

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

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E BIOQUÍMICA DOS  
MÚSCULOS *LONGISSIMUS DORSI* E *SEMITENDINOSUS* DE  
BUBALINOS MEDITERRÂNEO ABATIDOS EM DIFERENTES  
PESOS

CAROLINE DE LIMA FRANCISCO

Dissertação apresentada ao  
programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia – Área de Concentração:  
Produção Animal, como parte das  
exigências para obtenção do título  
de Mestre.

BOTUCATU - SP  
Setembro – 2009

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

CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA E BIOQUÍMICA DOS  
MÚSCULOS *LONGISSIMUS DORSI* E *SEMITENDINOSUS* DE  
BUBALINOS MEDITERRÂNEO ABATIDOS EM DIFERENTES  
PESOS

CAROLINE DE LIMA FRANCISCO

Zootecnista

ORIENTADOR: PROF. DR. ANDRÉ MENDES JORGE

CO-ORIENTADORA: PROF. DRA. MAELI DAL PAI SILVA

Dissertação apresentada ao  
programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia – Área de Concentração:  
Produção Animal, como parte das  
exigências para obtenção do título  
de Mestre.

BOTUCATU - SP  
Setembro – 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

F819c Francisco, Caroline de Lima, 1982-  
Caracterização histológica e bioquímica dos músculos *Longissimus dorsi* e *Semitendinosus* de bubalinos Mediterrâneo abatidos em diferentes pesos / Caroline de Lima Francisco. - Botucatu : [s.n.], 2009.  
viii, 74 f. : il., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009

Orientador: André Mendes Jorge  
Co-orientadora: Maeli Dal Pai Silva  
Inclui bibliografia.

1. Búfalos de rio. 2. Músculo esquelético. 3. Miosina de cadeia pesada. 4. Carne - Qualidade. I. Jorge, André Mendes. II. Silva, Maeli Dal Pai. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

*Eu fico com a pureza da resposta das crianças  
É a vida, é bonita e é bonita...*

*Viver!  
E não ter a vergonha de ser feliz!!  
Cantar e cantar e cantar  
A beleza de ser um eterno aprendiz  
Ah meu Deus! Eu sei, eu sei  
Que a vida devia ser bem melhor e será  
Mas isso não impede que eu repita  
É bonita, é bonita e é bonita...*

*E a vida! E a vida o que é?  
Diga lá, meu irmão  
Ela é a batida de um coração  
Ela é uma doce ilusão  
Hê! Hô!..*

*E a vida  
Ela é maravida ou é sofrimento?  
Ela é alegria ou lamento?  
O que é? O que é?  
Meu irmão...*

*Há quem fale que a vida da gente  
É um nada no mundo  
É uma gota, é um tempo que nem dá um segundo...  
Há quem fale  
Que é um divino mistério profundo  
É o sopro do Criador numa atitude repleta de amor...*

*Você diz que é luxo e prazer  
Ele diz que a vida é viver  
Ela diz que melhor é morrer pois amada não é  
E o verbo é sofrer...*

*Eu só sei que confio na moça  
E na moça eu ponho a força da fé  
Somos nós que fazemos a vida  
Como der, ou puder, ou quiser*

*Sempre desejada por mais que esteja errada  
Ninguém quer a morte só saúde e sorte  
E a pergunta roda e a cabeça agita  
Eu fico com a pureza da resposta das crianças  
É a vida, é bonita e é bonita...*

*Dedico este trabalho...*

*Aos meus pais Autevir e Maria Helena,  
aos meus irmãos Luciana e Eduardo...  
Minha família: meu alicerce, minha fonte,  
meu refúgio, meu porto seguro.*

*Ao meu Billy Jon....meu eterno "Jon Jon".*

## **Agradecimentos**

À Deus por me abençoar com saúde, guiando meus passos por todos os caminhos já percorridos; por sempre colocar pessoas muito especiais em minha trajetória, as quais levarei para sempre em meu coração.

À minha família pelo apoio, amor e compreensão que, mesmo com a distância física, nunca deixaram faltar.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. André Mendes Jorge, Mestre e amigo, pela confiança, oportunidade e orientação concedidas.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maeli Dal Pai Silva pelo acolhimento em seu laboratório, pela amizade e co-orientação proporcionadas.

Aos meus amigos que, nos momentos de alegria e tristeza, tornaram minha caminhada mais suave.

Aos amigos do Departamento de Morfologia – IBB – Unesp/Botucatu pela amizade e pelo auxílio nas análises.

Aos professores e funcionários do Departamento de Produção Animal, do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal, do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – Unesp/Botucatu e a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Estado de São Paulo – FAPESP pelo Auxílio Financeiro, processo 07/59965-4, e pelo fornecimento de bolsa de mestrado processo 07/53487-3.

Aos Búfalos pela participação fundamental neste trabalho, meu respeito e admiração sempre.

## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 .....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	2
Introdução.....	2
O bubalino doméstico ( <i>Bubalus bubalis</i> ).....	4
Produção de carne bubalina no Brasil.....	4
Morfofisiologia do músculo esquelético.....	6
Fibras musculares <i>versus</i> carcaça e parâmetros de qualidade da carne .....	8
Perfil eletroforético da miosina de cadeia pesada (MyHC) .....	12
Referências Bibliográficas.....	16
CAPÍTULO 2 .....	22
CARACTERIZAÇÃO DAS MIOSINAS DE CADEIA PESADA E DAS FIBRAS MUSCULARES DE BUBALINOS MEDITERRÂNEO .....	23
Resumo .....	23
Abstract .....	24
Introdução.....	25
Material e Métodos .....	26
Local, animais utilizados, instalações e período experimental .....	26
Manejo pré-abate, abate e coleta dos dados.....	28
Eletroforese SDS-PAGE .....	29
Avaliação da morfometria e das características dos tipos de fibras musculares.....	30
Análise estatística .....	31
Resultados.....	32
Eletroforese.....	32
Análise morfológica: HE, m-ATPase e NADH-TR .....	33
Morfometria: Frequência, Área e Diâmetro das fibras musculares.....	33
Discussão .....	34
Conclusão.....	38
Referências .....	39
CAPÍTULO 3 .....	51
CORRELAÇÃO ENTRE AS ISOFORMAS DE MyHC E TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES COM PARÂMETROS DE QUALIDADE DA CARNE DE BUBALINOS MEDITERRÂNEO .....	52

Resumo .....	52
Abstract .....	53
Introdução.....	54
Material e Métodos .....	55
Instalações, animais utilizados e período experimental.....	55
Manejo pré-abate, abate e coleta dos dados.....	56
Eletroforese SDS-PAGE .....	57
Análise morfológica – m-ATPase.....	58
Análise da cor, escore de marmorização e força de cisalhamento .....	58
Análise estatística .....	59
Resultados e Discussão .....	60
Correlação entre o peso de abate e as características morfológicas e qualitativas do músculo.....	60
Correlação entre as características das fibras e os parâmetros de qualidade da carne .....	62
Conclusão.....	63
Referências .....	64
CAPÍTULO 4 .....	73
IMPLICAÇÕES .....	74

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ABCB – Associação Brasileira de Criadores de Búfalos

*Afast* – Área da fibra *fast*

*Aslow* – Área da fibra *slow*

*Dfast* – Diâmetro da fibra *fast*

*Dslow* – Diâmetro da fibra *slow*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

*Ffast* – Frequência da fibra *fast*

FG – *Fast twitch Glycolytic*

FOG – *Fast twitch Oxidative Glycolytic*

*Fslow* – Frequência da fibra *slow*

HE – Hematoxilina-Eosina

IOD – Densidade óptica integrada

LD – *Longissimus dorsi*

m-ATPase – Adenosina Tri Fosfatase miofibrilar

Mrb – Marmorização

MyHC – *Myosin Heavy Chain*

MyLC – *Myosin Light Chain*

NADH-TR – Nicotinamida adenina tetrazólio redutase

PAGE – *Polyacrylamide gel electrophoresis*

PV – Peso vivo

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SO – *Slow twitch Oxidative*

ST – *Semitendinosus*

TEMED – Tetrametiletenodiamino

Tris – Hidroxi metil aminoetano

%MyHC – Porcentagem relativa da MyHC

## LISTA DE TABELA

Página

## CAPÍTULO 1

**Tabela 1.** Comparação entre algumas propriedades físicas e bioquímicas das fibras vermelhas e brancas do músculo esquelético.....7

## CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Composição percentual da dieta com base na matéria seca (MS).....43

**Tabela 2.** Valores de frequência, área e diâmetro das fibras dos músculos *Longissimus dorsi* (LD) e *Semitendinosus* (ST) de bubalinos Mediterrâneo abatidos em diferentes pesos .....50

## CAPÍTULO 3

**Tabela 1.** Composição percentual da dieta com base na matéria seca (MS).....69

**Tabela 2.** Coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre as características das fibras musculares e parâmetros de qualidade do músculo *Longissimus dorsi* de bubalinos Mediterrâneo .....70

**Tabela 3.** Valores médios e desvio-padrão das características qualitativas do músculo *Longissimus dorsi* de bubalinos Mediterrâneo nos diferentes pesos de abate .....71

**Tabela 4.** Valores médios de área e diâmetro das fibras dos músculos *Longissimus dorsi* de bubalinos Mediterrâneo abatidos em diferentes pesos .....72

## LISTA DE FIGURA

Página

## CAPÍTULO 2

**Figura 1.** Perfil eletroforético das isoformas de miosina de cadeia pesada (MyHC) nos músculos *Longissimus dorsi* (LD) e *Semitendinosus* (ST) de bubalinos Mediterrâneo, em gel 8% SDS – PAGE .....44/45

**Figura 2.** Porcentagem relativa (%) das isoformas de MyCH presentes nos músculos *Longissimus dorsi* (LD) e *Semitendinosus* (ST) de bubalinos Mediterrâneo abatidos em diferentes pesos .....46/47

**Figura 3.** Técnica de m-ATPase alcalina (esquerda) e NADH-TR (direita) realizada em cortes seriados nos músculos *Longissimus dorsi* (A) e *Semitendinosus* (B) de bubalinos Mediterrâneo.....48/49

## **CAPÍTULO 1**

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### Introdução

A busca por alimentos que conciliem alto valor biológico e atributos de qualidade sensorial tornou-se um hábito frequente entre os consumidores de proteína animal. Atualmente, para atender essa demanda têm-se direcionado estudos que avaliem o aumento da massa muscular e a diminuição da quantidade de gordura presente na carcaça (LEYMASTER & JENKINS, 1993), além dos aspectos qualitativos da carne como, a maciez, cor, suculência e textura.

O incremento da massa muscular pode ser obtido principalmente pela elevação do número de fibras musculares, aumento da área das fibras ou modulação de fibras menores em maiores (WEGNER et al., 2000). A tipificação das fibras musculares é uma ferramenta extremamente útil em muitos aspectos biológicos como a ciência da carne e, em bases histoquímicas, a classificação dos tipos de fibras ajuda a definir as propriedades funcionais e metabólicas do tecido muscular (KARLSSON et al., 1999). Existem diferenças marcantes na composição dos tipos de fibras de diversos músculos, entre os animais e dependentes de fatores como localização corporal, idade, peso e raça (MOODY et al., 1970; HAWKINS et al., 1985). A composição do tipo de fibra muscular e a área de músculos específicos são fatores importantes que, associados ao tipo de produção e nível de estresse a que os animais são submetidos, influenciam boa parte dos processos bioquímicos *ante* e *post-mortem* e, conseqüentemente, a qualidade da carne (ASHMORE, 1974).

Ferrara & Infascelli (1994) relataram que a carne de bubalinos tem menor teor de gordura e maior maciez que a de bovinos, em razão da menor taxa de crescimento do diâmetro da fibra muscular, associada à menor consistência do tecido conjuntivo. Tais atributos deveriam favorecer seu consumo, porém, a carne bubalina encontra alguns “tabus” há tempos. Segundo Cockrill (1994), na Índia, o bubalino sempre foi

visto como animal produtor de leite e como instrumento de trabalho; o consumo da carne só era realizado através da caça de bubalinos selvagens ou quando os animais chegavam ao fim de sua vida produtiva, reprodutiva e apresentavam doenças incuráveis ou injúrias irreparáveis. Assim, a qualidade da carne desses animais era classificada como péssima e essa opinião persistiu por décadas por diversos países, mistificando a espécie.

A reavaliação dos princípios fundamentais da produção animal trouxe grandes mudanças na produção e especialmente nas técnicas de produção de carne para o consumo humano (COCKRILL, 1994). Animais abatidos com idades mais jovens otimizam a produção, atendendo as exigências dos criadores e a demanda de proteína animal, além de fornecer os atributos de qualidade exigidos pelos consumidores. Assim, o conhecimento do número e do grau de diferenciação das fibras musculares constitui-se um dos mais importantes parâmetros que auxiliam na decisão da época do abate econômico de uma espécie animal (BONAGURIO, 2005).

Apesar da especulação de que as fibras musculares podem responder de diferentes maneiras às estratégias de produção e, conseqüentemente, afetar a qualidade da carne, essa relação ainda não está totalmente clara (MALTIN et al., 2001). Somado a isso, em bubalinos, a escassez de estudos referentes ao comportamento dessas fibras no decorrer do desenvolvimento dos animais dificulta o conhecimento da espécie e de possíveis melhorias no processo de criação cuja finalidade seja obter animais produtores de carne em menor tempo. Sendo assim, fica clara a necessidade de se desenvolver estudos que aprofundem o conhecimento sobre a espécie bubalina e esclareçam as qualidades dessa fonte alternativa de proteína animal.

### **O bubalino doméstico (*Bubalus bubalis*)**

De origem asiática e domesticados a mais de 7.000 anos, os bubalinos são classificados como animais ruminantes pertencentes à família *Bovidae*, subfamília *Bovinae*, espécie *Bubalus bubalis*. São ditos animais de dupla aptidão nos modelos trabalho/carne, trabalho/leite e leite/carne, porém, tendo em vista os produtos e subprodutos gerados por esses animais, como couro, pelos, cascos, chifres, sobras de toailete e sebo, poderíamos denominá-los como sendo animais com múltiplas aptidões (COCKRILL, 1994).

No Brasil, sua origem data de 1890 com a entrada de animais da raça Carabao pela Ilha de Marajó, no Pará, trazidos por fugitivos da Guiana Francesa. Posteriormente, as raças Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo foram introduzidas no país e são, juntamente com a Carabao, as raças reconhecidas no Brasil pela Associação Brasileira de Criadores de Bubalinos (ABCB) e definidas para fins de registro genealógico.

A raça Mediterrâneo, utilizada neste estudo, obteve essa denominação proposta pela ABCB por serem animais comuns a região mediterrânea (Mar Mediterrâneo), em países como Itália, Bulgária, Romênia, Grécia, Turquia, Egito e Tunísia. Tiveram origem na Índia e foram introduzidos na Europa através da ocupação árabe. Entre os países citados, a Itália se destaca na criação leiteira desta raça; os exemplares existentes no Brasil possuem maior aptidão para o corte. Quanto à conformação, a raça apresenta como padrões, animais de porte médio e mediano, com chifres longos, grossos e fortes, direcionados para trás, para fora e para o alto, terminado em forma semicircular ou de lira (ABCB, 2009).

### **Produção de carne bubalina no Brasil**

O Brasil possui, segundo o FAO (2007), um rebanho de aproximadamente 1,1 milhão de cabeças, sendo que deste total 62,2%; 10,6%; 9,8%; 11,3% e 6,1%

localizam-se nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste, respectivamente (IBGE, 2007). Apesar das estatísticas oficiais controversas e muitas vezes subestimadas, a criação de bubalinos no mundo todo e, em particular no Brasil e países vizinhos do Mercosul, tem apresentado um crescimento substancial, rompendo fronteiras, produzindo e se reproduzindo em locais onde outras espécies de ruminantes não têm apresentado índices zootécnicos satisfatórios (JORGE, 2005).

A carne bubalina é tratada e comercializada, em boa parte do país, sem uma forma definida de identificação das suas características, principalmente de qualidade ou do valor justo. Como a carne bovina, ela também é uma *commodity*, ou seja, vale o quanto pesa. Sem uma diferenciação baseada na identificação da carne, do rendimento e da qualidade, deixa de existir o estímulo para que o setor produtivo se modernize e invista na obtenção de um produto mais adequado, orientado para o atendimento dos desejos e anseios do consumidor (JORGE, 2005).

Os bubalinos apresentam resultados satisfatórios quanto ao rendimento de cortes primários da carcaça e podem até mesmo superar os bovinos em rendimentos de determinados cortes, o que contribui para desmistificar a espécie e esclarecer a cadeia produtiva quanto ao seu real potencial de produção (JORGE, 1999; 2001).

Jorge et al. (1997a;b), trabalharam com bovinos e bubalinos abatidos em diferentes estádios de maturidade fisiológica (pesos de abate) e observaram que os bubalinos apresentaram menor rendimento de dianteiro e maior de traseiro total em consequência de sua maior proporção de ponta-de-agulha, uma vez que eles não diferiram dos bovinos quanto ao rendimento de traseiro especial.

As indústrias de carne vermelha, incluindo a de bubalinos, têm que competir com outras fontes de proteína, especialmente suínos e aves. Para competir neste mercado, a pecuária bubalina terá que melhorar ainda mais seus índices de produtividade, criando identidade aos seus produtos, e atender as exigências dos

consumidores, em relação à segurança alimentar, qualidade do produto, bem-estar animal e respeito ao meio ambiente (JORGE, 2005).

### **Morfofisiologia do músculo esquelético**

A unidade estrutural do tecido muscular esquelético é formada por células altamente especializadas conhecidas como fibras musculares, miofibras ou célula muscular. As fibras musculares constituem 75 a 92 % do volume total do músculo; e o volume restante é constituído por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, fibras nervosas e fluidos extracelulares. Embora as fibras possam alcançar comprimentos de muitos centímetros, elas não se estendem ao comprimento do músculo inteiro afinando-se nas extremidades; possuem diâmetros que variam de 10 a 100  $\mu\text{m}$  dentro de uma mesma espécie e até dentro de um mesmo músculo (ABERLE et al., 2001).

O crescimento do tecido muscular esquelético é caracterizado por aumentos na área e no comprimento, seja por adição ou alongamento dos sarcômeros, das fibras musculares (SWATLAND, 1978).

As fibras do tecido muscular esquelético de vertebrados podem responder vagarosamente a um estímulo (*slow twitch*) ou rapidamente (*fast twitch*). Podem ser ainda de metabolismo oxidativo ou glicolítico dependendo do suprimento sanguíneo, número de mitocôndrias e velocidade de hidrólise do ATP. Assim, elas são comumente classificadas como (a) *slow twitch oxidative* (SO,  $\beta\text{I}$  ou tipo I), (b) *fast twitch glycolytic* (FG, FF,  $\alpha\text{R}$  ou tipo IIB), ou (c) *fast twitch oxidative glycolytic* (FOG, FR,  $\alpha\text{W}$  ou tipo IIA), correspondendo também às denominações vermelha, branca e intermediária, respectivamente (PEARSON & YOUNG, 1989).

As fibras vermelhas, ricas em enzimas oxidativas, têm metabolismo aeróbico e utilizam a gordura como o principal substrato energético, além de apresentar pequena área e contração lenta. As fibras brancas, ricas em enzimas glicolíticas, são adaptadas para o metabolismo anaeróbico e utilizam o glicogênio como substrato energético,

apresentam maior área e contração rápida. As fibras intermediárias apresentam área intermediária, ambos os metabolismos aeróbico/glicolítico e possuem contração rápida, apresentando também coloração vermelha (PETER et al., 1972).

A Tabela 1 apresenta comparações de algumas propriedades físicas e bioquímicas das fibras vermelhas e brancas do músculo esquelético.

**Tabela 1** – Comparação entre algumas propriedades físicas e bioquímicas das fibras vermelhas e brancas do músculo esquelético

Propriedade	Vermelha	Branca
Conteúdo de mioglobina	Elevado	Baixo
Proteína solúvel	Baixo	Elevado
Conteúdo de tecido conectivo	Baixo	Elevado
Conteúdo de glicogênio	Baixo	Elevado
Conteúdo de lipídio	Elevado	Baixo
Conteúdo de Creatina Fosfatase e ATP	Baixo	Elevado
Tamanho da fibra muscular	Pequena	Grande
Suprimento sanguíneo	Maior	Menor
Conteúdo de RNA	Elevado	Baixo
Retículo sarcoplasmático	Menor	Maior
Conteúdo de cálcio	Maior	Menor
Número de Mitocôndrias	Elevado	Baixo
Largura da linha-Z	Largo	Estreito
Tempo de contração	Lento	Rápido
Tempo de relaxamento	Lento	Rápido
Taxa de fadiga	Lenta	Rápida
Área de superfície de inervação	Superficial	Profunda

Fonte: Adaptado de Pearson & Young (1989)

De acordo com Morita et al. (2000), os músculos são compostos por ambos os tipos de fibras e não exclusivamente por fibras vermelhas ou brancas; e o que os difere com relação à classificação branco ou vermelho, é a proporção de cada tipo de fibra, sendo que a grande maioria apresenta uma mescla de ambas. Um exemplo

disso é o músculo *longissimus* de bezerras bovinos da raça japonesa Black, que embora possua em mais de sua metade fibras vermelhas (SO e FOG), ao nível da 11ª vértebra torácica ele é considerado um músculo branco.

### **Fibras musculares versus carcaça e parâmetros de qualidade da carne**

As características dos tipos de fibras, frequência e distribuição em um músculo, de animais da mesma espécie, podem ser determinadas pela função do músculo, tipo de inervação (ASHMORE, 1974), por herança genética, condições ambientais, como também pelo sistema de produção, sexo, idade (OZAWA et al., 2000). Músculos relacionados à atividade de força possuem maior quantidade de fibras glicolíticas, enquanto que músculos posturais e aqueles utilizados com muita frequência (músculo de resistência) possuem maior quantidade de fibras oxidativas (BONAGURIO, 2005). Além disso, a frequência de distribuição dos tipos de fibras no interior de um mesmo músculo se revela variável e, segundo Pearson & Young (1989), existe, de maneira geral, maior concentração de fibras oxidativas em regiões mais profundas do músculo e maior distribuição de fibras glicolíticas na porção superficial.

Diferenças com relação à percentagem de fibras no músculo *Longissimus* foram descritas por Solomon et al. (1985) ao avaliarem bubalinos e bovinos, onde não foram encontradas fibras FG nos bubalinos, porém, as intermediárias (FOG) representaram em média 76% e as SO 23%, enquanto que os três tipos de fibras estavam presentes nesse mesmo tipo de músculo nos bovinos. Os autores verificaram que a presença de fibras FG nos bovinos está relacionada com a seleção genética para o desenvolvimento muscular e que a presença de fibras somente de metabolismo oxidativo (SO e FOG) em bubalinos é devida a seleção natural.

Estudos realizados por Carpenter et al. (1996) e Koohmaraie et al. (1996) associaram o aumento da área de fibras FG, no *Longissimus dorsi* de bovinos e ovinos de diferentes genótipos, ao aumento da massa muscular caracterizada pela hipertrofia.

Entretanto, Monteiro et al. (2000) em estudo sobre os efeitos do genótipo nas características morfológicas e histoquímicas do *Longissimus dorsi* de cordeiros encontraram predominância do metabolismo intermediário (*Fast oxidative glycolytic* – FOG).

O sexo pode ser um fator de diferenciação de frequência de fibras musculares. Em ovinos, as fêmeas têm maior frequência de fibras SO em relação aos machos (inteiros) devido estes sofrerem ação da testosterona, o que aumenta seu metabolismo glicolítico, resultando em maior frequência de fibras FG em relação às fêmeas. A castração de machos induz a modulação de fibras FG para FOG (BONAGURIO, 2005).

A proporção dos tipos de fibras musculares pode também estar relacionada com a maciez da carne. Estudos em ovinos e bovinos revelam uma correlação significativa entre as fibras musculares oxidativas (SO e FOG) e a maciez da carne (MOODY et al., 1980; OCKERMAN et al., 1984) já que, essas fibras estão mais correlacionadas com depósitos de gordura intra e intermuscular do que as fibras brancas. Entretanto, Totland et al. (1988), estudaram o músculo *Semitendinosus* de bovinos e descreveram aumento no volume das fibras vermelhas do tipo *slow oxidative* (SO) (de 10 para 30%) e decréscimo das fibras brancas do tipo *fast glycolytic* (FG) da região superficial para a região profunda. Observaram, ainda, decréscimo gradual na maciez da região superficial para a região profunda e alteração na composição das fibras musculares.

A maciez tende a ser maior em animais jovens e diminuir com a idade, devido ao acúmulo e à maturação do tecido conjuntivo da matriz extracelular do tecido muscular, entretanto, a suculência e o sabor da carne estão relacionados com a gordura intramuscular (marmorização) a qual aumenta com a idade e o acabamento do animal (OCKERMAN et al., 1984; MALTIN et al., 2001). Segundo Renand et al. (2001), existem várias diferenças na relação entre maciez e alguns parâmetros como

lipídios musculares e tipos de fibras musculares; os autores atribuem essas diferenças às variações nas condições de mensuração e enfatizam a importância em se estabelecer uma padronização para o abate, seja pelo peso ou pela idade.

Hadlich (2007) verificou correlação positiva entre a área e o diâmetro das fibras FG com a força de cisalhamento em bovinos produzidos no sistema superprecoce, concluindo e ressaltando que o tamanho da fibra muscular pode influenciar negativamente nas características qualitativas da carne, em especial na maciez.

Com relação à cor da carne, parâmetro que tem influência significativa na decisão da compra pelo consumidor, que associa esta característica com o produto fresco e saudável, ou seja, de qualidade, pode-se esperar que músculos vermelhos contenham maiores teores de mioglobina e de suprimento sanguíneo, quando comparados aos músculos brancos. A função da mioglobina no animal vivo é o armazenamento de oxigênio, assim, o nível é mais alto nos músculos que são utilizados constantemente, ou seja, em músculos que possuem maior quantidade de fibras de metabolismo oxidativo (PEARSON & YOUNG, 1989). Neste contexto, pode-se dizer que os músculos dos animais produzidos em sistema extensivo provavelmente são mais escuros que nos animais criados em sistema intensivo (VARNAM & SUTHERLAND, 1998). Em contra partida, Wegner et al. (2000) associaram a palidez do músculo *Semitendinosus* de bovinos Belgian Blue ao aumento da frequência das fibras FOG e diminuição da área das fibras FG e SO.

Pesquisas que correlacionam os tipos de fibras musculares com parâmetros de qualidade (maciez, cor, marmoreio) em carne de bubalinos não foram encontradas na literatura.

As alterações decorrentes do crescimento para um dado músculo podem ser avaliadas por meio da análise da frequência e área ocupada pelos diferentes tipos de fibras. Desta maneira, espera-se que a área das fibras musculares aumente com o

decorrer da idade e aumento do peso vivo (SOLOMON et al., 1986), desde que outros fatores como doenças e restrição alimentar não interfiram no desenvolvimento.

Arrigoni et al. (2004) em pesquisa realizada com animais de tamanhos corporais diferentes (mestiços Angus, Canchim e Simental) encontraram comportamento diferente de crescimento e deposição tecidual em relação ao peso vivo de abate, área e espessura de gordura do músculo *Longissimus dorsi* e diâmetro da fibra muscular esquelética SO. Observaram diferenças no diâmetro das fibras SO (32,02 e 41,03  $\mu\text{m}$ ), FOG (48,51 e 57,62  $\mu\text{m}$ ) e FG (37,02 e 46,72  $\mu\text{m}$ ) em relação à idade dos animais (295 e 408 dias, respectivamente) e concluíram que os animais mestiços Angus têm maior espessura de gordura subcutânea e menor diâmetro de fibra muscular esquelética, demonstrando sua precocidade quanto às características de carcaça quando comparados aos outros grupos genéticos.

Cervieri et al. (2005) ao avaliarem os efeitos da idade sobre o diâmetro e a frequência das fibras musculares do músculo *Semitendinosus* de bovinos mestiços (Angus x Nelore) produzidos no sistema superprecoce encontraram efeito significativo da idade (117 e 217 dias) para o diâmetro das fibras SO e FOG e tendência de aumento para o diâmetro das fibras FG. Para os três tipos de fibras ocorreu aumento do diâmetro entre idade x tratamento (somatotropina bovina recombinante x solução salina), porém observaram que as frequências de distribuição dos três tipos de fibras foram semelhantes entre os tratamentos testados.

Wegner et al. (2000) verificaram que o músculo *Semitendinosus* apresenta menor proporção de fibras SO em comparação as fibras FOG e FG em bezerros em idades bastante jovens. Entretanto, estes autores observaram redução da frequência das fibras FOG e aumento da percentagem das fibras FG, entre um e 12 meses de idade, caracterizando este período de crescimento como incremento do metabolismo glicolítico do músculo *Semitendinosus*, em função da transformação das fibras FOG em FG. Bee et al. (2007) postularam que o efeito do peso de abate na distribuição das

fibras musculares de suínos depende do tratamento alimentar que esses animais foram submetidos.

Zakhariev & Petrov (1982) em estudo sobre as alterações na estrutura do tecido muscular de bubalinos nativos da Bulgária nas idades de 3, 6, 12, 18 e 24 meses observaram que, em quase todos os músculos estudados, o crescimento das fibras em diâmetro foi maior até o terceiro mês de idade e que, aos 18 meses, o diâmetro médio das fibras foi de 49,85  $\mu\text{m}$  no músculo *longissimus* e 55,20  $\mu\text{m}$  no músculo *Semitendinosus*.

Porto (1992) observou que em bubalinos Mediterrâneo, a frequência dos tipos de fibras do músculo *Semitendinosus* foi influenciada pela idade dos animais; e a frequência das fibras do tipo *fast* aumentou a partir dos 6 meses de idade nas fêmeas e a partir dos 3 meses nos machos.

Yadava & Singh (1985) avaliando as alterações na composição do músculo esquelético de bubalinos Murrah de 1, 2, 3 e 5 anos de idade concluíram que os dados de peso corporal, diâmetro das fibras e constituintes químicos observados sugerem que a melhor qualidade da carne de búfalo pode ser obtida de animais abatidos entre 2 e 3 anos.

### **Perfil eletroforético da miosina de cadeia pesada (MyHC)**

As propriedades de contração muscular e também do *rigor mortis* variam entre espécie animal. Os tipos de fibras musculares são responsáveis por diferentes intensidades de contração, tanto durante a vida quanto no *rigor mortis*, podendo influenciar na qualidade da carne (CHIKUNI et al., 2004).

A molécula de miosina é a proteína mais abundante do músculo esquelético e apresenta papel crucial no processo de contração muscular (REISER et al., 1985). Cada molécula consiste de duas cadeias pesadas (MyHC) idênticas e dois pares, não idênticos, de miosina de cadeia leve (MyLC), sendo que todos os vertebrados

expressam uma família de isoformas de MyHC e de MyLC no músculo esquelético que influenciam a força mecânica, a velocidade de encurtamento e a capacidade de ativação das células musculares (LUTZ & LIEBER, 2000).

Na família MyHC, genes específicos codificam as diferentes isoformas da proteína e, atualmente, pelo menos 10 genes foram identificados nos músculos de mamíferos, que incluem os tipos, I (lento), IIa, IIb, IIx/IIc, IIm, alfa, neonatal, embrionário e extraocular (PICARD & CASSAR-MALEK, 2009). Uma fibra muscular pode conter especificamente uma dessas isoformas, ou seja, fibras IA contêm MyHC-I, fibras IIA contêm MyHC-IIa, fibras IIB contêm MyHC-IIb. Entretanto, a fibra também pode conter simultaneamente várias isoformas de MyHC e, assim, ser denominada de fibra híbrida em contraste com a fibra pura.

As fibras musculares são estruturas dinâmicas capazes de alterar seus fenótipos sob várias condições como idade, nutrição, estresse. As mudanças nas isoformas da MyHC seguem uma sequência, porém a transição pode ocorrer em ambos os sentidos: MyHC-I  $\longleftrightarrow$  MyHC-IIa  $\longleftrightarrow$  MyHC-IIx  $\longleftrightarrow$  MyHC-IIb (PETTE & STARON, 2000).

Em grandes mamíferos a identificação concreta da presença de uma isoforma da MyHC é mais difícil do que em animais de laboratório pela alta percentagem de fibras híbridas que expressam duas ou mais isoformas. Por exemplo, em músculo esquelético de suínos, as fibras híbridas 2A/X e 2X/B são abundantes nos músculos do tronco e dos membros, enquanto que fibras 2B estão presentes somente em músculos especializados como o músculo extraocular (TONIOLO et al., 2004).

Em estudo com diversas espécies de animais, Chikuni et al. (2004) demonstraram a presença da isoforma MyHC-IIb em ratos, porém, verificaram a ausência dessa isoforma em búfalo, alce, girafa, cervo, carneiros. Por outro lado, Picard & Cassar-Malek (2009), em estudo com bovinos da raça Blonde d'Aquitaine, observaram que dois dos animais utilizados no experimento apresentaram a isoforma

MyHC-IIb, atribuindo tal evento ao fato desse gene estar ligado ao alto desenvolvimento muscular e que a seleção do gado para produção de carne pode ter favorecido a expressão da isoforma MyHC-IIb, como observado em suínos. Os mesmos autores revelaram também que esta isoforma está presente em maior proporção no músculo *Semitendinosus* comparado ao *Longissimus*.

A atividade da ATPase é associada com a região globular da cadeia pesada da miosina e análises demonstram que tipos m-ATPase da fibra se correlacionam com os perfis específicos de MyHC. Como tal, a histoquímica da m-ATPase provou ser útil para delinear os tipos de fibras musculares. Entretanto, o método histoquímico induz a uma avaliação qualitativa da miosina como um todo e, conseqüentemente, limita a caracterização da variedade de fibras híbridas que possam existir (PETTE & STARON, 2000).

Alguns métodos têm sido empregados na produção animal com o intuito de identificar e diferenciar essas proteínas, principalmente em animais produtores de carne, tornando possível correlacionar a proporção ou a evidência de cada isoforma com o tipo de fibra e, conseqüentemente, com o desenvolvimento muscular e as características qualitativas do produto final.

A técnica da eletroforese tem se mostrado uma ferramenta valiosa para a análise bioquímica das MyHC e de outras proteínas musculares (CLAEYS et al., 1995; KOLCZACK et al., 2003b; SAWDY et al., 2004; MIZUNOYA et al., 2008). Esta técnica evidencia os padrões polimórficos das proteínas, dissociando suas cadeias polipeptídicas em cadeias simples e com cargas negativas, possibilitando a determinação do peso molecular dos componentes protéicos do músculo, além de permitir a análise qualitativa de proteínas e suas subunidades (CLAEYS et al., 1995). A presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) na solução carreadora propicia a separação das proteínas em função do peso molecular, pois recobre as moléculas com cargas negativas deslocando-as através da corrente elétrica.

A literatura disponibiliza muitos trabalhos empregando a eletroforese em SDS com o objetivo de se caracterizar e estudar especificamente algumas proteínas miofibrilares e sua relação com a maciez da carne (YOUNG & DAVEY, 1981; CLAEYS et al., 1995; NEGISH et al., 1996; KOOHMARAIE et al., 2002; KOLCZAK et al., 2003a).

Com relação à espécie bubalina, alguns estudos abordaram a composição protéica muscular e sua relação com parâmetros qualitativos da carne, principalmente a maciez (SOARES & ARÊAS, 1995; NAVEENA et al., 2004; NEATH et al., 2007a; NEATH et al., 2007b), porém, nenhum dos autores citaram a possível relação entre as isoformas da MyHC e tais características.

Tendo em vista a escassez de estudos referentes à caracterização dos tipos de fibras musculares, bem como a análise das características do crescimento muscular na espécie bubalina, torna-se imprescindível que pesquisas sejam realizadas, de forma a contribuir, ao mesmo tempo, com as necessidades do produtor (menor tempo para o abate, menor custo de produção) e as exigências do consumidor com relação ao produto final (carne de qualidade). Os resultados obtidos, a partir do estudo de métodos histológicos de animais abatidos com idade ao redor dos 18 meses, também podem ajudar a definir melhor a diversidade dos tipos de fibras e das MyHCs, proporcionar maior confiabilidade nos dados e, assim, definir com mais precisão as características morfológicas e bioquímicas do tecido muscular. Estes dados podem contribuir para o entendimento sobre as variações geradas pelo crescimento animal na qualidade do produto (carne) que consumimos.

Desse modo, objetivou-se com o presente estudo caracterizar qualitativa, morfológica e bioquimicamente os músculos *Longissimus dorsi* e *Semitendinosus* de bubalinos Mediterrâneos não castrados abatidos em diferentes pesos assim como, analisar a correlação entre a MyHC com o desempenho e qualidade da carne.

O Capítulo 2, intitulado **Caracterização das miosinas de cadeia pesada e das fibras musculares de bubalinos Mediterrâneo**, foi redigido de acordo com as normas para publicação na revista *Meat Science*. Objetivou-se com o presente estudo caracterizar o perfil de miosinas de cadeia pesada e os diferentes tipos de fibras dos músculos *Longissimus dorsi* e *Semitendinosus* de bubalinos Mediterrâneo e suas possíveis modulações de acordo com os diferentes pesos de abate.

O Capítulo 3, intitulado **Correlação entre as isoformas de MyHC e tipos de fibras musculares com parâmetros de qualidade da carne de bubalinos Mediterrâneo**, foi redigido de acordo com as normas para publicação na revista *Meat Science*. Objetivou-se com o presente estudo correlacionar os diferentes tipos de miosinas de cadeia pesada e os tipos de fibras existente no músculo *Longissimus dorsi* de bubalinos Mediterrâneo com os parâmetros relacionados à qualidade da carne dentro dos diferentes pesos de abate.

### Referências Bibliográficas

ABERLE, E. D. et al. Structure and composition of animal tissues. In: ABERLE, E.D. et al. *Principles of meat science*. 40 ed. Iowa: Kendall/Hunt Publishing Company, 2001. p. 9-43.

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

ASHMORE, C. R. Phenotypic expression of muscle fiber types and some implications to meat quality. *Journal of Animal Science*, v.38, p.1158-1164, 1974.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS – ABCB. Disponível em:<<http://www.bufalo.com.br>>. Acesso em: 25 fev. 2009.

BEE, G. et al. Changes in the histochemical properties and meat quality traits of porcine muscles during the growing-finishing period as affected by feed restriction, slaughter age, or slaughter weight. *Journal of Animal Science*, v.85, p.1030-1045, 2007.

BONAGURIO, S. *Estudo da suplementação de ovelhas, idade à desmama e sistemas de terminação de cordeiros machos inteiros sobre a qualidade da carne*. 2005. 86p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade estadual Paulista, Botucatu, 2005.

CARPENTER, E. C. et al. Histology and composition of muscles from normal and callipyge lambs. *Journal of Animal Science*, v.74, n.2, p.388-393, Feb.1996.

CERVIERI, R.C. et al. Caracterização das fibras musculares do músculo Semitendinosus de bezerros mestiços Angus-Nelore recebendo somatotropina bovina recombinante (rbST) até a desmama. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.34, p.907-914, 2005.

CHIKUNI, K.; MUROYA, S.; NAKAJIMA, I. Myosin heavy chain isoforms expressed in bovine skeletal muscle. *Meat Science*, v.67, p.87-94, 2004.

CLAEYS, E.; UYTTERHAEGEN, B.; DEMEYER, D. Quantification of beef myofibrillar proteins by SDS-PAGE. *Meat Science*. 39:177. 1995.

COCKRILL, W. R. Present and Future of Buffalo Production in the world. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, 1994, São Paulo. *Proceedings...* São Paulo: FAO/FINEP, 1994. v.1, p.3-21.

FAO – FAO Statistics Divisions, dez de 2007. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 14 ago. 2009.

FERRARA, B.; INFASCELLI, F. Buffalo meat production. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, 1994, São Paulo. *Proceedings...* São Paulo: FAO/FINEP, 1994. v.1, p.122-136.

HADLICH, J. C. *Características do crescimento animal, do tecido muscular esquelético e da maciez da carne de bovinos nelore e mestiços no modelo biológico superprecoce*. 2007. 87p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

HAWKINS, R. R.; MOODY, W. G.; KEMP, J. D. Influence of genetic type, slaughter weight and sex on ovine muscle fiber and fat-cell development. *Journal of Animal Science*, v.61, p.1154-1163, 1985.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal, dez de 2007. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 1 jun. 2009.

JORGE, A. M. et al. Rendimento de carcaça e de seus cortes básicos em bovinos e bubalinos, abatidos em diferentes estágios de maturidade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.26, p.1048-1054, 1997a.

JORGE, A. M.; MATTOS, J. C. A.; NOGUEIRA, J. R. Rendimentos de cortes comerciais da carcaça de bubalinos e bovinos terminados em confinamento. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34, 1997, Juiz de Fora. *Anais...* Juiz de Fora: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1997b. p.323-325.

JORGE, A. M. Desempenho em confinamento e características de carcaça em bubalinos. In: Barnabé V.H. *Bubalinos: sanidade, reprodução e produção*. Jaboticabal: Funep, 1999. p.51-67.

JORGE, A. M. Produção e qualidade da carne bubalina. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE BUBALINOCULTURA, 2, 2001, Pirassununga. *Anais...* Pirassununga: USP/FZEA, 2001. p.1-47.

JORGE, A. M. Produção de carne bubalina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.84-95, abr-jun, 2005. Disponível em:<<http://www.cbra.org.br>>. Acesso em: 16 jan. 2007.

KARLSSON, A. H.; KLONT, R. E.; FERNANDEZ, X. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livestock Production Science*, v.60, p.255-269, 1999.

KOLCZAK, T. et al. Changes of myofibrillar and centrifugal drip proteins and shear force of *psaos major* and *minor* and *semitendinosus* muscle from calves, heifers and cows during post-mortem ageing. *Meat Science*, v.64, p.69-75, 2003a.

KOLCZAK, T. et al. Changes in structure of *psaos major* and *minor* and *semitendinosus* muscle of calves, heifers and cows during post-mortem ageing. *Meat Science*, v.64, p.77-83, 2003b.

KOOHMARAIE, M. et al. Effects of a b-adrenergic agonist (L-644,969) and male sex condition on muscle growth and meat quality of callipyge lambs. *Journal Animal Science*, v.74, n.1, p.70-79, Jan. 1996.

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

LEYMASTER, K. A.; JENKINS, T. G. Comparison of Texel and Suffolk sired crossbred lambs for survival, growth and compositional traits. *Journal of Animal Science*, v.71, n.4, p.859-869, Apr. 1993.

- LUTZ, G. J.; LIEBER, R. L. Myosin isoforms in anuran skeletal muscle: their influence on contractile properties and in vivo muscle function. *Microscopy Research and Technique*, v.50, p.443-457, 2000.
- MALTIN, C. A. et al. Factors influencing beef eating quality 2. Effects of nutritional regimen and genotype on muscle fibre characteristics. *Animal Science*, v. 72, p. 279-287, 2001.
- MIZUNOYA, W. et al. Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system. *Analytical Biochemistry*, 377, p.111-113, 2008.
- MONTEIRO, E. M. et al. Efeito do genótipo nas características morfológicas e histoquímicas do longissimus dorsi e em alguns parâmetros quantitativos das carcaças de cordeiros. *Ciência Agrotecnológica*, Lavras, v.24, p.153-162, dez., 2000.
- MOODY, W. G. et al. Effects of weight, castration and rate of gain on muscle fiber and fat cell diameter in two ovine muscles. *Journal of Animal Science*, v.31, p.676-680, 1970.
- MOODY, W. G. et al. Effects of feeding systems, slaughter weight and sex on histological properties of lamb carcasses. *Journal of Animal Science*, v.50, n.2, p.249-256, 1980.
- MORITA, S. et al. Heterogeneous composition of histochemical fibre types in the different parts of *M. longissimus thoracis* from Mishima (Japanese native) steers. *Meat Science*, v.54, p.59-63, 2000.
- NAVEENA, B. M.; MENDIRATTA, S. K.; ANJANEYULU, A. S. R. Tenderization of buffalo meat using plant proteases from *Cucumis trigonus* Roxb (Kachri) and *Zingiber officinale* roscoe (Ginger rhizome). *Meat Science*, v.68, p. 363-369, 2004.
- NEATH, K.E. et al. Difference in tenderness and pH decline between water buffalo meat and beef during postmortem aging. *Meat Science*, v.75, p.499-505, 2007a.
- NEATH, K.E. et al. Protease activity higher in postmortem water buffalo meat than Brahman beef. *Meat Science*, v.77, p.389-396, 2007b.
- NEGISH, H.; YAMAMOTO, E.; KUTAWA, T. The origin of the 30 kDa component appearing during post-mortem ageing of bovine muscle. *Meat Science*, v.42, p.289-303, 1996.

OCKERMAN, H. W. et al. Castration and sires effects on carcass traits, meat palatability and muscle fiber characteristics in Angus cattle. *Journal of Animal Science*, v.59, n.4, p.981-990, 1984.

OZAWA, S. et al. The characteristics of muscle fiber types of longissimus thoracis muscle and their influences on the quantity and quality of meat from Japanese Black steers. *Meat Science*, v.54, p.65-70, 2000.

PEARSON, A.M.; YOUNG, R.B. Skeletal muscle fibers. In: PEARSON, A.H.; YOUNG, R.B. *Muscle and meat biochemistry*. San Diego: Academic Press, 1989. p.235-265.

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

PETTE, D.; STARON, R. S. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*, v.50, p.500-509, 2000.

PICARD, B.; CASSAR-MALEK, I. Evidence for expression of IIb myosin heavy chain isoform in some skeletal muscles of Blonde d'Aquitaine bulls. *Meat Science*, doi:10.1016/j.meatsci.2008.11.022, 2009.

PORTO, S. M. *Morfologia e histoenzimologia das fibras do músculo Semitendinosus de búfalos (Bubalus bubalis) em crescimento*. 1992. 103p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

REISER, P. J. et al. Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscle is correlated with myosin heavy chain composition. *The Journal of Biological Chemistry*, v.260, n.16, p.9077-9080, 1985.

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

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

SOARES, G. J. D.; ARÊAS, J. A. G. Effect of electrical stimulation on *post mortem* biochemical characteristics and quality of *Longissimus dorsi thoracis* muscle from buffalo (*Bubalus bubalis*). *Meat Science*, v.41, n.3, p.369-379, 1995.

SOLOMON, M. B.; WEST, R. L.; CARPENTER, J. W. Fiber types in the longissimus muscle from water buffalo and selected domestic beef breeds. *Meat Science*, v.13, n.3, p.129–135, 1985.

SOLOMON, M. B., WEST, R. L., HENTGES, J. F. Growth and muscle development characteristics of purebred Angus and Brahman bulls. *Growth*, v.50, p.51-67, 1986.

SWATLAND, H. J. Longitudinal growth and rate of new sarcomere formation in porcine muscle. *Journal of Animal Science*, v.46, n.1, p.118-124, 1978.

TONIOLO, L. et al. Fast fibres in a large animal: fibre types, contractile properties and myosin expression in pig skeletal muscles. *The Journal of Experimental Biology*, v. 207, p.1875-1886, 2004.

TOTLAND, G. K.; KRIVY, H.; SLINDE, E. Composition of muscle fiber types and connective tissue in bovine muscle *Semitendinosus* and its relations to tenderness. *Meat Science*, v.23, p.303-315, 1988.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. *Carne y productos cárnicos: tecnología, química y microbiología*. Zaragoza: Acibia, 1998. 423 p.

WEGNER, J. et al. Growth and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *Journal of Animal Science*, v.78, n. 6, p.1485-1496, 2000.

YOUNG, O. A.; DAVEY, C. L. Electrophoretic analysis of proteins from single bovine muscle fibres. *Journal Biochemistry*, v.195, p.317-327, 1981.

YADAVA, B. S.; SINGH, L. N. Age-related changes in chemical composition of buffalo skeletal muscles. *Indian Journal Animal Science*, v.55, n.A, p.212-277, 1985.

ZAKHARIEV, A. J., PETROV, J. Growth rate, development and histo-structure of skeletal muscle of native buffalo. *Zhivotnovd Nauki*, v.18, n.5, p. 27-39, 1982.

## CAPÍTULO 2

O artigo a seguir está redigido de acordo com as exigências para publicação na revista *Meat Science*, excetuando-se o idioma

## CARACTERIZAÇÃO DAS MIOSINAS DE CADEIA PESADA E DAS FIBRAS MUSCULARES DE BUBALINOS MEDITERRÂNEO

### Resumo

Sabendo-se do grande potencial dos bubalinos como produtores de carne e da importância da análise das fibras musculares para a caracterização da qualidade da carne, objetivou-se neste estudo avaliar as isoformas da miosina de cadeia pesada (MyHC) e os tipos de fibras dos músculos *Longissimus dorsi* (LD) e *Semitendinosus* (ST) de 28 bubalinos Mediterrâneo não-castrados e a possível modulação de acordo com os diferentes pesos de abate (450, 480, 510 e 540 kg). Amostras dos músculos foram coletadas e submetidas às técnicas de eletroforese (SDS-PAGE), m-ATPase e NADH-TR. Foram analisadas a porcentagem relativa das isoformas de MyHC, assim como, frequência, área e diâmetro das fibras musculares. Constatou-se que bubalinos Mediterrâneo não possuem a isoforma MyHC IIb, apresentando somente três isoformas de MyHC (IIa, IIx/d e I), cujas porcentagens não variaram significativamente ( $P > 0,05$ ) entre os pesos de abate. A presença de fibras musculares híbridas (IIA/X) nos músculos LD e ST permitiu a classificação dos tipos de fibras pela atividade contrátil, em *fast* e *slow*. Para ambos os músculos, a frequência foi maior para as fibras *fast* em todas as categorias avaliadas, porém houve diferença ( $P < 0,05$ ) na frequência dos tipos de fibras dos músculos LD e ST de acordo com os pesos de abate. Os animais abatidos aos 540 kg obtiveram maiores valores para área e diâmetro das fibras, tanto para o LD quanto para o ST. O músculo ST apresentou maiores valores de área e diâmetro que o músculo LD para todos os pesos de abate avaliados, revelando o crescimento mais tardio.

**Palavras chave:** Búfalos de rio, Músculo esquelético, MyHC

## CHARACTERIZATION OF MYOSIN HEAVY CHAIN AND MUSCLE FIBERS OF MEDITERRANEAN BUFFALOES

### Abstract

Knowing of the great productive potential of the water buffalo as meat producer and of the importance of the research of muscle fiber types for the characterization of the meat quality, the aim of the study was to evaluate Myosin Heavy Chain Isoforms (MyHC) and the muscle fiber types of *Longissimus dorsi* (LD) and *Semitendinosus* (ST) muscles of 28 Mediterranean buffaloes not-castrated and its possible modulation according with the different slaughter weights (450, 480, 510 and 540 kg). Samples of the muscles were collected and submitted the electrophoresis (SDS-PAGE), m-ATPase and NADH-TR techniques. The relative percentage of isoforms MyHC were measured, as well as, frequency, area and diameter of muscle fiber types. The absence of MyHC IIb isoform in Mediterranean buffaloes was evidenced, which had only three MyHC isoforms (IIa, IIx/d and I), whose percentage had not varied significantly ( $P > 0.05$ ) between the slaughter weights. The presence of hybrid fibers (IIA/X) in muscles LD and ST allowed to the classification of the fiber types for a contraction activity, in *fast* and *slow*. For both muscles, the frequency was higher for fiber *fast* in all the evaluated categories, however had differences ( $P < 0.05$ ) in the frequency of muscle fiber types LD and ST in the slaughter weights evaluated. The animals of slaughter weight 540 kg showed higher values for area and diameter of the fibers, as much for the LD as well as the ST. Muscle ST presented greater values of area and diameter than muscle LD for all slaughtered weights evaluated, disclosing the more delayed growth.

**Keywords:** MyHC, Skeletal muscle, Water buffalo

## 1. Introdução

A demanda alimentar por proteína animal e a exigência por um produto saudável e de qualidade têm aumentado constantemente. Neste contexto, o bubalino (*Bubalus bubalis*) aparece como mais uma alternativa e demonstra capacidade de suprir as necessidades dos consumidores de proteína animal. Sistemas de produção que visam o aumento da massa muscular em menor período de tempo têm revelado que o bubalino demonstra grande aptidão para o ganho de peso e, conseqüentemente, para o alto rendimento de carcaça e de cortes comerciais (Jorge et al., 1997; Vaz, Restlé, Bondaini & Pacheco, 2003; Jorge, Andrighetto, Millen, Calixto & Vargas, 2006; Francisco, Jorge, Andrighetto, Rodrigues, Pinheiro & Silva, 2009). Porém, para que esse desempenho seja satisfatório o conhecimento sobre o desenvolvimento e o crescimento muscular é imprescindível.

Alguns fatores podem promover modificações no perfil miofibrilar, como sexo, idade, função do músculo, tipo de inervação, herança genética, condições ambientais, como também o sistema de produção (Ashmore, 1974; Arnold & Meyer, 1988; Ozawa et al., 2000; Bee, Calderini, Biolley, Guex, Herzog & Lindemann, 2007).

Animais produtores de carne submetidos a um sistema intensivo de criação apresentam maior frequência das fibras de contração rápida comparada a das fibras lentas, porém, Solomon, West e Carpenter (1985) observaram, em bubalinos, a ausência da fibra FG no músculo *longissimus* e elevada frequência das fibras SO comparada a FOG, sugerindo que estes animais estariam, ainda, sob efeito da seleção natural (constante instinto de fuga) o que aumentaria a necessidade pelas fibras oxidativas, já que essas respondem a fadiga mais lentamente que as fibras glicolíticas.

Estudos com várias espécies domésticas (Ashmore, Tompkins & Doerr, 1972; Pette & Staron, 2000; Peinado et al., 2004; Albrecht, Teuscher, Ender & Wegner, 2006) têm abordado a importância do conhecimento das características das fibras

musculares e suas possíveis modulações durante o crescimento. A utilização de métodos histoquímicos, como a m-ATPase, e a técnica de eletroforese possibilitam uma melhor classificação dos tipos de fibras.

O perfil eletroforético da miosina de cadeia pesada (MyHC) permite revelar as isoformas de miosinas (MyHC I, MyHC IIa, MyHC IIx ou MyHC IIc e MyHC IIb) existentes no músculo, as quais não poderiam ser identificadas somente com análises convencionais como a m-ATPase. Contudo, há uma relação entre as fibras identificadas pela ATPase e as isoformas de miosinas obtidas na eletroforese, pois, uma fibra muscular pode conter especificamente uma isoforma, ou seja, fibra lenta oxidativa (*slow twitch oxidative* - SO, IA,  $\beta$ R ou vermelha) contém MyHC I; fibra rápida oxidativa/glicolítica (*fast twitch oxidative glycolytic* - FOG, IIA,  $\alpha$ R ou vermelha) contém MyHC IIa; fibra rápida glicolítica (*fast twitch glycolytic* - FG, IIB,  $\alpha$ W ou branca) contém MyHC IIb. Essas fibras são denominadas puras. Entretanto, a fibra pode conter simultaneamente várias isoformas de MyHC e ser denominada de fibra híbrida, em contraste com a fibra pura.

Sabendo-se do potencial produtivo da espécie bubalina (*Bubalus bubalis*) como produtora de carne e da escassez de trabalhos referentes às possíveis modulações das fibras musculares no desenvolvimento desses animais, objetivou-se com este trabalho caracterizar o perfil das isoformas das miosinas de cadeia pesada e a análise dos tipos de fibras dos músculos *Longissimus dorsi* e *Semitendinosus* de bubalinos Mediterrâneo terminados em confinamento, abordando as possíveis modulações das fibras musculares de acordo com os diferentes pesos de abate.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Local, animais utilizados, instalações e período experimental*

O experimento foi desenvolvido na Universidade Estadual Paulista – FMVZ - UNESP, Botucatu/SP, Brasil, sendo realizado de acordo com os princípios éticos na

experimentação animal (protocolo nº 07/2008-CEEA) determinados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da referida instituição.

As análises das fibras musculares foram realizadas no laboratório de Biologia do Músculo Estriado do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências – UNESP - Botucatu/SP, Brasil.

Foram utilizados 28 bubalinos (*Bubalus bubalis*) machos, não-castrados, puros de origem, da raça Mediterrâneo, filhos de um mesmo touro, recriados em pastagem nativa e com idade média inicial de  $14 \pm 1,66$  meses e peso vivo (PV) médio inicial de aproximadamente  $330 \pm 9,62$  kg, que foram adquiridos do rebanho da Fazenda Três Rios, situada no município de Caraguatatuba, litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil.

Ao chegarem ao local do experimento, os animais foram pesados, após jejum de sólidos e líquidos de 16 h, identificados com brincos numerados e submetidos ao controle de endo e ectoparasitas. Os mesmos foram mantidos em regime de confinamento, distribuídos aleatoriamente em quatro baias coletivas, as quais possuíam área total de 300 m<sup>2</sup>, sendo 70 m<sup>2</sup> cobertos com sombra artificial por meio de sombrite; e providas de 10 metros lineares de comedouro de concreto e bebedouro do tipo australiano com capacidade para 1.500 litros e bóia automática.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, com sete animais cada, que correspondiam às categorias de pesos preconizadas para o abate: 450, 480, 510 e 540 kg PV.

O período de adaptação, às instalações e à alimentação, foi de 28 dias. Durante todo o período experimental, os animais receberam ração balanceada *ad libitum*, formulada segundo as normas do NRC (1996), nível 2, de modo à permitir um ganho médio diário de 1,3 kg PV. A proporção concentrado:volumoso foi mantida próxima de 70:30, na matéria seca (MS).

Os animais eram alimentados duas vezes ao dia (refeições iguais) às 8h00 e às 15h00. A quantidade de ração foi ajustada, de forma que as sobras foram mantidas entre 5 e 10% do fornecimento inicial. Tanto a quantidade de ração fornecida quanto as sobras foram registradas, semanalmente, para que fosse possível realizar o ajuste do consumo de alimentos.

A composição percentual da dieta e dos nutrientes utilizados no experimento é apresentada na Tabela 1.

## 2.2. Manejo pré-abate, abate e coleta dos dados

As pesagens dos animais foram realizadas a cada 28 dias. Quando próximos dos pesos pré-estabelecidos para o abate (450, 480, 510 e 540 kg PV) os animais eram pesados a intervalos mais curtos, a cada 14 dias. Antes do abate, os animais foram submetidos a um período de jejum de 16 horas, com livre acesso à água. O abate foi realizado em frigorífico comercial, obedecendo ao fluxo normal do estabelecimento, a insensibilização foi realizada com pistola de dardo cativo e posterior sangria por seção da veia jugular.

As carcaças foram lavadas com água clorada (500 ppm de cloro ativo) e, em seguida, submetidas ao resfriamento tradicional, por 24 horas à temperatura ambiente da câmara de 0 a 4 °C.

Decorrido o resfriamento, a meia-carcaça esquerda de cada animal foi seccionada entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas e, durante os procedimentos de desossa, foram retiradas amostras do músculo *Longissimus dorsi* (LD) entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas, e do músculo *Semitendinosus* (ST), tomando-se o devido cuidado para que as amostras fossem retiradas de uma mesma região do músculo de cada animal. Foram coletados aproximadamente 10 g de cada músculo para análise das fibras, as quais foram mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos, sendo em seguida processadas. O processamento consistiu em retirada de um fragmento com aproximadamente 0,5

cm<sup>3</sup> que foram passados em talco, imersos em nitrogênio líquido por um minuto e acondicionados em tubos plásticos (Eppendorfs®) identificados; após isso foram transportados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer a -80 °C.

### 2.3. Eletroforese SDS-PAGE

Para a análise das miosinas de cadeia pesada, as amostras dos músculos foram processadas de acordo com a metodologia de Toniolo et al. (2007) e submetidas à corrida eletroforética.

A separação das isoformas de MyHC foi realizada segundo a metodologia de Mizunoya, Wakamatsu, Tatsumi e Ikeuchi (2008) com algumas adaptações. O gel de separação foi obtido a partir de 35% v/v glicerol (100%), 2,667% v/v acrilamida-bis (99:1), 0,995% v/v água destilada, 1,333% v/v 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 1% v/v 1 M glicina, 0,4% v/v SDS (10%), 0,1% v/v persulfato de Amônio (10%), 0,005% v/v TEMED. O gel de empacotamento consistiu em 30% v/v glicerol (100%), 1,333% v/v acrilamida-bis (50:1), 3,362% v/v água destilada, 1,4% v/v 0,5 M Tris-HCl (pH 6,7), 0,4% v/v 100 mM EDTA (pH 7,0), 0,4% v/v SDS (10%), 0,1% v/v persulfato de amônio (10%), 0,005% v/v TEMED. Foram utilizadas placas de 16 cm de comprimento, 14 cm de largura e pentes de 0,75 mm de espessura. Em cada poço foi aplicado 15 µl de cada amostra processada. A corrida eletroforética foi realizada a 4 °C por 26 h, 180 V e 13 mA. Os géis foram corados com Coomassie brilliant blue e fotografados por meio do aparelho Image Quant 300TL v.2002.01 – Analysis Software (GE HealthCare). A quantificação das cadeias de miosinas foi realizada por densitometria, por meio do software Image Master VDS (v.3.0), com base densidade óptica integrada (IOD). Como parâmetro para a classificação das isoformas de miosinas de cadeia pesada foi utilizado o músculo *Plantaris* de rato.

#### 2.4. Avaliação da morfometria e das características dos tipos de fibras musculares

As amostras foram retiradas do freezer, transportadas em nitrogênio líquido e transferidas para o micrótomo criostato a -20 °C (Leica CM 1900, Leica).

Para a realização dos cortes, os fragmentos musculares foram fixados perpendicularmente em suportes metálicos do próprio micrótomo, com a ajuda da resina *Jung Tissue Freezing Medium* (Leica Instruments), onde várias séries de cortes com 10 µm de espessura foram obtidos e fixados em lâminas previamente identificadas.

A orientação das fibras musculares e a integridade das amostras foram verificadas com a primeira série de cortes por meio da técnica da Hematoxilina-Eosina (HE), descrita por Lillie (1954).

Para a montagem das lâminas, os cortes foram desidratados rapidamente em álcool (95%, 100% I, 100% II, 100% III) e xilol (álcool/xilol -50%/50%, xilol I, xilol II, xilol III montagem). A resina utilizada para a fixação da lamínula foi o Permount.

Uma segunda série de cortes foi utilizada para demonstração do metabolismo oxidativo da nicotinamida adenina tetrazólio redutase (NADH-TR), utilizando a técnica modificada por Dubowitz e Brooke (1973), que consiste em: aplicação da solução de NADH sobre os cortes, obtida a partir de 4,5 mg de NADH reduzido; 5,6 mg de NBT (Nitro Blue Tetrazolium) e 5,6 ml de Tampão Tris (0,2 M e pH 7,4); incubação em estufa a 37 °C por 40 minutos; lavagem das lâminas com água destilada para retirar o excesso da solução; fixação em formol 5% tamponado por 5 minutos; lavagem com água destilada. A desidratação e a montagem das lâminas foram realizadas como citado anteriormente.

Posteriormente, uma terceira série de cortes foram submetidos à reação histoquímica de ATPase-miofibrilar (Lowe, 1997) com incubação alcalina, cujos os pHs foram padronizados neste estudo para os músculos dos bubalinos (pH=9,83 e pH=9,53, para os músculos LD e ST, respectivamente). Essa técnica foi utilizada para

verificação da atividade contrátil e diferenciação dos tipos de fibras musculares, e consistiu na preparação de três soluções iniciais: Solução A (Glicina 0,1 M) - 0,75 g de Glicina, 0,585 g NaCl, 100 ml Água destilada; solução B (Glicina/NaCl 0,1 M com  $\text{CaCl}_2$  0,75 M) – 50 ml solução A e 10 ml  $\text{CaCl}_2$  0,75 M (foi adicionado NaOH 0,1 M até atingir pH entre 9,6 e 9,8, aferindo sempre com um pHômetro); solução C (ATP) – 5 mg ATP em 10 ml solução B, na qual ajustou-se o pH desejado adicionando-se NaOH 0,1 M (para pH mais alcalino do que a solução inicial) ou HCl 0,1 M (para pH menos alcalino do que a solução inicial). As etapas seguintes consistiram em: incubação dos cortes na solução C em estufa por tempo determinado na padronização e de acordo com cada músculo (LD = 15'; ST= 13'); lavagem das lâminas com água destilada tomando o devido cuidado para que os cortes não se desprendam da lâmina; Aplicar  $\text{CoCl}_2$  2% sobre os cortes e deixar agir por 5 minutos; Enxaguar bem as lâminas com água destilada; Adição da solução de Sulfeto de Amônio (1:10) por 30 segundos. Procedeu-se a desidratação dos cortes e a montagem das lâminas como citado anteriormente.

Para as mensurações da frequência, da área e do menor diâmetro, cinco campos foram amostrados em cada corte, resultando em aproximadamente 400 fibras por animal, por intermédio do analisador de imagens computadorizadas (Digital Image Analysis System QWin v3 for Windows / Leica, Wetzlar, Germany), utilizando objetiva de 20x (1 pixel = 0,4  $\mu\text{m}$ ).

## 2.5. Análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (pesos de abate) e sete repetições.

A análise dos dados obtidos das diversas variáveis foi realizada pelo procedimento GLM (General Linear Model) do Sistema de Análise Estatística (SAS,

2001). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e consideradas significativamente diferentes se  $P < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1. Eletroforese

A eletroforese dos músculos LD e ST revelou, para todas as categorias de pesos de abate, três bandas de intensidades variáveis que foram caracterizadas como isoformas da MyHC a partir da comparação com o padrão utilizado (músculo *Plantaris* de rato). De acordo com Weydert et al. (1983), pequenos roedores apresentam quatro isoformas da MyHC (I, IIa, IIx/d, IIb) pois a separação eletroforética das isoformas MyHC IIx e MyCH IIb é dificultada devido a proximidade de seus pesos moleculares, fazendo com que apareçam em uma única banda definida como MyHC IIx/d (Bee, Solomon, Czerwinski, Long & Pursel, 1999).

Assim, nos bubalinos deste experimento observamos a presença das isoformas MyHC IIa, MyHC IIx/d e MyHC I, respectivamente (Fig. 1), e a ausência da isoforma MyHC IIb nos músculos LD e ST.

Nas Figs. 2a e 2c são apresentadas as porcentagens relativas das três isoformas de MyHC encontradas em ambos os músculos, assim como, a porcentagem agrupada (Figs. 2b, 2d) em *fast* (MyHC IIa e MyHC IIx/d) e *slow* (MyHC I), para cada categoria de peso de abate. A análise dos dados demonstra que a frequência de uma mesma isoforma não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre as categorias de peso de abate, tanto para o músculo LD quanto para o ST.

Ao agrupar as isoformas, classificando-as somente em *fast* e *slow*, observa-se que ambos os músculos apresentam uma maior porcentagem de isoformas *fast* (LD - 65, 61, 59 e 65%; ST - 89, 93, 92 e 92%, para as categorias de 450, 480, 510 e 540 kg, respectivamente). Porém, a relação *fast:slow* é maior para o músculo ST do que

para o LD (Figs. 2b, 2d). As porcentagens *fast* e *slow* não apresentaram diferenças significantes ( $P > 0,05$ ) entre as categorias de peso estudadas.

### 3.2. Análise morfológica: HE, m-ATPase e NADH-TR

Analisando a integridade das fibras através da técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), verificou-se que as fibras estavam íntegras e aptas a serem utilizadas em outras análises. Os cortes apresentam fibras em forma de mosaico, característico do tecido animal, com alguns núcleos periféricos aparentemente visíveis. Comparando as categorias de abate, não houve diferença no tamanho das fibras que fosse visualmente perceptível, para ambos os músculos.

A análise de m-ATPase alcalina nos músculos LD e ST revelou três tipos de fibras musculares que permitem classificá-las, de acordo com a atividade contrátil, como *fast* (intensidade forte e moderada) e *slow* (fraca intensidade de coloração).

A reação de NADH-TR possibilitou evidenciar o metabolismo das fibras e, por meio de comparações com cortes seriados, verificar que algumas fibras dos músculos LD e ST, que tiveram forte intensidade na coloração pela m-ATPase, mostraram tanto o metabolismo glicolítico como o oxidativo (Fig. 3). Porém, nos dois músculos analisados, todas as fibras que demonstraram baixa ou moderada atividade miofibrilar (fraca e moderada intensidade de coloração, respectivamente) na reação de m-ATPase apresentaram alta e moderada atividade enzimática, respectivamente, pela técnica de NADH-TR.

### 3.3. Morfometria: Frequência, Área e Diâmetro das fibras musculares

Para as mensurações dos parâmetros frequência, área e diâmetro, as fibras foram classificadas de acordo com sua atividade contrátil, em *fast* e *slow*.

A Tabela 2 apresenta os resultados das mensurações nos músculos LD e ST.

Os resultados para frequência dos tipos de fibras, no músculo LD, demonstraram que houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre as categorias de peso de abate. Animais com peso de abate aos 450 kg apresentaram menor frequência das fibras do tipo *slow* e maior do tipo *fast* quando comparados aos mesmos tipos de fibras dos animais da categoria 510 kg. Ao analisar os dados para este mesmo parâmetro no músculo ST, também se constata diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as categorias, no entanto, resultados apontam que animais da categoria de 450 kg possuem uma maior quantidade de fibras *slow* e menor de fibras *fast* quando confrontados com os animais das demais categorias de peso de abate.

Para ambos tipos de fibras mensuradas no músculo LD, os animais das categorias 450 e 540 kg manifestaram menores e maiores áreas ( $P < 0,05$ ), respectivamente, comparados aos outros pesos de abate; essa evolução no tamanho da área não foi significativa ( $P > 0,05$ ) para o músculo ST.

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) para o parâmetro diâmetro das fibras *fast*, em ambos os músculos, entre as categorias avaliadas. As fibras *slow* atingiram o maior diâmetro na categoria 540 kg de peso ao abate, apresentando diferenças ( $P < 0,05$ ) entre as demais categorias.

As fibras do músculo ST obtiveram valores para os parâmetros área e diâmetro numericamente superiores as fibras do músculo LD em todas as categorias de peso de abate analisadas.

#### **4. Discussão**

O foco deste estudo foi fazer uma caracterização de dois músculos de bubalinos Mediterrâneo através da observação do perfil eletroforético das miosinas de cadeia pesada (MyHC), dos tipos de fibras e suas possíveis modulações de acordo com os pesos de abate preconizados. Foi possível evidenciar que bubalinos Mediterrâneos, produzidos nas condições deste estudo, apresentam três isoformas da miosina de

cadeia pesada (MyHC I, MyHC IIa e MyHC IIx/d) cujas porcentagens relativas foram diferentes para cada músculo analisado. Essa diferença nas porcentagens das isoformas está relacionada com a função de cada músculo. Músculos posturais que são requisitados constantemente, como o LD, apresentam maior quantidade de isoformas MyHC I, comparados aos músculos de explosão, como o ST.

Além deste fato, ficou constatado que bubalinos não possuem a isoforma MyHC IIb. Estudos (Chikuni, Tanabe, Muroya & Nakajima, 2001; Mascarello, Maccatrozzo, Toniolo & Reggiani, 2004; Toniolo et al., 2004) relataram que, em grandes mamíferos, a isoforma MyHC IIb é perceptível no RNAm de músculos especializados como o extraocular, masseter e retrator do bulbo, sendo que, sua presença em músculo esquelético é encontrada somente em suínos, ratos e marsupiais. Em estudo com diversas espécies de animais, Chikuni, Muroya e Nakajima (2004) também verificaram a ausência dessa isoforma em bubalino.

A evidência neste estudo de que bubalino não possui a isoforma MyHC IIb gera controvérsia a respeito da classificação dos tipos de fibras pelo método da m-ATPase. Sabendo-se que fibras puras são aquelas que possuem uma única isoforma de MyHC, pode-se afirmar que bubalinos não possuem fibras do tipo IIB e que, na realidade, as fibras que reagem intensamente pela técnica de ATPase alcalina são fibras híbridas, possivelmente fibras 2A/X ou 2X/D. Solomon et al. (1985), ao avaliarem o músculo *longissimus* de bubalinos pelas técnicas de m-ATPase e NADH-TR, observaram a presença de dois tipos de fibras, FOG (IIA) e SO (IA), sendo que o tipo SO apresentou maior frequência. No presente estudo, foram evidenciados três tipos de fibras por intermédio das mesmas reações utilizadas por esses autores. Assim, foi possível confrontar, por meio de cortes seriados realizados nos músculos LD e ST, a atividade contrátil (m-ATPase) com o metabolismo oxidativo (NADH-TR) de cada fibra. Essa comparação revelou que fibras que apresentam a mesma atividade contrátil podem

revelar metabolismo mais intenso ou moderado, fato que reforça a idéia da presença da fibra híbrida.

Dados da literatura (Gorza, 1990; Gil, López-Albors, Vázquez, Latorre, Ramírez-Zarzosa & Moreno, 2001; Peinado et al., 2004) demonstraram que situação similar à descrita no presente experimento ocorreu em outras espécies animais (cunídeos, ovinos, roedores, suínos), onde os autores descreveram que fibras FOG e FG não podem ser comparadas com fibras IIA e IIB, respectivamente, pois algumas fibras IIB apresentaram atípica atividade oxidativa e que podem corresponder a um tipo de fibra particular nomeada de IIX. O aparecimento e/ou identificação desse tipo de fibra em bubalinos pode ser atribuída ao efeito da domesticação (Ashmore et al., 1972) destes animais, atuando na redução da exigência para a resistência muscular, ou seja, na diminuição da proporção de fibras *slow*.

Pela grande dificuldade de diferenciar os tipos de fibras puras (IIA e IIX) das fibras híbridas (IIA/X e IIX/D) a partir da intensidade das reações histoquímicas e sabendo que a classificação por tal método pode induzir ao erro, optou-se por classificar e, posteriormente, mensurar a área e o diâmetro dos tipos de fibras musculares de bubalinos, considerando a atividade contrátil pela classificação das fibras em *fast* e *slow*.

Desta forma, foi possível constatar uma maior frequência de fibras *fast* nos músculos LD e ST, tanto pela avaliação das isoformas de MyHC quanto das fibras analisadas pelo método de m-ATPase, que talvez esteja relacionada com o sistema de produção. Animais desenvolvidos para a produção de carne e condicionados a um sistema intensivo, como nas condições deste estudo, tendem a apresentar modulação das fibras. Nesse tipo de criação os animais permanecem mais ociosos, assim, os músculos que não são frequentemente requisitados acabam modificando seu perfil.

A percepção da modulação fica evidente ao analisar as frequências dos tipos de fibras de ambos os músculos. As fibras *slow* do músculo LD aumentaram sua

frequência até a categoria de peso de abate de 510 kg e diminuíram na categoria 540 kg. Os animais criados nesse sistema se alimentam constantemente fazendo com que os músculos posturais sejam mais solicitados, devido à necessidade de equilíbrio para se manter em pé frente ao comedouro. Ao ficarem mais pesados, os animais diminuem as idas ao comedouro, permanecendo mais tempo ruminando (deitados) pela dificuldade em levantar. Assim, as fibras *slow*, que passam a ser pouco requisitadas, começam a se modular em fibras *fast*. Gotoh (2003) constatou essa mesma transição das fibras no músculo *Longissimus thoraci* de bezerras da raça Japan Black, com aumento de fibras *slow* com paralela depleção das fibras *fast*.

Com relação ao músculo ST, um músculo de explosão utilizado como ponte para a contração e relaxamento de outros músculos, possui sua função reduzida em sistema de criação intensivo, já que nesse sistema não há necessidade nem possibilidade do animal percorrer grandes distâncias em busca de alimento. Desta forma, um músculo que é utilizado esporadicamente aumenta sua característica *fast* a partir da modulação das poucas fibras *slow* existentes. Pette e Staron (2000) relataram que em situações nas quais os músculos permanecem relaxados e sem sobrecarga, há uma diminuição das fibras *slow* e aumento das fibras *fast*. Pode-se constatar este fato confrontando os dados das frequências dos tipos de fibras da primeira categoria de abate (450 kg) com as demais.

Abordando o desenvolvimento da fibra, ambos os músculos apresentaram maiores valores, para a área e o diâmetro, na última categoria de abate (540 kg), conforme esperado, já que o ganho de peso provoca a hipertrofia das fibras musculares resultando em aumento de tamanho. Além disso, o avanço da maturidade fisiológica também é caracterizada pelo aumento do diâmetro da fibra muscular (Hawkins, Moody & Kemp, 1985).

Outro fato que deve ser enfatizado é a respeito da área da fibra muscular do ST, que não variou estatisticamente entre as categorias de abate e, além disso,

apresentou valores numéricos de área e de diâmetro de fibras superiores comparados aos valores para o músculo LD. Essas características nos permitem evidenciar o desenvolvimento tardio do músculo LD em bubalinos.

### **Conclusão**

É possível prever as modulações nos tipos de fibras musculares, devido ao desenvolvimento dos animais e de acordo com o sistema de produção. A presença ou ausência de alguns tipos de fibras estão relacionadas a vários fatores e o conhecimento desta plasticidade permite direcionar a criação e produzir animais de acordo com a necessidade do mercado. Neste estudo, a técnica da eletroforese em SDS e as análises histoquímicas contribuíram com valiosas informações para a caracterização dos tipos de fibras e estudos das MyHCs. Os músculos LD e ST de bubalinos Mediterrâneo não possuem a isoforma MyHC-IIb, apresentando somente três isoformas de MyHC (I, IIa e IIx/d); para os mesmos músculos, existe três tipos de fibras musculares, evidenciadas pela comparação dos métodos histológicos da m-ATPase alcalina e do NADH-TR em cortes seriados; e, houve maior frequência de fibras *fast* em todas as categorias de peso de abate para ambos os músculos avaliados. Porém, é necessário executar mais trabalhos com a espécie bubalina com o intuito de evidenciar as características do desenvolvimento muscular em diversas situações (sistemas de criação) para que, assim, as manipulações pelo homem na criação desses animais sejam realizadas de modo eficaz.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Estado de São Paulo – FAPESP pelo Auxílio Financeiro, processo 07/59965-4, e pelo fornecimento de bolsa de mestrado processo 07/53487-3.

## Referências

- Albrecht, E., Teuscher, F., Ender, K., & Wegner, J. (2006). Growth and breed-related changes of muscle bundle structure in cattle. *Journal of Animal Science*, *84*, 2959-2964.
- Arnold, A. M., & Meyer, H. H. (1988). Influences of gender, time of castration, genotype, birthtype and feeding regimen on lamb longissimus fiber type proportions. *Journal of Animal Science*, *66*, 2476-2483.
- Ashmore, C. R. (1974). Phenotypic expression of muscle fiber types and some implications to meat quality. *Journal of Animal Science*, *38*, 1158-1164.
- Ashmore, C. R., Tompkins, G., & Doerr, L. (1972). Postnatal development of muscle fiber types in domestic animals. *Journal of Animal Science*, *34*, 37-41.
- Bee, G., Calderini, M., Biolley, C., Guex, G., Herzog, W., & Lindemann, M. D. (2007). Changes in the histochemical properties and meat quality traits of porcine muscles during the growing-finishing period as affected by feed restriction, slaughter age, or slaughter weight. *Journal of Animal Science*, *85*, 1030-1045.
- Bee, G., Solomon, M. B., Czerwinski, S. M., Long C., & Pursel, V. G. (1999). Correlation between histochemically assessed fiber type distribution and isomyosin and myosin heavy chain content in porcine skeletal muscles. *Journal of Animal Science*, *77*, 2104-2111.
- Chikuni, K., Muroya, S., & Nakajima, I. (2004). Myosin heavy chain isoforms expressed in bovine skeletal muscle. *Meat Science*, *67*, 87-94.

- Chikuni, K., Tanabe, S., Muroya, S., & Nakajima, I. (2001). Differences in molecular structure among porcine myosin heavy chain 2a, 2x and 2b isoforms. *Meat Science*, *57*, 311–317.
- Dubowitz, V., & Brooke, M. (1973). *Muscle biopsy: A modern approach*. London: Saunders.
- Francisco, C. L., Jorge, A. M., Andrighetto, C., Rodrigues, E., Pinheiro, R. S. B., & Silva, T. L. S. (2009). Yields of carcass and retail cuts of buffaloes finished in feedlot. In *Proceedings of the 18nd Animal Science Congress*, (pp.297-300), 6-9 May 2009, Vila Real, Portugal.
- Gil, F., López-Albors, O., Vázquez, J. M., Latorre, R., Ramírez-Zarzosa, & Moreno, F. (2001). The histochemical profiles of fibre types in porcine skeletal muscle. *Histology and Histopathology*, *16*, 439-442.
- Gorza, L. (1990). Identification of a novel type II fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti myosin monoclonal antibodies. *Journal of Histochemistry and Citochemistry*, *30*, 257-265.
- Gotoh, T. (2003). Histochemical properties of skeletal muscles in Japanese cattle and their meat production ability. *Animal Science Journal*, *79*, 339-354.
- Hawkins, R. R., Moody, W. G., & Kemp, J. D. (1985). Influence of genetic type, slaughter weight and sex ovine muscle fiber and fat-cell development. *Journal of Animal Science*, *61*, 1154-1163.
- Jorge, A. M., Fontes, C. A. A., Freitas, J. A., Soares, J. E., Rodrigues, L. R. R., Resende, F. D., & Queiróz, A. C. (1997). Carcass dressing percentage and yield of primal cuts from bovines and buffalo slaughtered at different stages of maturity. *Brazilian Journal of Animal Science*, *26*, 1048-1054.
- Jorge, A. M., Andrighetto, C., Millen, D. D., Calixto, M. G., & Vargas, A. D. F. (2006). Production and biological efficiency of feedlot buffaloes from three genetic groups

- and slaughtered in different maturities, *Brazilian Journal of Animal Science*, 35, 252-257.
- Lillie, R. D. (1954). *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 2nd ed. New York: Blakiston.
- Lowe, J. (1997). *Histotechnology technical methods: Enzyme Histochemical Stain - Adenosine Triphosphatase (ATPase)*. Available in <<http://www.nottingham.ac.uk/pathology/protocols/atpase.html>>.Access in: 26 July 2008.
- Mascarello, F., Maccatrozzo, L., Patruno, M., Toniolo, T., & Reggiani, C. (2004). 2B myosin heavy chain Isoform expression in bovine skeletal muscle. *Veterinary Research Communications*, 28, 201–204.
- Mizunoya, W., Wakamatsu, J., Tatsumi, R., & Ikeuchi, Y. (2008). Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system. *Analytical Biochemistry*, 377, 111-113.
- National Research Council - NRC. (1996). *Nutrients requeriments of beef cattle*. 7.ed. Washington, D.C. 244p.
- Ozawa, S., Mitsunashi, T., Mitsumoto, M., Matsumoto, S., Itoh, N., Itagaki, K., Kohno, Y., & Dohgo, T. (2000). The characteristics of muscle fiber types of longissimus thoracis muscle and their influences on the quantity and quality of meat from Japanese Black steers. *Meat Science*, 54, 65-70.
- Peinado, B., Latorre, R., Vázquez-Autón, J. M., Poro, A., Ramírez, G., López-Albors, O., Moreno, F., & Gil, F. (2004). Histochemical skeletal muscle fibre types in the sheep. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 33, 236-243.
- Pette, D., & Staron, R. S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*, 50, 500-509.
- SAS (2001). *SAS user's guide: statistics* (Version 8.2). Cary, NC: SAS Inst. Inc.

- Solomon, M. B., West, R. L., & Carpenter, J. W. (1985). Fiber types in the longissimus muscle from water buffalo and selected domestic beef breeds. *Meat Science*, *13*, 129–135.
- Toniolo, L., Maccatrozzo, L., Patrino, M., Pavan, E., Caliaro, F., Rossi, R., Rinaldi, C., Canepari, M., Reggiani, C., & Mascarello, F. (2007). Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, *292*, 1915-1926.
- Toniolo, L., Patrino, M., Maccatrozzo, L., Pellegrino, M.A., Canepari, M., Rossi, R., D'Antona, G., Bottinelli, R., Reggiani, C., & Mascarello, F. (2004). Fast fibres in a large animal: fibre types, contractile properties and myosin expression in pig skeletal muscles. *The Journal of Experimental Biology*, *207*, 1875-1886.
- Vaz, F. N., Restle, J., Bondaini, I. L., & Pacheco, P. S. (2003). Study of carcass and meat of Mediterranean buffalos finished in feedlot with different roughage sources. *Brazilian Journal of Animal Science*, *32*, 393-404.
- Weydert, A., Daubas, P., Caeravetti, M., Minty, A., Bugaisky, G., Cohen, A., Robert, B., & Buckingham, M. (1983). Sequential accumulation of mRNAs encoding different myosin heavy chain isoforms during skeletal muscle development in vivo detected with a recombinant plasmid identified as coding for an adult fast myosin heavy chain from mouse skeletal muscle. *Journal of Biology and Chemistry*, *258*, 13867–13874.

Tabela 1. Composição percentual da dieta com base na matéria seca (MS).

Composição da Dieta	MS (%)
Silagem de milho	7,8
Feno de <i>coast cross</i>	20,6
Caroço de algodão	8,2
Silagem de grão úmido de milho	46,0
Núcleo*	17,4
Nutrientes Estimados	
Proteína Bruta (%)	13,0
Nutrientes Digestíveis Totais (%)	73,2
Fibra em Detergente Neutro (%)	23,6
Energia Metabolizável (Mcal/kg)	2,7

\*Composição do Núcleo: Ureia (6,25%), Levedura Seca (68,75%), Mistura Mineral\*\* (25%) e Rumensin® (3 ppm de monensina).

\*\*Composição da Mistura Mineral por quilograma de produto: 75 g P, 126 g Ca, 160 g Na, 240 g Cl, 20 g S, 15 mg Mg, 4.000 mg Zn, 1.800 mg Cu, 1.500 mg Fe, 1.400 mg Mn, 150 mg Co, 120 mg I, 15 mg Se, 750 mg F (max), 50 mg palatilizante.

Fig. 1. Perfil eletroforético das isoformas de miosina de cadeia pesada (MyHC) nos músculos *Longissimus dorsi* (LD) e *Semitendinosus* (ST) de bubalinos Mediterrâneo, em gel 8% SDS – PAGE.

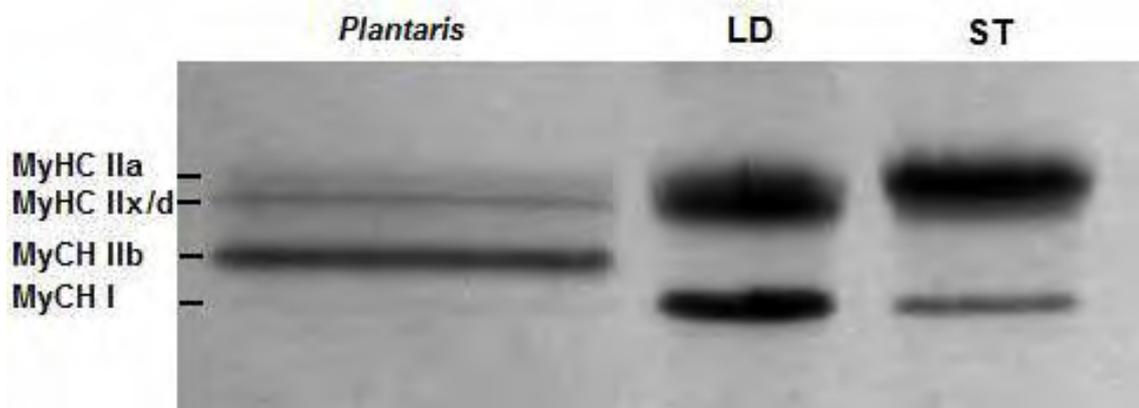


Fig. 2. Porcentagem relativa (%) das isoformas de MyCH presentes nos músculos *Longissimus dorsi* (LD) e *Semitendinosus* (ST) de bubalinos Mediterrâneo abatidos em diferentes pesos.

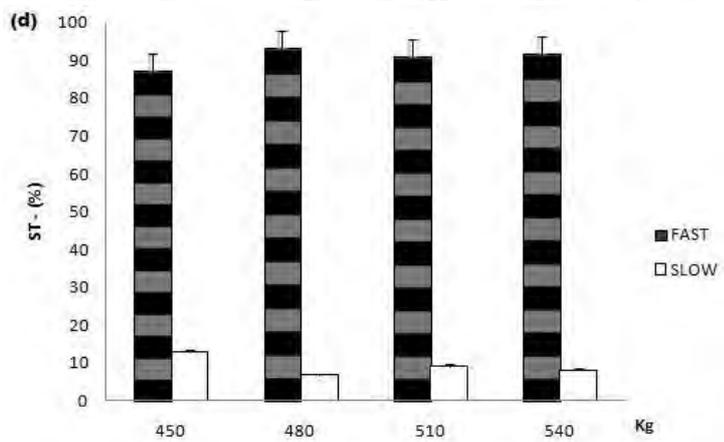
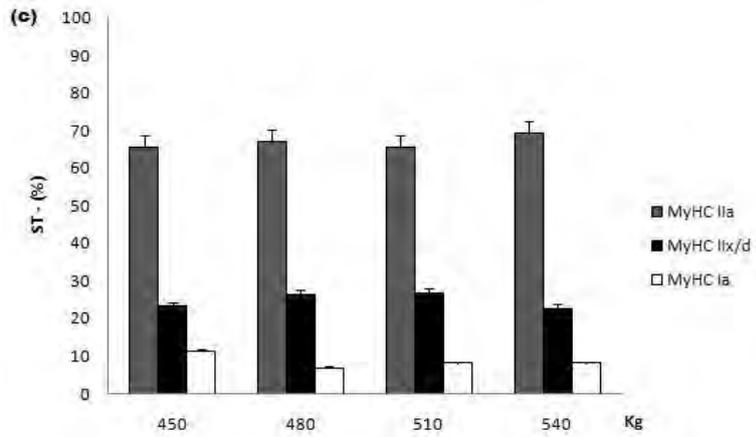
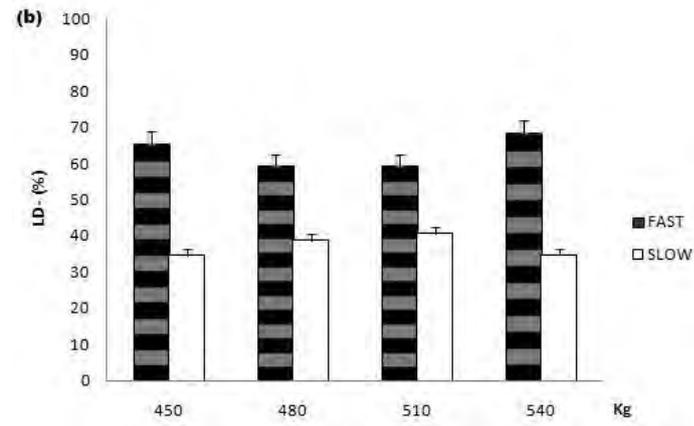
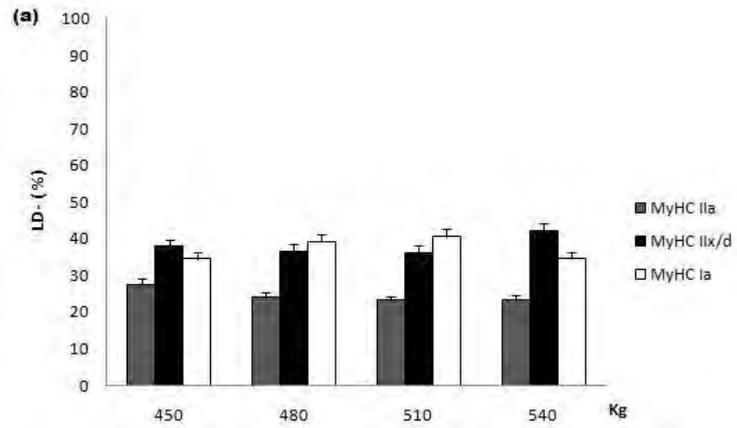


Fig. 3. Técnica de m-ATPase alcalina (esquerda) e NADH-TR (direita) realizada em cortes seriados nos músculos *Longissimus dorsi* (A) e *Semitendinosus* (B) de bubalinos Mediterrâneo. As setas apontam fibras que não tiveram o comportamento metabólico esperado de acordo com a m-ATPase. 1 e 2 = fibras *fast*, intensidade de coloração forte e moderada, respectivamente; 3 = fibra *slow*, intensidade de coloração fraca; G = metabolismo glicolítico; O = metabolismo oxidativo. Aumento 20x.

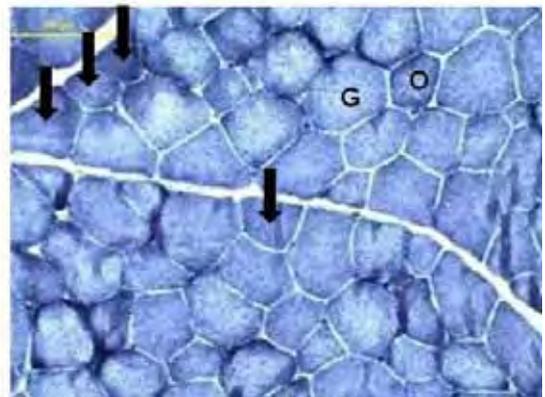
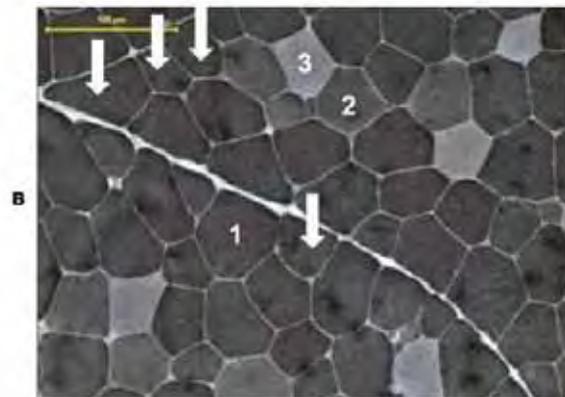
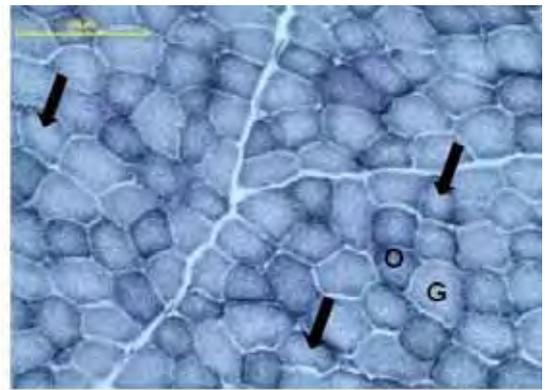
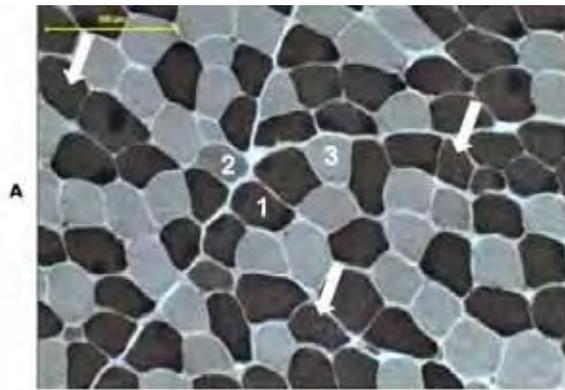


Tabela 2. Valores de frequência, área e diâmetro das fibras dos músculos *Longissimus dorsi* (LD) e *Semitenidosus* (ST) de bubalinos Mediterrâneo abatidos em diferentes pesos.

Variável	Peso de abate (kg)												CV <sup>2</sup> (%)				
	450				480				510					540			
	LD	ST	LD	ST	LD	ST	LD	ST	LD	ST	LD	ST		LD	ST		
<i>Fast</i>																	
Frequência (%)	65,34 <sup>a</sup>	84,13 <sup>B</sup>	59,89 <sup>ab</sup>	89,53 <sup>A</sup>	53,52 <sup>b</sup>	91,88 <sup>A</sup>	56,79 <sup>b</sup>	90,30 <sup>A</sup>	6,90	2,54							
Área (µm <sup>2</sup> )	499,97 <sup>c</sup>	1065,81	748,43 <sup>b</sup>	1252,29	567,30 <sup>bc</sup>	1158,72	1100,89 <sup>a</sup>	1354,90	14,86	27,07							
Diâmetro (µm)	38,10	42,62	36,18	46,95	38,34	44,72	40,80	45,45	13,03	8,51							
<i>Slow</i>																	
Frequência (%)	34,64 <sup>b</sup>	15,87 <sup>A</sup>	40,11 <sup>ab</sup>	10,47 <sup>B</sup>	46,48 <sup>a</sup>	8,12 <sup>B</sup>	43,35 <sup>a</sup>	9,70 <sup>B</sup>	10,02	20,02							
Área (µm <sup>2</sup> )	506,34 <sup>c</sup>	923,73	781,32 <sup>b</sup>	1048,61	724,09 <sup>b</sup>	910,28	1168,77 <sup>a</sup>	1301,70	13,39	25,73							
Diâmetro (µm)	39,24 <sup>ab</sup>	41,96 <sup>AB</sup>	36,99 <sup>b</sup>	42,69 <sup>AB</sup>	35,51 <sup>b</sup>	39,45 <sup>B</sup>	43,79 <sup>a</sup>	47,72 <sup>A</sup>	9,34	9,36							

<sup>a,b,c</sup> Médias seguidas por letras iguais na mesma linha, para o músculo LD, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P < 0,05).

<sup>A,B</sup> Médias seguidas por letras iguais na mesma linha, para o músculo ST, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P < 0,05).

<sup>1</sup>Coeficiente de variação para o músculo LD.

<sup>2</sup>Coeficiente de variação para o músculo ST.

### CAPÍTULO 3

O artigo a seguir está redigido de acordo com as exigências para publicação na revista *Meat Science*, excetuando-se o idioma

**CORRELAÇÃO ENTRE AS ISOFORMAS DE MyHC E TIPOS DE FIBRAS  
MUSCULARES COM PARÂMETROS DE QUALIDADE DA CARNE DE BUBALINOS  
MEDITERRÂNEO**

**Resumo**

Objetivou-se com este estudo correlacionar as isoformas da miosina de cadeia pesada (MyHC) e os tipos de fibras com parâmetros da qualidade do músculo *Longissimus dorsi* (LD) de 28 bubalinos Mediterrâneo não-castrados, abatidos em diferentes pesos (450, 480, 510 e 540 kg). Amostras do músculo LD foram coletadas entre a 12-13ª costelas e submetidas às técnicas de eletroforese (SDS-PAGE) e m-ATPase alcalina, e as avaliações referentes às características qualitativas, como cor (Co), marmorização (Mrb) e força de cisalhamento (FC). Porcentagem das isoformas da miosina (%MyHC IIa, %MyHC IIx/d, %MyHC I), assim como, frequência (*Ffast*, *Fslow*), área (*Afast*, *Aslow*) e diâmetro (*Dfast*, *Dslow*) das fibras musculares foram mensuradas. Foi possível observar alterações na qualidade da carne dos bubalinos de acordo com as mudanças ocorridas nos tipos de fibras de acordo com o aumento do peso de abate. Constatou-se correlação ( $P < 0,05$ ) entre o peso de abate e os parâmetros %MyHC IIa ( $r = -0,51$ ), %MyHC IIx/d ( $r = 0,38$ ), *Ffast* ( $r = -0,63$ ), *Fslow* ( $r = 0,63$ ), *Afast* ( $r = 0,79$ ), *Aslow* ( $r = 0,87$ ), *Dslow* ( $r = 0,38$ ), Mrb ( $r = 0,34$ ) e FC ( $r = 0,70$ ). As variáveis Mrb e FC foram correlacionadas positivamente ( $P < 0,05$ ) com a *Aslow* ( $r = 0,42$ ;  $r = 0,68$ , respectivamente). A cor da carne foi influenciada pelo diâmetro da fibra *slow* ( $r = 0,39$ ;  $P < 0,05$ ). A maciez da carne avaliada nos bubalinos tem correlação com a área das fibras musculares.

**Palavras chave:** Búfalo de rio, carne, *Longissimus*, maciez

## **CORRELATIONS BETWEEN MUSCLE FIBER CHARACTERISTICS AND MEAT QUALITY TRAITS OF MEDITERRANEAN BUFFALOES**

### **Abstract**

The aim of this study was to correlate Myosin Heavy Chain Isoforms (MyHC) and the muscle fiber types with different parameters of quality in *Longissimus dorsi* muscle (LD) of 28 not-castrated Mediterranean buffaloes slaughtered in different weights (450, 480, 510 and 540 kg). Samples of the LD were collected between 12-13th ribs and submitted to the techniques of electrophoresis (SDS-PAGE), alkaline m-ATPase and evaluations to the qualitative characteristics, color (Co), marbling (Mrb) and shear force (SF). Relative percentage of isoforms (%MyHC IIa, %MyHC IIx/d, %MyHC I), as well as, muscle fiber frequency (*Ffast*, *Fslow*), area (*Afast*, *Aslow*) and diameter (*Dfast*, *Dslow*) were measured. It was possible to observe alterations in the water buffalo meat quality according to the changes that occurred in muscle fiber types influenced by the increase of the slaughter weight. Correlation was evidenced ( $P < 0.05$ ) between the slaughter weight and the parameters %MyHC IIa ( $r = -0.51$ ), %MyHC IIx/d ( $r = 0.38$ ), *Ffast* ( $r = -0.63$ ), *Fslow* ( $r = 0.63$ ), *Afast* ( $r = 0.79$ ), *Aslow* ( $r = 0.87$ ), *Dslow* ( $r = 0.38$ ), Mrb ( $r = 0.34$ ) and SF ( $r = 0.70$ ). The variable Mrb and SF were correlated positively ( $P < 0.05$ ) with the *Aslow* ( $r = 0.42$ ;  $r = 0.68$ , respectively). Meat color was influenced by the *slow* fiber diameter ( $r = 0.39$ ;  $P < 0.05$ ). The meat tenderness found in this experiment is related to the area of muscle fiber types.

**Keywords:** *Longissimus*, Meat, tenderness, buffaloes

## 1. Introdução

Alguns parâmetros de qualidade da carne como cor, maciez e marmorização têm peso fundamental no momento da escolha do produto pelo consumidor. A criação de animais em sistemas de produção que favoreçam tais atributos tem sido foco de muitos produtores e frigoríficos. Estudos revelam que o bubalino apresenta alto rendimento de cortes cárneos, com notáveis características de qualidade química e sensorial. A criação desses animais pode contribuir para o incremento da produção de carne de alto valor biológico, atendendo às exigências dos consumidores (Jorge et al., 1997; Jorge, Andrighetto, Millen, Calixto & Vargas, 2006; Andrighetto, Jorge, Roça, Rodrigues, Bianchini & Francisco, 2008; Lapitan et al., 2008; Francisco, Jorge, Andrighetto, Rodrigues, Pinheiro & Silva, 2009).

Vários autores (Renand, Picard, Touraille, Berge & Lepetit, 2001; Kolczak, Pospiech, Palka & Lacki, 2003; Sawdy, Kaiser, St-Pierre & Wick, 2004) afirmam que são múltiplos os mecanismos envolvidos na expressão da qualidade da carne, e que os efeitos da produção influenciam as características musculares (colágeno, fibras, lipídios, enzimas) atuando nos atributos sensoriais. Outros estudos têm apresentado correlações entre os tipos de fibras musculares ou isoformas de miosina de cadeia pesada (MyHC) e a qualidade da carne (Klont, Brocks & Eikelenboom, 1998; Chang et al., 2003; Maltin, Balcerzak, Tilley & Delday, 2003; Chikuni, Muroya & Nakajima, 2004).

Ao analisarmos os tipos de fibras musculares e suas relações com a qualidade da carne, é importante considerar a função a qual o músculo avaliado está relacionado. Músculos posturais, como o *longissimus*, ou outros que também são usados continuamente pelo animal, têm uma proporção elevada de fibras vermelhas (oxidativas). Já os músculos que são utilizados ocasionalmente, têm uma proporção elevada de fibras brancas (glicolíticas). Além disso, músculos que possuem grande proporção de fibras vermelhas necessitam de produção energética contínua e, conseqüentemente, de uma fonte constante de oxigênio, nutrientes e de remoção de

resíduos, caracterizada pela circulação sanguínea (Ashmore, Topinkins & Doerr, 1972). A rede de capilares que abastece as fibras vermelhas está relacionada diretamente a deposição de gordura intramuscular (Gotoh, 2003; Franck, Figwer, Godfraind, Poirel, Khazzaha & Ruchoux, 2007), pois as arteríolas invadem as fibras vermelhas formando uma rede onde a gordura intramuscular é inicialmente depositada. Desta forma, músculos que apresentam em sua composição maior proporção de fibras vermelhas são dotados de maior quantidade de gordura intramuscular. Além disso, esses tipos de músculos exibem coloração mais intensa (escura) devido a presença de grande quantidade do pigmento mioglobina nas fibras vermelhas (Pearson & Young, 1989).

Esses fatores, somados ao efeito da domesticação dos animais produtores de carne sobre as propriedades das fibras musculares, podem influenciar os processos bioquímicos do músculo, tanto no pré como no *post mortem*, refletindo diretamente na qualidade da carne.

Objetivou-se com este estudo correlacionar os tipos de fibras e miosinas de cadeia pesada existentes no músculo *Longissimus dorsi* de bubalinos Mediterrâneo abatidos em diferentes pesos com parâmetros relacionados à qualidade da carne.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Instalações, animais utilizados e período experimental*

O ensaio experimental foi desenvolvido na Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu/SP, Brasil, sendo realizado de acordo com os princípios éticos na experimentação animal (protocolo n° 07/2008-CEEA) determinados pela Câmara de Ética em Experimentação Animal da referida instituição.

As análises das fibras musculares foram realizadas no laboratório de Biologia do Músculo Estriado do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências - UNESP, Botucatu/SP, Brasil.

Foram utilizados 28 bubalinos (*Bubalus bubalis*) machos, não-castrados, puros de origem, da raça Mediterrâneo, filhos de um mesmo touro, recriados em pastagem nativa e com idade média inicial de  $14 \pm 1,66$  meses e peso vivo (PV) médio inicial de aproximadamente  $330 \pm 9,62$  kg, adquiridos do rebanho da Fazenda Três Rios, situada no município de Caraguatatuba, litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil.

Os animais foram mantidos em regime de confinamento, distribuídos aleatoriamente em quatro baias coletivas (sete animais em cada baia), as quais possuíam área total de  $300 \text{ m}^2$ , sendo  $70 \text{ m}^2$  cobertos com sombra artificial por meio de sombrite; e providas de 10 metros lineares de comedouro de concreto e bebedouro do tipo australiano com capacidade para 1.500 litros com bóia automática.

O período de adaptação, às instalações e à alimentação, foi de 28 dias. Durante todo o período experimental, os animais receberam ração balanceada *ad libitum* fornecida duas vezes ao dia e formulada segundo as normas do NRC (1996), nível 2, de modo a permitir um ganho médio diário de 1,3 kg PV. A proporção concentrado:volumoso foi mantida próxima de 70:30, na matéria seca (MS). A quantidade de ração foi ajustada para que as sobras fossem mantidas entre 5 e 10% do fornecimento inicial. A composição percentual da dieta e dos nutrientes utilizados no experimento é apresentada na Tabela 1.

## 2.2. Manejo pré-abate, abate e coleta dos dados

As pesagens dos animais foram realizadas a cada 28 dias. Quando próximos do peso pré-estabelecido para o abate (450, 480, 510 e 540 kg PV) os animais eram pesados a intervalos mais curtos, a cada 14 dias. Antes do abate, os animais foram submetidos a um período de jejum de 16 horas, com livre acesso à água. O abate foi realizado em frigorífico comercial, obedecendo ao fluxo normal do estabelecimento, e deu-se por insensibilização com pistola de dardo cativo e posterior sangria por seção da veia jugular.

As carcaças foram lavadas com água clorada (500 ppm de cloro ativo) e, em seguida, submetidas ao resfriamento tradicional, por 24 horas à temperatura ambiente da câmara de 0 a 4 °C. Decorrido o resfriamento, a meia-carcaça esquerda de cada animal foi seccionada entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas e as amostras do músculo *Longissimus dorsi* (LD), utilizadas nas análises, foram coletadas dessa região durante os procedimentos de desossa.

### 2.3. Eletroforese SDS-PAGE

Para a análise das miosinas de cadeia pesada, as amostras dos músculos foram processadas de acordo com a metodologia de Toniolo et al. (2007) e submetidas à corrida eletroforética.

A separação das isoformas de MyHC foi realizada segundo a metodologia de Mizunoya, Wakamatsu, Tatsumi e Ikeuchi (2008) com algumas adaptações. O gel de separação foi obtido a partir de 35% v/v glicerol (100%), 2,667% v/v acrilamida-bis (99:1), 0,995% v/v água destilada, 1,333% v/v 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 1% v/v 1 M glicina, 0,4% v/v SDS (10%), 0,1% v/v persulfato de Amônio (10%), 0,005% v/v TEMED. O gel de empacotamento consistiu em 30% v/v glicerol (100%), 1,333% v/v acrilamida-bis (50:1), 3,362% v/v água destilada, 1,4% v/v 0,5 M Tris-HCl (pH 6,7), 0,4% v/v 100 mM EDTA (pH 7.0), 0,4% v/v SDS (10%), 0,1% v/v persulfato de amônio (10%), 0,005% v/v TEMED. Foram utilizadas placas de 16 cm de comprimento, 14 cm de largura e pentes de 0,75 mm de espessura. Em cada poço foi aplicado 15 µl de cada amostra processada. A corrida eletroforética foi realizada a 4 °C por 26 h, 180 V e 13 mA. Os géis foram corados com Coomassie brilliant blue e fotografados por meio do aparelho Image Quant 300TL v.2002.01 – Analysis Software (GE HealthCare). A quantificação das cadeias de miosinas foi realizada por densitometria, por meio do software Image Master VDS (v.3.0), com base densidade óptica integrada (IOD).

Como parâmetro para a classificação das isoformas de miosinas de cadeia pesada foi utilizado o músculo *Plantaris* de rato.

#### 2.4. Análise morfológica – m-ATPase

As amostras foram retiradas do freezer, transportadas em nitrogênio líquido e transferidas para o micrótomo criostato a -20 °C (Leica CM 1900, Leica).

Para a realização dos cortes, os fragmentos musculares foram fixados perpendicularmente em suportes metálicos do próprio micrótomo, com a ajuda da resina *Jung Tissue Freezing Medium* (Leica Instruments), onde várias séries de cortes com 10 µm de espessura foram obtidos e fixados em lâminas previamente identificadas. Posteriormente, os cortes foram submetidos à técnica histoquímica de ATPase-miofibrilar (Lowe, 1997) com incubação alcalina (pH=9,83), para verificação da atividade contrátil e diferenciação dos tipos de fibras musculares. As fibras foram classificadas em *fast* (forte e moderada intensidade de coloração) e *slow* (fraca intensidade de coloração). Para as mensurações da frequência, da área e do menor diâmetro, cinco campos foram amostrados em cada corte, resultando em aproximadamente 400 fibras por animal, por intermédio do analisador de imagens computadorizadas (Digital Image Analysis System QWin v3 for Windows / Leica, Wetzlar, Germany), utilizando objetiva de 20x (1 pixel = 0,4 µm).

#### 2.5. Análise da cor, escore de marmorização e força de cisalhamento

A cor da carne foi determinada segundo Müller (1980), após o resfriamento das carcaças no período de 24 horas, a uma temperatura de 1 °C. Foi realizado um corte transversal no músculo *Longissimus dorsi*, na região entre a 12<sup>a</sup> e a 13<sup>a</sup> costelas e, após 30 minutos, iniciou-se a avaliação seguindo a escala de pontos (1 = escura; 2 = vermelha escura; 3 = vermelha levemente escura; 4 = vermelha; 5 = vermelha viva).

Para a determinação do escore de marmorização foi utilizada a metodologia descrita pelo USDA Quality Grade (1997), sendo os escores de 1 a 10 onde: 1= praticamente ausente, 2 = traços, 3 = leve, 4 = pouco, 5 = modesto, 6 = moderado, 7 = levemente abundante, 8 = moderadamente abundante, 9 = abundante e, 10 = muito abundante.

Para a realização da análise da força de cisalhamento, foram retiradas amostras do músculo *Longissimus dorsi*, de aproximadamente 2,5 cm de espessura, obtidas entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas da meia-carcaça esquerda de cada um dos animais.

As amostras congeladas foram transferidas para um refrigerador e lá mantidas por aproximadamente 24 horas até atingirem temperatura de 2 a 5 °C. Passado esse tempo, as amostras resfriadas foram assadas em forno elétrico até atingirem temperatura interna de 71 °C, conforme procedimento desenvolvido por Wheeler, Koohmaraie e Shackelford (1995). Após este processo, as amostras foram resfriadas por 24 horas, quando então foi realizada a retirada de seis cilindros de cada amostra, com aproximadamente 1,27 cm de diâmetro, a fim de se obter maior precisão dos dados na determinação da força de cisalhamento. O aparelho utilizado nas análises foi o Warner-Bratzler Shear Force mecânico com capacidade de 25 kgf e velocidade do seccionador de 20 cm/minuto.

## 2.6. Análise estatística

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro tratamentos (pesos de abate) e sete repetições.

A análise dos dados obtidos das diversas variáveis, bem como suas correlações (Pearson), foi realizada pelo procedimento GLM (General Linear Model) do Sistema de Análise Estatística (SAS, 2001). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e consideradas significativamente diferentes se  $P < 0,05$ .

### 3. Resultados e discussão

Os resultados da correlação entre as características morfológicas das fibras musculares e os índices qualitativos da carne de bubalino, obtidos em diferentes pesos de abate, estão apresentados na Tabela 2.

#### 3.1. Correlação entre o peso de abate e as características morfológicas e qualitativas do músculo.

Ao analisar a correlação entre o peso de abate e as isoformas de MyHC, observa-se que houve correlação significativa ( $P < 0,05$ ) para ambas isoformas *fast* (MyHC Ila e MyHC IIX/d) encontradas, porém, essa correlação atuou de forma contrária para cada uma. Ou seja, a MyHC Ila apresentou correlação negativa em relação ao peso de abate, enquanto a isoforma MyHC IIX/d manifestou correlação positiva para o mesmo parâmetro. Ao avaliarmos os dados obtidos na frequência histológica das fibras *fast*, observa-se que, assim como para a MyHC Ila, a correlação ( $P < 0,01$ ) foi inversamente proporcional ao aumento do peso de abate. Além disso, verificou-se correlação significativa e positiva ( $P < 0,01$ ) da frequência de fibras *slow* e o peso de abate. Pode-se atribuir a este fato a modulação dos tipos de fibras (IIX/D → IIA → IA) devido à constante utilização do músculo pelo animal, favorecendo o aparecimento de fibras *slow* durante seu desenvolvimento. Gotoh (2003) também demonstrou aumento na frequência das fibras I (*slow*) de acordo com o aumento da idade dos animais em vários músculos de bovinos Wagyu, dos 11 aos 29 meses de idade. Resultados contrários com bovinos foram relatados por Ashmore et al. (1972), que atribuíram o aumento da quantidade de fibras *fast* ao desenvolvimento pós-natal. Ozawa et al. (2000), analisaram o músculo *Longissimus thoracis* de bovinos e atribuíram o aumento das fibras *fast* ao aumento do peso de abate provocado pela ingestão de dietas de alto valor energético. Esse desencontro de dados pode ser

atribuído a diferenças entre espécie animal, tipo e região do músculo analisado, assim como o tipo de sistema produção que o animal foi submetido.

As correlações entre a área da fibra e o peso de abate foram positivas e significativas ( $P < 0,01$ ) para os dois tipos de fibras, *fast* e *slow*. A área das fibras aumentou de acordo com a elevação do peso de abate, o que caracteriza o desenvolvimento do músculo pela hipertrofia das fibras. Essa situação também se reflete na correlação positiva ( $P < 0,05$ ) entre peso de abate e diâmetro das fibras *slow*, indicando seu aumento.

Para os parâmetros de qualidade e peso de abate (Tabela 2), a análise de correlação demonstrou ( $P < 0,05$ ) que animais mais pesados possuem maior quantidade de marmorização e a carne com maior resistência ao corte. Apesar dessa constatação, os bubalinos deste experimento apresentaram valores baixos para gordura intramuscular avaliada subjetivamente (Tabela 3). A gordura foi praticamente ausente nos animais da categoria de abate 450 kg, e evoluiu para traços e leve, de acordo com o aumento do peso de abate. Essa característica pode estar relacionada com a idade dos animais (jovens), pois a gordura intramuscular é depositada mais tardiamente, depois da gordura subcutânea (Berg & Walter, 1983).

O fato dos animais apresentarem baixa quantidade de gordura intramuscular não comprometeu a maciez da carne, pois os bubalinos apontaram valores satisfatórios para força de cisalhamento que caracterizam a carne como macia, mesmo na categoria de peso de abate mais elevado. Esses aspectos sugerem que a maciez da carne não está vinculada somente aos níveis de gordura intramuscular e sim a outros fatores como proteínas miofibrilares, tecido conjuntivo, sexo, raça, músculo e degradação de proteínas no *post mortem* (Koochmaraie et al., 2002; Kuber et al., 2004). Resultados semelhantes para os parâmetros de qualidade foram encontrados por Andrighetto et al. (2008) ao avaliarem bubalinos Murrah abatidos em diferentes períodos de confinamento (75, 100, 125 e 150 dias). Os resultados obtidos neste

experimento para as variáveis qualitativas da carne favorecem a criação de bubalinos destinados a produção de carne.

### 3.2. Correlação entre as características das fibras e os parâmetros de qualidade da carne

Os parâmetros diâmetro da fibra *slow* e cor (Tabela 2) apresentaram correlação positiva ( $P < 0,05$ ); fato que pode estar correlacionado com a quantidade de mioglobina existente na fibra muscular. Fibras que apresentam metabolismo oxidativo possuem alta quantidade de mitocôndrias e pigmentos de mioglobina em abundância. As fibras do tipo I (*slow*) possuem maior quantidade de mitocôndrias, com ampla distribuição dentro da fibra. Essas características refletem na intensidade da cor vermelha (Pearson & Young, 1989). Wegner, Albrecht, Fiedler, Teuscher, Papstein e Ender (2000), relacionaram a palidez e a baixa quantidade de gordura do músculo *Semitendinosus* à alta frequência das fibras IIB, à pequena área das fibras IIA e I, indicando que a presença das fibras *slow* é fundamental para a coloração vermelha da carne.

Vários autores (Ashmore et al., 1972; Gotoh, 2003) atribuíram a quantidade de gordura intramuscular à presença das fibras vermelhas pelo fato dessas possuírem metabolismo elevado, e alto requerimento de energia, necessitando de constante fonte de oxigênio e nutrientes. Outros autores (Franck et al., 2007) complementaram que existe uma alta correlação entre fibras *slow* e a quantidade de capilares, relacionando isso ao aumento da maciez da carne em músculos que apresentam maior proporção desse tipo de fibra. Porém, os dados do presente estudo apontaram correlação positiva ( $P < 0,05$ ) entre a frequência das fibras *slow* e a força de cisalhamento (Tabela 2), assim como a correlação negativa ( $P < 0,05$ ) desta característica com a frequência das fibras *fast*, o que contradiz os autores citados. Verificou-se que a isoforma MyHC IIA possui correlação negativa ( $P < 0,01$ ) com a força de cisalhamento

do músculo LD. Esse tipo de isoforma está presente em fibras do tipo IIA (intermediária) que apresenta o metabolismo oxidativo/glicolítico e, apesar de também ser considerada uma fibra vermelha, sua contribuição para a maciez seria pequena, pois a quantidade de capilares é menor comparada a das fibras *slow*. A marmorização foi correlacionada positivamente com a isoforma MyHC IId/x, outro fato conflitante, já que essa é a isoforma que mais se aproxima das características da fibra IIB (ausente em bubalino). Estudos revelam que esse tipo de fibra é correlacionado negativamente com a gordura intramuscular (Ozawa et al., 2000; Gotoh, 2003).

Os dados referentes às dimensões dos tipos de fibras indicam correlação positiva entre o tamanho da fibra e o peso de abate. Porém, ao avaliar os valores da área e do diâmetro (Tabela 4) e contrastá-los com os dados existentes na literatura (Iwamoto et al., 1991; Gotoh, 2003), observamos que o bubalino possui menor diâmetro de fibra (35,51 e 38,34  $\mu\text{m}$  para *slow* e *fast*, respectivamente) comparado a bovinos (40,74 e 54,45  $\mu\text{m}$  para *slow* e *fast*, respectivamente) abatidos em idades equivalentes (22 meses). Wegner et al. (2000) relataram que há correlação negativa entre o tamanho da fibra muscular e a maciez da carne em suínos, porém afirmaram que a precisão deste tipo de correlação em bovino ainda não está definida. Contudo, sugerimos que esse fato explique, em partes, valores mais baixos da resistência ao corte da carne dos animais produzidos nas condições deste estudo. Segundo Maltin et al. (2001), outros fatores podem estar relacionados à maciez, como a degradação das proteínas no *post-mortem* e o conteúdo de colágeno ao redor e entre as fibras. Assim, ao se analisar parâmetros relacionados à qualidade da carne, deve-se examinar o conjunto de fatores e acontecimentos que podem influenciar no resultado final.

## **Conclusão**

As características da qualidade da carne de bubalinos sofreram alterações pela variação da fibra muscular atrelada ao desenvolvimento dos mesmos; o tamanho da

fibra muscular apresentou relação com a maciez da carne avaliada, assim como, o tamanho das fibras *slow* com os parâmetros cor e marmorização. Os animais com peso de abate mais elevado possuem carne com maior resistência ao corte e maior grau de marmorização devido a hipertrofia das fibras musculares. Entretanto, mais estudos relacionados às características qualitativas da carne bubalina precisam ser realizados, a fim de elucidar fatores que ainda não estão totalmente esclarecidos com relação a essa espécie.

### **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Estado de São Paulo – FAPESP pelo Auxílio Financeiro, processo 07/59965-4, e pelo fornecimento de bolsa de mestrado processo 07/53487-3.

### **Referências**

- Andrighetto, C., Jorge, A. M., Roça, R. O., Rodrigues, E., Bianchini, W., & Francisco, C. L. (2008). Physical-chemical and sensory characteristics of meat from Murrah buffaloes slaughtered at different feedlot periods. *Brazilian Journal of Animal Science*, *37*, 2179-2184.
- Ashmore, C. R., Tompkins, G., & Doerr, L. (1972). Postnatal development of muscle fiber types in domestic animals. *Journal of Animal Science*, *34*, 37-41.
- Berg, R.T., & Walters, R.M. (1983). The meat animal: changes and changes. *Journal of Animal Science*, *57*, 133-146.
- Chang, K. C., Da Costa, N., Blackley, R., Southwood, O., Evans, G., Plastow, G., et al. (2003). Relationships of myosin heavy chain fiber types to meat quality traits in traditional and modern pigs. *Meat Science*, *64*, 93-103.
- Chikuni, K., Muroya, S., & Nakajima, I. (2004). Myosin heavy chain isoforms expressed in bovine skeletal muscle. *Meat Science*, *67*, 87-94.

- Francisco, C. L., Jorge, A. M., Andrighetto, C., Rodrigues, E., Pinheiro, R. S. B., & Silva, T. L. S. (2009). Yields of carcass and retail cuts of buffaloes finished in feedlot. In *Proceedings of the 18th Animal Science Congress*, (pp.297-300), 6-9 May 2009, Vila Real, Portugal.
- Franck, M., Figwer, P., Godfraind, C., Poirel, M. T., Khazzaha, A., & Ruchoux, M. M. (2007). Could the pale, soft, and exudative condition be explained by distinctive histological characteristics? *Journal of Animal Science*, *85*, 746-753.
- Gotoh, T. (2003). Histochemical properties of skeletal muscles in Japanese cattle and their meat production ability. *Animal Science Journal*, *79*, 339-354.
- Iwamoto, H., Ono, Y., Gotoh, T., Nishimura, S., Nakanishi, Y., Umetsu, R., Takahara, H. (1991). Comparative studies on the composition of muscle fiber types in Japanese Black, Japanese Brown and Holstein steers. *Animal Science and Technology*, *62*, 674-682.
- Jorge, A. M., Fontes, C. A. A., Freitas, J. A., Soares, J. E., Rodrigues, L. R. R., Resende, F. D., & Queiróz, A. C. (1997). Carcass dressing percentage and yield of primal cuts from bovines and buffalo slaughtered at different stages of maturity. *Brazilian Journal of Animal Science*, *26*, 1048-1054.
- Jorge, A. M., Andrighetto, C., Millen, D. D., Calixto, M. G., & Vargas, A. D. F. (2006). Production and biological efficiency of feedlot buffaloes from three genetic groups and slaughtered in different maturities, *Brazilian Journal of Animal Science*, *35*, 252-257.
- Klont, R. E., Brocks, L., & Eikelenboom, G., (1998). Muscle fibre type and meat quality. *Meat Science*, *49*, S219-S229.
- Kolczak, T., Pospiech, E., Palka, K., & Lacki, J. (2003). Changes of myofibrillar and centrifugal drip proteins and shear force of *psoas major* and *minor* and *semitendinosus* muscle from calves, heifers and cows during post-mortem ageing. *Meat Science*, *64*, 69-75.

- Koohmaraie, M., Ketnt, M.P., Shakelford, S.D., Veiseth, E., & Wheeler, T. L. (2002) Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? *Meat science*, 62, p. 345-352, 2002.
- Kuber, P. S., Busboom, J. R., Huff-Lonergan, E., Duckett, S. K., Mir, P. S., Mir, Z., McCormick, R. J., Dodson, M. V., Gaskins, C. T., Cronrath, J. D., Marks, D. J., & Reeves, J.J. (2004). Effects of biological type and dietary fat treatment on factors associated with tenderness: I. Measurements on beef longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 82, 770-778.
- Lapitan, R. M., Del Barrio, A. N., Katsube, O., Ban-Tokuda, T., Orden, E. A., Robles, A. Y., Fujihara, T., Cruz, L. C., Homma, H., & Kanai, Y. (2008). Comparison of carcass and meat characteristics of Brahman grade cattle (*Bos indicus*) and crossbred water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Animal Science*, 78, 596-604.
- Lowe, J. (1997). *Histotechnology technical methods: Enzyme Histochemical Stain - Adenosine Triphosphatase (ATPase)*. Available in <<http://www.nottingham.ac.uk>>. Access in: 26 July 2008.
- Maltin, C. A., Balcerzak, D., Tilley, R., & Delday, M. (2003). Determinants of meat quality: tenderness. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 337–347.
- Maltin, C. A., Loble, G. E., Grant, C. M., Miller, L. A., Kyle, D. J., Horgan, G. W., Matthews, K. R., & Sinclair, K. D. (2001). Factors influencing beef eating quality 2. Effects of nutritional regimen and genotype on muscle fibre characteristics. *Animal Science*, 72, 279-287.
- Mizunoya, W., Wakamatsu, J., Tatsumi, R., & Ikeuchi, Y. (2008). Protocol for high-resolution separation of rodent myosin heavy chain isoforms in a mini-gel electrophoresis system. *Analytical Biochemistry*, 377, 111-113.
- Müller, L. (1980). Normas para avaliação de carcaças e concurso de carcaças de novilhos. Santa Maria: UFSM, Inc.

- National Research Council - NRC. (1996). *Nutrients requirements of beef cattle*. 7.ed. Washington, D.C. 244p.
- Ozawa, S., Mitsuhashi, T., Mitsumoto, M., Matsumoto, S., Itoh, N., Itagaki, K., Kohno, Y., & Dohgo, T. (2000). The characteristics of muscle fiber types of *longissimus thoracis* muscle and their influences on the quantity and quality of meat from Japanese Black steers. *Meat Science*, 54, 65-70.
- Pearson, A.M., & Young, R.B. (1989). Skeletal muscle fibers. In: Pearson, A.H., & Young, R.B, *Muscle and meat biochemistry* (pp. 235-265). San Diego: Academic Press.
- Renand, G., Picard, B., Touraille, C., Berge, P., & Lepetit, J. (2001). Relationship between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Science*, 59, 49-60.
- SAS (2001). *SAS user's guide: statistics* (Version 8.2). Cary, NC: SAS Inst. Inc.
- Sawdy, J.C., Kaiser, S.A., ST. Pierre, N.R., & Wick, M.P. (2004). Myofibrillar 1-D fingerprints and myosin heavy chain MS analyses of beef loin at 36h post-mortem correlate with tenderness at 7 days. *Meat Science*, 67, 421-426.
- Toniolo, L., Maccatrozzo, L., Patruno, M., Pavan, E., Caliaro, F., Rossi, R., Rinaldi, C., Canepari, M., Reggiani, C., & Mascarello, F. (2007). Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 292, 1915-1926.
- USDA. (1997). Official United States Standards for Grades of Carcass Beef. Washington, DC: MAS-USDA.
- Wegner, J., Albrecht, E., Fiedler, I., Teuscher, F., Papstein, H. J., & Ender, K. (2000). Growth and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. *Journal of Animal Science*, 78, 1485-1496.

Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., & Shackelford, S.D. (1995). *Standardized Warner-Bratzler Shear Force Procedures for Meat Tenderness Measurement*. Clay Center: Roman L. Hruska U. S. MARC. USDA.

Tabela 1. Composição percentual da dieta com base na matéria seca (MS).

Composição da Dieta	MS (%)
Silagem de milho	7,8
Feno de <i>coast cross</i>	20,6
Caroço de algodão	8,2
Silagem de grão úmido de milho	46,0
Núcleo*	17,4
Nutrientes Estimados	
Proteína Bruta (%)	13,0
Nutrientes Digestíveis Totais (%)	73,2
Fibra em Detergente Neutro (%)	23,6
Energia Metabolizável (Mcal/kg)	2,7

\*Composição do Núcleo: Ureia (6,25%), Levedura Seca (68,75%), Mistura Mineral\*\* (25%) e Rumensin® (3 ppm de monensina).

\*\*Composição da Mistura Mineral por quilograma de produto: 75 g P, 126 g Ca, 160 g Na, 240 g Cl, 20 g S, 15 mg Mg, 4.000 mg Zn, 1.800 mg Cu, 1.500 mg Fe, 1.400 mg Mn, 150 mg Co, 120 mg I, 15 mg Se, 750 mg F (max), 50 mg palatilizante.

Tabela 2. Coeficientes de correlação de Pearson obtidos entre as características das fibras musculares e parâmetros de qualidade do músculo *Longissimus dorsi* de bubalinos Mediterrâneo.

	Peso de abate	Cor	Marmorização	FC <sup>1</sup>
Peso de abate	-	-0.06	0.34*	0.70**
<i>MyHC</i>				
MyHC IIa	-0.51**	0.18	-0.18	-0.40*
MyHC IIx/d	0.38*	0.20	0.44*	0.32
MyHC I	-0.01	-0.33	-0.31	-0.03
<i>Fast</i>				
Frequência	-0.63**	0.27	-0.29	-0.40*
Área	0.79**	-0.01	0.32	0.59**
Diâmetro	0.26	-0.03	0.06	0.27
<i>Slow</i>				
Frequência	0.63**	-0.27	0.29	0.40*
Área	0.87**	-0.04	0.42*	0.68**
Diâmetro	0.38*	0.39*	0.05	0.34

<sup>1</sup>FC = Força de cisalhamento

\*P < 0,05; \*\*P < 0,01

Tabela 3. Valores médios e desvio-padrão das características qualitativas do músculo *Longissimus dorsi* de bubalinos Mediterrâneo nos diferentes pesos de abate.

Peso de abate (kg)	Cor <sup>1</sup>	Marmorização <sup>2</sup>	Força de Cisalhamento (kgf)
450	4,00 <sup>a</sup> ±0,20	1,83 ±0,43	2,67 <sup>b</sup> ±0,24
480	3,00 <sup>b</sup> ±0,22	1,80 ±0,48	3,67 <sup>ab</sup> ±0,26
510	2,87 <sup>b</sup> ±0,25	2,32 ±0,53	3,77 <sup>ab</sup> ±0,30
540	3,64 <sup>ab</sup> ±0,10	2,80 ±0,40	4,57 <sup>a</sup> ±0,22

<sup>a,b</sup>Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

<sup>1</sup>Escala de 1 a 5 pontos, sendo 1 = vermelho escura e 5 = vermelho brilhante.

<sup>2</sup>Escore de 1 a 10 pontos, sendo 1= praticamente ausente e 10 = muito abundante.

Tabela 4. Valores médios de área e diâmetro das fibras dos músculos *Longissimus dorsi* de bubalinos Mediterrâneo abatidos em diferentes pesos.

Variáveis	Peso de abate (kg)				CV <sup>1</sup> (%)
	450	480	510	540	
<i>Fast</i>					
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	499,97 <sup>c</sup>	748,43 <sup>b</sup>	567,30 <sup>bc</sup>	1100,89 <sup>a</sup>	14,86
Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	38,10	36,18	38,34	40,80	13,03
<i>Slow</i>					
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	506,34 <sup>c</sup>	781,32 <sup>b</sup>	724,09 <sup>b</sup>	1168,77 <sup>a</sup>	13,39
Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	39,24 <sup>ab</sup>	36,99 <sup>b</sup>	35,51 <sup>b</sup>	43,79 <sup>a</sup>	9,34

<sup>a,b,c</sup>Médias seguidas por letras iguais na mesma linha, não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P < 0,05).

<sup>1</sup>CV = Coeficiente de variação.

## **CAPÍTULO 4**

## IMPLICAÇÕES

A bubalinocultura de corte no Brasil enfrenta várias barreiras, tanto em relação à produção quanto ao escoamento do produto, pois está limitada a nichos de mercados ainda não explorados e/ou ignorados pela grande parte dos pecuaristas e da população.

O desconhecimento dos produtores aliado ao pré-conceito dos consumidores, em relação ao potencial dos bubalinos como produtores de carne, restringe uma alternativa que poderia auxiliar a produção de alimentos. O fato dos bubalinos serem considerados animais rústicos, faz com que os consumidores associem as características da carne desses a um produto de baixa qualidade. Essa opinião equivocada pode ser revertida com a realização de pesquisas que auxiliem na divulgação da espécie e dos seus atributos.

O desenvolvimento muscular do animal repercute nas características quantitativas e qualitativas da carcaça e, nesse contexto, as fibras musculares possuem grande importância. Entretanto, vários fatores precisam ser analisados em conjunto para que permitam o entendimento e a elucidação do fenômeno do crescimento e o seu reflexo nos aspectos qualitativos da carne. Assim como, a determinação do melhor peso de abate de um animal está relacionada à razão custo/benefício da produção, onde fatores como tipo e objetivo da criação precisam ser considerados.

Os bubalinos podem incrementar o quadro de animais produtores de carne vermelha, sendo mais uma alternativa de fonte protéica que pode atender as necessidades dos consumidores, relacionadas tanto aos aspectos nutricionais quanto aos qualitativos.