantíssimo no amaciamento e são, em última análise, os responsáveis pela maciez final da carne (Silva, 2004). Sendo assim, é aceito que grande parte ou todo o aumento da maciez é oriundo da degradação de determinadas proteínas miofibrilares por proteases endógenas do músculo (Koohmaraie *et al.*, 1987, 1991; Whipple *et al.*, 1990b; Whipple & Koohmaraie, 1991). O principal mecanismo ou sistema relacionado com a maciez é o das calpaínas os quais contêm cisteína e são produzidas pelos músculos como proenzimas ativadas pelo cálcio. Esse sistema é absolutamente dependente de cálcio e

apresenta três componentes principais: a calpaína tipo I; a calpaína tipo II e a calpastatina, que tem como principal função inativar as calpaínas (Silva, 2004).

PROTEÍNAS MIOFIBRILARES ENVOLVIDAS NA MACIEZ DA CARNE

O citoesqueleto das células musculares estriadas (cardiomiócitos e miônios) é organizado em miofibrilas e ocupa grande volume do citoplasma. As miofibrilas são formadas por filamentos espessos de miosina associados à microfilamentos de actina associados ainda à tropomiosina e à troponina. A unidade funcional das miofibrilas são os sarcômeros (Souza, 2004). As faixas mais extremas do sarcômero são denominadas **banda I** e contém filamentos de actina. A faixa central mais escura é a **banda A**, cujas extremidades são formadas por filamentos de actina e miosina sobrepostos. A região mediana mais clara a **banda H**, contém miosina. No *post-mortem*, quando o músculo se contrai, as bandas I e H diminuem de largura, o que se dá pelo deslizamento dos filamentos de actina sobre os de miosina, interferindo na maciez da carne.

PROTEOMA

O termo proteoma foi inventado em 1994 por Marc Wilkins em uma conferência sobre mapeamento do genoma e da proteína em Sienna, Italy. Apesar de atualmente existirem varias definições para o proteoma, pode-se definir como a determinação sistemática da seqüência da proteína, da quantidade, estado da modificação, interações, atividade, localização subcelular, e da estrutura em um dado tipo de célula em um tempo em particular. A análise do Proteoma é uma medida direta das proteínas nos termos de sua presença e abundância relativa (Campbell, 2003).

Devido à abundância e a diversidade das proteínas e a vasta quantidade de dados que podem ser gerados, a produção, o processamento e a interpretação de dados do proteoma torna-se complexo.

Há muitos fatores que contribuem para a qualidade da carne, tal como o crescimento e o desenvolvimento do tecido do músculo. Bouley et al. (2005) reportaram o primeiro estudo de proteoma em bovinos, estudando a hipertrofia dos músculos com uma mutação, resultando na expressão de níveis normais para a inatividade da proteína miostatina.

Resultados interessantes vêm sendo obtidos utilizando géis de eletroforese unidimensionais (1DE) em análises de proteínas musculares em busca de marcadores para maciez (Mullen, 2006). Estas pesquisas vem incorporar métodos de grande potencial para compreensão e elucidação dos processos celulares que influenciam a qualidade da carne (Sayd et al., 2006). Compreendendo como estes processos interagem com os fatores ambientais tais como no processo pós-morte na qualidade da carne, pode ser possível contribuir na otimização de sistemas da cadeia de produção para uma consistente melhoria da qualidade da carne. O proteoma deve também facilitar a aplicação de sistemas para modelar fenômenos complexos, e revelar os biomarcadores de proteína que podem ser usados em diagnósticos e predições da qualidade da carne (Mullen, 2006).

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O que tornou possível as pesquisas na área do proteoma foi o desenvolvimento do espectrômetro de massas que possibilitou a identificação das proteínas que sofriam mudanças.

Um espectrômetro de massas é um instrumento analítico que determina a massa molecular de compostos químicos. Isto é feito pela ionização destes compostos e posterior separação dos íons moleculares de acordo com sua razão massa por carga (m/z). Os espectrômetros são constituídos basicamente de uma fonte de ionização, um analisador de massa e um detector. O resultado do processo é um espectro que fornece a massa molecular e/ou informações estruturais sobre as moléculas analisadas.

As proteínas de interesse são submetidas à digestão enzimática *in situ* com tripsina e os peptídeos resultantes são analisados por espectrometria de massas, onde são ionizados positivamente, podendo assumir uma ou múltiplas cargas. Os íons gerados são então separados e têm suas massas moleculares determinadas com base na sua razão m/z . As abordagens mais utilizadas para caracterização e identificação de proteínas por espectrometria de massas são “Peptide Mass Fingerprinting” e Sequenciamento por Dissociação Induzida por Colisão (CID).

A análise por “Fingerprinting” baseia-se na determinação das massas dos peptídeos tripsínicos (*parent ions*) gerados após a digestão da proteína. A técnica de sequenciamento de peptídeos baseia-se na determinação das massas dos peptídeos

gerados após a fragmentação de um *parent ion*. Nessa técnica, conhecida também com MS2, os *parent ions* são separados e direcionados individualmente para uma câmara de colisão, onde são bombardeados com um feixe de gás inerte. Esse processo, conhecido como CID, promove a clivagem do peptídeo, gerando uma nova população de íons, denominados *daughter ions*, originado um espectro de MS/MS ou MS2. A diferença de m/z entre dois *daughter ions* consecutivos representa a massa do aminoácido perdido durante a clivagem. Portanto, a partir da análise seqüencial do espectro, é possível determinar a estrutura primária do peptídeo selecionado.

IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS EM BANCO DE DADOS

As informações obtidas por meio dos géis SDS-PAGE, como peso molecular e dos espectros de massas, como “Fingerprinting” e estrutura primária, servem como base para a identificação de proteínas de interesse. Esse processo é feito utilizando ferramentas específicas encontradas em sites especializados, como Mascot, Protein Prospector, Fasta e BLAST.

O capítulo 2, intitulado CORRELAÇÕES ENTRE A FORÇA DE CISALHAMENTO E O ÍNDICE DE FRAGMENTAÇÃO MIOFIBRILAR EM ANÁLISE DA MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DE CORTE, CRIADOS NO MODELO BIOLÓGICO SUPERPRECOCE E EM REBANHOS COMERCIAIS, teve como objetivos estudar possíveis correlações entre as técnicas de força de cisalhamento e o índice de fragmentação miofibrilar para análise da maciez da carne de bovinos de corte.

O capítulo 3, intitulado IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DO MÚSCULO LONGÍSSIMUS DORSI RELACIONADAS À MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DE CORTE, teve como objetivos identificar as proteínas miofibrilares do músculo Longíssimus dorsi de bovinos de corte, associado à maciez da carne.

Todos os trabalhos foram apresentados de acordo com as normas da Revista Meat Science.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOULEY, J., *et al.* Proteomic analysis of bovine skeletal muscle hypertrophy. **Proteomics**, v.5, p.450–490, 2005.

CAMPBELL, P. A cast of thousands. **Nature Biotechnology**, v.21, p. 213, 2003.

CASSERLY, U.; MOONEY, M-T.; TROY, D. Standardisation and application of a semi-quantitative sds–page method for measurement of myofibrillar protein fragments in bovine longissimus muscle. **Food chemistry**, v.69, p. 379–385, 2000.

CHANG, K.C.; *et al.* Relationships of myosin heavy chain fibre types to meat quality traits in traditional and modern pigs. **Meat Science**, v. 64, p. 93-103, 2003.

CHARDULO, L.A.L. Desempenho, níveis plasmáticos e hormônios, expressão e quantificação de proteínas musculares, características de carcaça e qualidade de carne de bovinos inteiros jovens de cinco diferentes grupos genéticos submetidos a confinamento. Tese (Doutorado em Zootecnia) – FCAV, Unesp, Jaboticabal. 101 p. 2000

DAVEY, C.L.; GILBERT, K.V. Studies in meat tenderness. 7. Changes in the fine structure of meat during aging. **Journal of Food Science**, v. 34, p.69-74. 1969.

DRANSFIELD, E. Optimization of tenderization, ageing and tenderness. **Meat Science**, v.36, p.105, 1994.

HADLICH, J.C. Metodologias de análises de maciez como parâmetro de qualidade de carne de bovinos de diferentes grupos genéticos e idades. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – FMVZ, Unesp, Botucatu. 94 p. 2004.

HOPKINS, D.L.; LITTLEFIELD, P.J.; THOMPSON, J.M. A research note on fators affecting the determination of myofibrillar fragmentation. **Meat Science**, v. 56, p. 19-22. 2000.

KAJAERSGARD, I. V.H; JESSEN, F. Proteome analysis elucidating post-mortem Changes in Cod (*Gadus morhua*) muscle proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3985-3991. 2003.

KOOHMARAIE, M.; *et. al.* Effect of posmortem storage on muscle protein degradation: analysis by SDS-polyacrylamide gel eletrophoresis. **Journal of Food Science**, v.49, p. 292-293, 1984.

KOOHMARAIE, M.; *et al.* Effect of post-mortem storage on Ca⁺⁺-dependent proteases, their inhibitor and myofibril fragmentation. **Meat Science**, v. 19, p.187-196. 1987.

KOOHMARAIE, M.; *et al.* Postmortem proteolysis in longissimus muscle from beef lamb and pork carcass. **Journal of Animal Science**, v.69, p.617, 1991.

KOOHMARAIE, M. The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. **Biochimie**, v.74, p.239-245,1992.

KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D. Beef tenderness: regulation and prediction. Proc. NCA Cattleman's College. Reno. NV. 1994.

KOOHMARAIE, M.; DOUMIT, M. E.; WHEELER, T.L. Meat toughening does not occur when rigor shortening is prevented. **Journal of Animal Science**, v.74, p.2935. 1996.

KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L. Effect of prerigor freezing and post-rigor calcium chloride injection on the tenderness of callipyge longissimus **Journal of Animal Science**, v.76, p.1427-1432. 1998.

KOOHMARAIE, M.; *et al.* Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, v. 62, p. 345-352. 2002.

LEE, M.; *et al.* Irradiation and Packaging of Fresh Meat and Poultry. **Journal of Food Protection**, v.59, p. 62-72, 1996.

LEPETIT, J.; SALÉ, P.; OUALI, A. Post-mortem evolution of rheological properties of the myofibrillar structure. **Meat Science**, v. 16, p.161-174. 1986.

MULLEN, A.M.; *et al.* Understanding meat quality through the application of genomic and proteomic approaches. **Meat Science**, v.74, p. 3–16, 2006.

OLSON, D.G.; PARRISH, F.C.J.R.; STROMER, M. H. Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during postmortem storage. **Journal Food Science**, v.41, p.1036-1041. 1976.

RENAND, G.; *et al.* Relationship between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. **Meat Science**, Jouy-en-Josas Cedex, France, v.59, p.49-60, 2001.

RESTLE, J., GRASSI, C., FEIJÓ, G.L.D. Características de carcaça de bovinos de corte inteiros ou castrados em diferentes idades. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.1603-1607. 1994.

RESTLE, J., VAZ, F.N. Aspectos quantitativos da carcaça de machos Hereford inteiros ou castrados, abatidos aos quatorze meses. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.1091-1095, 1997.

RESTLE, J., BRONDANI, I.L., BERNARDES, R.A.C. O novilho superprecoce. In: RESTLE, J. (Ed.) *Confinamento, pastagens e suplementação para produção de bovinos de corte*. Santa Maria: Imprensa Universitária. p.191-214, 1999a.

RESTLE, J., VAZ, F.N., ALVES FILHO, D.C. Machos não-castrados para a produção de carne. In: RESTLE, J. (Ed.) *Confinamento, pastagens e suplementação para produção de bovinos de corte*. Santa Maria: Imprensa Universitária, p.215-231, 1999b.

ROÇA, R.O. Modificações post-mortem da carne. Internet: <http://dgta.fca.unesp.br/carnes/Artigos%20Tecnicos/Roca105.pdf>. Acessado em: 05/06/2004.

RÜBENSAM, J.M.; MONTEIRO, E.M. Maciez e atividade de calpastatina em carne bovina. Documentos CPPSul/EMBRAPA, n. 28, 2000. 53p.

SAYD, T.; *et al.* Proteome analysis of the sarcoplasmic fraction of pig semimembranosus muscle: implications on meat color development. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.54, p.2732–2737, 2006.

SILVA, A.T.S. Maciez da Carne Bovina. Internet: <http://www.boidecorte.com.br/pesquisas/profmario/maciez.htm>. Acessado em: 05/06/2004.

SOUZA, V. R. As Miofibrilas. Internet: <http://www.icb.ufmg.br/~biocelch/musculo/sarcomero.html>. Acessado em: 05/06/2004.

THERKILDSEN, M.; *et al.* Effect of growth rate on tenderness, development and final tenderness of meat from Friesian calves. **Animal Science**, Tjele, Denmark, v.74, p.253-264, 2002.

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

VAZ, F.N., ROSO, C., VAZ, R.Z. Gerenciamento visando a eficiência econômica da pecuária de corte. In: RESTLE, J. (Ed.) *Confinamento, pastagens e suplementação para produção de bovinos de corte*. Santa Maria: Imprensa Universitária. p.232-258, 1999.

VAZ, F.N.; RESTLE, J. Produção de carne com qualidade. In: RESTLE, J.; BRONDANI, I.L.; PASCOAL, L.L. *et al.* (Eds.) **Produção intensiva com qualidade em bovinos de corte**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, p.104-119. 1998.

VEISETH, E.; *et al.* Technical note: comparison of myofibril fragmentation index from fresh and frozen pork and lamb longissimus. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 904-906. 2001.

WHEELER, T. L.; *et al.* Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p.4206-4220. 1990.

WHEELER, T. L.; *et al.* Effects of postmortem injection time, injection level, and concentration of calcium chloride on beef quality traits. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 2965-2974. 1993.

WHIPPLE G.; KOOHMARAIE M. Degradation of myofibrillar proteins by extractable lysosomal enzymes and m-calpain, and the effects of zinc chloride. **Journal of Animal Science**, v.11, p. 4449-4460. 1991.

WHIPPLE G.; *et al.* Predicting beef-longissimus tenderness from various biochemical and histological muscle traits. **Journal of Animal Science**, v.12, p. 4193-4199. 1990b.

WHIPPLE G.; *et al.* Effects of high-temperature conditioning on enzymatic activity and tenderness of *Bos indicus* longissimus muscle. **Journal of Animal Science**, v.11, p. 3654-3662. 1990a.

YU, L.P.; LEE, Y.B. Effects of postmortem pH and temperature on bovine muscle muscle structure and meat tenderness. **Journal Food Science**, v.51, p.774, 1986.

CAPÍTULO 2

CORRELAÇÕES ENTRE A FORÇA DE CISALHAMENTO E O ÍNDICE DE FRAGMENTAÇÃO MIOFIBRILAR EM ANÁLISE DA MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DE CORTE, CRIADOS NO MODELO BIOLÓGICO SUPERPRECOCE E EM REBANHOS COMERCIAIS

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo estabelecer possíveis correlações entre as técnicas de força de cisalhamento e o MFI para análise da maciez da carne de bovinos de corte da raça Nelore e animais cruzados ½ Nelore ½ Aberdeen Angus obtidos pelo modelo biológico Superprecoce e de rebanhos comerciais, com 12 e 24 meses de idades, entre amostras não maturadas e submetidas a 7 e 14 dias de maturação. As amostras foram colhidas do músculo *Longissimus dorsi* com osso, na região entre a 12^a e a 13^a costelas das hemi-carcaças esquerdas de cada animal e submetidas à 24 horas de resfriamento, 7 e 14 dias de maturação, para à análise da força de cisalhamento em um Warner-Bratzler Shear Force mecânico e a determinação do MFI. Para a força de cisalhamento, não houve diferença significativa entre as raças ou idades. O presente estudo observou diferenças significativas entre a carne sem maturação e as com maturação, porém não foi encontrado diferenças significativas entre 7 e 14 dias de maturação. Para o MFI, os resultados foram significativos ($p < 0,01$) para raça, idade e dias de maturação, apresentando também, uma correlação significativa ($p < 0,01$) com os valores da força de cisalhamento.

INTRODUÇÃO

Os consumidores vêm cada vez mais procurando qualidade no produto a ser consumido, e a maciez está entre os fatores mais importantes quanto à qualidade da carne. Desta maneira, conhecer os mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de amaciamento da carne pode fornecer potenciais marcadores de qualidade, os quais poderiam ser utilizados e testados para prever possíveis variações na qualidade da carne (Casserly, 2000).

A maciez da carne é o atributo mais importante para o consumidor (Therkildsen *et al.*, 2002), existindo uma relação entre o preço do corte e a maciez da carne (Koochmaraie *et al.*, 2002). Vários fatores *ante mortem* (genótipo, sexo, idade, nutrição, exercício, estresse antes do abate, presença de tecido conjuntivo, espessura e comprimento de sarcômero) e *post mortem* (estimulação elétrica, *rigor mortis*, esfriamento da carcaça, maturação, método e temperatura de cozimento e pH final) influenciam a maciez da carne.

O Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) é um índice bastante utilizado, pois prediz mais de 50% da variação da maciez da carne (Hopkins, 2000), além de ser altamente correlacionado com índices de maciez como a força de cisalhamento, já que com o aumento do MFI têm-se diminuição dos valores obtidos para força de cisalhamento e “painel sensorial” (Olson, 1976). Além disso, o MFI tem correlação significativa com aumento de maciez da carne cozida após estocagem, e está associado com alterações físico-químicas durante a maturação da carne (Davey & Gilbert, 1969).

Em músculos de tamanho insuficiente para a determinação de valores da força de cisalhamento ou análise sensorial, este índice torna-se uma ferramenta muito útil como indicador de maciez da carne (Veiseth, 2001).

O presente estudo teve como objetivo estabelecer possíveis correlações entre as técnicas de força de cisalhamento e o MFI para análise da maciez da carne de bovinos de corte da raça Nelore e animais cruzados ½ Nelore ½ Aberdeen Angus obtidos pelo modelo biológico Superprecoce e de rebanhos comerciais, com 12 e 24 meses de idades, entre amostras não maturadas e submetidas a 7 e 14 dias de maturação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais utilizados

Foram utilizados sessenta animais divididos em dois grupos genéticos, sendo 30 da raça Nelore e 30 ½ Nelore ½ Aberdeen Angus, com idades de 12 meses (inteiros) e 24 meses (castrados), onde as raças foram distribuídas igualmente nas diferentes idades. Os animais com idade de abate prevista para 12 meses são provenientes do setor de confinamento da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp, Câmpus de Botucatu. Foram confinados aos 7 meses de idade recebendo dieta rica em energia, principalmente na fase de terminação (aproximadamente 90 dias pré-abate) e abatidos ao atingirem peso, de aproximadamente 450 kg, e terminação de carcaça com 3,0 mm de gordura subcutânea, estabelecidos pelo modelo biológico superprecoce. Os animais com idade de abate prevista para 24 meses, provenientes de rebanhos comerciais, foram desmamados com aproximadamente 7 meses de idade e recriados, a pasto, durante 400 dias, sendo terminados em confinamento por mais 75 dias, até atingirem o peso aproximado de 450 kg e terminação de carcaça com aproximadamente 3,0 mm de gordura.

Os abates de ambos os grupos ocorreram em frigorífico comercial, onde foram feitas as medidas de carcaça e colheita de amostras para a análise das características de qualidade de carne.

Colheita de amostras e análise morfométrica do músculo *Longissimus dorsi*

Após o abate as carcaças foram resfriadas em câmara fria por 24 horas. Foram desossadas e as amostras do músculo *Longissimus dorsi* coletadas com osso, na região entre a 12^a e a 13^a costelas das hemi-carcaças esquerdas de cada animal. As amostras foram identificadas e congeladas em embalagem plástica (freezer -20°C).

Determinação de força de cisalhamento do músculo *Longissimus dorsi*

As determinações da textura foram executadas no Laboratório de Qualidade de Carnes do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp, Campus de Botucatu.

Foram utilizadas amostras obtidas entre a 12^a e 13^a costelas das hemi-carcaças esquerdas dos animais amostrados. Utilizou-se o procedimento proposto por Wheeler *et al.* (1995), em que as referidas amostras foram embaladas em saco plástico adequado e congeladas, após o resfriamento de 24 horas.

Quando do início das determinações as amostras foram descongeladas sob refrigeração (4°C) durante 24 horas. Para o procedimento de cozimento foi introduzido, no centro geométrico de cada amostra, um termoacoplador ligado em termômetro digital, com o objetivo de monitorar a temperatura interna até 40°C, sendo a amostra virada, para atingir o limite de 71°C, quando então foram retiradas do forno e resfriadas em temperatura ambiente até atingirem temperatura interna de 24 a 25°C.

As amostras foram então resfriadas (5 a 6°C) durante 24 horas, quando retirou-se oito cilindros do interior das mesmas.

Foi utilizada a média das oito medidas por amostra, a fim de se obter maior precisão nos resultados, na determinação da força de cisalhamento em um Warner-Bratzler Shear Force (Chatillon) mecânico com capacidade de 25kg.

Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI)

A determinação do Índice de Fragmentação Miofibrilar foi feita conforme metodologia descrita por Culler *et al.* (1978). Foram utilizadas amostras do músculo *Longissimus dorsi* na região da 12^a e 13^a costelas submetidas à 24 horas de resfriamento, à 7 e 14 dias de maturação. Utilizou-se três gramas do músculo *Longissimus dorsi* livre de gordura e de tecido conjuntivo. As amostras foram homogeneizadas em Ultra-turrax com haste de cisalhamento (Marconi – MA 102/E) a 18000 rpm em 30 mL de tampão de Índice de Fragmentação Miofibrilar (TMFI) à 2°C (KCl 100 mM, fosfato de potássio 20 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM e NaN₃ 1 mM, pH 7,0) duas vezes por 30 segundos com mesmo intervalo em gelo. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 1000×g por 15 minutos à 2°C e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuscitado em 30 mL de TMFI à 2°C e homogeneizado com bastão de vidro.

As amostras foram centrifugadas a 1000×g por 15 minutos à 2°C e o sobrenadante foi novamente descartado. O pellet foi então ressuscitado em 7,5 mL de TMFI à 2°C e submetido ao Vortex até a amostra tornar-se bastante homogênea para ser

filtrada em filtro de polietileno com porosidade de 1,0 mm, aproximadamente. Foram adicionados 7,5 mL de TMFI à 2°C para a lavagem do tubo de centrifuga e auxiliar na filtragem. Foi feita quantificação de proteínas miofibrilares totais pelo método Macro Biureto (Gornall *et al.*, 1949). Para a determinação do MFI, as amostras foram preparadas com TMFI para uma concentração de proteína 0,5 mg/mL.

As amostras foram homogeneizadas por agitação vigorosa e então submetidas à leitura em absorvância no comprimento de onda de 540 nm. O valor de MFI foi obtido pelo seguinte cálculo:

$$\text{MFI} = \text{Absorvância} \times 200$$

Análise de dados

Para avaliar os efeitos de grupos genéticos, período de maturação e de idade ao abate sobre a força de cisalhamento e o Índice de fragmentação miofibrilar, foi utilizado o procedimento GLM (SAS, 2002) com modelo de análise de variância que incluiu além dos efeitos principais, as interações duplas e tripla, sendo considerado um delineamento em parcelas subdivididas, com o animal dentro de grupo genético e idade de abate, a parcela subdividida no tempo.

Para determinar as associações entre força de cisalhamento e o Índice de fragmentação miofibrilar em cada tempo de maturação isoladamente, os dados foram analisados com um modelo que incluiu apenas grupo genético, idade e interação, separadamente para cada tempo de maturação. A partir dos resíduos das duas características neste modelo foram obtidas as correlações lineares simples de Pearson. Utilizando-se o procedimento CORR (SAS, 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a força de cisalhamento, não houve diferença significativa entre as raças ou idades (Tabela 1). Entretanto, apresentaram valores da força de cisalhamento inferiores ao limite de 4,5 kg proposto por MCKEITH *et al.* (1985). Esse valor limite para a maciez da carne varia entre os autores, como os propostos por KOOHMARAIE *et al.* (1994) e WHEELER *et al.* (1994) em que o valor limite de força de cisalhamento entre carne dura e carne macia é de 6,0 kg. JOHNSON *et al.* (1990) consideram o valor limite de 5,5 kg e SHACKELFORD *et al.* (1991) o de 4,6 kg. Segundo KOOHMARAIE *et al.*

(2003) esta variação entre estes valores ocorre porque, durante o post-mortem, as mudanças bioquímicas na carne não acontecem de maneira uniforme entre os animais o que levaria a uma superestimação ou subestimação do que realmente ocorre neste período.

Os resultados encontrados no presente estudo demonstraram não haver diferenças significativas entre as raças para os valores da força de cisalhamento, concordando com Cucki (2006) e Arrigoni *et al.* (2004). Segundo Shackelford *et al.* (1991) e Koohmaraie *et al.* (2003), animais com proporção de genes *Bos indicus* superiores a 25% devem ser submetidos a períodos mínimos de 14 dias de maturação. Entretanto, por se tratar de animais jovens, 7 dias de maturação são suficientes para conferir uma carne com valores de força de cisalhamento menores que 5 kg, podendo ser considerada uma carne macia (Arrigoni *et al.*, 2004).

Crouse *et al.* (1989) estudando características qualitativas da carne de 422 bovinos de cruzamentos de raças taurinas Hereford ou Angus, e zebuínas Brahman e Sahiwal, com diferentes composições genéticas Zebu:Taurino (0:100, 25:75, 50:50 e 75:25) abatidos com idades entre 12 e 15 meses foram avaliadas considerando a força de cisalhamento. Observaram que com o aumento da composição genética do zebu nos animais, havia também aumento na força de cisalhamento ($P < 0,01$) e diminuição nas notas dos painéis de degustação.

Restle *et al.* (1999) trabalhando com animais cruzados Hereford e Nelore relataram efeitos negativos nos parâmetros de maciez e palatabilidade da carne com o aumento da composição genética do zebuíno. Jonhson *et al.* (1990) trabalhando com cruzamentos de Angus e Brahman, também observaram diminuição na maciez e aumento da força de cisalhamento na carne dos animais conforme aumentava a composição genética do zebu. No mesmo trabalho, foi avaliado o efeito do período de maturação na força de cisalhamento, em que a carne de animais sem gene zebuíno ou com 25 % de Brahman proporcionou maior maciez na carne que os animais com 50 % ou mais de composição genética zebu.

Os períodos de maturação de 7 e 14 dias do presente estudo, apresentaram menores valores da força de cisalhamento que os resfriados por 24 horas, o que vem a confirmar o observado em vários trabalhos, demonstrando que com o aumento no período de maturação ocorre uma diminuição dos valores de força de cisalhamento

(HADLICH, 2004; MORALES, 2004; MANÇO, 2002; SHACKELFORD *et al.* 1991; RUBENSAM *et al.*, 1998; PRINGLE *et al.*, 1997; O'CONNOR *et al.*, 1997; FEIJÓ & MÜLLER, 1994; CROUSE *et al.*, 1989).

Maher *et al.* (2005) trabalhando com a raça Belgian Blue e períodos de maturação de 2, 7 e 14 dias, também observaram que havia uma diminuição do valor da força de cisalhamento conforme aumentava o período de maturação.

Eilers *et al.* (1996) trabalhando com diferentes cortes, verificaram que a maturação aos 12 dias apresentava uma carne com maciez aceitável, porém alguns cortes apresentavam um aumento maior na maciez quando maturado por 21 dias. Também concluíram que o músculo *Longissimus dorsi* deveria ser maturado por, no mínimo, 12 dias para apresentar uma maciez aceitável e 24 dias para uma maciez considerada superior. O presente estudo contradiz estes dados, visto que não foi encontrado diferenças significativas entre 7 e 14 dias de maturação.

Segundo Wheeler *et al.* (1990), carnes consideradas macias, podem não sofrer influência da maturação, porém, carnes que estivessem próximos desse limite entre macia e dura, sofreriam um aumento na maciez passando a ser consideradas macias.

Existem evidências de que a maturação pode melhorar cerca de 25 % a maciez da carne, mas sua eficácia é bem menor em carcaças de bovinos de quatro anos ou mais, bem como naquelas que sofreram um rigoroso enrijecimento das fibras musculares pelo frio (FELÍCIO, 1997).

Para o MFI, os resultados do presente estudo foram significativos ($p < 0,01$) para raça, idade e dias de maturação, apresentando também, uma correlação significativa com os valores da força de cisalhamento, apresentada na Tabela 3. Com a diminuição dos valores da força de cisalhamento, ocorre o aumento dos valores de MFI em relação aos dias de maturação, melhorando a maciez da carne.

No presente estudo todos os valores encontraram-se acima de 50, com as médias apresentadas na Tabela 2.

Segundo Culler *et al.* (1978), valores do índice de fragmentação de 60 ou acima de 60 para o músculo *Longissimus* denota-se uma carne muito macia, valores de 50 uma carne macia e valores abaixo de 50 uma carne pouco macia. Hopkins *et al.* (2000) afirma que as miofibrilas submetidas a processos de maturação tendem a apresentar

maior degradação, quando comparadas àquelas que não sofreram esse processo. Essa degradação seria a responsável pela maciez da carne.

O aumento dos valores do MFI em relação ao aumento nos dias de maturação encontrado neste trabalho está de acordo com os reportados por vários autores (MANÇO, 2006; HADLICH, 2004; MORALES, 2004; ROBBINS *et al.*, 2003; CHAMBAZ *et al.*, 2003; THERKILDSEN *et al.*, 2002 e SILVA *et al.*, 1999). Porém, Morales (2004) não encontrou diferenças significativas entre as raças Nelore e $\frac{1}{2}$ Nelore $\times\frac{1}{2}$ Brahman, quando estudado o período de maturação.

Os mecanismos biológicos responsáveis pelas mudanças estruturais e bioquímicas durante o aumento da idade controlando a maciez da carne ainda não são completamente conhecidos (Sawdy *et al.*, 2004).

CONCLUSÃO

A composição genética do Zebu em animais abatidos com idades entre 12 e 24 meses avaliadas por meio da força de cisalhamento e do índice de fragmentação miofibrilar não influenciou a maciez da carne.

O período de maturação só influenciou na maciez da carne até os sete dias de maturação nos animais estudados.

A força de cisalhamento e o índice de fragmentação miofibrilar apresentaram correlações altas, sendo ambas, ferramentas viáveis para avaliação da maciez em cortes cárneos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) por oferecer condições de infra-estrutura para a realização deste trabalho e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos ao autor André Rodrigues Abrahão.

BIBLIOGRAFIA

ARRIGONI, M.D.B.; *et al.* Desempenho, fibras musculares e carne de bovinos jovens de três grupos genéticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 1033-1039, 2004.

CASSERLY, U.; MOONEY, M-T.; TROY, D. Standardisation and application of a semi-quantitative SDS–Page method for measurement of myofibrillar protein fragments in bovine longissimus muscle. **Food chemistry**, v.69, p. 379–385, 2000.

CHAMBAZ A.; *et al.* Meat quality of Angus, Simmental, Charolais and Limousin steers compared at the same intramuscular fat content. **Meat Science**, v.63, p.491-500, 2003.

CROUSE, J.D.; CALKINS, C.R.; SEIDEMAN, S.C. The effects of rate of change in body weight on tissue development and meat quality of youthful bulls. **Journal of Animal Science**, v. 63, n.6, p.1824-1829, 1986.

CUCKI, T.O. Desempenho, características de qualidade de carcaça e carne de bovinos de diferentes grupos genéticos no sistema Superprecoce. 2006. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

CULLER, R.D.; *et al.* Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical physical and sensory characteristics of bovine *longissimus* muscle. **Journal of Food Science**, v.43, p. 1177-1180, 1978.

DAVEY, C.L.; GILBERT, K.V. Studies in meat tenderness. 7. Changes in the fine structure of meat during aging. **Journal of Food Science**, v. 34, p.69-74. 1969.

EILERS, J. D.; *et al.* Modification of early post mortem muscle pH and use of post mortem aging to improve beef tenderness. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 790-798, 1996.

FEIJÓ, G. L. D.; MÜLLER, L. Estudo dos efeitos da desossa a quente e na maturação na qualidade da carne de bovinos. **Ciência Rural**, v. 24, n. 3, p.617-622, 1994.

FELÍCIO, P.E. Fatores ante e pós-mortem que influenciam na qualidade da carne bovina. In: SIMPÓSIO SOBRE PECUARIA DE CORTE, 4, Produção de novilho de corte, 1996, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz”, p. 79-97, 1997.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v.177, p. 751–760, 1949.

HADLICH, J.C. Metodologias de análise de maciez como parâmetro de qualidade de carne de bovinos de diferentes grupos genéticos e idades. 2004. 94p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

HOPKINS, D.L.; LITTLEFIELD, P.J.; THOMPSON, J.M. A research note on factors affecting the determination of myofibrillar fragmentation. **Meat Science**, v. 56, p. 19-22. 2000.

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

KOOHMARAIE, M.; *et al.* Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, v. 62, p. 345-352. 2002.

KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D. Beef tenderness: regulation and predicton. Proc. NCA Cattleman's College. Reno. NV. 1994.

KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D. Beef tenderness: Regulation and prediction. Disponível em: http://meats.marc.usda.gov/MRU_WWW/TENDREV/TENDREV.html. *Acessado em: 04/08/2003.*

MAHER, S.C.; *et al.* The influence of biochemical differences on the variation in tenderness of M. *Longissimus dorsi* of Belgian Blue steers managed homogenously pre and post slaughter. **Meat Science**, v.69, n.2, p.215–224, 2005.

MANÇO, M.C.W. Efeito da idade de abate em parâmetros *post-mortem* e na maturação da carne de bovinos da raça Nelore. 2002. 84p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

MCKEITH, F.K.; *et al.* Chemical and sensory properties of thirteen major beef muscles. **Journal of Food Science**, v.50, p.869–872, 1985.

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

O'CONNOR, S.F. *et al.* Genetic effects on beef tenderness in *Bos indicus* composite and *Bos taurus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1822-1830, 1997.

OLSON, D.G.; PARRISH, F.C.J.R.; STROMER, M. H. Myofibril fragmentation and shear resistance of three bovine muscles during *postmortem* storage. **Journal Food Science**, v.41, p.1036-1041. 1976.

PRINGLE, T.D. *et al.* Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2955 - 2961, 1997.

RESTLE, J.; VAZ, F.N.; QUADROS, A.R.B. Características de carcaça e da carne de novilhos de diferentes genótipos de Hereford x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.6, p.1245-1251, 1999.

ROBBINS K.; *et al.* Consumer attitudes towards beef and acceptability of enhanced beef. **Meat Science**, v. 65, p.72 –729, 2003.

RUBENSAM, J. M.; FELÍCIO, P. E.; TERMIGNONI, C. Influência do genótipo *Bos indicus* na atividade de calpastatina e na textura da carne de novilhos abatidos no sul do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n. 4, p.405-409, 1998.

SAS user's guide: Statistics. Cary: Statistical Analysis System Intitute, 2002.

SAWDY, J.C.; *et al.* Myofibrillar 1-d fingerprints and myosin heavy chain ms analyses of beef loin at 36 h postmortem correlate with tenderness at 7 days. **Meat Science**, v.67, p. 421-426. 2004.

SHACKELFORD, S.D.; *et al.* An evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. **Journal of Animal Science**, v. 69, p.171-177, 1991.

SILVA, J. A.; PATARATA, L.; MARTINS, C. Influence of ultimate pH on bovine meat tenderness during ageing. **Meat Science**, v. 52, p. 453 – 459, 1999.

THERKILDSEN, M.; *et al.* Effect of growth rate on tenderness, development and final tenderness of meat from Friesian calves. **Animal Science**, Tjele, Denmark, v.74, p.253-264, 2002.

THERKILDSEN, M.; *et al.* Effect of growth rate on tenderness, development and final tenderness of meat from Friesian calves. **Animal Science**, v.74, p.253-264, 2002.

VEISETH, E.; *et al.* Technical note: comparison of myofibril fragmentation index from fresh and frozen pork and lamb longissimus. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 904-906, 2001.

WHEELER, T. L.; *et al.* Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p.4206-4220. 1990.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Effect of *postmortem* injection time and posinjection aging time on the calcium-activated tenderization process in beef. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2652-2660, 1997.

WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M.; SHACKELFORD, S. D. Standardized Warner-Bratzler Shear Force Procedures for Meat tenderness measurement. Roman L. Hruska U. S. MARC. USDA, Clay Center, NE. 1995. Internet: http://192.133.74.26/MRU_WWW/PROTOCOL/WBS.HTML

Tabela 1. Médias observadas (kg) da força de cisalhamento dos animais Nelore e ½ Nelore ½ Aberdeen Angus aos 12 e 24 meses de idade, sem maturação e maturadas por 7 e 14 dias.

Tratamento	Angus			Nelore		
	Período de maturação					
	0	7	14	0	7	14
12 meses	4,56	3,19	3,00	4,45	2,97	2,49
24 meses	3,26	2,89	2,82	4,35	4,00	3,89

Tabela 2. Médias observadas do índice de fragmentação miofibrilar dos animais Nelore e ½ Nelore ½ Aberdeen Angus aos 12 e 24 meses de idade, sem maturação e maturadas por 7 e 14 dias.

Tratamento	Angus			Nelore		
	Período de maturação					
	0	7	14	0	7	14
12 meses	67,22	87,25	105,05	91,36	109,06	112,26
24 meses	62,22	99,06	107,11	42,5	52,74	68,58

Tabela 3. Correlações lineares simples de Pearson entre os resíduos do índice de fragmentação miofibrilar e a Força de cisalhamento de acordo com o tempo de maturação.

	0	7	14
	-0,47*	-0,36	-0,65**

* (p<0,05) ** (P<0,01)

CAPÍTULO 3

IDENTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE PROTEÍNAS MIOFIBRILARES DO MÚSCULO *LONGÍSSIMUS DORSI* RELACIONADAS À MACIEZ DA CARNE EM BOVINOS DE CORTE

RESUMO

O presente estudo teve como objetivos: 1) Identificar as proteínas miofibrilares do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de corte, associado à maciez da carne; 2) Estudar o efeito da raça, idade do abate e tempo de maturação, sobre as proteínas Miofibrilares. Foram utilizados 30 animais da raça Nelore (*Bos indicus*) e 30 animais ½ Nelore ½ Aberdeen Angus (*Bos indicus x Bos taurus*), criados no modelo biológico Superprecoce abatidos nas idades de 12 meses, e de rebanhos comerciais abatidos com 24 meses de idade. As amostras foram colhidas do músculo *Longissimus dorsi* com osso, na região entre a 12^a e a 13^a costelas das hemi-carcaças esquerdas de cada animal e submetidas à análise da força de cisalhamento em um *Warner-Bratzler Shear Force* mecânico. O isolamento das miofibrilas foi feito segundo protocolo adaptado de Clayes et. al. (1995) e a quantificação de proteínas miofibrilares foi feito pelo método de Bradford. Eletroforese 1D foi utilizado para separação das proteínas, em gel homogêneo contendo 10% de acrilamida. Os géis foram fixados, corados com Coomassie blue e submetidos à análise densitométrica, determinando-se tanto os pesos moleculares aparentes das proteínas como as quantidades relativas de proteína em cada banda individualizada. Os valores das densidades foram analisadas com relação aos grupos genéticos, período de maturação e de idade ao abate e correlacionados com os valores da força de cisalhamento. As bandas que apresentaram mudanças significativas nas intensidades foram submetidas à hidrólise tripsínica e à espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro do tipo eletrospray triplo/quadrupolo Quattro II da Micromass (UK). As proteínas miofibrilares selecionadas para análise em relação à força de cisalhamento foram a Miosina de cadeia pesada, Actina, α -Tropomiosina e β -Tropomiosina e um fragmento de 30kDa. Não foi observada diferença entre idade e

grupo racial tanto para maciez como para a degradação das proteínas miofibrilares. Somente a banda de 30kDa apresentou correlação alta ($r=0,60$) com período de maturação de 14 dias em ambas as raças. Esta banda foi submetida à análise por eletrospray triplo/quadrupolo. O espectro de fragmentação do peptídeo $m/z=782,5$, cuja seqüência de aminoácidos foi deduzida como sendo ALSSMGANYSSYLAK, corresponde ao espectro dos fragmentos de peptídeos da proteína troponina T do músculo esquelético de contração lenta de *Bos taurus*. As proteínas foram identificadas pela base de dados SwissProt ou NCBIInr quando relacionados a *Bos taurus*. Embora, no presente estudo, tenhamos analisados animais de dois grupos genéticos distintos (*Bos indicus* e *Bos taurus*), todas as proteínas foram identificadas como do grupo das proteínas miofibrilares da espécie *Bos taurus*, o que impossibilita a diferenciação das espécies por análise de espectrometria de massas. Isto pode ser atribuído, provavelmente ao número limitado das seqüências dos Bovídeos disponíveis no banco de dados.

INTRODUÇÃO

Para os consumidores, a maciez é considerada a mais importante de todas as características organolépticas que contribuem à qualidade da carne (Koohmaraie, 1992), existindo uma relação entre o preço do corte e a sua maciez (Koohmaraie *et al.*, 2002). A maciez da carne é resultado da contribuição de dois componentes principais do músculo, sendo um o tecido conectivo e outro a perda *post-mortem* da integridade estrutural dentro do sarcômero, que é o componente contrátil fundamental do músculo esquelético (Sawdy *et al.*, 2004). Outros fatores *ante-mortem* (genótipo, sexo, idade, nutrição, exercício, estresse antes do abate, presença de tecido conjuntivo, espessura e comprimento de sarcômero) e *post-mortem* (estimulação elétrica, *rigor mortis*, esfriamento da carcaça, maturação, método e temperatura de cozimento e pH final) influenciam a ação desses mecanismos.

Vários pesquisadores vêm correlacionando a degradação enzimática de proteínas miofibrilares com a maciez da carne (Sawdy *et al.*, 2004), se iniciando imediatamente ao *post-mortem*.

A proteólise da proteína miofibrilar troponina T e subsequente aparecimento da banda de 30 kDa vem sendo reportada como um bom indicador de proteólise e de um preditor para a maciez da carne (Koohmaraie, 1994).

Como a miosina e suas isoformas têm sido relacionadas com características de qualidade de carne e crescimento animal (Chang, 2003), identificar essas isoformas em animais Nelore (*Bos indicus*) e estabelecer possíveis correlações destas com a taxa de crescimento e a qualidade medida por métodos convencionais pode ser um novo caminho para o estudo da qualidade da carne bovina. Desta maneira, conhecer os mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de amaciamento da carne pode fornecer potenciais marcadores de qualidade, os quais poderiam ser utilizados e testados para prever possíveis variações na qualidade da carne (Cassery, 2000). Assim, o presente estudo teve como objetivos: 1) Identificar as proteínas miofibrilares do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos de corte, associado à maciez da carne; 2) Estudar o efeito da raça (zebu e europeu), idade do abate (12 e 24 meses) e tempo de maturação (1, 7 e 14 dias), sobre as proteínas Miofibrilares.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais utilizados

Foram utilizados sessenta animais divididos em dois grupos genéticos, sendo 30 da raça Nelore e 30 cruzados $\frac{1}{2}$ Nelore $\frac{1}{2}$ Aberdeen Angus, com as idades de 12 meses (inteiros) e 24 meses (castrados). Os animais abatidos aos 12 meses foram provenientes do setor de confinamento da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp, Câmpus de Botucatu. Foram confinados aos 7 meses de idade recebendo dieta rica em energia, principalmente na fase de terminação (aproximadamente 90 dias pré-abate) e abatidos ao atingirem peso de aproximadamente 450 kg, e terminação de carcaça com 3,0 mm de gordura subcutânea, estabelecidos pelo modelo biológico superprecoce. Os animais abatidos com 24 meses, foram provenientes de rebanhos comerciais, foram desmamados com aproximadamente 7 meses de idade e recriados a pasto durante 400 dias, sendo terminados em confinamento por mais 75 dias, até atingirem o peso aproximado de 450 kg e terminação de carcaça com aproximadamente 3,0 mm de gordura.

Os abates de ambos os grupos ocorreram em frigorífico comercial, onde foram realizadas as medidas de carcaça e colheita de amostras para a análise das características de qualidade de carne, de composição protéica e de expressão de proteínas do músculo esquelético.

Colheita de amostras do músculo “Longissimus dorsi”

Após o abate as carcaças foram resfriadas em câmara fria por 24 horas. Foram desossadas e as amostras do músculo *Longissimus dorsi* colhidas com osso, na região entre a 12^a e a 13^a costela das hemi-carcaças esquerdas de cada animal. As amostras foram identificadas e congeladas em embalagem plástica (freezer -20°C).

Determinação semiquantitativa da composição protéica do músculo “Longissimus dorsi”

A extração das proteínas foi feita no Laboratório de Análise de Carnes, do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências da Unesp, Campus de Botucatu. As análises referentes à quantificação, perfil eletroforético e identificação das proteínas por espectrometria de massas foram feitas no Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - Universidade de São Paulo-Ribeirão Preto-SP.

a) Isolamento das miofibrilas

Para o isolamento das miofibrilas utilizou-se o protocolo adaptado de Claves et. al. (1995), em que homogeneizou-se 1,0 g de tecido em 10 mL de tampão de lise (Tris 10 mM / Sacarose 250 mM / Na₂EDTA 1 mM, pH 7,6 à 4°C) utilizando um Ultra-Turrax (Marconi - MA 102/E). Foi utilizado 3 ciclos de 1 minuto cada, com intervalos de 30 segundos no gelo.

A solução foi centrifugada à 1000×g (centrífuga Eppendorf, modelo 5804R) por 10 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi descartado. O precipitado (pellet) foi ressuspenso em 10 mL de Tris 50 mM / Na₂EDTA 1 mM, pH 7,6 à 4°C. A solução foi centrifugada à 1000×g por 10 minutos, à 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado. O precipitado (pellet) foi ressuspenso em 10 mL de KCl 150 mM. A solução foi centrifugada à 1000×g por 10 minutos, à 4°C. O sobrenadante foi descartado. E o precipitado (pellet) foi ressuspenso em 12 mL de solução contendo Imidazol 10 mM / SDS 2 % (m/v) / β-mercaptoetanol 2 % (v/v), pH 7,0 (esta solução foi preparada no dia da extração). Esta solução foi deixada “overnight” à temperatura ambiente. Após este período, a solução foi agitada e filtrada em lã de vidro siliconizada.

Aliquotas de 1 mL foram transferidas para micro-tubos do tipo eppendorf e o restante em um único tubo tipo falcon e guardada em Freezer -80°C.

b) Quantificação das Proteínas

A quantificação de proteínas miofibrilares foi realizada pelo método de Bradford (Bradford et. al., 1976). Aliquotas dos extratos protéicos foram diluídas 100 vezes em água ultra-pura. Para a obtenção da curva padrão, foi utilizada a proteína BSA fração V (Pierce), nas concentrações de 2,5 a 10 µg, contidas em 20 µL de água ultra-pura. A seguir, adicionou-se a cada poço da placa de Elisa 200 µL do Reativo de Bradford

(Quick Start Bradford Dye Reagent, 1X – BioRad). Após incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente, a absorvância das amostras foi determinada em leitor de Elisa (VersaMax Tunable, Molecular Devices) no comprimento de onda de 595nm. As leituras foram feitas em duplicatas.

c) Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

A separação das proteínas foi feita em sistema de eletroforese vertical, onde utilizou-se gel homogêneo contendo 10% de acrilamida no gel separador e 4% no gel de empilhamento (Laemmli, 1970) com dimensões de 1,5 mm x 26 cm x 20 cm. As amostras com massa de 60µg de proteína total foram diluídas em Tris-HCl 0,125M pH 6,8, glicerol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,02% (m/v) e DTT (ditiotritol) 1% (m/v). As amostras foram fervidas por cinco minutos à 100°C e aplicadas no gel. As corridas foram desenvolvidas a amperagem constante de 10V, com temperatura de 9°C, em tampão de corrida Tris-HCl 25mM, pH 8,3, contendo glicina 192mM e SDS 1% (m/v) até que o indicador saísse da placa. Os géis foram fixados em solução 40 % etanol (v/v) e 10% ácido acético (v/v), corados com “Coomassie Brilliant Blue” G-250 e descorados em solução contendo 25% de metanol (v/v).

d) Densitometria

Os géis depois de descorados foram submetidos à análise densitométrica (ImageScanner II), determinando-se tanto as massas molares das frações protéicas como as quantidades relativas de proteína em cada banda individualizada, empregando-se a medida densitométrica por Densidade Óptica Integrada, por meio do programa Image Master 3D Prime & Elite – Gel Pro Analyser.

e) Análise de dados

Para avaliar os efeitos de grupos genéticos, período de maturação e de idade ao abate sobre a intensidade das bandas proteicas, foi utilizado o procedimento GLM, com um modelo que incluiu além dos efeitos principais, as interações duplas e tripla considerando um delineamento em parcelas subdivididas no tempo de maturação.

Para medir as associações entre a intensidade de cada banda protéica e as duas características da carne (Força de cisalhamento e MFI) cada tempo de maturação foi

considerado isoladamente. Os dados de todas as características foram inicialmente analisados com um modelo que incluiu os efeitos de idade ao abate e grupo genético. Posteriormente foram obtidas as correlações lineares simples de Pearson utilizando-se o procedimento CORR (SAS, 2002) dentro de cada tempo de maturação.

f) Espectrometria de Massas

Foi utilizado um espectrômetro do tipo eletrospray triplo/quadrupolo Quattro II da Micromass (UK). Cada amostra em banda separada por eletroforese em gel de poliacrilamida foi submetida à digestão com tripsina. SDS e corante *Coomassie blue* foram removidos por 3 lavagens com 400 µL de bicarbonato de amônio 100mM contendo acetonitrila 50% (v/v), por ultimo a amostra foi desidratada com acetonitrila pura e secada em concentrador rotatório à vácuo (SpeedVac, Savant). A banda do gel seco foi re-hidratada com uma solução de tripsina (Promega) a 0,5 µg/20 µl e após a completa re-hidratação do gel, um volume de bicarbonato de amônio foi adicionado para cobrir completamente o gel que foi incubado à 37°C por 24 horas. A reação foi interrompida pela adição de 5µl de ácido fórmico e mantida em temperatura ambiente para extração dos peptídeos. O extrato foi conservado em freezer (-20°C) até o momento da análise por espectrometria de massas.

Os peptídeos tripsínicos da amostra foram dessalificados em micro-tip contendo resina de fase reversa (POROS R2, Perseptive Biosystems, USA) previamente ativada com metanol, equilibrada com ácido fórmico a 0,2 % (v/v). A amostra foi carregada em micro-tip individual e dessalificado com 3 x 100µl de ácido fórmico a 0,2 % (v/v) sendo eluída da resina com 30µl de uma solução de metanol 60%, ácido fórmico 5% (v/v). Neste solvente a amostra foi introduzida diretamente no espectrômetro de massas utilizando uma bomba tipo seringa (Harvard Apparatus).

Os peptídeos tripsínicos e os íons fragmentados por meio de dissociação induzida por colisão (CID) foram identificados usando o site Matrix Science - MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) no banco de dados SwissProt.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas miofibrilares são representadas pela miosina, actina, proteína C, proteína M, tropomiosina, α -actina e β -actina. São proteínas que formam os miofilamentos grossos e finos que constituem a miofibrila, organela que desempenha a função de contração muscular. Representam de 52% a 56% das proteínas musculares (SGARBIERI,1996). Entretanto, estudos têm demonstrado proteólises das proteínas miofibrilares, como a troponina-T, e subsequente surgimento de um fragmento de 30 kDa. Este relato demonstra bons indicadores do nível de proteólises *post-mortem* e preditor da maciez da carne (Koohmaraie, 1994).

No presente trabalho, as proteínas miofibrilares estudadas foram a Miosina de cadeia alta, Actina, α -Tropomiosina e β -Tropomiosina e o fragmento de 30kDa. Elas foram analisadas em relação ao MFI e SF, onde somente a banda de 30kDa apresentou correlação alta com período de maturação de 14 dias em ambas as raças. Entretanto, apesar de não apresentarem diferenças entre as raças, todas sofreram diminuição da intensidade com o aumento do período de maturação, sendo que a de peso de 30 kDa apresentou comportamentos contrários. Esses resultados concordam com a literatura, onde Huff-Lonergan *et al.* (1996) notou o mesmo comportamento para as proteínas miosina, actina e troponina T, mesmo sendo menores que as proteínas titina e nebulina também estudadas por eles. Outros autores também verificaram que a miosina não sofreu degradação *post-mortem* à 4° C após 56 dias de maturação (Bandman & Zdanis, 1988; Yates *et al.*, 1983), sugerindo que a falta de proteólise da miosina de cadeia pesada foi devido a pouca atividade enzimática em baixas temperaturas. Sawdy *et al.* (2004), utilizou eletroforese com a técnica de “immunoblot” e análise de espectrometria de Massas para identificar os fragmentos da miosina de cadeia alta em bovinos, verificou correlações significativas com a maciez em animais jovens, demonstrando uma alta correlação entre a degradação da miosina de cadeia alta e a maciez com 36h e 7 dias de maturação. Entretanto, o mesmo autor retirou a contribuição da banda referente à actina do modelo de regressão, por esta proteína parecer não sofrer mudanças e por apresentar alta densidade ótica, cuja retirada auxiliaria a identificação de bandas menores que poderiam influenciar significativamente a maciez da carne.

Vários estudos têm demonstrado que a actina não apresenta degradação durante o período *post-mortem* (Takahashi, 1992; Bandman & Zdanis, 1988), assim como foi verificado no presente estudo.

A calpastatina é o inibidor da ação da calpaína durante o processo de proteólise *post-mortem*, e foi encontrada uma estreita relação entre este inibidor com a menor maciez da carne. O sistema da calpaína constitui-se de duas enzimas, a μ -calpaína que necessita de 5 a 50 μ M de íons cálcio para sua atividade e a m-calpaína, que requer 300 a 1000 μ M do mesmo íon para iniciar sua atividade. Estas duas enzimas apresentam a propriedade de autólise, atuando sobre si mesmas em um mecanismo ainda desconhecido, inibindo a degradação excessiva das proteínas (ROÇA, 2000; KUBOTA *et al.*, 1993). Assim, as enzimas não atuam diretamente sobre miosina e actina, porém degradam o disco Z hidrolisando as proteínas desmina, titina, nebulina, tropomiosina, troponina e Proteína C. A hidrólise da tropomiosina e troponina facilitaria a desestruturação e a liberação dos filamentos finos, resultando nos monômeros de actina, enquanto que a degradação da Proteína C, em um mecanismo semelhante, desestabilizaria e liberaria os filamentos grossos, resultando nos monômeros de miosina (KUBOTA *et al.*, 1993).

Negishi *et al.*, (1996) verificou que, com a maturação, o conteúdo da troponina-T tem uma leve diminuição, e devido à degradação desta proteína, polipeptídeos de aproximadamente 30 kDa aparecem. Provavelmente estas mudanças podem estar relacionadas às mudanças que ocorrem na estrutura do músculo, tais como o aumento no comprimento do sarcômero, e principalmente devido ao alargamento da banda-I e algumas mudanças ocorridas na banda-A (Kolczak *et al.*, 2003).

Vários autores vêm demonstrando um decréscimo de várias proteínas miofibrilares como a troponina-T (Morales, 2004; Boehm *et al.*, 1998; Ho *et al.*, 1997; Huff-lonergan *et al.* 1996). Whipple *et al.* (1990) trabalhando com carne maturada de animais da raça Brahman, observou uma pequena degradação da proteína de 30kDa, entretanto, Morales (2004) trabalhando com animais da raça Nelore e mestiço (½ Nelore ½ Brahman), observou uma degradação considerável destas duas proteínas. Estes resultados também foram observados no presente estudo, em relação ao MFI e SF, em que somente a banda de 30 kDa apresentou correlação alta com período de maturação de 14 dias em ambas as raças, sendo assim, submetida à análise por ESI-3Q-MS com o objetivo de identificar a origem da banda protéica.

As bandas denominadas miosina, actina, tropomiosinas α e β foram recortadas do gel, submetidas à digestão com tripsina e preparadas para análise por ESI-3Q-MS

com o objetivo de confirmar sua identificação. A banda de 30 kDa que apresentou correlação significativa nas amostras maturadas foi selecionada e identificada por MS (Figura 2). A Figura 2a representa o espectro de varredura dos peptídeos tripsínicos correspondentes à banda de 30 kDa, mostrando em detalhe, a distribuição isotópica do peptídeo $m/z = 782,5[M+2H^+]$, o qual foi posteriormente fragmentado. A Figura 2b mostra o espectro de fragmentação do peptídeo $m/z = 782,5$, cuja seqüência de aminoácidos foi deduzida como sendo ALSSMGANYSSYLAK, correspondendo à proteína troponina T do músculo esquelético de contração lenta do *Bos taurus*.

As proteínas foram identificadas e listadas na Tabela 1 com sua referencia na base de dados SwissProt ou NCBIInr quando relacionados ao *Bos taurus*. O mapa de referência do gel SDS-PAGE apresentou, na Figura 1, as bandas das respectivas proteínas identificadas. A proteína de maior peso molecular identificada foi a Miosina de cadeia alta com 222,99 kDa, enquanto a de menor peso molecular foi a Troponina T com 31,28 kDa.

A cobertura das seqüências foram ao redor de 18% para proteínas menores que 50 kDa, sendo o valor (%) que expressa o alinhamentos dos aminoácidos dos peptídeo identificados por espectrometria de massas, com a seqüência total da proteína depositada no banco de dados. Para a identificação da miosina de cadeia alta, foi obtida uma cobertura da seqüência de 8%. Foram utilizados, no presente estudo, animais de dois grupos genéticos, sendo da raça Nelore (*Bos indicus*) e ½ Nelore ½ Aberdeen Angus (*Bos indicus x Bos taurus*), no entanto todas as proteínas foram identificadas como do grupo das miofibrilares da espécie *Bos taurus* o que impossibilita a identificação das diferentes espécies por análises de espectrometria de Massas. Tal fato nas falhas da identificação, provavelmente é uma consequência do número limitado das seqüências dos Bovídeos atuais no banco de dados. A fim de aumentar a confiabilidade da identificação das proteínas do músculo entre os diferentes grupos genéticos, foram feitos alinhamentos dos peptídeos identificados por espectrometria de massas com a seqüência total das proteínas dos Bovídeos depositada no banco de dados, utilizando o site FASTA (<http://www.ebi.ac.uk>).

CONCLUSÃO

Não foi observada diferença entre idade e grupo racial tanto para maciez como para a degradação das proteínas miofibrilares. Entretanto, a troponina T demonstrou estar diretamente ligada à maciez com relação ao período de 14 dias de maturação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Estadual Paulista (UNESP) e ao Centro de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) por oferecer condições de infra-estrutura para a realização deste trabalho e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudos ao autor André Rodrigues Abrahão.

BIBLIOGRAFIA

BANDMANE, Z; DANIS, D. An immunological method to assess protein degradation in post-mortem muscle. **Meat Science**, v.22, p.1–19, 1988.

BOEHM, W.E.; KENDALL, T.L.; THOMPSON, V.F.; GOLL, D.E. Changes in the calpains and calpastatin during postmortem storage of bovine muscle. **Meat Science**, v.76, p. 2415–2434, 1998.

BRADFORD, M.B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CASSERLY, U.; MOONEY, M-T.; TROY, D. Standardisation and application of a semi-quantitative sds–page method for measurement of myofibrillar protein fragments in bovine longissimus muscle. **Food chemistry**, v.69, p. 379–385, 2000.

CHANG, K.C.; *et al.* Relationships of myosin heavy chain fibre types to meat quality traits in traditional and modern pigs. **Meat Science**, v. 64, p. 93-103, 2003.

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

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

HUFF-LONERGAN, E., T.; *et al.* Proteolysis of specific muscle structural proteins by calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle. **Journal of Animal Science**, v.74, p.993-1008, 1996.

KOLCZAK, T.; *et al.* Changes of myofibrillar and centrifugal drip proteins and shear force of *psoas major* and *minor* and *semitendinosus* muscles from calves, heifers and cows during *postmortem* ageing. **Meat Science**, v. 64, p 69-75, 2003.

KOOHMARAIE, M.; *et al.* Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Science**, v. 62, p. 345-352. 2002.

KOOHMARAIE, M.; WHEELER, T. L.; SHACKELFORD, S. D. Beef tenderness: regulation and prediction. Proc. NCA Cattleman's College. Reno. NV. 1994.

KOOHMARAIE, M. The role of Ca(2+)-dependent proteases (calpains) in post mortem proteolysis and meat tenderness. **Biochimie**, v.74, p.239-245,1992.

KUBOTA, E. H., OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Maturação da carne: um processo enzimático. **Revista Nacional da Carne**, v.18, n.200, p.12-15, 1993.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

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

NEGISHI, H.; YAMAMOTO, E.; KUWATA, T. The origin of the 30 kda component appearing during postmortem ageing of bovine muscle. **Meat Science**, v.42, p.289-303, 1996.

ROÇA, R.O. Tecnologia da carne e produtos derivados. Botucatu: Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, 2000. 202p.

SAS user's guide: Statistics. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2002.

SAWDY, J.C.; KAISER, S.A.; ST-PIERRE, N.R.; ET AL. Myofibrillar 1-d fingerprints and myosin heavy chain ms analyses of beef loin at 36 h postmortem correlate with tenderness at 7 days. **Meat Science**, v.67, p. 421-426. 2004.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. São Paulo : Varela, 1996. p.184-229.

TAKAHASHI, K. Non-enzymatic weakening of myofibrillar structures during conditioning of meat: calcium ions at 0.1 mm and their effect on meat tenderization. **Biochimie**, v. 74, p. 247-250, 1992.

WHIPPLE G.; *et al.* Predicting beef-longissimus tenderness from various biochemical and histological muscle traits. **Journal of Animal Science**, v.12, p. 4193-4199. 1990.

YATES, L.D.; *et al.*, effect of temperature and ph on the post mortem degradation of myofibrillar proteins, **Meat Science**, v.8, p.157–179, 1983.

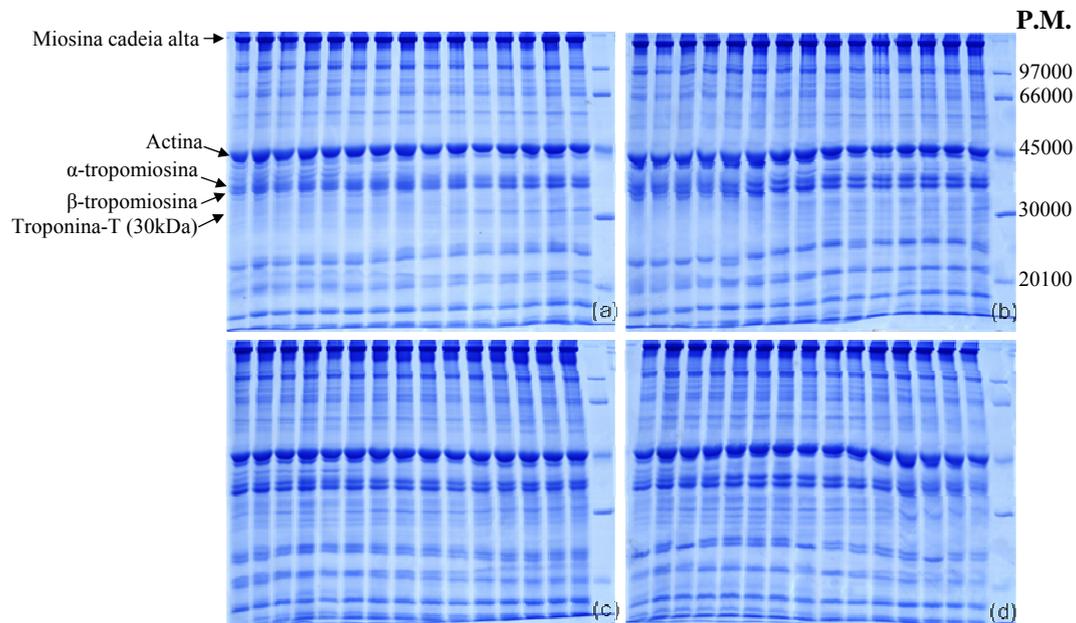


Figura 1. Eletroforese de gel SDS-PAGE com cinco animais em cada tratamento. (a) Animais da raça Nelore com 12 meses de idade com amostras não maturadas e submetidas a 7 e 14 dias de maturação. (b) Animais da raça Nelore com 24 meses de idade com amostras não maturadas e submetidas a 7 e 14 dias de maturação. (c) Animais da raça Aberdeen Angus com 12 meses de idade com amostras não maturadas e submetidas a 7 e 14 dias de maturação. (d) Animais da raça Aberdeen Angus com 24 meses de idade com amostras não maturadas e submetidas a 7 e 14 dias de maturação.

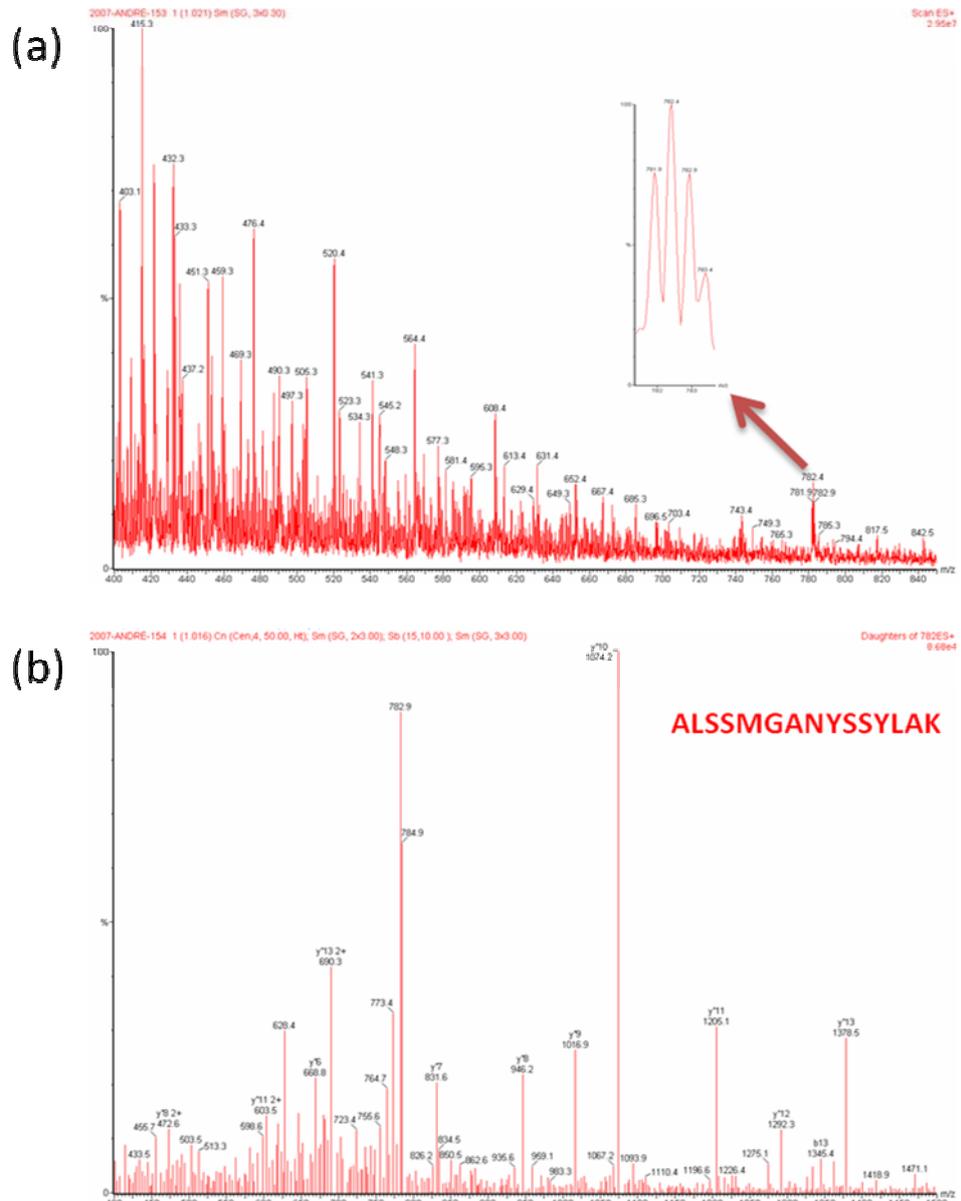


Figura 2. Análise de espectrometria de massas em MS e MS/MS no ESI-3Q-MS. (a) Espectro de varredura obtido dos peptídeos tripsínicos da banda de 30 kDa. A imagem inserida é um zoom do íon $m/z = 782,5$, duplamente carregado, mostrando sua distribuição isotópica natural. (b) Espectro de massas obtido por meio da fragmentação do íon $m/z = 782,5[M+2H^+]$ por CID-MS/MS. O perfil apresenta íons da série y, cuja seqüência pode ser deduzida como ALSSMGANYSSYLAK, correspondente à proteína Troponina T do músculo esquelético de contração lenta do *Bos taurus* (Q8MKH6).

Tabela 1. Lista das proteínas músculo esquelético de bovinos identificadas em espectrômetro do tipo eletrospray triplo/quadrupolo, com suas funções, número de acesso na base de dados NCBI, ponto isoelétrico e peso molecular.

Proteína identificada	Função	Número de acesso no NCBI nr ou SWISS-PROT	pI/Mr teórico	Mr experimental	% cobertura
Miosina de cadeia alta, músculo esquelético	Contração muscular	Q9BE40	5.57/222990.06	132160.00	8
Actina, músculo aórtico liso	A actina é uma proteína altamente conservada, envolvida em vários tipos de modificações celulares e são ambigualmente expressas em todas as células eucariotes.	P62739	5.24/42008.95	43403.00	21
Cadeia da alfa Tropomiosina	Ligamento aos filamentos de actina em células musculares e não musculares. Representam a função central na associação com o complexo troponina, na regulação de cálcio dependente na contração dos músculos estriados dos vertebrados. A contração do músculo liso é regulada pela interação com caldesmon. Em células não musculares é implicado na estabilização dos filamentos de actina no citoesqueleto.	Q5KR49	4.69/32694.58	36875.00	24
Cadeia beta da Tropomiosina	Ligamento aos filamentos de actina em células musculares e não musculares. Representam a função central na associação com o complexo troponina, na regulação de cálcio dependente na contração dos músculos estriados dos vertebrados. A contração do músculo liso é regulada pela interação com caldesmon. Em células não musculares é implicado na estabilização dos filamentos de actina no citoesqueleto.	Q5KR48	4.66/32836.70	35556.00	14
Troponina T, músculo esquelético lento	Troponina T é uma subunidade da troponina, ligante da tropomiosina; é um filamento fino do complexo regulatório que confere sensibilidade ao cálcio para a atividade da actomiosina ATPase no músculo estriado.	Q8MKH6	5.71/31284.25	31623.00	11

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

Os grupos genéticos estudados apresentaram características de qualidade satisfatórias quanto às exigências do setor de produção e dos consumidores que desejam carne macia. Devido à pouca idade de abate e ao sistema de produção não ocorreram diferenças entre os dois grupos, sendo que para a obtenção de carne macia 7 dias de maturação foram suficientes. Esse dado mostra a importância do estudo de animais jovens, não somente pelo potencial de produção, mas também pela qualidade do produto final.

Em relação aos métodos de predição da taxa de degradação miofibrilar no postmortem, a eletroforese na presença de dodecil sulfato de sódio SDS-PAGE se mostrou adequado para análise semiquantitativa das proteínas da carne. O emprego da espectrometria de massas para a identificação das proteínas provavelmente relacionadas à maciez se mostrou eficiente, sendo uma ferramenta importante nesse tipo de estudo.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)