

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES E DAS  
ISOFORMAS DA MyHC E SUAS RELAÇÕES COM A QUALIDADE  
DA CARNE DE BOVINOS NELORE SUPERPRECOSES**

**DANIELA CRISTINA MORALES**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia como parte  
das exigências para obtenção do título de  
Doutor.

BOTUCATU - SP  
Junho de 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU

**CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES E DAS  
ISOFORMAS DA MyHC E SUAS RELAÇÕES COM A QUALIDADE  
DA CARNE DE BOVINOS NELORE SUPERPRECOSES**

**DANIELA CRISTINA MORALES**  
ZOOTECNISTA

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIS ARTUR LOYOLA CHARDULO

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia como parte  
das exigências para obtenção do título de  
Doutor.

BOTUCATU - SP  
Junho de 2007

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **CLÁUDIO E VICENTINA** e aos meus irmãos, **SILVIA e CLAUDINHO**, que com seu amor, amizade e incentivo, me possibilitaram atingir este objetivo.

Ao **CAIO**, amor da minha vida!

## OFEREÇO

À minha filha **BRUNA**, que está sendo esperada com todo o **AMOR** e **FELICIDADE** do mundo!

## ***Agradecimentos***

Ao Prof. Dr. **Luis Artur Loyola Chardulo**, pela amizade, carinho, compreensão e orientação.

Ao Prof. Dr. **Antonio Carlos Silveira** pela amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. **Henrique Nunes de Oliveira** pela amizade, carinho e realização das análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. **Mário de Beni Arrigoni**, pela amizade, carinho e colaboração na etapa de campo do experimento.

Ao Prof. Dr. **Paulo Rodrigues Ramos**, pela atenção e sugestões para o trabalho.

À prof. **Maelli Dal Pai**, pela preciosa colaboração nas análises histoquímicas.

À prof. **Cyntia Martins Ludovico**, pela amizade, carinho e auxílio na etapa do confinamento e abate dos animais do experimento.

Aos **Profs. do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal**, pela amizade e carinho sempre.

À minha amiga **Janaina Conte Hadlich**, pelo carinho,  
companheirismo, auxílio nas análises e dedicação desde os anos da  
graduação!

À amiga **Fernanda Carani** por toda a colaboração nas análises e  
simpatia sempre.

Às amigas **Seila C. Vieira e Carmem S. Prado**, por toda atenção e  
carinho sempre.

A todos os **Colegas de Curso** que tornaram as aulas, experimentos e  
análises no laboratório mais divertidas.

Aos **estagiários** que ajudaram em todas as fases do projeto.

A **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo –**  
**Fapesp**, pela bolsa de estudos concedida.

**A DEUS** que me deu saúde e a convivência com pessoas  
maravilhosas para a realização deste trabalho!

**QUEIRA.....**

**BASTA SER SINCERO E PROFUNDO  
E VOCÊ SERÁ CAPAZ DE SACUDIR O MUNDO!!!!**

Frejat

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	<b>2</b>
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES E</b>	
<b>ISOFORMAS DA CADEIA PESADA DE MIOSINA (MyHC) NO TECIDO</b>	
<b>MUSCULAR E NA CARNE DE BOVINOS NELORE (Bos indicus)</b> .....	<b>13</b>
RESUMO .....	14
ABSTRACT .....	16
INTRODUÇÃO .....	17
MATERIAL E MÉTODOS .....	21
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
CONCLUSÕES .....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>44</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES E</b>	
<b>ISOFORMAS DA CADEIA PESADA DE MIOSINA (MyHC) E A QUALIDADE</b>	
<b>DE CARNE DE BOVINOS NELORE (Bos indicus)</b> .....	<b>44</b>
RESUMO .....	45
ABSTRACT .....	46
INTRODUÇÃO .....	47
MATERIAL E MÉTODOS .....	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
CONCLUSÕES .....	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>77</b>
IMPLICAÇÕES .....	78

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A maciez da carne é um dos principais atributos de qualidade que afetam a satisfação de consumidores e conseqüentemente o aumento do consumo. A inconsistência na maciez é um dos maiores problemas da indústria da carne (JAYASOORIYA *et al.*, 2007). Para a indústria da carne a principal meta é produzir carne de qualidade que traga satisfação ao consumidor e retorno para todos os processos da cadeia de produção (SAWDY *et al.*, 2004).

A identificação de bovinos que tenham propensão genética para produzir carne de qualidade é de alta prioridade para a indústria da carne em muitos países. As características da carcaça, bem como os fatores que determinam a qualidade da carne, são influenciados, entre outros, por parâmetros genéticos e maturidade do animal (MILLER, 2001). A maciez da carne é resultado da contribuição de dois principais componentes musculares, sendo eles tecido conectivo e perda no *postmortem* da integridade estrutural do sarcômero, principal aparato de contração do músculo esquelético (SAWDY *et al.*, 2004).

Desta maneira identificar os mecanismos envolvidos na definição da qualidade da carne de animais zebuínos para que haja possibilidade de intervenção no processo de amaciamento e produção de carne com qualidade desejada é necessário, já que estes animais compõem a base do rebanho de corte brasileiro (RUBENSAM & MONTEIRO, 2000).

Consumidores cada vez mais procuram qualidade no produto a ser consumido e a maciez está entre o fator mais importante quanto à qualidade da carne. Este fato é confirmado pela relação existente entre o preço do corte e a maciez que o mesmo apresenta (KOOHMARAIE *et al.*, 2002). Desta maneira,

conhecer os mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de amaciamento da carne, potenciais marcadores de qualidade poderiam ser utilizados e testados para prever possíveis variações na qualidade da carne (CASSERLY *et al.*, 2000).

Há uma grande variação individual na qualidade da carne entre animais da mesma raça, sexo e ambiente natural que ainda não é bem explicada. Essa variação parece ser causada por fatores genéticos e ambientais. A composição do tipo de fibra e a área da fibra de músculos específicos exercem influências nos processos bioquímicos e conseqüentemente na carne (KLONT *et al.*, 1998).

O estudo da composição das fibras musculares tem aumentado consideravelmente tanto em suínos, como em bovinos, pois sabe-se que o tipo de fibra influencia significativamente na qualidade e maciez da carne (PICARD *et al.*, 1999).

O músculo esquelético é um tecido heterogêneo compreendido por diferentes tipos de fibras. O metabolismo, características bioquímicas e biofísicas, como capacidade oxidativa e glicolítica, tamanho da fibra, coloração, conteúdo de lipídios e glicogênio podem levar a essas variações entre os tipos de fibras musculares (CHANG *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, os tipos de fibras são classificados de acordo com suas propriedades histoquímicas (PETER, 1972): fibras vermelhas ou SO (*slow-oxidative*) que apresentam pequena área, contração lenta e metabolismo aeróbico, fibras brancas ou FG (*fast-glycolytic*) que são glicolíticas, apresentam contração rápida, maior área e metabolismo anaeróbico e as fibras

intermediárias ou FOG (*fast oxidative-glycolytic*) que possuem área intermediária, contração rápida e metabolismo aeróbico e glicolítico.

A composição do tipo de fibra varia entre músculos anatomicamente diferentes de acordo com a função tanto que músculos de manutenção tendem a ter fibras com maior capacidade oxidativa que os músculos utilizados para contrações rápidas (CHANG *et al.*, 2003).

Músculos são convertidos em carne através do *rigor mortis*, e alguns fatores que aceleram o *rigor mortis* parecem aumentar a perda da qualidade da carne. O conteúdo e a taxa de consumo de glicogênio relacionam-se com a qualidade da carne, por que o glicogênio transfere ATP como uma reposição de energia durante o *rigor mortis* e conseqüentemente afeta o desenvolvimento do *rigor*. Animais sob condições de estresse, tem acelerado consumo de glicogênio e como resultado produz um baixo pH final da carne (LAWRIE, 1998). O processo de *rigor mortis* é uma contração muscular que consome glicogênio como uma reposição de energia e as propriedades de contração são variáveis de acordo com o tipo de fibra muscular. Isto demonstra que os tipos de fibras musculares são capazes de provocar diferentes taxas de contração nos músculos tanto durante a vida do animal quanto durante o processo de *rigor mortis*, o que pode de fato afetar a qualidade da carne (CHIKNUI *et al.*, 2004).

O processo de amaciamento da carne que transforma o músculo em carne no *postmortem* envolve mecanismos enzimáticos e físico-químicos, que em intensidade e amplitude são largamente governados pela proporção de distintos tipos de fibras (PICARD *et al.*, 1999). A composição do tipo de fibra

pode ter profunda influência nas mudanças que ocorrem no *postmortem* e na conversão do músculo em carne e posterior efeito na qualidade do produto (CHANG *et al.*, 2003). A composição dos tipos de fibras musculares pode ser um dos mais importantes fatores que influenciam os eventos bioquímicos associados com a conversão do músculo em carne (SAZILI *et al.*, 2005).

Estudos encontraram correlações positivas entre o tipo ou tamanho da fibra e a qualidade da carne, principalmente em relação à maciez (CROUSE *et al.*, 1991; MALTIN *et al.*, 1998).

Outro fator atualmente relevante no estudo da qualidade da carne é o estudo da miosina, que é a proteína mais abundante no músculo, envolvendo o crescimento muscular, desenvolvimento do animal, geração de força (contração muscular) e maciez da carne. Ela é expressa por isoformas específicas em diferentes tecidos ou proteínas com estruturas quase idênticas (TIDYMAN, 1996).

Sabe-se que existe diferença quanto as isoformas de miosina em tipos de fibras musculares específicas, porém a diversidade funcional das suas isoformas não é bem definida (WICK & MARRIOTT, 1999).

Em roedores e humanos, onde a pesquisa em músculos é bastante avançada, e também em suínos, quatro principais tipos de fibra foram identificados pela presença de quatro isoformas da *Myosin Heavy Chain* (*MyHC*), sendo (*slow1*, *fast II a*, *fast II x* e *fast II b*), através da hibridização *in situ* e pela imunohistoquímica para específicas isoformas de miosina (WEISS & LEINWARD, 1996).

Quanto ao tipo molecular, os tipos *slow I* e *fast II b*, respectivamente *slow oxidative* e *fast glycolytic*, representam os dois extremos de perfil metabólico. Já as fibras *fast II a* e *fast II x* são intermediárias das fibras *fast oxidative-glycolytic* (CHANG *et al.*, 2003).

Poucos trabalhos demonstraram as isoformas da *MyHC* ( I, II a e II b) em músculo de bovinos adultos (TOTLAND & KRYVI 1991; JURIE *et al.*, 1995). A terceira isoforma (II x) tem sido identificada em muitas espécies. Resultados de vários estudos (DURIS *et al.*, 2000; PICARD *et al.*, 1998; LEFAUCHEUR & ECOLAN, 1998), indicam que as isoformas da *MyHC* II b e II x no músculo de bovinos tem estrutura bastante similar e são coidentificadas por anticorpos anti II b ou II x. Isto explica a dificuldade de separação destas isoformas de acordo com o seu peso molecular.

As seqüências de aminoácidos das isoformas de bovinos mostraram 97,6 (*MyHC*- II a), 97,3 (*MyHC* – II x), e 98,8 (*MyHC* – slow) por cento de identidade com as isoformas de suínos e 96,7 (*MyHC* – II a), 96,9 (*MyHC* – II x), e 97,5 (*MyHC* – Slow) por cento de identidade com as isoformas de humanos (CHIKNUI *et al.*, 2004).

Diferenças em qualidade de carne entre músculos branco e vermelho e entre algumas raças são bem documentadas, no entanto ainda não é claro quanto que a composição do tipo de fibra da *MyHC* influencia nas diferenças observadas quanto a qualidade da carne (CHANG *et al.*, 2003).

O entendimento molecular das características do tipo de fibra da *MyHC* na qualidade da carne facilitaria a busca pela melhoria da qualidade.

Poucos trabalhos têm feito a relação entre tipagem da fibra de músculo esquelético com qualidade de carne, no entanto CHANG *et al.* (2003) mostrou clara relação entre superior qualidade do músculo *psaos* de suínos e a relativa abundancia das fibras *MyHC* II a e II x. Por outro lado, pior qualidade do músculo *L. dorsi* foi associada com a relativa abundancia das fibras *MyHC* II b. Neste mesmo estudo foi observado maior abundância das fibras *MyHC* II b e II x. As fibras *slow/I* variaram muito pouco entre os músculos e acabou não sendo utilizada na relação entre maciez e o tipo de fibra.

Os resultados de CHANG *et al.* (2003), demonstraram também que as fibras oxidativas (II a e II x) apontam maior relação com a maciez medida por diferentes métodos. Desta maneira fica claro que conhecer a composição do tipo de fibra pode ser um fator importante na determinação da qualidade da carne.

As diferenças quanto à composição do tipo de fibra do mesmo músculo entre raças é menor do que as diferenças entre diferentes músculos dentro da mesma raça, provavelmente devido a similaridade funcional entre o mesmo músculo de diferentes raças (CERVIERI, 2003).

O uso da eletroforese com gel de poliacrilamida na presença do *SDS-PAGE* tem sido utilizado para a determinação da *MyHC* desde a década de setenta. BURRIDGE & BRAY (1975) foram os primeiros a encontrar diferenças na eletroforese quanto à mobilidade da *MyHC* e desde então a técnica tem sido constantemente testada e melhorada. As condições de separação da corrida eletroforética variam bastante entre espécies (PICARD *et al.*, 1999).

PICARD *et al.* (1999) foram os primeiros a determinar e testar as melhores condições de separação da *MyHC* tanto na fase de crescimento quanto na fase adulta de bovinos.

Para uma boa separação eletroforética da *MyHC* muitos fatores devem ser levados em consideração. A separação da *MyHC* II a e II b tem melhor resolução quanto se usa diferentes gradientes de gel (CAIZZO *et al.*, 1991). JURIE *et al.* (1995) somente conseguiram identificar as isoformas I, II a e II b de bovinos. No entanto, PICARD *et al.* (1999), após testar diferentes gradientes de acrilamida, encontrou que o gradiente 3,5 – 10% forneceu a melhor resolução na separação da *MyHC*, além de conseguir separar três isoformas *fast* (I, II a, II b e II x) de bovinos adultos com *cross-link* de 1,3 %. Porém como já citado tanto a isoforma II b com a II x são assumidas como II b.

Outro fator que é de extrema importância quanto a resolução das isoformas da *MyHC*, é a concentração de Tris no gel de separação. O Tris mantém o pH do gel constante e conseqüentemente melhora a claridade das bandas obtidas. PICARD *et al.* (1999) encontrou que para a separação das isoformas da *MyHC* de bovinos adultos a melhor concentração de Tris é de 200mM, e para a fase de crescimento a melhor concentração 250 mM.

Além destes fatores, o uso de glicerol e a adição de *2-mercaptoetanol* também melhoram a resolução da separação das isoformas da *MyHC*.

Como as isoformas da miosina e a caracterização morfológica dos tipos de fibras têm sido freqüentemente relacionadas com as características de qualidade de carne e crescimento animal (CHANG *et al.*, 2003), o presente projeto objetiva estudar as relações existentes entre as isoformas destas

proteínas e tipos de fibras com a taxa de crescimento muscular e a qualidade da carne de animais Nelore (*Bos indicus*) submetidos a um sistema intensivo de produção.

O Capítulo 2, denominado **Caracterização dos tipos de fibras musculares e isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) no tecido muscular e na carne de bovinos Nelore (*Bos indicus*)**, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na revista Pesquisa Agropecuária Brasileira - PAB. O objetivo deste trabalho foi identificar as isoformas da Cadeia Pesada da Miosina (MyHC) de animais Nelore e caracterizar morfologicamente as fibras musculares do músculo *Longissimus dorsi* e do músculo *Semitendinosus* quanto ao tipo, área e diâmetro em bovinos Nelore.

O Capítulo 3, denominado **Caracterização dos tipos de fibras musculares e isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC) e a qualidade de carne de bovinos Nelore (*Bos indicus*)** apresenta-se de acordo com as normas para publicação na revista Pesquisa Agropecuária Brasileira - PAB. O objetivo deste trabalho foi identificar a qualidade de carne de bovinos superprecoces e as possíveis relações com as características do músculo esquelético como os tipos de fibras musculares e as isoformas da cadeia pesada de miosina (MyHC).

## Referências Bibliográficas

BURRIDGE, K.; BRAY, D. Purification and structural analysis of myosins from brain and other non muscles tissues. *J. Mol. Biol.* ; v. 99; p. 1-14, 1975.

CAIZZO, V. L.; HERRICK, R.E.; BALDWIN, K. Influence of hyperthyroidism o maximal shortening velocity and myosin isoform distribution in skeletal muscles. *Am. J. Physiol.* .; v. 261, p. 285-295, 1991.

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 Chem.*, v.69, p. 379-385, 2000.

CERVIERI, R. C. *Níveis plasmáticos hormonais e crescimento muscular de bovinos superprecoces recebendo somatotropina bovina recombinante (rbST)*. Tese(Doutorado em Zootecnia/ área Nutrição e produção Animal)- FMVZ,Unesp, Botucatu, 2003.

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.

CROUSE, J. D.; KOOMARAIE, M. Effect of time of sampling postmortem on myofibril fragmentation index of meat. *J.Food Sci.*, v. 55, p. 254-256, 1990.

DURIS, M. P.; PICARD, B.; GEAY, Y. Characterisation of the specificity of different anti myosin heavy chain antibodies in bovine muscle. *Meat Science*, v.55, p. 67-78, 2000.

JAYASOORIYA, S. D. *et al*.Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine *Semitendinosus* and *Longissimus* muscles. *Meat Science*, v.75, p. 628-639,2007.

JURIE, C. *et al*.Postnatal changes in the biological characteristics of *Semitendinosus* muscle in male Limousin cattle. *Meat Science*, v. 41, p. 125-135, 1995.

KLONT, R. E.; BROCKS, L.;EIKELENBOOM, G. Muscle fibre type and meat quality. *Meat Science*, v. 49, p. 219-229, 1998.

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

LEFANCHEUR, L.; ECOLAN, P. Composition en chaines Lourdes de myosine des fibres musculaires de type II echez le porc. *INRA Prod. Anim*, v. 11, p. 52-154, 1998.

MALTIN, C. A. *et al.* The effects of age at slaughter, genotype and finishing system on the biochemical properties, muscle fibre type characteristics and eating quality of bull beef from sckled calves. *Animal Science*, v. 66, p. 341-348, 1998.

MILLER, R. K. Obtendo carne de qualidade consistente. 2001. 1° CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DA CARNE, Campinas: CTC/ITAL, 2001.

PETER, J. B.; BARNARD, R. J.; EDGERTON, V. R. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in Guinea pig and rabbits. *Biochem*, v. 11, p. 2633-2672, 1972.

PICARD, B. *et al.* Electrophoretic separation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. *Meat Science*, v. 53, p. 1-7, 1999.

PICARD, B.; DURIS, M. P.; JURIE, C. Classification of bovine muscle type by differents histochemical techniques. *Histochem. J*, v. 30, p. 473-479,1998.

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

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.

TOTLAND, G. K.; KRYVI, U. Distribution patterns of muscle fibre type in major muscles of the bulls (*Bos Taurus*). *Anat. Embryol*, v. 184, p. 441-450, 1991.

TYDYMAN, W. Characterization of the chicken neonatal myosin heavy chain isoform: Differential expression of the chicken fast myosin heavy chain genes

during development, and in normal and dystrophic adult muscles. *Ph. D. Thesis*. 1996.

WEISS, A.; LEINWAND, L. A.. The mammalian myosin heavy chain gene family. *Animal Review of Cell and Developmental Biology*, v. 12, p. 417-439, 1996.

WICK, M., MARRIOTT, N. G. The relationship of the sarcomeric architecture to meat tenderness. *Special Circular* ,172-99, 1999.

## CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES E ISOFORMAS DA CADEIA PESADA DE MIOSINA (*MyHC*) NO TECIDO MUSCULAR E NA CARNE DE BOVINOS NELORE (*Bos indicus*)

### Resumo

O objetivo do presente estudo foi identificar as isoformas da Cadeia Pesada de Miosina (*Myosin Heavy Chain - MyHC*) por eletroforese (*SDS-PAGE*), nos músculos *Semitendinosus* por biópsia durante o crescimento e ao abate e no músculo *Longissimus dorsi* ao abate. Foram utilizados 20 bovinos inteiros da raça Nelore submetidos ao modelo biológico superprecoce em um delineamento inteiramente casualizado. Foi realizada a caracterização morfológica das fibras musculares quanto ao tipo (SO, FOG e FG) e diâmetro nos mesmos músculos. Em relação ao músculo *Semitendinosus* somente foram identificadas duas bandas da cadeia pesada de miosina, a *MyHC* do tipo I e a *MyHC* do tipo II sem diferenciação da isoforma do tipo II e no músculo *Longissimus dorsi* foram identificadas as isoformas dos tipos I, II a e II x. Quanto a caracterização dos tipos de fibras no músculo *Semitendinosus* as mesmas estavam distribuídas em mosaico com predomínio de fibras glicolíticas FOG e FG e houve um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da área dos três tipos de fibras da biópsia para o abate. No músculo *Longissimus dorsi* constatou-se predominância de fibras do tipo FG em relação as fibras do tipo FOG e SO ( $P < 0,05$ ). Também em relação ao diâmetro das mesmas, as fibras SO apresentaram menor diâmetro ( $P < 0,05$ ) em relação aos demais tipos. Comparando-se os dois músculos no abate, observa-se que o músculo

*Longissimus dorsi* apresenta maior área ( $P < 0,05$ ) tanto em relação as fibras SO como quanto as fibras FG. Com relação ao diâmetro observa-se maiores valores ( $P < 0,05$ ) também para as fibras do músculo *Longissimus dorsi*, principalmente em relação as fibras FG.

**Palavras Chave:** fibras musculares, isoformas da miosina (*MyHC*), bovinos Nelore.

## Characterization of muscles fiber types and myosin heavy chain isoforms (*MyHC*)

### Abstract

The objective of this study was identify the myosin heavy chain isoforms in *Semitendinosus* (biopsy and slaughter) and *Longissimus dorsi* (slaughter) by electrophoresis (SDS – PAGE) and the muscles fiber types (SO, FOG and FG) in Brazilian yearly cattle system - Superprecoce. Were used twenty young bulls *Bos indicus* (Nellore) in completely randomized design. In relation of *Semitendinosus* muscle were identified only two MyHC isoforms (type I and II) without any differentiation of type II, and in the *Longissimus dorsi* muscle were identified the MyHC isoforms I, II a and II x. About the characterization of fiber types, in the *Semitendinosus*, the same were distributed in Mosaic with predominance of the FG and FOG fibers and significant increase ( $P<0,05$ ) of the fibers of biopsy to slaughter. In *Longissimus dorsi* muscle were observed predominance of FG fibers in relation to FOG and SO fibers ( $P<0,05$ ) and in relation to diameter, the SO fibers showed smallest values. Comparing the two muscles, the *Longissimus dorsi*, showed high area in relation the SO and FG fibers and high diameter especially in the FG fibers.

**Key Words:** muscles fibers, MyHC isoforms, Nellore catilles.

## Introdução

O estudo da composição das fibras musculares tem aumentado consideravelmente tanto em suínos, como em bovinos, pois sabe-se que o tipo de fibra influencia significativamente na qualidade e maciez da carne (PICARD *et al.*, 1999).

O músculo esquelético é um tecido heterogêneo compreendido por diferentes tipos de fibras. O metabolismo, características bioquímicas e biofísicas, como capacidade oxidativa e glicolítica, tamanho da fibra, coloração, conteúdo de lipídios e glicogênio podem levar a essas variações entre os tipos de fibras musculares (CHANG *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, os tipos de fibras são classificados de acordo com suas propriedades histoquímicas (PETER, 1972): fibras vermelhas ou SO (*slow-oxidative*) que apresentam pequena área, contração lenta e metabolismo aeróbico, fibras brancas ou FG (*fast-glycolytic*) que são glicolíticas, apresentam contração rápida, maior área e metabolismo anaeróbico e as fibras intermediárias ou FOG (*fast oxidative-glycolytic*) que possuem área intermediária, contração rápida e metabolismo aeróbico e glicolítico.

O processo de amaciamento da carne que transforma o músculo em carne no *postmortem* envolve mecanismos enzimáticos e físico-químicos, que em intensidade e amplitude são largamente governados pela proporção de distintos tipos de fibras (PICARD *et al.*, 1999). A composição do tipo de fibra pode ter profunda influência nas mudanças que ocorrem no *postmortem* e na conversão do músculo em carne e posterior efeito na qualidade do produto

(CHANG *et al.*, 2003; SAZILI *et al.*, 2005), principalmente em relação à maciez (CROUSE *et al.*, 1991; MALTIN *et al.*, 1998).

Outro fator atualmente relevante no estudo da qualidade da carne é o estudo da miosina, que é a proteína mais abundante no músculo, envolvendo o crescimento muscular, desenvolvimento do animal, geração de força (contração muscular) e maciez da carne. Ela é expressa por isoformas específicas em diferentes tecidos ou proteínas com estruturas quase idênticas (TIDYMAN, 1996).

Outros estudos com animais também tem demonstrado correlações entre os tipos de fibras musculares ou isoformas da cadeia pesada de miosina (*MyHC*) e a qualidade da carne (CHANG *et al.*, 2003).

As propriedades de contração muscular e o estabelecimento do *rigor mortis* variam entre as espécies. Tanto a taxa como a extensão do pH *postmortem* são influenciados pela espécie animal e o tempo para que o *rigor mortis* se estabeleça varia entre as diferentes espécies (LAWRIE, 1998). A base molecular para o tipo de fibra muscular é a principal diferença entre as isoformas da cadeia pesada de miosina (*MyHC*). As estruturas moleculares das isoformas da miosina podem ser as responsáveis pelas propriedades espécie-específicas no *rigor mortis* (CHIKNUI *et al.*, 2004).

Em geral, músculos que possuem maior quantidade de fibras do tipo II (fast-glycolytic) são mais susceptíveis a glicólise no *postmortem*, desenvolvimento do *rigormortis* e proteólise que os músculos que possuem maior quantidade de fibras do tipo I (slow oxidative) (SAZILI *et al.*, 2005). Diferenças entre a composição dos tipos de fibras entre músculos ou no próprio

músculo parecem estar associadas com a variação na qualidade da carne (KLONT, BROCKS, & EIKELENBOOM, 1998).

Quanto ao tipo molecular, os tipos *slow I* e *fast II b*, respectivamente *slow oxidative* e *fast glycolytic*, representam os dois extremos de perfil metabólico. Já as fibras *fast II a* e *fast II x* são intermediárias das fibras *fast oxidative-glycolytic* (CHANG *et al.*, 2003). Poucos trabalhos demonstraram as isoformas da MyHC ( I, II a e II b) em músculo de bovinos adultos (TOTLAND & KRYVI 1991; JURIE *et al.*, 1995). A terceira isoforma (II x) tem sido identificada em muitas espécies.

Resultados de vários estudos (DURIS *et al.*, 2000; PICARD *et al.*, 1998; LEFAUCHEUR & ECOLAN, 1998), indicam que as isoformas da *MHC* II b e II x no músculo de bovinos tem estrutura bastante similar e são coidentificadas por anticorpos anti II b ou II x. Recentemente estudos envolvendo seqüência de nucleotídeos para três tipos de isoformas da cadeia pesada de miosina foram realizados no músculo esquelético de bovinos adultos e foram expressas as isoformas (MyHC) I, II a e II x. A isoforma II b não foi identificada, o que sugere que esta não seja expressa no músculo esquelético de bovinos. Devido ao fato da isoforma II b ser o tipo mais glicolítico (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996), sua ausência pode levar os músculos de bovinos a se adaptarem mais as condições *slow oxidative*. Estes resultados contradizem os dados obtidos por PICARD *et al* (1999), que com o método da eletroforese separou três bandas de isoformas *fast* em músculos de bovinos. Apesar dos dados sugerirem a ausência da isoforma II b, isso não quer dizer que as fibras do tipo II b não estão presentes em músculos de bovinos. Como as isoformas da MyHC

predominantemente determinam a atividade da *ATPase*, os tipos de fibras musculares relacionam-se com as isoformas expressas.

A aparente ausência da isoforma II b no músculo esquelético de bovinos parece ser a responsável pelo desenvolvimento do *rigor mortis* mais lento, quando comparado ao músculo esquelético de suínos. Assim as diferenças nas isoformas da MyHC, que levam ao *rigor mortis*, podem explicar algumas diferenças na qualidade da carne entre as espécies (CHIKNUI *et al.*, 2004; BOWKER *et al.*, 2004).

Poucos trabalhos têm feito a relação entre tipagem da fibra de músculo esquelético com qualidade de carne, no entanto CHANG *et al.* (2003) mostrou clara relação entre superior qualidade do músculo *psoas* de suínos e a relativa abundância das fibras MyHC II a e II x. Por outro lado, pior qualidade do músculo *L. dorsi* foi associada com a relativa abundância das fibras MyHC II b. Neste mesmo estudo foi observado maior abundância das fibras MyHC II b e II x. As fibras *slow/I* variaram muito pouco entre os músculos e acabou não sendo utilizada na relação entre maciez e o tipo de fibra.

Os resultados de CHANG *et al.* (2003), demonstraram também que as fibras oxidativas (I e II x) apontam maior relação com a maciez medida por diferentes métodos. Desta maneira fica claro que conhecer a composição do tipo de fibra pode ser um fator importante na determinação da qualidade da carne.

As diferenças quanto à composição do tipo de fibra do mesmo músculo entre raças é menor do que as diferenças entre diferentes músculos dentro da

mesma raça, provavelmente devido a similaridade funcional entre o mesmo músculo de diferentes raças (CERVIERI, 2003).

O uso da eletroforese com gel de poliacrilamida na presença do *SDS-PAGE* tem sido utilizada para a determinação da MyHC desde a década de setenta. BURRIDGE & BRAY (1975) foram os primeiros a encontrar variações na eletroforese quanto à mobilidade da MyHC e desde então a técnica tem sido constantemente testada e melhorada.

Como as isoformas da miosina e a caracterização morfológica dos tipos de fibras têm sido freqüentemente relacionadas com as características de qualidade da carne e crescimento animal (CHANG *et al.*, 2003), o presente estudo objetiva caracterizar os diferentes tipos de fibras, identificar as isoformas da cadeia pesada de miosina de animais Nelore (*Bos indicus*) submetidos a um sistema intensivo de produção e validar a metodologia da *MyHC* como parâmetro indicador dos tipos de fibras musculares.

## **Material e Métodos**

### **Local e Animais Utilizados**

O experimento zootécnico de campo foi conduzido no Setor de Confinamento de Gado de Corte do Departamento de Melhoramento Genético e Nutrição Animal da FMVZ - Unesp - Botucatu, SP.

Foram utilizados 20 bovinos inteiros *Bos indicus* da raça Nelore. Os animais foram desmamados aos sete meses de idade em sistema *creep*

*feeding* e confinados por 168 dias até atingirem o peso de abate e terminação de carcaça estabelecidos pelo modelo biológico superprecoce.

### **Colheita de Amostras**

Durante o período de confinamento foi realizada a biopsia do músculo *Semitendinosus* em todos os animais estudados para a caracterização do tipo de fibra muscular. Assim que os animais atingiram o peso de abate estabelecido pelo sistema superprecoce - aproximadamente 450 Kg com 14 meses de idade - os mesmos foram abatidos em frigorífico comercial (*Marfrig* - Promissão, SP).

Após o transporte dos animais até o frigorífico, os mesmos permaneceram em jejum de sólidos 16 horas antes do abate. Durante o abate foram colhidas amostras dos músculos *Semitendinosus* e *Longissimus dorsi* para a caracterização do tipo de fibra muscular e determinação do tipo de isoforma da cadeia pesada de miosina.

### **Caracterização Morfológica das Fibras Musculares dos Músculos *Semitendinosus* e *Longissimus dorsi*.**

Para o estudo do perfil morfométrico do tecido muscular esquelético foram realizadas duas colheitas do músculo *Semitendinosus*, uma no início do período de confinamento (biópsia) segundo técnica descrita por DUBOWITZ E BROOKE (1984) e outra no abate dos animais. No músculo *Longissimus dorsi* foi realizada apenas uma coleta no abate.

Foram colhidas aproximadamente 3,0g de tecido muscular na biopsia e 10,0g no abate. Após a colheita das amostras de músculo as mesmas foram mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos quando foi retirado um fragmento de aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup>. Estes fragmentos foram envoltos em talco e imersos em nitrogênio líquido por um minuto e acondicionados em tubos plásticos para armazenamento em *freezer* -80°C.

As análises de caracterização morfológica das fibras musculares foram realizadas no *Laboratório do Depto. de Morfologia IB - Unesp, Botucatu, SP*. As amostras foram retiradas do *freezer* -80°C e transferidas para o micrótomo criostato a -20°C (*Keichert Jung, mod. CM 1800, Leica*), onde várias séries de cortes histológicos com 10µm foram obtidas e fixadas em lâmina. Para a realização dos cortes os fragmentos musculares foram dispostos perpendicularmente em suportes metálicos do próprio micrótomo criostato utilizando-se o adesivo líquido OCT *Tissue TEK (Optimal Critical temperature Compound, Miles)*. Em seguida as séries de cortes foram submetidas a técnica histoquímica para verificação da atividade contrátil da *ATPase*, com pré incubação ácida em pH 4,6 (BROOKE e KAISER, 1970), para a diferenciação dos tipos de fibras musculares.

Para a nomenclatura dos tipos de fibras foi utilizada a classificação adotada por PETER *et al.* (1972) com a identificação de três tipos de fibras musculares: SO (oxidativa e de contração lenta), FOG (oxidativas-glicolíticas e de contração rápida) e FG (glicolíticas e de contração rápida). Para os cálculos das áreas e dos diâmetros das fibras foram obtidos aproximadamente dez campos em cada lâmina, totalizando entre 700 e 900 fibras analisadas por

animal. Para a leitura dos campos foi utilizado microscópio óptico (*Olympus*, ocular 12,5X e objetiva 20X) acoplado ao analisador de imagens de microscopia óptica *Leica* e computador com programa de análise de imagens (*Image-Pro Plus 4.5.0.27*).

### **Separação Eletroforética da Cadeia Pesada de Miosina – *MyHC***

Para a determinação das isoformas da *MyHC* foram utilizadas as técnicas tradicionais de eletroforese em *SDS-PAGE*, em condição redutora combinada com reações denaturantes em gel de poliacrilamida vertical descrita por LAEMMLI (1970) e utilizando-se o procedimento proposto por PICARD *et al.* (1995). Para tanto foram utilizados 200mg de músculo congelado (*Semitendinosus* (biopsia e abate) e *Longissimus dorsi*). Algumas alterações foram realizadas no protocolo após testes no Laboratório do Departamento de Morfologia para a melhor obtenção dos resultados.

#### *- Processamento das amostras*

Foram obtidos de cinco a oito cortes do músculo (12 µm de espessura) em micrótomo criostato. Os cortes foram homogeneizados em 450 µL de Tampão de Lise (solução zero). Em seguida o homogeneizado foi colocado em banho-maria a 60°C durante 10 minutos, após a retirada do banho, foram acrescentadas quatro gotas de glicerol. Após a homogeneização do glicerol as amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -20°C. A preparação das placas de vidro foi feita após as mesmas serem limpas com lenço de papel e álcool 100% (deixar o álcool evaporar). Foi

marcado com caneta permanente em uma das placas a altura de 10,8 cm, e as mesmas foram montadas com separadores. O cuidado para nivelar corretamente o sistema foi levado em consideração.

*- Preparo do Gel de Separação 9% (suficiente para 1 placa de corrida)*

Foi utilizada uma proveta de 25 mL, onde foram adicionados e homogeneizados até a dissolução 10,5 mL de glicerol, 7 mL da solução de acrilamida/bisacrilamida (30.8) e 6 mL da solução-tampão Tris-HCl 1.5M (pH 8.8). Em seguida a solução foi transferida para um kitassato de 100 mL tampado com rolha de borracha e inserido em isopor com gelo e levado à bomba à vácuo para desgaseificar durante 10 minutos. A solução foi transferida com cuidado para um béquer de 50 mL, onde foram acrescentados 24 µL de SDS 10%, 24 µL de APS 10% (homogeneizados gentilmente) e 15 µL do catalisador da reação Temed (misturados com a ponteira). O gel foi despejado com muito cuidado dentro da placa, até atingir a marca feita com caneta permanente. O gel foi mantido com a solução para cobrir o gel e permaneceu por uma hora para polimerizar.

*- Preparo do Gel de Empacotamento 4%*

Foi utilizada uma proveta de 25 mL, onde foram acrescentados e homogeneizados 3,75 mL de glicerol, 1,95 mL da solução de acrilamida/bisacrilamida (30.8), 5,20 mL de água deionizada e 3,75 mL de tampão Tris-HCl 0.5M (pH 6.8). A solução foi transferida para um kitassato de 100 mL fechado com rolha de borracha que foi colocado em isopor com gelo e

levado à bomba à vácuo para desgaseificar por 10 minutos. A solução foi transferida com cuidado para um béquer de 50 mL, onde foram acrescentados 24  $\mu$ L da solução de SDS 10%, 24  $\mu$ L da solução de APS 10% e 15  $\mu$ L de Temed. O gel de empacotamento foi despejado por cima do gel de separação com cuidado, até faltar 0.5 cm para cobrir toda a placa. O pente foi colocado com cuidado para não formar bolhas no gel. Esperou-se uma hora para a polimerização do gel.

#### *- Lavagem dos pocinhos*

O pente foi retirado com cuidado e os pocinhos preenchidos com a solução de azul de bromofenol. A limpeza dos pocinhos foi feita com a ajuda de uma agulha e uma seringa por pelo menos três vezes, sempre preenchendo com a solução de azul de bromofenol. A aplicação das amostras nos pocinhos foi feita sempre anotando a ordem de cada amostra. As amostras foram descongeladas e mantidas em isopor com gelo. O sistema foi montado e colocado o agitador magnético, onde foi acrescentado o tampão de corrida inferior e o tampão de corrida superior (acrescido de 546  $\mu$ L de 2- $\beta$ -mercaptoethanol). O sistema foi fechado e levado à geladeira (4°C), neste momento foram ligados o agitador magnético e a fonte e os parâmetros foram anotados. A corrida foi de 3 horas a 100 V e mudou-se a voltagem para 230 V por mais 18 horas (total de horas corridas: 21 horas).

#### *- Fixação e Coloração do Gel*

O gel foi retirado da placa com cuidado e o gel de empacotamento foi cortado e descartado. Foi utilizada a Solução para Fixar o Gel por 10 minutos e a Solução para Corar o Gel (*Coomassie Blue*) por 30 minutos e a Solução para Descorar o Gel por 15 minutos. O gel foi lavado em água destilada (4x) e estocado nesta mesma água e protegido da luz.

A captação das imagens das bandas foi realizada no equipamento de foto-documentação VDS (*Pharmacia Biotech*). Os géis foram analisados utilizando o programa para análise de imagens *Image Master 3D Prime & Elite – Gel Pro Analyser*.

Para análise dos dados, os géis foram digitalizados empregando-se o Sistema de Foto-documentação e análise *Image Master VDS (Pharmacia – Biotech)* e também utilizou-se de *Software Image Master*, sendo as imagens editadas pelo *Software Adobe Photopoint 5.0*. Na eletroforese, foram analisadas as mobilidades relativas de acordo com os músculos utilizados como padrão.

A identificação das isoformas de *MyHC* foi realizada pelo perfil eletroforético das respectivas bandas nos géis que foram analisados no equipamento de foto-documentação VDS (*Pharmacia - Biotech*) e no Software analisador de imagens *Image Master 1D Prime & Elite*, sendo as imagens editadas pelo *Software Adobe Photopoint 5.0*.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional *Statistical Analysis System 6.12 (SAS, 1996)* e os dados foram submetidos à análise de variância através do procedimento GLM.

A comparação das médias de acordo com os métodos foi realizada pelo teste de *Student-Neuman-Keuls* e pelo *Teste de Tukey*. Para estabelecimento das correlações entre as características de qualidade de carne e fibras musculares, utilizou-se o procedimento CORR (SAS, 1996).

## **Resultados e Discussão**

Os dados da eletroforese realizada para a obtenção das isoformas da cadeia pesada de miosina demonstraram que em relação ao músculo *Semitendinosus* somente foram identificadas, tanto na biópsia como no abate, duas bandas da cadeia pesada de miosina e que estas são a *MyHC* do tipo I e a *MyHC* do tipo II sem diferenciação da isoforma do tipo II (Figura 1 e Figura 2). Pode-se observar também uma maior quantidade da isoforma do tipo II em relação a isoforma do tipo I medido pelo Índice de Densidade Óptica (IOD) tanto na biópsia quanto nas amostras colhidas no abate (Tabela 1). Como padrão de corrida para a identificação das bandas foram utilizados os músculos *Soleus* de ratos como padrão do tipo I e *EDL* de ratos como padrão do tipo II, sendo que este último possui predominância para o tipo II a.

Os dados obtidos estão de acordo com a literatura, pois existe uma relação direta entre a velocidade de contração da fibra muscular (hidrólise do *ATP*) e o tipo de isoforma da miosina de cadeia pesada (*MyHC*) presente nas fibras (SCHIAFFINO e REGGIANI, 1994). As fibras do tipo SO contêm *MyHC* I e as fibras dos tipos FOG e FG contêm *MyHC* II a e II b, respectivamente (STARON, 1991; STARON & PETTE, 1993).

No entanto, conforme citado abaixo, sabe-se que a isoforma II b não está presente em bovinos e sim a isoforma II x (PICARD *et al.*, 1998). De acordo com os dados obtidos pode-se observar maior presença das isoformas do tipo II no músculo *Semitendinosus*, o que é comprovado pela maior quantidade de fibras FOG e FG ( $P < 0,05$ ), tanto na biopsia como no abate.

Em relação a análise das isoformas realizadas no músculo *Longissimus dorsi* foram identificadas três isoformas da cadeia pesada de miosina (Figura 3 e Tabela 1). Poucos trabalhos demonstraram as isoformas da *MyHC* ( I, II a e II b) em músculo de bovinos adultos (TOTLAND & KRYVI 1991; JURIE *et al.*, 1995). A terceira isoforma (II x) tem sido identificada em muitas espécies. Resultados de vários estudos (DURIS *et al.*, 2000; PICARD *et al.*, 1998; LEFAUCHEUR & ECOLAN, 1998) indicam que a isoforma da *MyHC* II b e II x no músculo de bovinos tem estrutura bastante similar e são co-identificadas por anticorpos monoclonais anti II b ou II x. Este fato explica a dificuldade de separação destas isoformas de acordo com a sua massa molar.

Recentes estudos envolvendo o sequenciamento de nucleotídeos para três tipos de isoformas da cadeia pesada de miosina foram realizados no músculo esquelético de bovinos adultos e observou-se a expressão das isoformas (*MyHC*) I, II a e II x. A isoforma II b não foi identificada o que sugere que esta não seja expressa no músculo esquelético de bovinos. Devido ao fato da isoforma II b ser o tipo mais glicolítico (SCHIAFFINO & REGGIANI, 1996) sua ausência pode levar os músculos de bovinos a se adaptarem mais as condições de contração lenta e metabolismo predominantemente oxidativo.

Estes resultados contradizem os dados obtidos por PICARD *et al* (1999), que fracionaram três bandas de isoformas de contração rápida (*fast*) em músculos de bovinos. Apesar dos dados sugerirem a ausência da isoforma II b, isso não quer dizer que as fibras do tipo II b não estejam presentes em músculos de bovinos. As fibras musculares são convencionalmente classificadas em tipo I (*slow oxidative*), II a (*fast oxidative glycolytic*) e II b (*fast glycolytic*) pelas técnicas histoquímicas as quais são baseadas na atividade da *ATPase* das fibras (CHIKNUI *et al.*, 2004). Como as isoformas da *MyHC* predominantemente determinam a atividade da *ATPase*, os tipos de fibras musculares relacionam-se com as isoformas expressas.

No presente estudo foram identificadas as isoformas do tipo I, II a e II x no músculo *Longissimus dorsi*, utilizando para a identificação das bandas o músculo *soleus* como padrão do tipo I e músculo *EDL* como padrão das fibras do tipo II, sendo estas com predominância para o tipo II a (Figura 3).

Os dados obtidos puderam ser confirmados pela análise morfológica das fibras musculares onde foi observado no músculo *Longissimus dorsi* (Figura 6) maior área das fibras do tipo FOG e FG ( $P < 0,05$ ) relacionadas a maior presença das isoformas da *MyHC* dos tipos II a e II x.

Estudos anteriores (CHANG *et al.*, 2003) demonstraram que no músculo *Longissimus dorsi* de suínos a presença em abundância das isoformas do tipo II b, indicam menor qualidade de carne neste músculo, tanto em termos de pH, como nas perdas totais e coloração da carne. Em geral músculos com maior proporção de isoformas do tipo II (contração rápida - *fast*), são mais susceptíveis a glicólise no *postmortem*, desenvolvimento do *rigor mortis* e

proteólise do que músculos com isoformas do tipo I (oxidativas) (MONIN & OUALI 1991), por que as isoformas do tipo *fast* funcionam como um regulador na atividade da *ATPase* que influencia o pH e a temperatura da carcaça (BOWKER *et al.*, 2004).

Exatamente o quanto a composição das fibras musculares esta relacionada com a maciez da carne ainda não é muito evidente. Estudos em suínos e bovinos tem demonstrado que a freqüência de fibras glicolíticas (*fast*) está correlacionada negativamente com a maciez (SAZILI *et al.*, 2005). Estes estudos estão baseados na possível correlação entre a proporção de fibras oxidativas e a maciez em trabalhos realizados com búfalos. (RENAND *et al.*, 2001). No entanto, métodos como a força de cisalhamento, utilizados para a análise da maciez da carne neste músculo em ovinos e suínos não apresentaram correlações significantes com as isoformas da *MyHC* (SAZILI *et al.*, 2005; CHANG *et al.*, 2003).

A análise histoquímica das fibras do músculo *Semitendinosus* permitiu a observação de três tipos de fibras, segundo o metabolismo e as características da *ATPase* miofibrilar: SO (*Slow Oxidative*), FOG (*Fast Oxidative-Glycolytic*) e FG (*Fast Glycolytic*) (PETER *et al.*, 1972) como pode ser observado nas Figuras 4 e 5.

A distribuição dos tipos de fibras musculares está relacionada com as propriedades fisiológicas dos músculos. Por exemplo, aqueles envolvidos na realização de movimentos de resistência, como os músculos posturais são mais oxidativos do que aqueles envolvidos na realização de movimentos de força (TOTLAND E KRYVI, 1991; HENCKEL, 1995). No presente estudo, as

fibras do músculo *Semitendinosus* estavam distribuídas em mosaico (Figura 4) com predomínio ( $P < 0,05$ ) de fibras glicolíticas FOG e FG (Figura 5).

No músculo estudado e nos períodos analisados, a área das fibras FG foi sempre maior ( $P < 0,05$ ) em relação à área das fibras FOG e SO, e a área das fibras FOG maior em relação as fibras SO (Tabela 2). Durante o experimento, houve um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da área dos três tipos de fibras da biopsia para o abate no músculo *Semitendinosus* (Tabela 2). Em relação ao diâmetro das fibras, os dados encontrados estão de acordo com a literatura onde as fibras SO apresentam menor diâmetro ( $P < 0,05$ ), as fibras FG maior diâmetro e as fibras FOG com diâmetro intermediário (Tabela 3).

Os dados obtidos de amostras do abate do músculo *Longissimus dorsi* também demonstram a predominância de fibras do tipo FG (Figura 6) em relação as fibras do tipo FOG e SO ( $P < 0,05$ ). Também em relação ao diâmetro das mesmas, os dados estão de acordo com a literatura, sendo que as fibras SO apresentam menor diâmetro em relação aos demais tipos (Tabela 3).

Comparando-se os dois músculos estudados no abate, observa-se que o músculo *Longissimus dorsi* apresenta maior área ( $P < 0,05$ ) tanto em relação as fibras SO como quanto as fibras FG (Tabela 2). Já em relação ao diâmetro observa-se maiores valores também para as fibras do músculo *Longissimus dorsi*, principalmente quanto as fibras FG (Tabela 3).

## Conclusões

1. No presente estudo, pôde-se observar maior abundância da *MyHC* do tipo II em relação ao tipo I, o que demonstra que tanto o músculo *Longissimus dorsi* como o *Semitendinosus* apresentam mais fibras glicolíticas do que fibras oxidativas, principalmente em sistemas intensivos de produção.
2. O estudo das isoformas da *MyHC* é uma boa ferramenta de identificação dos tipos de fibras musculares, podendo ser utilizado como análise para a caracterização das mesmas, substituindo a análise histoquímica para a diferenciação dos tipos de fibras musculares quanto ao metabolismo.

## Referências Bibliográficas

BOWKER, B. C. *et al.* Influence of myosin heavy chain isoform expression and postmortem metabolism on the ATPase activity of muscle fibers. *Meat Science*, v. 68, p. 587 – 594, 2004.

BROOKE, M. H.; KAISER, K. Muscle fiber type: how many and what kind? *Arch. Neurol.* , v. 23, p. 369, 1970.

BURRIDGE, K.; BRAY, D. Purification and structural analysis of myosins from brain and other non muscles tissues. *J. Mol. Biol.* , v. 99, p. 1-14, 1975.

CAIZZO, V. L.; HERRICK, R.E.; BALDWIN, K. Influence of hyperthyroidism o maximal shortening velocity and myosin isoform distribution in skeletal muscles. *Am. J. Physiol.* ,v. 261, p. 285-295, 1991.

CERVIERI, R. C. *Níveis plasmáticos hormonais e crescimento muscular de bovinos superprecoces recebendo somatotropina bovina recombinante (rbST)*. Tese ( dourado em Zootecnia/área Nutrição e Produção animal), FMVZ ,Unesp – Botucatu, 2003.

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.

CHIKUNI, K.; MUROYA, S.; NAKAJIMA, I. Myosin heavy chain isoforms expressed in bovine skeletal muscles. *Meat Science*, v. 67, p. 87-84, 2004.

CROUSE, J. D.; KOOMARAIE, M. Effect of time of sampling postmortem on myofibril fragmentation index of meat. *J.Food Sci.*, v. 55, p. 254-256, 1991.

DURIS, M. P.; PICARD, B.; GEAY, Y. Characterisation of the specificity of different anti myosin heavy chain antibodies in bovine muscle. *Meat Science*, v.55, p. 67-78, 2000.

JURIE, C. *et al.* Postnatal changes in the biological characteristics of *Semiteminosus* muscle in male Limousin cattle. *Meat Science*, v. 41, p. 125-135, 1995.

KLONT, R. E.; BROCKS, L.; EIKELENBOOM, G. Muscle fibre type and meat quality. *Meat Science*, v. 49, p. 219-229, 1998.

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

LEFANCHEUR, L.; ECOLAN, P. Composition en chaines Lourdes de myosine des fibres musculaires de type II chez le porc. *INRA Prod. Anim*, v. 11, p. 52-154, 1998.

MALTIN, C. A. *et al.* The effects of age at slaughter, genotype and finishing system on the biochemical properties, muscle fibre type characteristics and eating quality of bull beef from sckled calves. *Animal Science*, v. 66, p. 341-348, 1998.

MONIN, G.; QUALI, A. Muscle differentiation and meat quality. In R. Lawrie(Ed.), *Developments in meat science* 5<sup>th</sup> ed. ,p. 89-157. London: Elsevier Applied Science. 1991.

PETER, J. B.; BARNARD, R. J.; EDGERTON, V. R. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in Guinea pig and rabbits. *Biochem*, v. 11, p. 2633-2672, 1972.

PICARD, B. *et al.* Electrophoretic separation of bovine muscle myosin heavy chain isoforms. *Meat Science*, v. 53, p. 1-7, 1999.

PICARD, B.; DURIS, M. P.; JURIE, C. Classification of bovine muscle type by differents histochemical techniques. *Histochem. J*, v. 30, p. 473-479, 1998.

PICARD, B. *et al.* Presence of an unidentified myosin isoform in certain bovine foetal muscles. *Meat Science*,v. 41, p. 315, 1995.

RENAND, G. *et al.* Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Science*, v. 59, p. 49-60, 2001.

SAZILI, A. *et al.* The relationship between slow and fast myosin heavy chain content, calpastatin and meat tenderness in different ovine skeletal muscles. *Meat science*, v. 69, p. 17 – 25, 2005.

TOTLAND, G. K.; KRYVI, U. Distribution patterns of muscle fibre type in major muscles of the bulls (*Bos Taurus*). *Anat. Embryol*, v. 184, p. 441-450, 1991.

TYDYMAN, W. *Characterization of the chicken neonatal myosin heavy chain isoform: differential expression of the chicken fast myosin heavy chain genes during development, and in normal and dystrophic adult muscles. Ph. D. Thesis.* 1996.

WEISS, A.; LEINWAND, L. A. The mammalian myosin heavy chain gene family. *Animal Review of Cell and Developmental Biology*, v. 12, p. 417-439, 1996.

WICK, M., MARRIOTT, N. G. The relationship of the sarcomeric architecture to meat tenderness. *Special Circular* 172-99. 1999.

**Tabela 1.** Valores médios do índice de densidade óptica (IOD) das isoformas da cadeia pesada de Miosina (*MyHC*) analisadas nos músculos *Semitendinosus* (biopsia e abate) e *Longissimus dorsi* (abate) de bovinos Nelore superprecoces.

	<b>Variáveis</b>					
	<i>Semitendinosus</i>			<i>Longissimus dorsi</i>		
	<i>MyHC I</i>	<i>MyHC II a</i>	<i>MyHC II x</i>	<i>MyHC I</i>	<i>MyHC II a</i>	<i>MyHC II x</i>
<b>Biopsia</b>	5,46 A	15,45 B	-	-	-	-
<b>Abate</b>	19,32 A	37,85B	-	4,71 A	4,72 A	6,14 A
<b>Média</b>	12,39	23,65	-	-	-	-

*MyHC I*: isoforma da *MyHC* do tipo I (*slow*); *MyHC II a*: isoforma da *MyHC* do tipo II a (*fast*); *MyHC II x*: isoforma da *MyHC* do tipo II x (*fast*).

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo Teste de Tukey.

**Tabela 2.** Média ( $\mu\text{m}^2$ ) da área das fibras SO (*Slow oxidative*), FOG (*fast oxidative-glycolytic*) e FG (*fast-glycolytic*) das amostras do músculo *Semitendinosus* (ST) na biópsia e no abate e do músculo *Longissimus dorsi* (LD).

<b>FIBRAS</b>	<b>ST</b> biópsia	<b>ST</b> abate	<b>LD</b>
<b>SO</b>	1273,06 A a	2453,52 B b	3025,77 B b
<b>FOG</b>	1525,32 A a	3021,62 B b	3053,98 B b
<b>FG</b>	2805,74 B b	3998,58 C c	4578,22 C c

Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si pelo *Teste de Tukey* ( $P < 0,05$ ),  $A < B < C$ .

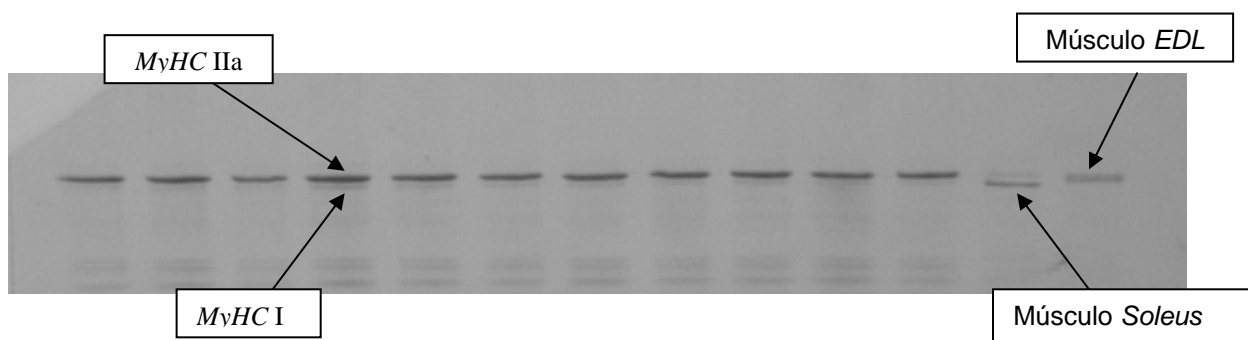
Médias seguidas de letras minúsculas na mesma coluna diferem entre si pelo *Teste de Tukey* ( $P < 0,05$ ),  $A < B < C$ .

**Tabela 3.** Diâmetro das fibras SO (*Slow oxidative*), FOG (*fast oxidative-glycolytic*) e FG (*fast-glycolytic*) das amostras do músculo *Semitendinosus* (ST) na biopsia e no abate e do músculo *Longissimus dorsi* (LD).

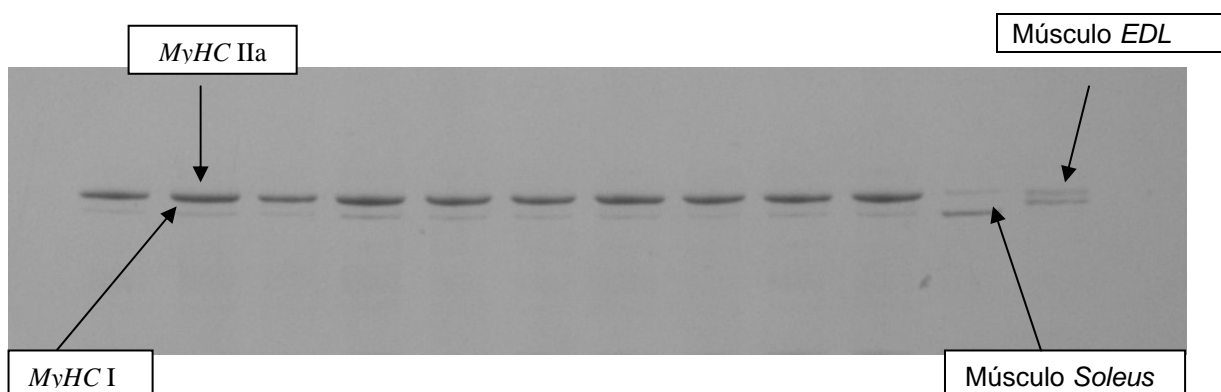
<b>FIBRAS</b>	<b>ST</b> biopsia	<b>ST</b> abate	<b>LD</b>
<b>SO</b>	32,26 A a	45,72 B b	48,84 B b
<b>FOG</b>	33,39 A a	47,28 B b	49,05 B b
<b>FG</b>	44,09 A a	50,69 B b	61,09 C c

Médias seguidas de letras maiúsculas na mesma linha diferem entre si pelo *Teste de Tukey* ( $P < 0,05$ ), A < B < C.

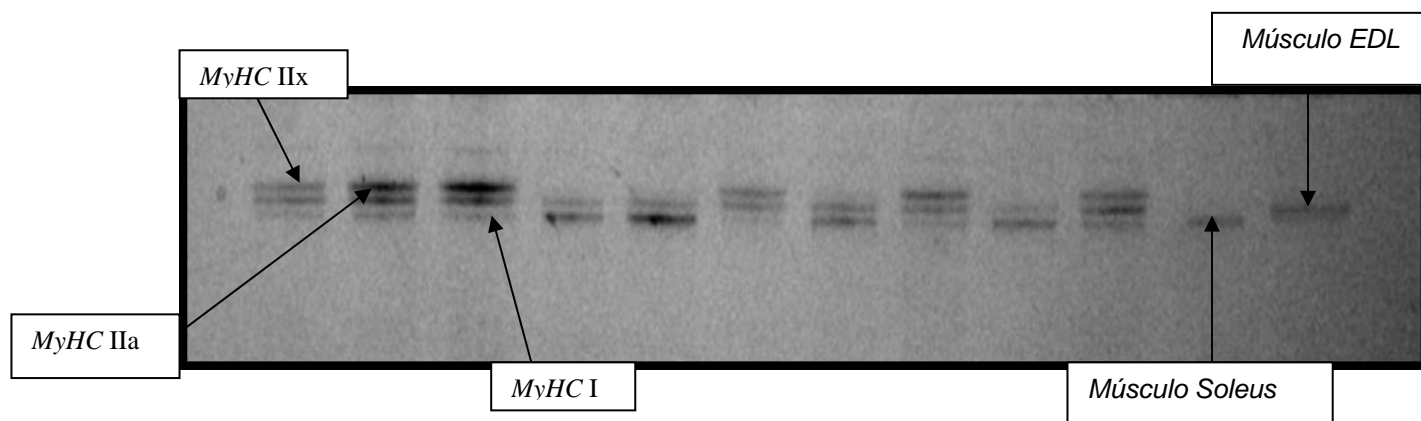
Médias seguidas de letras minúsculas na mesma coluna diferem entre si pelo *Teste de Tukey* ( $P < 0,05$ ), A < B < C.



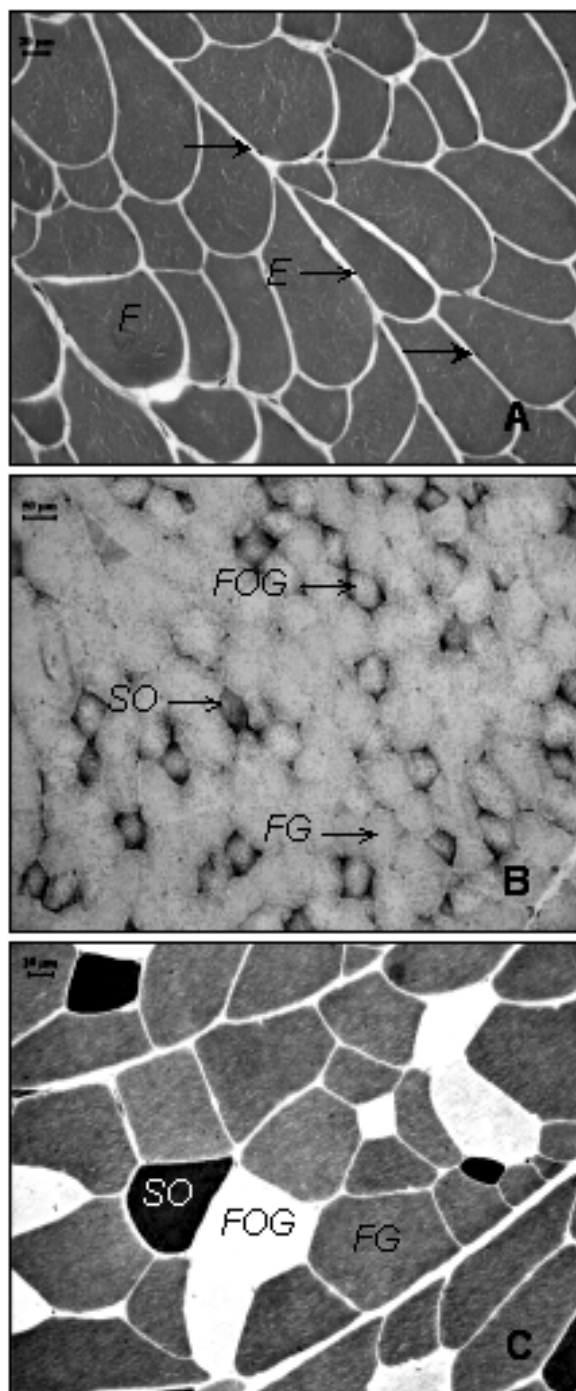
**Figura 1.** Foto do gel de *SDS-PAGE* a 9% de amostras do músculo *Semitendinosus* colhidas no abate onde são observadas as isoformas de *MyHC* do tipo II (com predominância para o tipo II a) e a isoforma do tipo I.



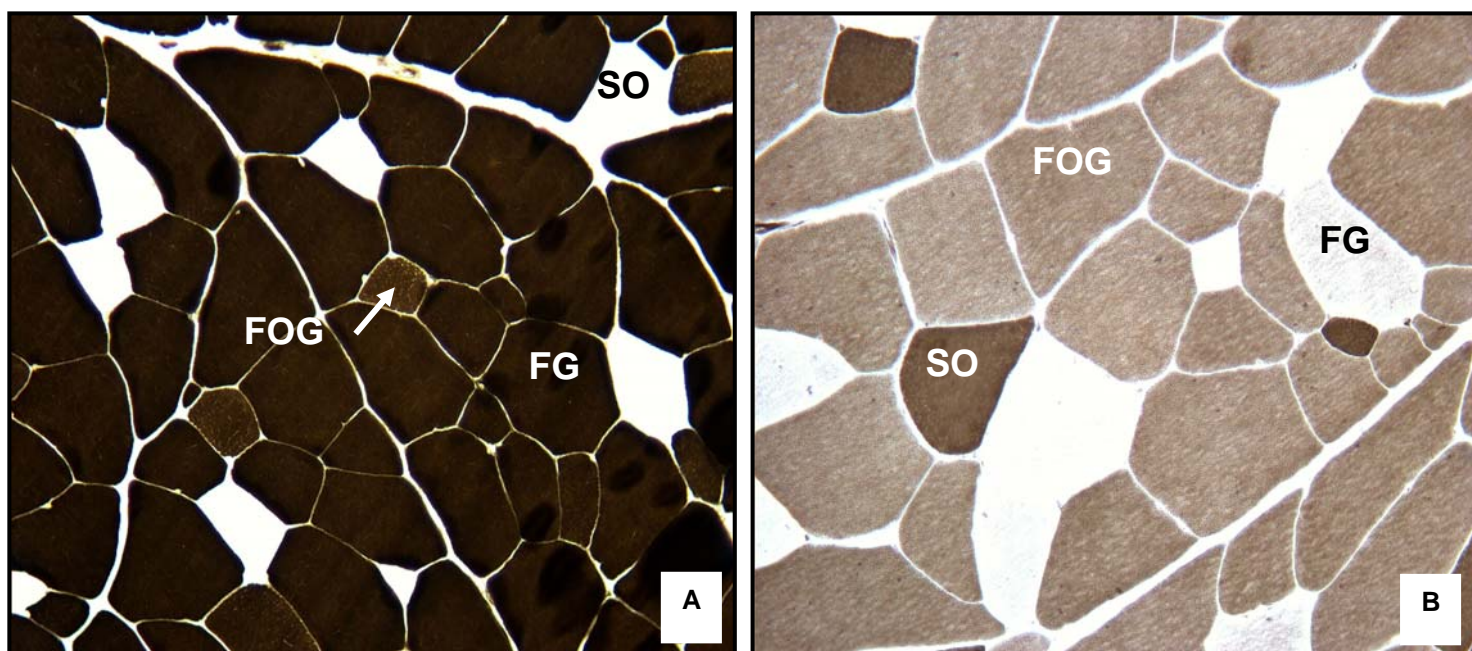
**Figura 2.** Foto do gel de *SDS-PAGE* a 9% de amostras do músculo *Semitendinosus* colhidas na biópsia onde são observadas as isoformas de *MyHC* do tipo II (com predominância para o tipo II a) e a isoforma do tipo I.



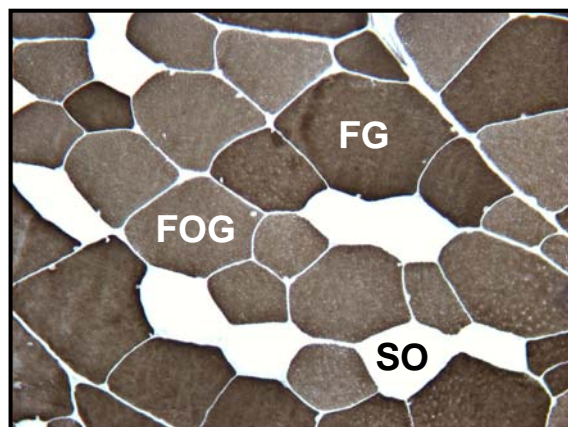
**Figura 3.** Foto do gel de *SDS-PAGE* a 9% de amostras do músculo *Longissimus dorsi* colhidas no abate onde são observadas as isoformas de *MyHC* do tipo II a, II x e a isoforma do tipo I.



**Figura 4:** Corte transversal do músculo *Semitendinosus* no início do experimento (biopsia). **A:** HE. Fibras musculares (F). Núcleos das fibras (setas). Endomísio (E). Fibras SO, FOG e FG. **B:** NADH-TR. **C:** mATPase ácida, pH 4.6.



**Figura 5:** Amostras do músculo *Semitendinosus* de animais *Bos indicus* da raça Nelore. **(A)** Amostra colhida na biópsia; *mATPase* alcalina (pH 10.4). **(B)** Amostra colhida no abate; *mATPase* ácida (pH 4.6). Fibras SO (oxidativas), FOG (oxidativas e glicolíticas) e FG (glicolíticas).



**Figura 6:** Amostra do músculo *Longissimus dorsi* de animais *Bos indicus* da raça Nelore colhida no abate; *mATPase* alcalina (pH 10.4). Fibras SO (oxidativas), FOG (oxidativas e glicolíticas) e FG (glicolíticas).

## CARACTERIZAÇÃO DOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES E ISOFORMAS DA CADEIA PESADA DE MIOSINA (*MyHC*) E A QUALIDADE DE CARNE DE BOVINOS NELORE (*Bos indicus*)

### Resumo

O presente trabalho teve como objetivo determinar as características de qualidade de carne nos músculos *Semitendinosus* (ST) e *Longissimus dorsi* (LD) e identificar possíveis relações entre estas características com os tipos de fibras musculares e isoformas da *MyHC*. Foram utilizados 20 bovinos inteiros da raça Nelore submetidos ao modelo biológico superprecoce em um delineamento inteiramente casualizado. Como características de qualidade foi realizado o Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI) no músculo ST e Força de Cisalhamento (FC) e MFI no músculo LD. Também foi determinada a porcentagem de lipídios, área de olho-de-lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea (EGS), índice de marmorização e perdas no cozimento. As medidas da FC confirmam os resultados obtidos pelo MFI, onde com elevados valores de MFI observou-se baixos valores de FC ( $r_p = -0,39$ ). Os valores da FC aumentam na medida em que a área e diâmetro das fibras glicolíticas (FG) aumentam ( $r_p = 0,67$ ;  $r_p = 0,82$ ;  $P < 0,05$ ). Com o aumento das fibras glicolíticas, teve-se diminuição nos valores de MFI e aumento nos valores da força de cisalhamento. Assim as fibras oxidativas (SO e FOG) parecem estar mais relacionadas com a qualidade da carne de animais *Bos indicus* do que as fibras glicolíticas. No músculo LD observou-se que quanto maior a AOL, maior a *MyHC* do tipo I (fibras do tipo SO) ao abate ( $r_p = 0,62$ ;  $P < 0,05$ ).

**Palavras chave:** fibras musculares, isoformas de miosina, qualidade de carne.

## CHARACTERIZATION OF MUSCLES FIBERS AND MYOSIN HEAVY CHAIN (*MyHC*) AND THE MEAT QUALITY OF NELLORE BULLS (*BOS INDICUS*)

### Abstract

The objective of this work was to evaluate the characteristics of meat quality in *Semitendinosus* (ST) and *Longissimus dorsi* (LD) muscles in Brazilian Yearly Cattle System – Superprecoce and identify possible relations between these characteristics with muscle fiber type and myosin heavy chain isoforms (*MyHC*) isoforms. Twenty young intact male *Bos indicus* (Nelore) were used in a completely randomized design. In ST and LD muscles the meat quality was identified by the miofibrillar fragmentation index (MFI). Additional LD muscle was submitted to Shear Force values. Lipid percentage, eye rib area, subcutaneous fat thickness, and cooking loss. The highest MFI results confirm the lowest shear force values ( $r_p = -0,39$ ). The shear force values increased with highest area and diameter values of glycolytic fibers ( $r_p = 0,67$ ;  $r_p = 0,82$ ;  $P < 0,05$ ). With the FG increase were observed smallest MFI values and highest shear force values. The oxidative fibers (SO and FOG) suggest more relation with meat quality of *Bos indicus* animals than glycolytic fibers. In LD muscle was observed that highest AOL values showed more *MyHC* of type I in slaughter ( $r_p = 0,62$ ;  $P < 0,05$ ).

**Key words:** muscle fibers, myosin isoforms, meat quality.

## **Introdução**

O aumento expressivo no volume de carne produzida combinada com o compromisso de atingir o mercado consumidor num curto período de tempo modificou marcadamente a tecnologia empregada no gerenciamento da qualidade e quantidade do produto industrializado. Estabelecer o entendimento do que é qualidade da carne bovina e a consistência na obtenção dessa qualidade tem sido um componente comum aos sistemas internacionais de produção de carne bovina por décadas (MILLER, 2001).

A variação de qualidade de carne bovina também se deve a pouca padronização dos sistemas de produção, da genética do rebanho bovino, bem como a dificuldade em identificar as carcaças que produzem maior quantidade de carne e de melhor qualidade, principalmente em relação a maciez.

Dessa maneira a identificação de bovinos que tenham propensão genética para produzir carne de qualidade é de extrema importância para a indústria da carne. As características da carcaça, bem como os fatores que determinam a qualidade da carne, são influenciados, entre outros, por parâmetros genéticos, maturidade do animal e dieta fornecida.

Consumidores consideram a maciez como o fator mais importante quanto à qualidade da carne. Este fato é confirmado pela relação existente entre o preço do corte e a maciez que o mesmo apresenta (KOOHMARAIE *et al.*, 2002).

A inconsistência na maciez da carne consumida tem sido identificada como o maior problema da indústria da carne. A produção de carne com qualidade, a qual os consumidores desejam é um dos maiores problemas da

indústria da carne, porque o processo de maciez da carne durante o *postmortem* é altamente variável entre carcaças (THOMPSON *et al.*, 2002).

Com o conhecimento dos mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de amaciamento da carne, potenciais marcadores de qualidade poderiam ser utilizados e testados para prever possíveis variações na qualidade da carne (CASSERLY *et al.*, 2000).

Neste sentido, é importante ressaltar os métodos de medição da maciez da carne. Um dos métodos mais empregados, e que tem alta correlação com a satisfação de painelistas sensoriais e consumidores (DELGADO, 2001), denomina-se força de cisalhamento ou *WBSF* (Warner-Bratzler Shear force). Este método associado a classificação de carcaças apresenta alto potencial para prever a maciez do contrafilé (KOOHMARAIE *et al.*, 1998).

O fenômeno da quebra das miofibrilas em segmentos menores na linha Z ou próximos a ela durante o *postmortem* do músculo é determinado como fragmentação miofibrilar (OLSON *et al.*, 1976).

O Índice de fragmentação miofibrilar (MFI) é também bastante utilizado, pois prediz mais de 50% da variação da maciez da carne (HOPKINS *et al.*, 2000), além de ser altamente correlacionado com índices de maciez como “*Warner-Bratzler Shear Force*”, já que com o aumento do MFI têm-se diminuição dos valores obtidos pelo shear force e “painel sensorial” (OLSON *et al.*, 1976).

Para músculos que não são grandes o suficiente para se determinar valores da força de cisalhamento ou análise sensorial, este índice torna-se

bastante utilizado como indicador de maciez da carne (VEISETH *et al.*, 2001). Segundo CULLER *et al.* (1978), valores do índice de fragmentação de 60 ou acima de 60 para o músculo *Longissimus dorsi* denota-se uma carne muito macia, valores de 50 uma carne macia e valores abaixo de 50 uma carne pouco macia.

Considerando que o gado zebu (*Bos indicus*) compõe a base do rebanho de corte brasileiro, e não poderia ser diferente devido a sua adaptação as condições do Brasil Central (RUBENSAM & MONTEIRO, 2000) é importante identificar os mecanismos que estão por trás da definição da maciez da carne destes bovinos para que haja possibilidade de intervenção no processo de amaciamento e produção de carne com qualidade desejada.

Inúmeros trabalhos realizados estabeleceram a existência de associação negativa entre *Bos indicus* e maciez da carne. Carnes provenientes de áreas com alta proporção de *Bos indicus* apresentam maiores valores de força de cisalhamento (e maior variação nesses valores) do que carnes com menor proporção de *Bos indicus* (MILLER, 2001).

Há uma grande variação individual na qualidade da carne entre animais da mesma raça, sexo e ambiente natural que ainda não é bem explicada. Essa variação parece ser causada por fatores genéticos e ambientais. A composição do tipo de fibra e a área da fibra de músculos específicos são importantes fatores que exercem influências nos processos bioquímicos e conseqüentemente na carne (KLONT *et al.*, 1998).

Desta maneira o objetivo deste trabalho é caracterizar os tipos de fibras musculares e isoformas da cadeia pesada de miosina (*MyHC*) e relacionar essas características com a qualidade de carne de bovinos Nelore (*Bos indicus*).

## **Material e Métodos**

### **LOCAL E ANIMAIS UTILIZADOS**

O experimento zootécnico de campo foi conduzido no Setor de Confinamento de Gado de Corte do Departamento de Melhoramento Genético e Nutrição Animal da FMVZ - Unesp - Botucatu, SP.

Foram utilizados 20 bovinos inteiros *Bos indicus* da raça Nelore. Os animais foram desmamados aos sete meses de idade em sistema *creep feeding* e confinados por 168 dias até atingirem o peso de abate e terminação de carcaça estabelecidos pelo modelo biológico superprecoce.

### **COLHEITA DE AMOSTRAS**

Assim que os animais atingiram o peso de abate estabelecido pelo sistema superprecoce - aproximadamente 450 Kg com 14 meses de idade - os mesmos foram abatidos em frigorífico comercial (*Marfrig* - Promissão, SP).

Após o transporte dos animais até o frigorífico, os mesmos permaneceram em jejum de sólidos 16 horas antes do abate. Após o abate com estimulação elétrica as carcaças permaneceram em câmara fria (-1°C) por 48 horas e em seguida foram desossadas. Na desossa foram colhidas amostras do músculo *Longissimus dorsi* na região entre a 11<sup>a</sup> e a 13<sup>a</sup> costelas

das meias-carcaças esquerdas de cada animal para a maturação das amostras, análise do índice de fragmentação miofibrilar e análises das características de qualidade da carne (lipídios totais, área de olho-de-lombo, espessura de gordura subcutânea e índice de marmorização). Ainda no frigorífico foram embaladas a vácuo e identificadas as amostras destinadas à maturação por sete dias. Nesta fase do trabalho foi testado o período de maturação das amostras de carne do músculo *Longissimus dorsi* com possíveis reflexos na qualidade final do produto.

### **ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO MÚSCULO *Longissimus dorsi***

Para a análise morfométrica do músculo *Longissimus dorsi*, as amostras foram descongeladas por 24 horas, sob refrigeração de 2 à 5°C. A área de olho-de-lombo (AOL) do músculo *Longissimus dorsi* foi determinada pelo método do quadrante de pontos, segundo metodologia descrita pelo *USDA Quality Grade* (1989). O índice de marmorização foi determinado por análise do escore visual subjetivo, segundo metodologia do *USDA Quality Grade* (1989). As medidas de espessura de gordura subcutânea (EGS) foram realizadas com paquímetro com medidas em centímetros.

### **ANÁLISE QUÍMICA DAS AMOSTRAS**

As análises químicas das amostras foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto

de Biociências, Botucatu, SP. A determinação das perdas por evaporação, gotejamento e totais foram realizadas quando as amostras foram assadas para a determinação da força de cisalhamento.

## **LIPÍDIOS**

A porcentagem de lipídios totais foi realizada utilizando-se o protocolo proposto por (BLIGH & DYER, 1959) onde foram pesados entre 3,0 a 3,5 g de amostra crua moída de carne. As amostras pesadas foram transferidas para erlenmeyer de 250 mL onde adicionou-se 10 mL de clorofôrmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. Os tubos foram colocados em agitador horizontal por 30 minutos. Em seguida adicionou-se aos tubos, 10 mL de clorofôrmio e 10 mL de solução aquosa de sulfato de sódio 1,5 %, sendo então agitados vigorosamente por dois minutos. Os tubos foram então centrifugados a 1000 X g por dois minutos. Descartou-se a camada sobrenadante e filtrou-se rapidamente a inferior (para evitar evaporação do clorofôrmio) em tubo de 30 mL. A solução foi filtrada novamente e mediu-se 5 mL do filtrado que foi transferido para um becker de 50mL previamente dessecado e pesado. O becker foi colocado em estufa a 110°C até evaporar o solvente (15 a 20 minutos), posteriormente resfriado em dessecador (O/N) e pesado. As diferenças de peso do becker, acrescidos ao peso da amostra, em relação ao peso final do becker ao final do procedimento, determinaram as quantidades percentuais de lipídeos na amostra. Os resultados obtidos representam os

valores quantitativos, das características observadas de marmorização da carne.

### **ANÁLISE DE FORÇA DE CISALHAMENTO DO MÚSCULO *Longissimus dorsi***

As análises de força de cisalhamento das amostras foram executadas no Laboratório de Qualidade de Carnes do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP.

No presente ensaio foram avaliadas duas diferentes metodologias de tratamento das amostras. As amostras de carne foram colhidas com 48hs de resfriamento pós-abate sendo que a metade das mesmas foi posteriormente congelada (-20°C) e a outra submetida à maturação por sete dias (-1°C). O objetivo desta avaliação foi verificar quantos dias são necessários para o fim do *rigor mortis*, pois sabe-se que este período pode variar tanto entre diferentes genótipos quanto entre indivíduos do mesmo genótipo (CASSERLY *et al.*, 2000).

Em conjunto aos testes da força de cisalhamento para a verificação da maciez destes períodos de maturação foram realizadas as análises do índice de fragmentação miofibrilar (MFI), uma vez que esta metodologia de análise apresenta alta correlação com os dados obtidos na força de cisalhamento (CULLER *et al.*, 1978).

As amostras utilizadas para a análise da força de cisalhamento foram descongeladas por 24 horas em temperatura de 2 à 5°C. Para a análise de

força de cisalhamento foram utilizadas amostras com aproximadamente 2,54 cm de espessura obtidas entre a 11<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas das meias carcaças esquerda dos animais. Foi adotado o procedimento padronizado e proposto por (WHEELER *et al.*, 1995). Após o devido período de maturação as amostras foram assadas em forno elétrico (200°C) até atingirem temperatura interna de 71°C. Após este processo as amostras permaneceram refrigeradas por 24 horas até atingirem temperatura interna de 5°C, quando então iniciou-se a determinação da força de cisalhamento. Foram retirados oito cilindros de cada amostra para a determinação da força de cisalhamento a fim de se obter maior precisão nos dados. Foi utilizado um *Warmer-Bratzler Shear Force* mecânico com capacidade de 25kg e velocidade do seccionador de 20 cm/minuto.

## **PERDAS NO COZIMENTO**

As perdas por evaporação, gotejamento e totais foram obtidas pela pesagem das bandejas de cozimento, com e sem as amostras. As pesagens foram feitas antes e após o cozimento das amostras e a relação percentual de perda de peso das bandejas com as amostras tomou-se como perdas por evaporação. O acréscimo de peso das bandejas após o cozimento e sem as amostras, representou as perdas por gotejamento que, acrescidas às perdas por evaporação resultaram, nas perdas totais de cozimento.

## **DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE FRAGMENTAÇÃO MIOFIBRILAR (MFI) NO MÚSCULO *Longissimus dorsi* e *Semitendinosus***

As análises de MFI foram realizadas no Laboratório de Bioquímica de Proteínas do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências, Botucatu, SP.

Após alguns testes, pôde-se observar que não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) quanto ao uso de carne fresca ou congelada o que também foi relatado por VEISETH *et al.* (2001). Devido aos resultados dos testes e a confirmação na literatura optou-se pela utilização de amostras congeladas para a determinação do MFI na realização das análises propostas no presente projeto.

Para a determinação do MFI foram utilizadas amostras do músculo *Longissimus dorsi* maturadas por sete dias e amostras do músculo *Semitendinosus* segundo metodologia descrita por CULLER *et al.* (1978).

Foram utilizados 3g de amostra congelada livre de gordura e de tecido conectivo. As amostras foram homogeneizadas em *Ultra-turrax* com haste de cisalhamento (Marconi - MA 102/E) à 18000 rpm em 30mL de Tampão de Índice de Fragmentação Miofibrilar (TMFI) em banho de gelo (100mM KCl, 20mM de fosfato de potássio pH7.0, 1mM  $MgCl_2$  e 1mM  $NaN_3$ , em pH7.0) por duas vezes de 30 segundos com mesmo intervalo em gelo. Após a homogeneização as amostras foram centrifugadas a 1000Xg por 17 minutos a 2° C quando então foi descartado o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspenso em 30mL de TMFI a 2° C utilizando-se um bastão de vidro.

Após a ressuspensão, as amostras foram novamente centrifugadas à 1000Xg por 17 minutos a 2° C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi

ressuspendido em 7,5 mL de TMFI à 2° C e vortexado até a amostra tornar-se bastante homogênea. A amostra foi filtrada em peneira doméstica e novamente adicionou-se 7,5mL de TIFM a 2° C para a lavagem do tubo de ressuspensão.

Após a extração das proteínas miofibrilares com o TMFI, foi realizada a quantificação de proteínas totais pelo método do Macro Biureto (GORNAL *et al.*, 1949). Em cada tubo de ensaio foram colocados 0,25 mL de amostra, 0,75 mL de TMFI e 4 mL do reagente de Biureto. Após este preparo das amostras as mesmas permaneceram por 30 minutos no escuro para posterior leitura no espectrofotômetro com absorbância em comprimento de onda de 540 nm.

Para a determinação do MFI obteve-se uma solução com um volume de 8mL e concentração de proteína de 0,5mg/mL (obtidas com o TMFI). Estas amostras foram homogeneizadas por agitação vigorosa e rapidamente foi realizada a leitura da absorbância em comprimento de onda de 540nm. O aparelho foi zerado com o TMFI. O cálculo do MFI foi realizado da seguinte maneira:

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

Algumas mudanças foram realizadas no procedimento, porém os resultados estão de acordo com os demais observados na literatura.

### **Caracterização Morfológica das Fibras Musculares do Músculo *Semitendinosus* e do Músculo *Longissimus dorsi*.**

Para o estudo do perfil morfométrico do tecido muscular esquelético foram realizadas duas colheitas do músculo *Semitendinosus*, uma no início do período de confinamento (biópsia) segundo técnica descrita por DUBOWITZ E

BROOKE (1984) e outra no abate dos animais por necropsia. No músculo *Longissimus dorsi* foi realizada apenas uma coleta no abate.

Foram colhidas aproximadamente 3,0g de tecido muscular na biopsia e 10,0g no abate. Após a colheita das amostras de músculo as mesmas foram mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos quando foi retirado um fragmento de aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup>. Estes fragmentos foram envoltos em talco e imersos em nitrogênio líquido por um minuto e acondicionados em tubos plásticos para armazenamento em *freezer* -80°C.

As análises de caracterização morfológica das fibras musculares foram realizadas no *Laboratório do Depto. de Morfologia IB - Unesp, Botucatu, SP*. As amostras foram retiradas do *freezer* -80°C e transferidas para o micrótomo criostato a -20°C (*Keichert Jung, mod. CM 1800, Leica*), onde várias séries de cortes histológicos com 10µm foram obtidas e fixadas em lâmina. Para a realização dos cortes os fragmentos musculares foram dispostos perpendicularmente em suportes metálicos do próprio micrótomo criostato utilizando-se o adesivo líquido OCT *Tissue TEK (Optimal Critical temperature Compound, Miles)*. Em seguida as séries de cortes foram submetidas a técnica histoquímica para verificação da atividade contrátil da *ATPase*, com pré incubação ácida em pH 4,6 (BROOKE & KAISER, 1970), para a diferenciação dos tipos de fibras musculares. Para a nomenclatura dos tipos de fibras foi utilizada a classificação adotada por PETER *et al.* (1972) com a identificação de três tipos de fibras musculares: SO (oxidativa e de contração lenta), FOG (oxidativas-glicolíticas e de contração rápida) e FG (glicolíticas e de contração rápida). Para os cálculos das áreas e dos diâmetros das fibras foram obtidos

aproximadamente dez campos em cada lâmina, totalizando entre 700 e 900 fibras analisadas por animal. Para a leitura dos campos foi utilizado microscópio óptico (*Olympus*, ocular 12,5X e objetiva 20X) acoplado ao analisador de imagens de microscopia óptica *Leica* e computador com programa de análise de imagens (*Image-Pro Plus 4.5.0.27*).

### **Separação Eletroforética da Cadeia Pesada de Miosina – MyHC**

Para a determinação das isoformas da *MyHC* foram utilizadas as técnicas tradicionais de eletroforese em *SDS-PAGE*, em condição redutora combinada com reações denaturantes em gel de poliacrilamida vertical descrita por LAEMMLI (1970) e utilizando-se o procedimento proposto por PICARD *et al.* (1995). Para tanto foram utilizados 200mg de músculo congelado (*Semitendinosus* (biopsia e abate) e *Longissimus dorsi*). Algumas alterações foram realizadas no protocolo após testes no Laboratório do Departamento de Morfologia para a melhor obtenção dos resultados.

#### **- Processamento das amostras**

Foram obtidos de cinco a oito cortes do músculo (12 µm de espessura) em micrótomo criostato. Os cortes foram homogeneizados em 450 µL de Tampão de Lise (solução zero). Em seguida o homogeneizado foi colocado em banho-maria a 60°C durante 10 minutos, após a retirada do banho, foram acrescentadas quatro gotas de glicerol. Após a homogeneização do glicerol as amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas

em freezer -20°C. A preparação das placas de vidro foi feita após as mesmas serem limpas com lenço de papel e álcool 100% (deixar o álcool evaporar). Foi marcado com caneta permanente em uma das placas a altura de 10,8 cm, e as mesmas foram montadas com separadores. O cuidado para nivelar corretamente o sistema foi levado em consideração.

*- Preparo do Gel de Separação 9% (suficiente para 1 placa de corrida)*

Foi utilizada uma proveta de 25 mL, onde foram adicionados e homogeneizados até a dissolução 10,5 mL de glicerol, 7 mL da solução de acrilamida/bisacrilamida (30.8) e 6 mL da solução-tampão Tris-HCl 1.5M (pH 8.8). Em seguida a solução foi transferida para um kitassato de 100 mL tampado com rolha de borracha e inserido em isopor com gelo e levado à bomba à vácuo para desgaseificar durante 10 minutos. A solução foi transferida com cuidado para um béquer de 50 mL, onde foram acrescentados 24 µL de SDS 10%, 24 µL de APS 10% (homogeneizados gentilmente) e 15 µL do catalisador da reação Temed (misturados com a ponteira). O gel foi despejado com muito cuidado dentro da placa, até atingir a marca feita com caneta permanente. O gel foi mantido com a solução para cobrir o gel e permaneceu por uma hora para polimerizar.

*- Preparo do Gel de Empacotamento 4%*

Foi utilizada uma proveta de 25 mL, onde foram acrescentados e homogeneizados 3,75 mL de glicerol, 1,95 mL da solução de acrilamida/bisacrilamida (30.8), 5,20 mL de água deionizada e 3,75 mL de

tampão Tris-HCl 0.5M (pH 6.8). A solução foi transferida para um kitassato de 100 mL fechado com rolha de borracha que foi colocado em isopor com gelo e levado à bomba à vácuo para desgaseificar por 10 minutos. A solução foi transferida com cuidado para um béquer de 50 mL, onde foram acrescentados 24 µL da solução de SDS 10%, 24 µL da solução de APS 10% e 15 µL de Temed. O gel de empacotamento foi despejado por cima do gel de separação com cuidado, até faltar 0.5 cm para cobrir toda a placa. O pente foi colocado com cuidado para não formar bolhas no gel. Esperou-se uma hora para a polimerização do gel.

*- Lavagem dos pocinhos*

O pente foi retirado com cuidado e os pocinhos preenchidos com a solução de azul de bromofenol. A limpeza dos pocinhos foi feita com a ajuda de uma agulha e uma seringa por pelo menos três vezes, sempre preenchendo com a solução de azul de bromofenol. A aplicação das amostras nos pocinhos foi feita sempre anotando a ordem de cada amostra. As amostras foram descongeladas e mantidas em isopor com gelo. O sistema foi montado e colocado o agitador magnético, onde foi acrescentado o tampão de corrida inferior e o tampão de corrida superior (acrescido de 546 µL de 2-β-mercaptoethanol). O sistema foi fechado e levado à geladeira (4°C), neste momento foram ligados o agitador magnético e a fonte e os parâmetros foram anotados. A corrida foi de 3 horas a 100 V e mudou-se a voltagem para 230 V por mais 18 horas (total de horas corridas: 21 horas).

#### - *Fixação e Coloração do Gel*

O gel foi retirado da placa com cuidado e o gel de empacotamento foi cortado e descartado. Foi utilizada a Solução para Fixar o Gel por 10 minutos e a Solução para Corar o Gel (*Coomassie Blue*) por 30 minutos e a Solução para Descorar o Gel por 15 minutos. O gel foi lavado em água destilada (4x) e estocado nesta mesma água e protegido da luz.

A captação das imagens das bandas foi realizada no equipamento de foto-documentação VDS (*Pharmacia Biotech*). Os géis foram analisados utilizando o programa para análise de imagens *Image Master 3D Prime & Elite*.

#### – *Gel Pro Analyser*.

Para análise dos dados, os géis foram digitalizados empregando-se o Sistema de Foto-documentação e análise *Image Master VDS (Pharmacia – Biotech)* e também utilizou-se de *Software Image Master*, sendo as imagens editadas pelo *Software Adobe Photopoint 5.0*. Na eletroforese, foram analisadas as mobilidades relativas de acordo com os músculos utilizados como padrão.

A identificação das isoformas de *MyHC* foi realizada pelo perfil eletroforético das respectivas bandas nos géis que foram analisados no equipamento de foto-documentação VDS (*Pharmacia - Biotech*) e no Software analisador de imagens *Image Master 1D Prime & Elite*, sendo as imagens editadas pelo *Software Adobe Photopoint 5.0*.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional *Statistical Analysis System (SAS, 1996)* e os dados foram

submetidos à análise de variância através do procedimento GLM. Para estabelecimento das correlações entre as características de qualidade de carne e fibras musculares, utilizou-se o procedimento CORR (SAS, 1996).

## **Resultados e Discussão**

Em relação aos valores da força de cisalhamento, os dados obtidos estão dentro dos padrões de animais superprecoces com peso vivo médio acima de 450 kg, cobertura de gordura subcutânea média na região da 12ª e 13ª costelas de 4 mm e idade média de 15 meses (Morales *et al.*, 2005).

No presente ensaio foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na maciez da carne, medida pela força de cisalhamento, nas amostras resfriadas por 48 horas e maturadas por sete dias (Tabela 1). Da mesma forma MORALES *et al.* (2005), em estudo com animais da raça Nelore superprecoces também observou diferenças na maciez de amostras do músculo *Longissimus dorsi* resfriadas por 24 horas *postmortem* e maturadas por sete dias. Este fato pode ser explicado pelo fato de algumas das carcaças avaliadas com 24 horas *postmortem* ainda estarem em processo de *rigor mortis*, caracterizando uma menor maciez evidenciada por maiores índices de força de cisalhamento.

Estudos anteriores (Morales *et al.*, 2005) demonstraram também que animais criados neste sistema de produção não apresentam diferenças na maciez da carne maturada por sete e 14 dias, havendo apenas diferenças para carnes armazenadas sob refrigeração por mais de 20 dias. De acordo com BIDNER *et al.* (2002), somente animais com 25% ou menos de genótipo Brahman apresentam maciez satisfatória, no entanto no presente estudo pôde-

se observar que animais que da raça Nelore apresentaram valores de força de cisalhamento satisfatórios quanto a maciez da carne.

Entretanto vale ressaltar que segundo KOOHMARAIE *et al.* (2002), nenhuma das mudanças no *postmortem* ocorrem uniformemente entre os animais e assumir que as mesmas ocorrem desta forma pode levar a superestimação da dinâmica natural das mudanças no *postmortem*. Para ilustrar este ponto, o mesmo autor exemplifica valores de força de cisalhamento de um mesmo estudo que variaram de cinco a 13Kg. Desta maneira fica clara a importância de se evitar generalizações para que os dados não levem a conclusões errôneas.

Um dos fatores que tem sido correlacionado em diversos estudos com a força de cisalhamento e a maciez desejada pelos consumidores é o Índice de Fragmentação Miofibrilar (MFI), como relatado por CULLER *et al.* (1978). Os dados obtidos neste trabalho (Tabela 1) estão de acordo com a literatura na qual uma carne macia tem valores do índice de MFI acima de 60 (CULLER *et al.*, 1978; OLSON *et al.*, 1976). As medidas da força de cisalhamento confirmam os resultados obtidos pelo MFI no presente ensaio (Tabela 1). De acordo com DELGADO *et al.* (2001) e OLSON *et al.* (1976) juntamente aos altos valores de MFI observaram-se baixos valores de força de cisalhamento.

A força de cisalhamento e o MFI apresentaram correlação negativa ( $r_p = -0,39$ ), o que era esperado, entretanto não foi significativa ( $P > 0,05$ ), uma vez que alguns valores da força de cisalhamento podem não ter sido ocasionados pela baixa fragmentação miofibrilar, mas sim pelo fato das carcaças estarem

ainda em processo de *rigor mortis*. Cabe ressaltar que quando foi analisado a força de cisalhamento em amostras maturadas por sete dias esta correlação entre as duas variáveis tornou-se maior ( $r_p = -0,57$ ) e significativa ( $P < 0,05$ ), pois houve tempo necessário para o estabelecimento do *rigor mortis*.

Recentes estudos (LAMETSCH *et al.*, 2007), também identificaram correlações entre o MFI e a força de cisalhamento, no entanto o coeficiente de correlação encontrado foi baixo ( $r_p = -0,33$  e  $r_p = -0,40$ ), o que também se deve provavelmente as baixas variações nos valores da força de cisalhamento.

Os dados evidenciam que as análises de maciez da carne de animais da raça Nelore (*Bos indicus*) apresentam valores mais confiáveis com sete dias de maturação, e que o MFI é um índice mais confiável, pois determina a degradação miofibrilar em laboratório, com todos os passos controlados, o que nem sempre ocorre com a força de cisalhamento com tanta precisão.

Quanto as correlações entre a força de cisalhamento entre 48 horas de resfriamento e sete dias de maturação também pode-se observar correlação significativa ( $r_p = 0,69$ ;  $P < 0,05$ ), o que era esperado.

Com relação aos dados da força de cisalhamento de amostras maturadas por sete dias e sua relação com a área e diâmetro das fibras musculares do músculo *Longissimus dorsi* (Figura 4), pôde-se observar que os valores da força de cisalhamento aumentam na medida em que a área e diâmetro das fibras glicolíticas (FG) aumentam, com correlações significativas ( $r_p = 0,67$ ;  $r_p = 0,82$ ;  $P < 0,05$ ), para área e diâmetro da fibra, respectivamente.

Supostamente animais com maior hipertrofia das fibras glicolíticas, apresentam uma carne menos macia, devido ao fato de que animais com maior

proporção de fibras glicolíticas tem maior atividade da *ATPase* logo após o abate, porém também são mais rapidamente inativadas pela queda do pH (BOWKER *et al.*, 2004). O mesmo fato pode ser observado com os dados das correlações entre os valores de MFI analisados em amostras maturadas por sete dias ( $r_p = -0,75$ ;  $P < 0,05$ ), quando utilizou-se a degradação miofibrilar como parâmetro de proteólise e maciez da carne. Com o aumento das fibras glicolíticas, teve-se diminuição nos valores de MFI e aumento nos valores da força de cisalhamento.

Com os dados obtidos, as fibras oxidativas (SO e FOG) parecem estar mais relacionadas com a qualidade da carne de animais *Bos indicus* do que as fibras glicolíticas (Figura 4). Cabe ressaltar que o diâmetro das fibras foi um bom indicativo do tamanho das fibras, pois apresentou maior correlação em relação a área.

No músculo *Longissimus dorsi*, também foi feita a correlação da medida da área de olho-de-lombo (AOL) com a isoforma da *MyHC* do tipo I (Figura 2) analisada no abate, e foi observado que quanto maior a AOL, maior a *MyHC* do tipo I ( $r_p = 0,62$ ;  $P < 0,05$ ), ou seja os animais que produziram mais carne, foram os que apresentaram maior quantidade da *MyHC* do tipo I (fibras do tipo SO).

Quanto aos dados ainda de qualidade da carne no mesmo músculo pôde-se observar que quanto maior a espessura de gordura subcutânea (EGS), maior foram as perdas totais ( $r_p = 0,56$ ;  $P < 0,05$ ), com 48 horas de resfriamento, sendo que a perda por evaporação teve maior influência que as perdas por gotejamento. Sendo assim, a EGS não foi um bom indicativo de

proteção da qualidade da carne no cozimento. Nos animais estudados, a EGS não apresentou correlação com a marmorização por escore visual e lipídeos.

Ainda com relação as perdas, foi feita a correlação com a força de cisalhamento das amostras maturadas por sete dias ( $r_p = 0,42$ ;  $P < 0,05$ ), e foi observado que a medida que ocorre a maturação, a relação da força de cisalhamento com as perdas também aumenta.

As medidas da AOL, EGS, marmorização e lipídios estão de acordo com trabalhos anteriores (MORALES *et al.*, 2005) e mostra que estes animais apresentam cobertura de gordura satisfatória para evitar o “cold shortening”. Os dados obtidos (Tabela 2) estão dentro do padrão esperado para animais criados no sistema superprecoce de produção.

Os dados obtidos em relação as perdas por evaporação, gotejamento e totais (Tabela 3) também estão dentro do padrão do superprecoce e de acordo com os dados obtidos por CHARDULO (1998).

Em relação ao músculo *Semitendinosus*, foi realizado o MFI como indicador de maciez, por ser o método mais indicado para este músculo.

Analisando amostras do *Semitendinosus* colhidas na biopsia (Figura 3 A), pôde-se observar o mesmo que no músculo *Longissimus dorsi*, ou seja o diâmetro das fibras FG apresentou correlação negativa ( $r_p = -0,68$ ;  $P < 0,05$ ) com o MFI, onde também pode-se verificar um suposto decréscimo na qualidade da carne. Em relação aos tipos I e II da *MyHC*, o diâmetro também apresentou correlação negativa ( $r_p = -0,87$ ;  $r_p = -0,67$ ;  $P < 0,05$ ).

Durante o crescimento não foram observadas diferenças (Figura 1) entre os tipos de isoformas da *MyHC* nas características de proteólise,

demonstrando que independente do tipo de fibra a taxa de renovação proteica do músculo não foi influenciada.

## **Conclusões**

1. Com o aumento das fibras glicolíticas foi observado diminuição nos valores de MFI e aumento nos valores da força de cisalhamento, o que denotou perda na qualidade da carne em relação a maciez.
2. O estudo das isoformas da miosina (*MyHC*) pode contribuir para o conhecimento do processo de maciez da carne bovina.

## Referências Bibliográficas

BIDNER, T. D. *et al.* Influence of Brahman-derivative breeds and Angus on carcass traits, physical composition, and palatability. *J. Anim. Sci*, v. 80, p. 2126-2133, 2002.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v. 37, p. 911, 1959.

BOWKER, B. C. *et al.* Influence of myosin heavy chain isoform expression and postmortem metabolism on the ATPase activity of muscle fibers. *Meat Science*, v. 68, p. 587 – 594, 2004.

BROOKE, M. H.; KAISER, K. Muscle fiber type: how many and what kind? *Arch. Neurol.* . , v. 23, p. 369, 1970.

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 Chem.*, v.69, p. 379-385, 2000.

CHARDULO, L. A. *et al.* Efeito da Somatotropina Bovina Recombinante no desempenho e nas características químicas da carne de bovinos. *Pesq. Agropec. Bras*, v. 33, p. 205, 1998.

CULLER R. D. *et al.* Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical, physical and sensory characteristics of bovine *longissimus* muscle. *J. Food Sci.*, v. 43, p. 1177-80, 1978.

DELGADO, E. F. Fatores bioquímicos que afetam a maciez da carne. 1º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia da carne. Campinas: CTC/ITAL, 2001.

DOBOWITZ, V.; BROOKE, M. *Muscle biopsy*. London: Saunders, 1984, 472.

GORNAL, A. G.; BARDAWILL, C. F.; DAVID, M. M. Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, v. 177, p.751, 1949.

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.

JAYASOORIYA, S. D. *et al.* Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine *Semitendinosus* and *Longissimus* muscles. *Meat Science*, v.75, p. 628-639, 2007.

KLONT, R. E.; BROCKS, L.; EIKELENBOOM, G. Muscle fibre type and meat quality. *Meat Science*, v. 49, p. 219-229, 1998.

KOOMARAIE, M. The role of endogenous proteases in meat tenderness. *Proc. Recip. Meat Conf.*, v. 4, p. 89, 1998.

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

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

MILLER, R. K. Obtendo carne de qualidade consistente. 2001. 1º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia da carne. Campinas: CTC/ITAL, 2001.

MORALES, D. C. *et al.* Parâmetros de análise de maciez da carne de bovinos da raça Nelore submetidos ao sistema de produção do novilho superprecoce. In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira De Zootecnia, Goiânia - GO. 2005.

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

PETER, J. B.; BARNARD, R. J.; EDGERTON, V. R. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in Guinea pig and rabbits. *Biochem.*, v. 11, p. 2633-2672, 1972.

PICARD, B. *et al.* Presence of an unidentified myosin isoform in certain bovine foetal muscles. *Meat Science*, v. 41, p. 315, 1995.

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

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

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

USDA.1989. Official United States Standards for Grades of Carcass Beef. Washington, DC: *MAS-USDA*.

VEISETH, E. *et al.* Technical note: comparison of myofibril fragmentation index from fresh and frozen pork and lamb longissimus. *J. Anim. Science*, v. 79, p. 904-06, 2001.

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.

**Tabela 1.** Valores médios da força de cisalhamento e índice de fragmentação miofibrilar medidos com 48 horas e sete dias de maturação (0 a 1°C).

	Variáveis	
	FC	MFI
48 horas	2,74 A	72,38 A
Maturação (sete dias)	2,28 B	98,06 B
Média	2,51	85,22

FC = Força de cisalhamento (kg); MFI = Índice de fragmentação miofibrilar.  
Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo Teste de *Tukey*.

**Tabela 2.** Valores médios das características de qualidade de carne do músculo *Longissimus dorsi*.

Grupo Genético	Parâmetros			
	AOL <sup>1</sup>	EG <sup>2</sup>	MARM <sup>3</sup>	Lipídeos <sup>4</sup>
<b>Nelore</b>	63,0	6,9	2,0	1,62

<sup>1</sup> AOL=Área de olho-de-lombo (cm<sup>2</sup>)

<sup>2</sup> EGS=Espessura de gordura subcutânea (mm)

<sup>3</sup> Marmorização= escore segundo *USDA Quality Grade* (1989). Marmorização (Praticamente ausente = 2,0-2,9; Traços =3,0-3,9; Muito pouco = 4,0-4,9)

<sup>4</sup> Lipídeos=quantidade de lipídeos totais (%)

**Tabela 3.** Valores médios das Perdas por evaporação, gotejamento e totais.

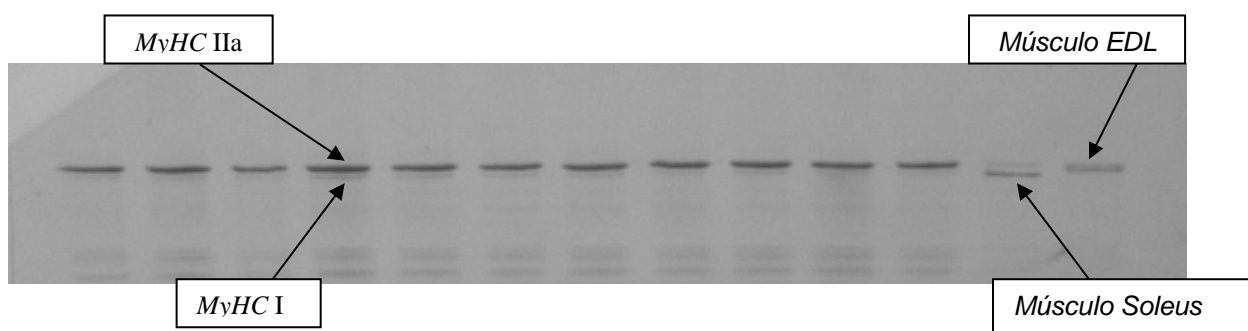
Grupo Genético	Período <i>postmortem</i> <sup>1</sup>	Perdas de peso por cozimento		
		PE <sup>2</sup>	PG <sup>3</sup>	PT <sup>4</sup>
Nelore	48 hs	11,32	1,47	12,79
	7 dias	10,87	0,22	11,09

<sup>1</sup> Período *postmortem* - 48 hs = 48 horas de resfriamento; 7 dias = 7 dias de maturação.

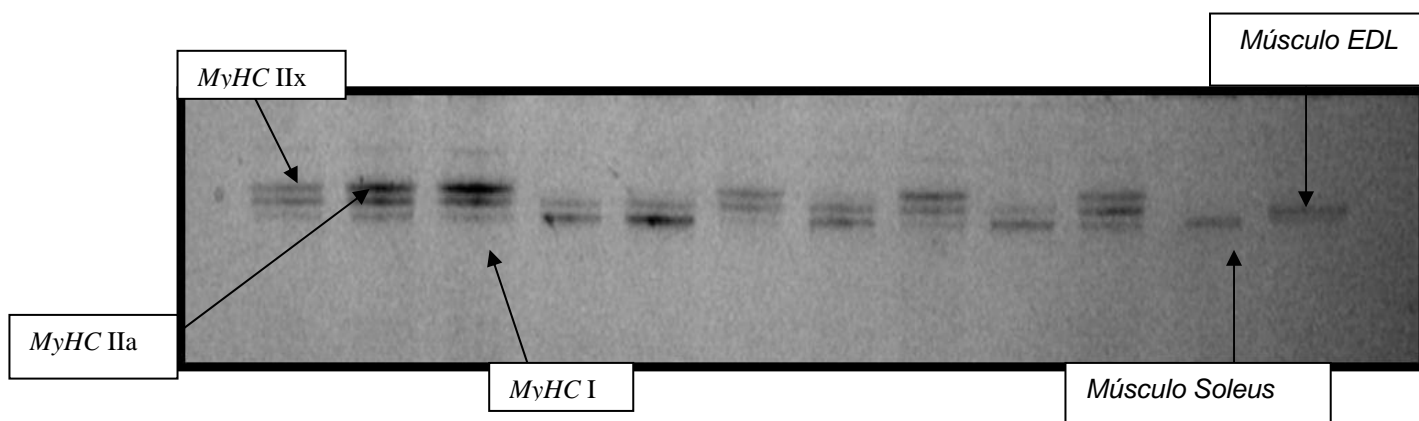
<sup>2</sup> PE = perdas por evaporação (%)

<sup>3</sup> PG = perdas por gotejamento (%)

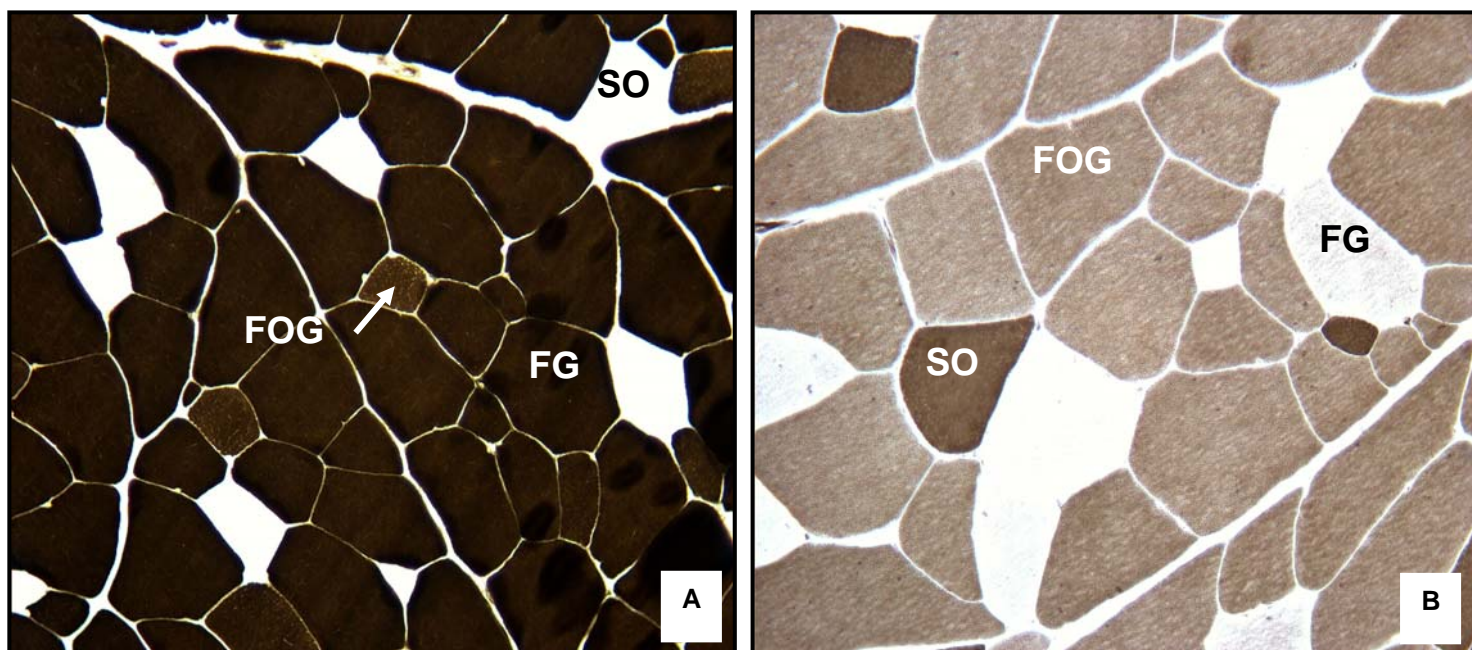
<sup>4</sup> PT = perdas totais (%), soma de perdas por gotejamento e por evaporação



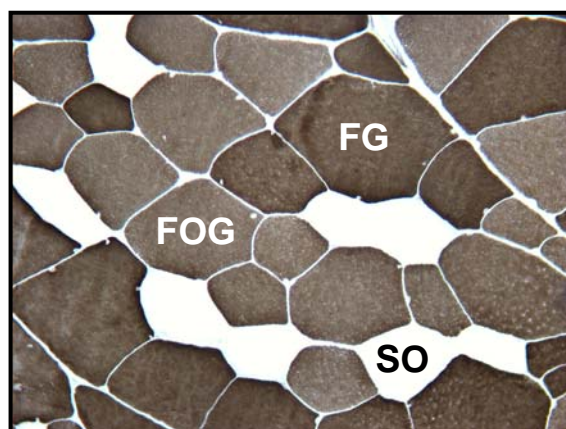
**Figura 1.** Foto do gel de *SDS-PAGE* a 9% de amostras do músculo *Semitendinosus* colhidas no abate onde são observadas as isoformas de *MyHC* do tipo II (com predominância para o tipo II a) e a isoforma do tipo I.



**Figura 2.** Foto do gel de *SDS-PAGE* a 9% de amostras do músculo *Longissimus dorsi* colhidas no abate onde são observadas as isoformas de *MyHC* do tipo II a, II x e a isoforma do tipo I.



**Figura 3:** Amostras do músculo *Semitendinosus* de animais *Bos indicus* da raça Nelore. **(A)** Amostra colhida na biópsia; *mATPase* alcalina (pH 10.4). **(B)** Amostra colhida no abate; *mATPase* ácida (pH 4.6). Fibras SO (oxidativas), FOG (oxidativas e glicolíticas) e FG (glicolíticas).



**Figura 4:** Amostra do músculo *Longissimus dorsi* de animais *Bos indicus* da raça Nelore colhida no abate; *mATPase* alcalina (pH 10.4). Fibras SO (oxidativas), FOG (oxidativas e glicolíticas) e FG (glicolíticas).

## IMPLICAÇÕES

A identificação dos tipos de fibras musculares e das isoformas da *MyHC* quanto ao metabolismo (oxidativo, oxidativo – glicolítico e glicolítico) no presente trabalho demonstrou ser uma eficiente ferramenta no estudo da qualidade da carne bovina, principalmente em relação a maciez. Constatou-se que o estudo das isoformas da *MyHC* é uma boa ferramenta de identificação dos tipos de fibras musculares, podendo ser utilizado como análise para a caracterização das mesmas.

Em bovinos *Bos indicus*, principalmente da raça Nelore, a identificação destas isoformas torna possível o estabelecimento de correlações das mesmas com métodos como força de cisalhamento e MFI, utilizados para a avaliação da maciez da carne *postmortem*.

O quanto e como cada isoforma da *MyHC* influencia na qualidade da carne ainda não é bem definido, porém futuros estudos podem contribuir para a relação de cada isoforma com a maciez da carne de bovinos.