



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ADRIANA APARECIDA DROVAL

**CARNES PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) EM FRANGO:
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICOS E SENSORIAIS E
ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM REGIÕES ESPECÍFICAS
DO GENE α RyR**

ADRIANA APARECIDA DROVAL

**CARNES PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) EM FRANGO:
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICOS E SENSORIAIS E
ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM REGIÕES ESPECÍFICAS
DO GENE α RyR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof Dr Massami Shimokomaki

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D791c Droval, Adriana Aparecida.
Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) em frango : avaliação de parâmetros físicos e sensoriais e análise de polimorfismos em regiões específicas do gene α RyR / Adriana Aparecida Droval. – Londrina, 2011.
xiv, 162 170 f. : il.

Orientador: Massami Shimokomaki.
Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos – Avaliação sensorial – Teses. 2. Carnes – Conservação – Teses. 3. Carne de ave – Teses. 4. Carne de ave – Qualidade – Teses. I. Shimokomaki, Massami. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 664.91

ADRIANA APARECIDA DROVAL

**CARNES PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) EM FRANGO:
AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICOS E SENSORIAIS E ANÁLISE
DE POLIMORFISMOS EM REGIÕES ESPECÍFICAS DO GENE α RyR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Massami Shimokomaki
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Gyslaine F. L. Trindade Vilas-Boas
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Sandra Helena Prudencio
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Mayka Reghiany Pedrão
UTFPR – Londrina – PR

Prof. Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia
UFPR – Curitiba – PR

Londrina, 14 de março de 2011.

Dedicatória

*Em especial ao meu esposo Eriton, pelo incentivo, amor e companheirismo e ao
meu filho João Vitor razão do meu viver.
Àos meus pais, Iria e Vitor (in memorium) e ao meu irmão Marcelo, vocês foram e
são muito importantes por todas as conquistas obtidas.
A vocês dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Massami Shimokomaki pela tão estimada orientação, comprometimento e dedicação no desenvolvimento deste trabalho, minha eterna gratidão e respeito.

Ao Dr. Alexandre Lima Nepomuceno pela co-orientação e imensa colaboração, agradeço pelo apoio e amizade prestada em muitos momentos difíceis vividos durante todo experimento, muito obrigada.

Ao Dr. Eliseu Binneck, grande colaborador e co-orientador que se dedicou com paciência, incentivo, sem sua ajuda com certeza não teria sido possível a obtenção dos resultados de molecular deste trabalho.

A Dra. Fernanda Gonzales Paião pelo seu empenho, dedicação, paciência, incentivo, auxílio e contribuições no desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro (Processos n. 558819/2008-7 e 479738/2007-6).

Aos Professores Dra. Sandra Helena Prudencio e Dr. Laurival Vilas Boas e à Silvana R. R. Marin pelo apoio técnico, auxílio, sugestões e ensinamentos no desenvolvimento deste trabalho.

A UTFPR, Campus Campo Mourão pelo apoio recebido.

A EMBRAPA-SOJA pelo apoio e disponibilidade de toda a sua estrutura física no desenvolvimento deste trabalho. A todos os funcionários e estagiários, muito obrigado, em especial agradeço a Pesquisadora Vera de Toledo Benassi pela ajuda e disponibilidade em todos os momentos em que precisei, a D. Maria e a Ivone, da cozinha experimental, pessoas maravilhosas e de um coração enorme, que me ajudaram com tanto amor e carinho. Aos colegas e amigos do

laboratório de biotecnologia, Larissa, César, Verinha, Márcia, Vieira, Adriana Polizel, João Vitor, Mayra, Elisandra, Renata Stofl, Renata Fuganti, Juliana Marcolino, Juliana Paula, Paula Camargo, Maísa, Salvador, Paulo, Euziane, Amanda Rusiska, Amanda Alves, André Gonçalves, André Passioto, André Paulo, Cibelle, Cynara, Edgar, Elton, Fabiana, Glória, Mayla, em especial a Tânia Hitomi e Selma que partiram desta vida e deixaram muitas saudades, muito obrigada, vocês foram muito importantes em muitos momentos compartilhados de trabalho, descontrações e alegrias.

Ao Abatedouro de Aves Copacol, localizado na cidade de Cafelândia, Paraná, pelas amostras cedidas de filé de peito de frango, em especial a Alessandro Rossa, Supervisor de Processamento, pela prontidão no atendimento, profissionalismo e ajuda durante a coleta.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos desta Instituição pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.

Aos docentes do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos desta Instituição pelos ensinamentos e pela atenção dispensada.

A todos os colegas deste Programa de Pós-graduação em especial as amigas, Cristiane Canan, Marinês Corso, Gislaine Silveira Simões e Gizele Nobre pelos momentos compartilhados e pelo incentivo nos dias difíceis.

A todos os meus familiares que me ajudaram direta e indiretamente para que este trabalho fosse concluído, em especial à Claris, Paulo Rogério, Rhaíssa e Rhuana por todas as acolhidas, pelo incentivo e todo o carinho prestado durante todo o tempo de estudo. À Cleire, Cido, Évelyn e Erico e também a Cléia, Adelmo e Jeferson pelo apoio, carinho, compreensão e amizade.

A D. Ermita, que cuidou com tanto amor, dedicação e carinho do pequeno João Vitor, muito obrigada.

A Deus pela graça da vida e por tudo o que nela tem realizado.

“Quando amamos e acreditamos do fundo de nossa alma, em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer nossa fé. Esta força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa, na hora exata e, quando atingimos nossos objetivos ficamos surpresos com nossa própria capacidade.”

(Autor desconhecido)

DROVAL, Adriana Aparecida. **Carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*) em frango: avaliação de parâmetros físicos e sensoriais e análise de polimorfismos em regiões específicas do gene α RyR**. 2011. 170 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido em duas etapas e se apresenta na forma de capítulos. O capítulo 1 teve por objetivos verificar se o fenômeno PSE em frango pode ser percebido por consumidores por meio de avaliação sensorial da intensidade de cor e intenção de compra de cortes "*in natura*", e identificar diferenças de atributos e aceitabilidade de cortes grelhados. Determinou-se parâmetros físicos de pH, luminosidade (L^*), capacidade de retenção de água (CRA), perda por cozimento (PC) e força de cisalhamento (FC). Os valores médios de pH e L^* para as amostras normais foram de 5,96 e 49,24 e para as PSE foram de 5,61 e 59,20, respectivamente. As amostras normais apresentaram uma CRA de 14,50% maior, uma PC de 30,92% menor e uma força de cisalhamento da carne cozida de 65,41% menor em relação às PSE. Os consumidores identificaram sensorialmente diferenças na cor de filés *in natura* e apontaram os cortes PSE como sendo os mais claros. A intenção preferencial de compra foi pelos filés normais. Foram identificadas diferenças sensoriais entre as amostras grelhadas de filés PSE e normais e as principais características indicadas como responsáveis pelas diferenças foram maciez, sabor e suculência. No teste pareado de diferenças de atributos apenas o sabor apresentou diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$). As amostras normais apresentaram maior aceitabilidade que as PSE ($p \leq 0,05$). O capítulo 2, teve por objetivo amplificar fragmentos do gene α RyR do DNA genômico de frangos, especificamente regiões *hotspots*, e identificar polimorfismos de nucleotídeos único (SNPs) em animais normais e animais que desenvolveram carnes PSE. Primeiramente, as aves ($n=851$) foram submetidas ao teste halotano e 94 aves foram sensíveis ao anestésico. Após o teste halotano, amostras de filés ($n=154$) foram selecionadas e caracterizadas em PSE e normais através da determinação das análises de pH, valor de L^* e CRA. A incidência de PSE nas amostras de filés foi de 42,2% e destes 64,6% foram de aves sensíveis ao halotano. Para os estudos moleculares foram utilizados 50 aves, 25 que desenvolveram carnes PSE e 25 que desenvolveram carnes normais. O DNA total foi extraído a partir do sangue dos animais, a seguir amplificado por PCR, clonado, sequenciado e utilizado para identificação da existência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Um fragmento de 604 nucleotídeos (nt) localizado na região *hotspot* 2 do gene α RyR foi amplificado e num trecho de 181 nt desse fragmento foram localizados dois exons hipotéticos comparando a sequência do DNA de frango com a do cDNA do gene α RyR de peru. Essa região codificadora (CR) apresentou na posição 585 uma mutação de sentido trocado G/A em pelo menos um dos três clones sequenciados, obtidos a partir de nove aves, seis PSE (HAL+) e três normais (HAL-) demonstrando a heterozigose nestes animais. Essa substituição significa uma mudança Met/Val na sequência da proteína codificada. Contudo, a alteração não é considerada suficiente para alterar a estrutura/função da proteína. Essa alteração e identificação de polimorfismos ainda não puderam ser correlacionadas ao fenômeno PSE, necessitando-se mais estudos a respeito da RYR e/ou outras

proteínas envolvidas no metabolismo de contração-excitação muscular para o desenvolvimento de métodos moleculares de detecção/seleção de frangos PSE.

Palavras-chave: Qualidade da carne. Capacidade de retenção de água. Maciez. Mutação. SNP e proteína receptora de rianodina.

DROVAL, Adriana Aparecida. **PSE meat (Pale, Soft, Exudative) in chicken:** Physical chemical parameters and sensory analysis and polymorphisms analysis in specific regions of gene α RyR evaluation. 2011. 170p. Thesis (Doctorate in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

This study was conducted in two steps and it is presented in two chapters. The first chapter aimed to investigate the consumers sensory perception in relation to raw fillet color and its purchasing desire, and to identify differences in attributes and acceptability between raw and cooked samples from control and PSE meats. The physical parameters measured were pH, lightness (L^*), water holding capacity (WHC), cooking loss (CL) and shear force (SF). The average pH and L^* values for normal and PSE meat samples were 5.96 and 49.24 and 5.61 and 59.20, respectively. Control samples presented 14.50% higher WHC, 30.92% lower CL and 65,41% lower SF for cooked in relation to PSE samples. Results of the sensory evaluation revealed that consumers detected difference in color of raw fresh breast fillets comparing to PSE meat samples classifying the latter as lighter or pale. For purchase intention normal fillets samples were preferred ($p \leq 0,05$). As for the purchasing intention the choice was for the normal meat samples. Experiments of the test panel for the cooked meat samples texture preference revealed that the causes of these results were due to their tenderness, flavor and juiciness although in the paired test difference attributes only flavor was statistically different ($p \leq 0,05$). Thus the control samples presented higher acceptability ($p \leq 0,05$). The second chapter aimed to amplify the chicken DNA α RyR genomic fragments located specifically at the hotspots regions and to identify polymorphisms (SNPs) in normal and in animals bound to produce PSE meat. Firstly, birds ($n=851$) were submitted to halothane test and among them 94 presented sensitivity to the anesthetic. After this test, breast fillet samples ($n=154$) were characterized as normal or control by determining the pH, L^* and WHC. The incidence of PSE in fillet samples was 42.2% and 64.6% of these chickens were sensitive to halothane. For the molecular studies, 50 chickens were used among them 25 birds were detected to produce PSE meat and the other half birds were able to develop normal meat. Total DNA was extracted from the animals blood then amplified by PCR, cloned, sequenced and used to identify the existence of polymorphisms (SNPs). One fragment of 604 nucleotide (nt) located in the *hotspot* 2 of α RyR was amplified and in a segment of 181 nt of this fragment was located in two hypothetical exons by comparing chicken DNA sequence in relation to turkey α RyR cDNA. This coding sequence (CR) presented at position 585 position a non synonymous replacement G/A in at least one of the sequenced three clones, obtained from 9 birds, among them 6 were classified as PSE (HAL +) and 3 as normal (HAL-) demonstrating heterozygosity in these animals. This substitution signified a change in Met/Val residue within the encoded protein sequence. However, this change was not considered sufficient to alter the protein structure/function. This change and identification of polymorphisms was not sufficient to be correlated to the PSE syndrome. There is a need to have more studies in relation to RYR and/or other proteins involved in excitation-contraction of skeletal muscle metabolism in order for the development of molecular methods for detection of PSE broiler chicken.

Keywords: Meat quality. Water holding capacity. Tenderness. Mutation. SNP and ryanodine receptor protein.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 –	Ficha de avaliação para o teste de intenção de compra	38
Figura 2 –	Ficha de avaliação para o teste pareado de diferença e intenção de compra	39
Figura 3 –	Ficha de avaliação para o teste triangular	41
Figura 4 –	Ficha de avaliação para o teste pareado de diferença de atributos	41
Figura 5 –	Ficha de avaliação para o teste de aceitação utilizando escala hedônica de 9 pontos	43
Figura 6 –	Foto de filés normal e PSE de frango	45
Figura 7 –	Correlação entre os valores de L^*_{24h} e de pH_{24h} de carnes PSE e normais de frango ($p \leq 0,05$, $y = -22,08x + 181,9$ e $r^2 = 0,707$)	45
Figura 8 –	Frequência dos valores hedônicos para carnes normal e PSE de frango	51
Figura 9 –	Frequência do sexo dos consumidores participantes dos testes sensoriais	51
Figura 10 –	Frequência da faixa etária dos consumidores participantes das análises sensoriais	52

CAPÍTULO 2

Figura 1 –	Representação esquemática do tecido muscular esquelético	96
Figura 2 –	Mecanismo de excitação-contração do músculo esquelético de mamíferos	100
Figura 3 –	Estrutura esquemática tridimensional da RYR1 e principais domínios estruturais	106
Figura 4 –	Mecanismo de excitação-contração muscular nas aves	107
Figura 5 –	Diagrama esquemático da RYR1 em humanos, mostrando as regiões hotspots 1 (N-terminal), 2 (central) e 3 (C-terminal, juntamente com os domínios de transmembranas M1, M2, M3 e M4	109

Figura 6 –	Foto dos frangos expostos ao halotano na câmara de vaporização	113
Figura 7 –	Placas de petri com crescimento de colônias de <i>E. coli</i> transformadas (brancas) e não transformadas (azuis)	119
Figura 8 –	Frequência da sensibilidade das aves ao anestésico halotano e caracterização da carne PSE de filés (n=154) de frangos	124
Figura 9 –	Sequência parcial do cDNA do gene α RyR de peru (EU177005.1) com a localização da região <i>hotspot</i> 2 e do <i>contig</i> NW_001476149. Localização do fragmento estudado em frango e localização dos iniciadores	128
Figura 10 –	Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação dos frangos PSE	129
Figura 11 –	Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação dos frangos normais	129
Figura 12 –	Alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos dos nove frangos que apresentaram poliformismo (seqüências genômicas I e II) na posição 585 do fragmento obtido do gene α RyR em frango	131
Figura 13 –	Alinhamento da sequência de nucleotídeos do fragmento obtido em frango com a tradução da sequência de aminoácidos, indicando o nucleotídeo (posição 585) e o aminoácido (posição 54) alterado na região codificadora	132
Figura 14 –	Alinhamento do fragmento com 604 pb seqüenciado com a sequência do cDNA do gene α RyR de peru. E localização dos exons 1 e 2 do fragmento de frango confrontado com a sequência de peru	133
Figura 15 –	Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína α RYR de frango com a sequência da mesma proteína de outros organismos	134
Figura 16 –	Identificação de domínios da sequência de cDNA do gene α RyR de peru (EU177005.1). Localização em peru da CR do fragmento estudado em frango	135

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1** – Análises físicas de pH e luminosidade (L*) nos filés PSE e normais dos frangos44
- Tabela 2** – Análises físicas de CRA, PC e FC realizadas nos filés PSE e normais dos fangos46
- Tabela 3** – Número de respostas avaliadas no teste pareado de diferença de atributos49
- Tabela 4** – Valores hedônicos médios das amostras de filés PSE e normal do teste de aceitabilidade51

CAPÍTULO 2

- Tabela 1** – *Primers Forward e Reverse* selecionados para a amplificação das regiões *hotspots* 1, 2 e 3 em frango com o tamanho aproximado dos fragmentos esperados em pares de base (pb) ...117
- Tabela 2** – *Primers Forward e Reverse* desenhados para a amplificação de fragmentos na região *hotspot* 2 do gene α RyR em frango baseando-se na sequência do *contig* NW_001476149, com o tamanho dos fragmentos esperados em pares de bases (pb)117
- Tabela 3** – Valores de pH, cor (L*) e CRA dos filés PSE e normais de frango126

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICOS E SENSORIAL DA CARNE PSE (PALE, SOFT, EXUDATIVE) EM FRANGO DE CORTE	20
1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1 O MERCADO DA CARNE DE AVES	24
3.2 CARNE PSE	25
3.3 QUALIDADE DA CARNE	28
3.4 ANÁLISE SENSORIAL	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 MATÉRIA-PRIMA	33
4.2 METODOLOGIA	33
4.2.1 Abate dos frangos	33
4.2.2 Caracterização da carne PSE	34
4.2.2.1 Determinação do pH	34
4.2.2.2 Medida da luminosidade	34
4.2.3 Capacidade de retenção de água (CRA)	35
4.2.4 Perda de peso por cozimento (PPC)	35
4.2.5 Força de cisalhamento	36
4.2.6 Avaliação sensorial	37
4.2.6.1 Primeira etapa	37
4.2.6.1.1 Preparo da amostra	38
4.2.6.1.2 Teste 1: Intenção de compra	38
4.2.6.1.3 Teste 2: Pareado de diferença e intenção de compra	39
4.2.6.2 Segunda etapa	39
4.2.6.2.1 Preparo das amostras	40

4.2.6.2.2	Teste 1: Teste triangular.....	40
4.2.6.2.3	Teste 2: Teste pareado de diferença de atributos	41
4.2.6.3	Terceira etapa	42
4.2.6.3.1	Preparo da amostra	42
4.2.6.3.2	Teste de aceitação – Escala hedônica	42
4.2.7	Análise estatística.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Caracterização da Carne PSE.....	44
5.2	Determinações dos Parâmetros Físicos	46
5.3	Avaliação Sensorial	47
5.3.1	Primeira etapa	47
5.3.2	Segunda etapa	48
5.3.3	Terceira etapa	50
6	CONCLUSÃO.....	53
7	REFERÊNCIAS	54
8	ANEXOS.....	64
8.1	ANEXO 1	65
8.2	ANEXO 2	66
8.3	ANEXO 3.....	67
8.4	ANEXO 4	68
9	ARTIGO CIENTÍFICO.....	69

**CAPÍTULO 2: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO
EM FRAGMENTOS LOCALIZADOS EM REGIÕES HOTSPOTS DO GENE
 α RyR DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS AO TESTE HALOTANO
QUE DESENVOLVERAM CARNES PSE.....**

1	INTRODUÇÃO.....	92
2	OBJETIVOS	95
2.1	OBJETIVO GERAL.....	95
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	95
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	96
3.1	TRANSFORMAÇÕES BIOQUÍMICAS DO MÚSCULO EM CARNE.....	96
3.1.1	Excitação-contração do músculo esquelético.....	99
3.2	CARNE PSE	102

3.3	PROTEÍNA RECEPTORA DE RIANODINA (RYR).....	105
4	MATERIAL E MÉTODOS	112
4.1	MATÉRIA-PRIMA	112
4.2	METODOLOGIA	112
4.2.1	Teste halotano e abate dos frangos	112
4.2.2	Caracterização da carne PSE	113
4.2.2.1	Determinação do pH.....	114
4.2.2.2	Medida da luminosidade (L*).....	114
4.2.2.3	Capacidade de retenção d e água (CRA).....	115
4.2.2.4	Análise estatística	115
4.2.3	Extração do DNA total	115
4.2.4	Etapas de biologia molecular.....	116
4.2.4.1	Seleção da região gênica	116
4.2.4.2	Amplificação da região estudada	118
4.2.4.3	Obtenção de clones recombinantes	118
4.2.4.4	Extração do DNA plasmidial	120
4.2.4.4.1	Digestão	121
4.2.4.5	Sequenciamento.....	122
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	124
5.1	Teste Halotano e Caracterização da Carne PSE.....	124
5.2	Extração do DNA Total e Seleção da Região Gênica.....	126
5.3	Amplificação da Região Estudada e Sequenciamento	128
6	CONCLUSÃO	136
7	REFERÊNCIAS	137
8	ANEXOS	149
8.1	ANEXO 1	150
8.2	ANEXO 2	151
9	ARTIGO CIENTÍFICO	160

INTRODUÇÃO

A carne de frango atualmente é uma das matérias-primas mais consumida pelo brasileiro, o consumo *per capita* está em aproximadamente 39 Kg por ano. Do total de carne produzida 65% permanecem no mercado interno e o restante é exportado para mais de 150 países, destacando o Brasil como o maior exportador desde 2004 e o terceiro maior produtor de frango seguido dos Estados Unidos e da China, sendo que em 2009 a produção brasileira foi de 10,9 milhões de ton. Considerando o cenário da produção e industrialização da carne de frango no país, a preocupação pela qualidade desta matéria-prima se tornou relevante nos últimos anos (UBABEF, 2010).

A qualidade de uma carne envolve propriedades tecnológicas, sensoriais e funcionais, com padrões estáveis que garantam o desenvolvimento de produtos finais de boa qualidade e rentabilidade (BRESSAN, 1998). Os principais atributos de qualidade são a aparência, que está relacionada principalmente a cor dos cortes, bem como a capacidade de retenção de água e a textura que estão relacionados com a maciez e o pH final. Os maiores desafios para a indústria de carnes é oferecer produtos macios, suculentos, com cor e sabor agradáveis (FLETCHER, 2002).

Entre os problemas da indústria processadora de frango de corte destaca-se a ocorrência de carnes PSE (*Pale, Soft, Exudative*). Essas carnes são pálidas, flácidas e exsudativas, devido à queda brusca do pH *post mortem* enquanto a temperatura da carcaça encontra-se elevada, acima de 35°C, levando à desnaturação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas (BARBUT, 1997). Os principais fatores que acometem o PSE são os fatores ambientais estressantes que antecedem o abate, como a temperatura elevada do ambiente, o transporte, a aglomeração dos animais durante o transporte, o manejo, entre outros (SIMÕES *et al.*, 2009; LARA *et al.*, 2002). Fatores genéticos também têm sido apontados como

responsáveis pelo desenvolvimento de carne PSE. Os programas de melhoramento genético além de desenvolver frangos com maior taxa de crescimento e desenvolvimento de músculos nobres têm dado importância a características relacionadas à qualidade da carne e presume-se que a intensa seleção a favor da taxa de crescimento das aves levou a problemas relacionados à qualidade, como o PSE (DRANSFIEL & SOSNICKI, 1999). Porém, até o presente momento, o fenômeno PSE em frango não está esclarecido e os estudos genéticos desenvolvidos ainda não podem ser correlacionados ao PSE nestes animais.

O grupo de Ciência e Tecnologia de Carnes e Derivados do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos desta instituição sob coordenação do Prof Dr. Massami Shimokomaki tem desenvolvido trabalhos na área de biologia molecular em parceria com pesquisadores da Embrapa-Soja há aproximadamente 10 anos. Este grupo tem desenvolvido pesquisas que envolvem a proteína receptora de rianodina, bem como outros trabalhos na área de ciência e tecnologia de carnes e derivados.

Este trabalho foi organizado em dois capítulos com o intuito de melhor informar os resultados relevantes do estudo desenvolvido no período de 2006 a 2010. O capítulo 1 apresenta os resultados referentes a um estudo de parâmetros físicos e sensoriais realizados com consumidores de filés de peito oriundos de frangos que desenvolveram PSE e comparados com filés de frangos normais que não desenvolveram o fenômeno. O capítulo 2 refere-se aos resultados dos experimentos de biologia molecular em que foi investigada a ocorrência de polimorfismos em regiões específicas denominadas de *hotspots* do gene α RyR de frangos de corte submetidos ao teste halotano e que desenvolveram carnes PSE.

REFERÊNCIAS

BARBUT, S. Problem of pale soft exsudative meat in broiler chickens. **British Poultry Science**, Roslin, v. 38, p. 355- 358, 1997.

BRESSAN, M. C. **Efeito dos fatores pré e pós-abate sobre a qualidade da carne de peito de frango**. 1998. 201p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, Brasil.

DRANSFIELD, E.; SOSNICKI, A. A. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. **Poultry Science**, Savoy, v. 78, p. 743-746, 1999.

FLETCHER, D. L. Poultry meat quality. **World's Poultry Science Journal**. Ithaca, v. 58, n. 2, p. 131-145, 2002.

LARA, J. A. F.; LEDUR, M. C.; NEPOMUCENO, A. L.; SHIMOKOMAKI, M. Estresse Térmico e Incidência de Carne PSE em Aves. In: Conferência APINCO, Campinas. **Anais. Campinas : Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**, 04,. 15-15, 2002.

SIMÕES, G.S.; OBA, A.; MATSUO, T.; ROSSA, A; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. II. Vehicle thermal microclimate evaluation during brazilian summer broiler transport and the occurrence of PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52, 195-204, 2009.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. A indústria avícola – História. Disponível no site:

www.brazilianchicken.com.br, acesso em: 29/11/2010

CAPÍTULO 1

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICOS E SENSORIAL DA CARNE PSE (*PALE, SOFT, EXUDATIVE*) EM FRANGO DE CORTE

1 INTRODUÇÃO

As características de qualidade tecnológica e sensorial da carne de frango são importantes para a industrialização e, conseqüentemente, para o consumo desta matéria-prima. Os maiores atributos de qualidade da carne de frango são a cor, a aparência e a textura, os quais estão interligados às propriedades sensoriais e funcionais, como a capacidade de retenção de água (CRA) e o pH final (SIMÕES et al., 2009). Porém, os parâmetros que mais influenciam a satisfação do consumidor são os atributos relacionados à cor e maciez (FLETCHER, 2002). Em um estudo realizado por Bressan e Beraquet (2002) verificou-se que a importância desses dois parâmetros foi observada em momentos distintos, onde a coloração do peito de frango foi associada a aceitabilidade no momento da compra enquanto que a maciez determinou a aceitabilidade global no momento do consumo.

Portanto, os problemas relacionados com a qualidade da carne têm preocupado as indústrias processadoras. Um desses problemas é a anomalia PSE, cujo termo tem origem nas iniciais das palavras inglesas *Pale*, *Soft* e *Exsudative*, que significam carne pálida, flácida ou mole e exsudativa ou molhada, respectivamente (KOMIYAMA, et al., 2009; DRANSFIEL & SOSNICKI, 1999). Até a última década, a qualidade da carne de frango era baseada somente na estética como, perdas de partes, cortes da pele, hematomas e outras manchas, pois predominava a comercialização dos cortes “*in natura*”. Mas nos últimos tempos a produção de industrializados a base de carne de frango fez com que o PSE ganhasse importância e as

propriedades funcionais e sensoriais da carne afetadas por esse fenômeno fossem estudadas (KISSEL *et al.*, 2009; SHIMOKOMAKI *et al.*, 2006). Em um estudo realizado por Garcia *et al.* (2010) a incidência de PSE em frango foi de 10,20%, já em outro estudo realizado por Soares *et al.* (2002) foi observado 15,86% da ocorrência de carne PSE.

Em aves as causas da anomalia PSE não estão totalmente esclarecidas. Na prática, condições de manejo *ante-mortem* mal conduzidos e estressantes a que são submetidos os animais, podem provocar um *rigor mortis* acelerado, induzindo ao PSE (SIMÕES *et al.*, 2009; GUARNIERI *et al.*, 2002; LARA *et al.*, 2002). A carne PSE possui um pH baixo, em geral menor do que 5,8, devido ao rápido declínio do pH *post-mortem* enquanto a temperatura da carcaça está elevada, resultando na desnaturação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, comprometendo as propriedades funcionais da carne e a sua qualidade, tornando-a indesejável para o processamento e consumo (OLIVO *et al.*, 2001; BARBUT, 1997). As aves susceptíveis ao estresse podem desenvolver carne PSE no filé do peito (OLIVO *et al.*, 1998).

Os testes sensoriais são incluídos como garantia de qualidade nas indústrias de alimentos por ser uma medida multidimensional integrada, possuindo múltiplas vantagens tais como: (I) ser capaz de identificar a presença ou ausência de diferenças perceptíveis, (II) definirem características sensoriais importantes em um produto, (III) detectar particularidades que não podem ser detectadas por outros procedimentos analíticos, como os físico-químicos e (IV) ser capaz de avaliar a aceitação de produtos (MUÑOZ *et al.*, 1992). Os métodos sensoriais discriminativos, como os testes de diferença pareada e o triangular, são geralmente utilizados para diferenciarem atributos sensoriais importantes entre dois ou mais alimentos. Já os testes afetivos de aceitabilidade são utilizados quando se necessita conhecer o “status afetivo” dos consumidores com relação a um produto (MEILGAARD *et al.*, 1999). Existem estudos sensoriais da carne PSE realizada com julgadores treinados e não treinados (GARCIA

et al., 2010; KOMIYAMA *et al.*, 2009; KOMIYAMA, 2006; ODA, 2006), mas não há dados que mostrem que os consumidores conseguem identificar cortes de frangos com fenômeno PSE. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar e diferenciar sensorialmente cortes PSE e normal de frango “*in natura*” por meio da intensidade de coloração e identificar diferenças de atributos e aceitabilidade de cortes cozidos utilizando o consumidor. Também foi realizado um estudo de parâmetros físicos da carne PSE como análises de pH, luminosidade (L*), capacidade de retenção de água (CRA), perda por cozimento (PC) e força de cisalhamento (FC).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar parâmetros físicos e avaliar sensorialmente filés PSE de frangos “*in natura*” e, identificar diferenças de atributos como maciez, sabor e suculência e o nível de aceitação de filés grelhados utilizando o consumidor como provador.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o pH, a luminosidade (L*), a capacidade de retenção de água (CRA), a perda por cozimento (PC) e a força de cisalhamento (FC) de amostras de filés PSE e normal
- Verificar diferença de coloração entre filés “*in natura*” PSE e normal por meio de teste sensorial
- Avaliar diferenças de atributos e aceitabilidade de filés grelhados PSE e normal.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O MERCADO DA CARNE DE AVES

A demanda por produtos industrializados a base de carne de aves nas últimas quatro décadas tem proporcionado um aumento considerável na produção desses animais. No Brasil, a avicultura é um setor em expansão que gera empregos a mais de 4,5 milhões de pessoas tanto de forma direta quanto indireta. Em 2009, a produção brasileira foi de 10,9 milhões de toneladas, destacando-se como o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, seguido dos Estados Unidos e da China. Os três países juntos são responsáveis por 54,3% da produção mundial. Na exportação o Brasil vem conquistando desde 2004 a primeira posição, graças à apresentação de cortes especiais, oferta de novos produtos industrializados, e a garantia da qualidade da carne produzida (UBABEF, 2010). A produção global de carne de frango em 2010 foi de aproximadamente 73,92 milhões de toneladas de acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), verificando então que a produção brasileira cresceu 3,5% em comparação a 2009 (PRODUÇÃO..., 2010).

A avicultura brasileira se desenvolveu a partir de 1950 na região Sudeste, principalmente no estado de São Paulo. Na década de 70, período em que houve profunda reorganização do complexo de carne no Brasil, a atividade se deslocou para a Região Sul. No mercado consumidor interno, o brasileiro tem mudado seus hábitos de consumo de carne, passando de um país preponderantemente consumidor de carne bovina para consumidor de carne de frango. A qualidade, a imagem de um produto saudável, o menor custo de produção, bem como os preços acessíveis auxiliaram nesta conquista (SARCINELLI *et al.*, 2007).

Atualmente as regiões responsáveis pela grande produção brasileira da carne de frango são as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (UBABEF, 2010). A intensa produção gerou aumento na demanda pela industrialização de produtos a base de carne de aves nas últimas quatro décadas. Fato este também observado na produção de perus, que teve um aumento de 300% desde 1970, e este se deve em parte às mudanças ocorridas na taxa de crescimento e rendimento de carcaça, associados ao aumento na proporção de peito e diminuição de gordura abdominal (STRASBURG & CHIANG, 2009; SHIMOKOMAKI, *et al.*, 2006).

A busca por conforto e comodidade tornou-se relevante em todas as regiões do mundo, e isso estimula a demanda por produtos à base de carne de frango, prontos para o consumo na forma de empanados, hambúrguers, embutidos, entre outros, agregando desse modo um grande valor a essa matéria-prima. O grande consumo de frango se deve também ao custo que vem sendo menor do que as demais carnes, como a bovina e a suína (UBABEF, 2010). Para cada quilo de carne produzida são necessários de 1 a 2 kg de proteína vegetal para produzir carne de frango, de 3 a 4 kg para carne suína e de até 7 kg para a carne bovina (SILVA, 2011).

3.2 CARNE PSE

As carnes PSE (*Pale, Soft e Exudative*) apresentam características de cor pálida, textura macia e pobre capacidade de retenção de água (CRA). O PSE resulta de uma taxa de glicólise *post mortem* extremamente elevada, levando a um valor de pH muscular relativamente baixo, geralmente inferior a 5,8, enquanto a carcaça ainda está quente, por volta de 35°C aos 45 minutos *post mortem*. A rápida queda do pH causa a desnaturação das

proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, levando a excessiva perda de exsudato (BENDALL & WISMER-PERDERSEN, 1962) prejudicando as propriedades funcionais, tecnológicas e sensoriais da carne (BREWER & McKEITH, 1999; CANDEK-POTOCAR *et al.*, 1998). As características destas carnes são resultados da manifestação em suínos da síndrome – *Porcine Stress Syndrome* (PSS) (CHEAH & CHEAH, 1981) ou Hipertermia Maligna (HM) (FUJII *et al.*, 1991).

A síndrome PSS é desencadeada por fatores de estresse ambientais ou fisiológicos que antecedem o abate, como o calor, o transporte, o manejo, a umidade relativa do ambiente, entre outros que podem levar a morte inesperada dos animais (SIMÕES *et al.*, 2009; MITCHELL & HEFFRON, 1982; CHEAH & CHEAH, 1981). E a fatores genéticos, pois o PSS está relacionado a uma mutação de ponto no gene que codifica a proteína rianodina (RYR1). A RYR1 está presente no tecido muscular esquelético e controla a liberação de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático no processo de excitação/contração muscular (MICKELSON & LOUIS, 1996). A mutação levou a alteração na sequência de aminoácidos da proteína afetando a estrutura/função interferindo na homeostase do Ca^{2+} , desencadeando uma glicólise acelerada aumentando a produção de ácido láctico e conseqüentemente o desenvolvimento de carne PSE (CHEAH & CHEAH, 1981; MICKELSON & LOUIS, 1996).

Anomalias semelhantes ao PSE foram descritas em aves. Os mecanismos que conduzem a ocorrência do PSE na carne de frango ainda não estão esclarecidos e podem realmente estar relacionados a fatores genéticos como alterações no gene da proteína receptora de rianodina, considerando-se que este é altamente conservado entre as espécies (STRASBURG & CHIANG, 2003; OLIVO, 1999; BARBUT, 1997; McCURDY *et al.*, 1996; SANTÉ *et al.*, 1991; GREASER, 1986). Os primeiros trabalhos relacionados ao PSE em perus demonstraram que fatores estressantes, como aquecimento e agitação, influencia diretamente o declínio de pH e a qualidade final da carne de peito. As principais

anormalidades observadas foram a descoloração e a diminuição na capacidade de retenção de água, e também aumento na rigidez da carne. Estudos observaram que a taxa de declínio de pH *post-mortem* foi maior em linhagens de perus de rápido crescimento do que naqueles de crescimento mais lento. Além da relação com a capacidade de crescimento, a existência deste problema também está relacionada com o estresse pré-abate (STRASBURG & CHIANG, 2009; VIEIRA, 1999; FRONING *et al.*, 1978; MA & ADDIS, 1973).

O PSE resulta em carnes com alta perda de exsudado que é inadequado para o processamento, ou seja, a qualidade tecnológica é inferior, e isto causa prejuízos para o setor avícola. Esses prejuízos aumentam com a comercialização de produtos industrializados, pois a ocorrência da carne PSE compromete as propriedades funcionais que são utilizadas para agregar valor à industrialização. Entretanto, o valor nutricional da carne PSE não é alterado e esta carne não causa dano ou risco para a saúde do consumidor (KOMIYAMA *et al.*, 2009; SHIMOKOMAKI *et al.*, 2006).

A ocorrência de carne PSE em aves passou a ser valorizada pela comunidade científica e pela cadeia produtiva de carne de frango, porque os problemas sensoriais como aparência da carne, principalmente no atributo cor e tecnológicos quando a mesma é destinada a industrialização compromete sua utilização e resulta em perdas econômicas e na rentabilidade industrial e comercial (KISSEL *et al.*, 2009; SHIMOKOMAKI *et al.*, 2006).

Em um estudo realizado por Oda (2006) foram avaliadas diferenças de atributos sensoriais entre filés PSE e normais de frango no qual utilizou o Teste de Comparação Pareada com 40 provadores treinados e os resultados demonstraram que a coloração dos filés „*in natura*“ PSE foi diferenciada da coloração dos filés normais e, embora após a cocção os filés PSE tenham apresentado maciez inferior em relação aos normais, não foram encontradas diferenças significativas para os atributos de textura como a mastigabilidade, maciez, suculência.

3.3 QUALIDADE DA CARNE

A qualidade da carne está intimamente relacionada a fatores como CRA, cor, pH, capacidade emulsificante, capacidade de geleificação, entre outros. Esses fatores são dependentes dos substratos primários que influenciam as propriedades funcionais da carne, principalmente durante o processamento, que são: umidade, gordura e proteína. Consequentemente, a qualidade é caracterizada pelas propriedades físicas, químicas, morfológicas, microbiológicas, nutricionais, aspectos sensoriais, forma de apresentação e tipo de exposição do produto (DE SOUZA, 2005). Para o consumidor, os atributos de maior influência no julgamento da qualidade e decisão para aquisição ou não do produto cárneo são a aparência, textura, suculência, odor e sabor (ANADÓN, 2002). Ou seja, a qualidade ideal da carne está relacionada com a capacidade de reter o valor nutritivo elevado, mesmo após o processamento (PRICE & SCHWEIGERT, 1994).

A carne PSE é uma condição que é afetada drasticamente pela perda da funcionalidade da proteína o que a torna caracterizada por uma cor clara, textura flácida, pobre CRA, redução do rendimento no cozimento e outras propriedades sensoriais, afetando drasticamente a industrialização de produtos (SHIMOKOMAKI, *et al.*, 2006; PARDI *et al.*, 1995). Esta condição PSE observada nas carnes de aves foi comumente encontrada em animais os quais foram submetidos a um severo estresse *ante-mortem*. A exposição prolongada ao calor, transporte e esforço excessivo das aves antes do abate aumentou a glicólise *pós-mortem* em aves que desenvolveram carne PSE (LANGER, *et al.*, 2010; OBA *et al.*, 2009; SIMÕES *et al.*, 2009; OLIVO *et al.*, 2001).

A cor é um dos mais importantes fatores que afeta a aceitabilidade do consumidor no momento da decisão da compra e satisfação dos produtos cárneos. A cor da carne pode ser influenciada por muitos fatores, como as enzimas, a dieta e a idade do animal e também

eventos que antecedem o abate do animal (MUCHENJE *et al.*, 2009; MANCINI & HUNT, 2005). A palidez está associada com a desnaturação protéica causada pelo baixo pH e pela elevada temperatura da carcaça. A cor observada na superfície das carnes é o resultado da absorção seletiva da mioglobina, provocada pela distribuição da luz que emerge da carne. Com a diminuição do pH, desnaturação protéica e a expulsão da água, aumenta a interação proteína-proteína e conseqüentemente aumenta a birrefringência, com menos luz sendo transmitida através das fibras e mais luz sendo dispersa (MUCHENJE *et al.*, 2009; SHIMOKOMAKI *et al.*, 2006). Dessa forma, a análise de cor é uma determinação física mais rápida e não destrutiva de distinguir carne PSE, pois é de consenso que amostras de peito de frango com valor de L* (luminosidade, 0= escuro e 100=claro) maior do que 53 (sistema de análise de cor objetiva CIE L* a* b*) são cortes tipicamente PSE (OLIVO, 2006), ou seja, que apresentam uma coloração mais clara (pálida).

A CRA é definida como a habilidade da carne em reter água durante a aplicação de forças externas, como o corte, o aquecimento, o cisalhamento e a pressão. A CRA é frequentemente afetada pelo pH e pela interação das proteínas da carne com a água, porém quando atinge o ponto isoelétrico (pI) das proteínas, ocorre uma diminuição na CRA. O pI das proteínas da carne estão entre os pHs de 5,3 a 5,9 e este também é o pH da carne quando atinge o *rigor mortis*. Por isso, a exposição das proteínas da carne a um pH baixo quando a temperatura da carne está elevada (acima de 35°C), leva a sua desnaturação e diminuição da CRA, ocorrendo a liberação excessiva de exudado que se encontrava entre os filamentos de actina e miosina. A actina e a miosina são importantes no entrelaçamento das proteínas, necessárias para a ligação da água e da gordura durante o processamento dos produtos cárneos (MUCHENJE *et al.*, 2009).

A qualidade final da carne de aves deve-se principalmente a fatores pré-abate que podem provir de efeitos a longo ou curto prazo, que ocorrem durante a vida do animal, como

fatores genéticos, fisiológicos, nutricionais, manejo e doenças ou podem ser decorrente de práticas realizadas até 24h antes do abate, como restrição de água e alimentos, apanha, engradamento, transporte, tempo de espera, descarregamento, pendura, imobilização, atordoamento e o próprio abate, sendo estes os pontos críticos que devem ser controlados para evitar consequências indesejáveis à qualidade da carne (SIMÕES, 2009; NORTH CUTT, 2001). Dentre todos os citados, ainda para aves o fator mais preocupante que reflete na qualidade da carne é o estresse térmico pré-abate, pois estudos têm verificado que há uma aceleração do desenvolvimento do *rigor mortis*, redução da CRA e aumento na palidez da carne (McKEE & SAMS, 1998).

3.4 ANÁLISE SENSORIAL

Há alguns estudos da carne PSE em frango realizados com provadores não treinados (GARCIA *et al.*, 2010) e outros com provadores treinados (KOMIYAMA, 2006; ODA 2006), porém não há pesquisas demonstrando que o consumidor consegue identificar cortes de frangos com características PSE, tanto na forma “*in natura*” como na forma preparada para o consumo. A análise sensorial é uma ferramenta importante para avaliar a qualidade e a aceitação de cortes de carnes. É definida como uma disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características dos alimentos e materiais pelo homem por meio dos órgãos dos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição (ABNT, 1993). O homem tem habilidade natural para comparar, diferenciar e quantificar atributos sensoriais em diferentes materiais. Desta maneira, a análise sensorial utiliza o próprio homem (julgador) para avaliar alimentos e bebidas, empregando a metodologia apropriada, e o tratamento estatístico dos dados obtidos (SBCTA, 2000).

Nas medidas sensoriais, os provadores são o instrumento de medida, e por serem humanos podem sofrer influências de diversos fatores como do próprio alimento que está sendo avaliado, do ambiente dos testes, reações de outros provadores, além de outros obtendo resultados controversos. Assim a análise sensorial deve ser conduzida de acordo com procedimentos adequados. Um dos efeitos psicológicos comum é o erro da expectativa, que surge quando o julgador possui conhecimento prévio ou esperado sobre o produto e para minimizar este erro devem-se fornecer apenas informações suficientes para a avaliação adequada do produto, pois detalhes em demasia podem influenciar os resultados (MEILGAARD *et al.*, 1999).

Os métodos sensoriais são agrupados em discriminativos, descritivos e afetivos. Nos métodos discriminativos e descritivos geralmente são necessários a seleção e/ou treinamento da equipe sensorial, já os afetivos são considerados as preferências ou opiniões pessoais dos membros da equipe. Os discriminativos são os testes de diferença (comparação pareada; triangular, duo-trio, ordenação e comparação múltipla ou diferença do controle), esses testes também podem ser conduzidos com consumidores habituados ao consumo do produto, após explicação do procedimento do teste. Exemplos de testes descritivos são perfil de sabor, perfil de textura e análise descritiva quantitativa. Nos afetivos estão incluídos os testes de preferência e aceitação (Comparação pareada – preferência, ordenação, escala hedônica e escala do ideal) (SBCTA, 2000).

Avaliar um produto sensorialmente é parte do dia-a-dia das pessoas que o fazem naturalmente desde crianças, quando aceitam ou rejeitam um alimento ou quando preferem um produto de uma determinada marca sobre outra pelas suas características sensoriais (SBCTA, 2000). Os estudos de consumidores são de grande utilidade na investigação de mercados, podendo ser realizados empregando equipe de consumidores tanto para avaliações em escala de laboratório, em condições controladas, como oferecendo produtos para que a

avaliação seja feita na própria casa dos indivíduos (GUERRERO, 1999). Quando realiza uma compra, o consumidor pode desenvolver diferentes mecanismos de decisão, que são influenciados por variáveis internas (cultura, classe social, grupo social e fatores econômicos) ou externas (percepção, aprendizagem, motivação e atitude). Dependendo do produto que pretende adquirir, maior é a complexidade na tomada de decisão de compra, e conseqüentemente maior a influência desses fatores sobre o processo (OLIVEIRA, 2008).

O estudo do comportamento do consumidor em relação a alimentos tem caráter multidisciplinar, pois envolve várias áreas tais como a ciência e tecnologia de alimentos, nutrição, psicologia e *marketing* (NORONHA *et al.*, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

Para a avaliação dos parâmetros físicos e análise sensorial da carne PSE em filés de frango foram utilizados 262 frangos comerciais de ambos os sexos da linhagem *Ross* com idades de 42 dias cedidos por um frigorífico localizado no município de Cafelândia/PR.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Abate dos frangos

Antes do abate, todos os frangos permaneceram em descanso pré-abate no galpão de espera, onde receberam aspersão de água e ventilação por um tempo médio de 45 min. Para o abate seguiu-se a linha de processamento comercial com as seguintes etapas: pendura, insensibilização elétrica, escaldagem (60 a 62 °C), depenagem, evisceração e resfriamento em pré-chiller com temperaturas de 5 a 10 °C por 25 min e em chiller com temperatura de 2 a 5 °C por 55 min. A permanência dos frangos na linha de abate foi de aproximadamente 90 min.

Em seguida, as carcaças foram retiradas da linha de processamento e desossadas manualmente, retirando-se as amostras de filés (*Pectoralis major*), que foram colocadas em bandejas plásticas identificadas, cobertos com plásticos de polietileno e armazenadas sob refrigeração a 2 °C por 24h para posterior análise de pH e luminosidade (valor de L*) para a

caracterização da carne PSE, e demais análises físicas como a CRA, PC, FC e análises sensoriais dos filés *in natura* e grelhados.

4.2.2 Caracterização da carne PSE

A identificação da carne PSE deu-se pela determinação em triplicata do pH e luminosidade (valor de L^*) com 24h *pós-mortem*. Foram consideradas carnes PSE as que apresentaram o valor de pH_{24h} inferior a 5,8 e valor de L^*_{24h} maior do que 53 (SOARES *et al.*, 2002).

4.2.2.1 Determinação do pH

As medidas de pH foram realizadas em triplicatas com auxílio do potenciômetro de contato (marca Testo) com 24h *post mortem*. O ponto de incisão do eletrodo foi a parte cranial ventral do filé conforme metodologia descrito por Olivo *et al.* (2001).

4.2.2.2 Medida da luminosidade

As medidas de luminosidade foram realizadas na face ventral do filé com 24h *post mortem*, tomando três pontos diferentes de leitura por amostra. Os valores de luminosidade (L^*) foram expressos no sistema de cor CIELab proposto pela *Comission Internationale de l'Eclairage* (CIE) em 1971. Os parâmetros de L^* foram fornecidos pelo colorímetro da marca

Minolta, em que L^* define a luminosidade ($L^*= 0$ preto e $L^*=100$ branco), a^* (componente vermelho-verde) e b^* (componente amarelo-azul).

Foram selecionados 20 filés de peito, sendo 10 de frangos PSE e 10 de frangos normais para as análises físicas em triplicata de CRA, PC e FC.

4.2.3 Capacidade de retenção de água (CRA)

A medida de CRA foi realizada em triplicata nos filés (PSE e normal) coletados com 24 horas *post-mortem* de acordo com o método descrito por Barbut (1996). Foi utilizada a medição de quantidade de água retida após a aplicação de uma pressão sobre o tecido muscular. Foram pesadas amostras em cubos de carne de aproximadamente 0,5 g e estas foram primeiramente colocadas entre dois papéis de filtro circulares e após, entre duas placas de acrílico, sobre as placas de acrílico foi colocado um peso de 10 kg e aguardou-se um tempo de 5 minutos. Posteriormente a amostra foi pesada para o cálculo da água retida. O resultado foi expresso em porcentagem de água retida em relação ao peso inicial da amostra (SIMÕES *et al.*, 2009).

4.2.4 Perda por cozimento (PC)

Os filés foram pesados, ainda íntegros, antes e após a cocção, com a finalidade de se conhecer a perda de peso durante o cozimento (*cooking loss*) (HONIKEL, 1998). Os resultados foram expressos em porcentagem, baseando-se na diferença de peso inicial da amostra em relação ao peso final. Primeiramente, os filés foram cozidos (grelhados) em chapa elétrica, previamente aquecida a 140 °C, até atingirem a temperatura interna de 72 °C (± 2 °C)

por aproximadamente 10 min., sendo 5 min. para cada lado do filé. A seguir, foram resfriados a 40 °C (± 2 °C) e novamente pesados em balança semi-analítica. A temperatura foi monitorada com auxílio de um termômetro digital. O resultado foi expresso em porcentagem de perda de peso após o cozimento em relação ao peso inicial da amostra.

4.2.5 Força de cisalhamento (FC)

A determinação da força de cisalhamento (maciez) de filés de peito *in natura* e grelhados foi realizada no texturômetro Texture Analyser TA-TX2i, equipado com lâmina Warner-Bratzler e regulado para a velocidade de 5,0 mm/s (BRATZLER, 1949). As amostras permaneceram congeladas (-18 °C) por 48 horas até a análise, e foram descongeladas em refrigerador (5 °C/ 12 h). Foram retiradas de cada amostra de filé cru (PSE e normal), seis amostragens na forma de cubos com 1,0 x 1,0 x 2,0 cm³ (altura, largura, comprimento) para a realização da avaliação da textura. Após, o restante do filé, foi cozido em chapa elétrica a 140 °C por aproximadamente 10 min. (5 min. para cada lado do filé) até atingirem temperatura interna de 72°C. Em seguida, foram novamente retiradas seis amostragens de cada amostra de filé grelhado na forma de cubo para a avaliação da textura. As amostragens foram colocadas com as fibras no sentido perpendicular às lâminas do aparelho e então realizada a análise de acordo com a metodologia descrita por Froning et al. (1978). Os resultados foram expressos em Newton (N), da força máxima necessária para o corte das amostras.

4.2.6 Avaliação sensorial

O projeto foi submetido e aprovado (Parecer nº 232/10) pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina para a realização dos testes sensoriais.

A avaliação sensorial dos filés de peito de frango caracterizados como PSE e normal foi realizada empregando-se consumidores (julgadores não-treinados) e desenvolvida em três etapas. Na primeira etapa, foram aplicados dois testes sensoriais (Intenção de Compra e Pareado de Diferença em relação à cor juntamente com a Intenção de Compra) para avaliação da aparência de cortes *in natura* de filés de peito. Esta etapa foi desenvolvida em um supermercado localizado na região noroeste do Paraná, no município de Campo Mourão.

A segunda (testes triangular e pareado de diferença de atributos) e a terceira (teste de aceitabilidade) etapas foram realizadas com filé de peito grelhados, e as análises desenvolvidas no Laboratório de Análise Sensorial da Cozinha Experimental da EMBRAPA-soja, Londrina - Paraná.

Os consumidores convidados e que aceitaram participar do estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos 1, 2 e 3) e preencheram uma ficha de identificação para a caracterização dos julgadores, contendo faixa etária e sexo (Anexo 4).

4.2.6.1 Primeira etapa

Os testes sensoriais realizados nesta etapa com os filés *in natura* foram conduzidos em momentos distintos e com grupos de consumidores diferentes.

4.2.6.1.1 Preparo da amostra

As amostras de filés com 24 horas *post mortem* foram congeladas em freezer doméstico a -18 °C por 24 horas. Após as amostras de filés *in natura* foram descongeladas em refrigerador (5° C/6 horas) e foram mantidas sob refrigeração (5° C) expostas em gôndolas no supermercado durante os testes, sob iluminação normal com intensidade de aproximadamente 500 lux (luz branca), acondicionadas em bandejas de isopor e polietileno cobertas com filmes plásticos. As amostras foram identificadas com código de três dígitos aleatórios.

4.2.6.1.2 Teste 1: Intenção de compra

Foram utilizados 58 consumidores de carne de frango de diferentes idades residentes no município de Campo Mourão/PR. Após explicar o procedimento do teste, foram apresentadas ao consumidor duas amostras (normal e PSE) codificadas de carne de peito de frango *in natura*, em ordem aleatória e solicitado a avaliar as amostras utilizando o modelo da Ficha de avaliação (Figura 1).

Teste de Intenção de Compra	
Nome: _____	Data: _____
Observe, da esquerda para a direita, as duas amostras codificadas de filé de peito de frango cru e indique, com um círculo no código, “Qual amostra você compraria?”	

Por que? _____	
Comentários:	

Figura 1 – Ficha de avaliação para o teste de intenção de compra

4.2.6.1.3 Teste 2: Pareado de diferença e intenção de compra

Foram utilizados 55 consumidores de carne de frango, de diferentes idades residentes no município de Campo Mourão/PR. Após explicar o procedimento do teste, foram apresentadas ao consumidor duas amostras (normal e PSE) codificadas de filé *in natura*, em ordem aleatória e solicitados a avaliar as amostras utilizando o modelo da Ficha de avaliação (Figura 2).

Teste Pareado de Diferença e Intenção de Compra	
Nome: _____	Data: _____
Observe, da esquerda para a direita, as duas amostras codificadas de filé de peito de frango cru e avalie a cor e indique qual amostra é mais clara.	

Qual amostra você compraria? _____	
Comentários: _____	

Figura 2 – Ficha de avaliação para o teste pareado de diferença e intenção de compra

4.2.6.2 Segunda etapa

Esta etapa foi realizada com filés grelhados de carnes normais e PSE e foram aplicados dois testes sensoriais. As análises foram desenvolvidas na cozinha experimental da Embrapa-Soja, Londrina, PR.

4.2.6.2.1 Preparo das amostras

Os filés de carne de peito de frango foram preparados e padronizados em relação a espessura, comprimento e largura. Os filés receberam minutos antes da cocção, a adição de 1,8% de cloreto de sódio e em seguida foram grelhados em chapa elétrica a 140°C, recebendo aproximadamente 2,0 mL de óleo de soja para cada 100 g de filé para auxiliar no aquecimento. As amostras permaneceram aproximadamente um intervalo de 5 minutos de aquecimento de cada lado do filé, podendo se repetir por 2 vezes até a temperatura interna atingir 72°C, para assegurar o cozimento completo e garantir a sua segurança e sanidade na eliminação de possíveis microorganismos causadores de intoxicação de origem alimentar. Após cocção as amostras foram cortadas em cubos de 1,5x1,5x1,0 cm³ (altura, comprimento e largura) e servidas aos consumidores três cubos de aproximadamente 5g (~15g) de cada amostra a temperatura de 40°C. As análises foram realizadas em cabines individuais sob luz branca e foi oferecida água potável à temperatura ambiente para lavar a boca antes e entre as avaliações.

4.2.6.2.2 Teste 1: Teste triangular

As amostras de filé normal e PSE grelhadas, sendo duas iguais e uma diferente, codificadas com números de três dígitos aleatórios foram apresentadas em todas as combinações possíveis à equipe composta por 68 consumidores. Após explicar o procedimento do teste, foi solicitado aos participantes a avaliar as amostras utilizando o modelo da Ficha de avaliação (Figura 3).

Teste Triangular	
Nome: _____	Data: _____
<p>Você está recebendo 3 amostras de filé de frango codificadas. Duas amostras são iguais e uma é diferente. Por favor, avalie as amostras, da esquerda para a direita, e circule o código da amostra DIFERENTE.</p>	
<p>Em quais características as amostras são diferentes?</p>	
<input type="checkbox"/> aparência	
<input type="checkbox"/> cor	
<input type="checkbox"/> sabor	
<input type="checkbox"/> maciez	
<input type="checkbox"/> suculência	
<input type="checkbox"/> Outra. Qual(is) _____	

Figura 3 – Ficha de avaliação para o teste triangular

4.2.6.2.3 Teste 2: Teste pareado de diferença de atributos

Participaram do teste, 57 consumidores para os quais foram apresentadas em ordem aleatória, duas amostras grelhadas normal e PSE codificadas com números de três dígitos aleatórios. Após explicar o procedimento do teste e indicar o protocolo de avaliação, “morder as amostras com os dentes incisivos (da frente), mastigar com os molares (do fundo), sendo uma mastigada por segundo, prestando atenção na maciez, suculência e sabor, e após engolir responder”, foi solicitado aos participantes proceder a análise utilizando o modelo da Ficha de Avaliação (Figura 4).

Teste Pareado de Diferença de Atributos	
Nome: _____	Data: _____
<p>Avalie, da esquerda para a direita, as duas amostras codificadas de filé de peito de frango grelhado e responda:</p>	
<p>Amostras ____ ____</p>	
<p>Qual é a mais macia? _____</p>	
<p>Qual é a mais suculenta? _____</p>	
<p>Qual tem sabor característico de frango mais acentuado? _____</p>	
<p>Comentários: _____</p>	

Figura 4 – Ficha de avaliação para o teste pareado de diferença de atributos

4.2.6.3 Terceira etapa

Na terceira etapa foi realizado o teste sensorial para avaliar o nível de aceitação de amostras de filés de peito PSE e normal. O teste sensorial foi realizado com amostras grelhadas e desenvolvido na Cozinha Experimental da Embrapa-soja, Londrina, PR.

4.2.6.3.1 Preparo da amostra

As amostras foram preparadas conforme o procedimento descrito no item 4.2.6.2.1 da segunda etapa.

4.2.6.3.2 Teste de aceitação – Escala hedônica

Para determinar a aceitação foi utilizado o teste de escala hedônica de 9 pontos (Figura 5). A equipe foi composta por 58 consumidores, as amostras normais e PSE grelhadas foram codificadas com números de três dígitos aleatórios e apresentadas aos julgadores em ordem aleatória de forma monádica.

Teste de Escala Hedônica	
Nome: _____	Data: _____
Avalie a amostra codificada e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou.	
9 – gostei muitíssimo	
8 –	
7 –	
6 –	
5 – nem gostei/nem desgostei	
4 –	
3 –	
2 –	
1 – desgostei muitíssimo	
Comentários: _____	

Figura 5 – Ficha de avaliação para o teste de aceitação utilizando escala hedônica de 9 pontos.

4.2.7. Análise estatística

Os resultados dos testes pareado de diferença e triangular foram avaliados pelo teste binomial utilizando tabelas apropriadas (MEILGAARD *et al.*, 1999). Resultados do teste de aceitabilidade e dos testes físico-químicos foram submetidos a ANOVA e teste de comparação de médias de t de *Student*. O nível de significância utilizado para os testes estatísticos foi de 5%. Utilizou-se o programa Statistica 7.0 (STATSOFT, 2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da Carne PSE

O índice de carne PSE observado em 262 filés de peito coletadas foi de 12,60% próximos ao descrito por Garcia *et al.* (2010) cuja incidência de PSE em amostras de filés de peito de frango foi de 10,20%. A caracterização da carne PSE realizada pelos valores médios de pH e luminosidade (valor de L*) medidos 24 h *post mortem* foram de 5,96 e 49,24 para as amostras normal e 5,61 e 59,20 para as PSE, respectivamente, e as amostras diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$) pelo teste t de *Student* (Tabela 1). Os valores de classificação para a carne PSE obtidos em relação ao pH e a luminosidade (L*) corroboram com Soares *et al.* (2002) e Barbut (1997), que afirmaram que o valor de pH para as carnes PSE em frango deve ser menor do que 5,8 e carnes normais entre 5,8 a 6,0 e para L* deve ser maior do que 53, pois valores de $L^* < 44$ foi classificado como análogo ao DFD (*Dry, Firm, Dark*) e valores intermediários, $44 \leq L^* \leq 53$, considerado como carne normal. A Figura 6 apresenta uma foto de dois filés de peito de frango, um normal e outro PSE.

Tabela 1 – Análises físicas de pH e luminosidade (L*) nos filés PSE e normais dos frangos:

Filés de peito	pH _{24h}	Luminosidade (L* _{24h} – 0 a 100)
Normal (n=10)	5,96 ^a ± 0,08	49,24 ^b ± 3,47
PSE (n=10)	5,61 ^b ± 0,19	59,20 ^a ± 1,97

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de t de *Student* ($p \leq 0,05$)

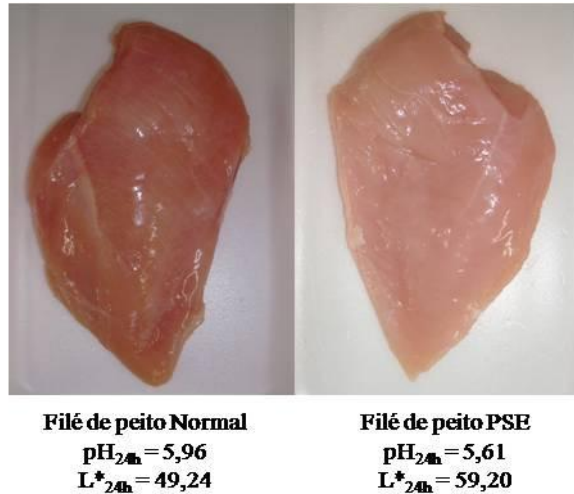


Figura 6 – Foto de filés Normal e PSE de frango

Os valores de $L^*_{24\text{h}}$ e de $\text{pH}_{24\text{h}}$ de carnes PSE e normal apresentaram correlações negativas e significativas ($p \leq 0,05$) (Figura 7). Foi observada uma correlação inversa entre os valores de pH e L^* , ou seja, quanto menor o pH, maior será o valor de L^* , ou vice-versa (SHIMOKOMAKI *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2003; SOLOMON *et al.*, 1998; BARBUT, 1997).

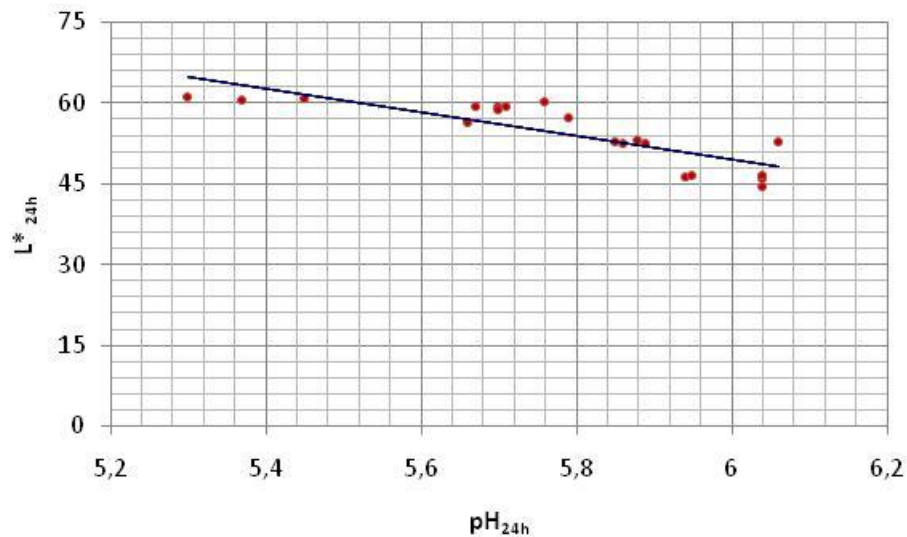


Figura 7 - Correlação entre os valores de $L^*_{24\text{h}}$ e de $\text{pH}_{24\text{h}}$ das carnes PSE e normal de frango ($p \leq 0,05$, $y = -22,08x + 181,9$ e $r^2 = 0,707$).

5.2 Determinações dos Parâmetros Físicos

Os parâmetros físicos de CRA, PC e FC foram avaliados nas 20 amostras selecionadas aleatoriamente após a caracterização da carne PSE de filé de peito de frango, oriundas de animais PSE (n=10) e de animais normal (n=10) e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Observa-se que apenas a FC da carne *in natura* entre as amostras PSE e normal não diferiu estatisticamente. As demais análises diferiram ao nível de 5% pelo teste t de *Student*. As amostras normal apresentaram maior CRA (14,50%), menor PC (30,92%) e menor FC (65,41%) após o cozimento em relação as amostras PSE (Tabela 2). As carnes PSE apresentam uma degradação e desnaturação protéica mais intensa do que a normal devido a queda brusca do pH durante a glicólise *post-mortem*, e isso, posteriormente, causou redução na CRA, maior PPC e aumento na rigidez da carne (OLIVO *et al.*, 2001; VIEIRA, 1999; BARBUT, 1997). Assim, os parâmetros físicos avaliados (Tabela 2) estão de acordo com os dados descritos por estes pesquisadores.

Tabela 2 – Análises físicas de CRA, PC e FC realizadas nos filés PSE e normal dos frangos

Filés	CRA (%)	PC (%)	FC da carne <i>in natura</i> (N)	FC da carne grelhada (N)
Normal (n=10)	69,28 ^a ± 5,67	26,84 ^b ± 5,68	14,96 ^a ± 3,35	24,66 ^b ± 5,72
PSE (n=10)	59,23 ^b ± 5,09	35,14 ^a ± 2,62	11,98 ^a ± 3,11	40,79 ^a ± 11,24

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de t de *Student* ($p \leq 0,05$)

5.3 Avaliação Sensorial

5.3.1 Primeira Etapa

O objetivo da primeira etapa da análise sensorial foi verificar a percepção do consumidor em relação à carne PSE de frango por meio de sua intenção de compra e identificação da cor. Foram realizados dois testes nesta primeira etapa, o Teste de intenção de compra e o Teste pareado de diferença e intenção de compra, desenvolvidos em um supermercado na cidade de Campo Mourão/Paraná. Os testes foram realizados em dois momentos e com grupos de consumidores diferentes e com perguntas elaboradas de formas diferentes (testes para evitar efeito psicológico no participante e ter uma resposta mais segura. Os testes da primeira etapa foram realizados em dois momentos, com grupos de consumidores diferentes (teste 4.2.6.1.2 e 4.2.6.1.3) para evitar efeito psicológico no participante e obter respostas mais seguras.

No teste de intenção de compra, 50 dos 58 consumidores participantes do teste comprariam os cortes de carne *in natura* caracterizado como normal, indicando diferença estatística significativa (teste bicaudal). As principais respostas do “por que” da preferência pelos cortes normais foram aparência, melhor consistência e textura, cor mais atrativa (mais rosada) e viva, aparência saudável e característica de carne fresca, e menor quantidade de líquido na bandeja. No segundo teste pareado de diferença para o atributo cor e intenção de compra, verificou-se que 43 dos 55 participantes indicaram os cortes de carne PSE como sendo as amostras mais claras ($p \leq 0,05$, teste monocaudal). Em relação a intenção de compra, dos 55 consumidores, 42 comprariam as amostras normais, indicando também diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste bicaudal). De acordo com Brewer e Mckeith (1999), Candek-

Potokar *et al.*, (1998) e Barbut (1997) a carne PSE é uma carne pálida, ou seja menos rosada e vivaz, possui textura flácida, ou seja, mole e apresenta uma maior quantidade de líquido exsudado em relação a carne normal. A palidez está associada a desnaturação protéica causada pelo baixo pH e pela elevada temperatura da carcaça durante o *rigor mortis*. A cor observada na superfície das carnes foi o resultado da absorção seletiva da mioglobina, provocada pela distribuição da luz que emerge da carne. O pH ácido aumenta a interação proteína-proteína e ocorre maior expulsão da água, conseqüentemente aumenta a birrefringência, com menos luz sendo transmitida através das fibras e mais luz sendo dispersa (SWATLAND, 2008; OLIVO, 2006; SHIMOKOMAKI *et al.*, 2006).

Observou-se nesta primeira etapa que o consumidor, mesmo sem treinamento, consegue diferenciar o corte PSE do normal, pela cor e por outros atributos (aparência, textura, consistência, entre outros) e opta pela compra de carne normal. Em um estudo realizado por Oda (2006) com julgadores treinados também foi possível detectar a diferença visual na intensidade da coloração de filés PSE em relação aos normais.

5.3.2 Segunda etapa

Na segunda etapa o objetivo foi verificar a percepção dos consumidores em relação à carne de frango grelhada. Foram também realizados dois testes sensoriais (Teste triangular e Teste pareado de diferença de atributos) em momentos distintos e com diferentes participantes, de ambos os sexos e de faixa etária variando entre 15 e acima de 56 anos. No teste triangular que avalia diferença global, houve 38 respostas corretas para 68 participantes, indicando diferença sensorial entre as amostras ($p \leq 0,05$, teste monocaudal). As principais características indicadas pelos consumidores como responsáveis pelas diferenças foram

maciez (30,5%), sabor (25,3%), suculência (19%) e outras (25,2%) Assim, a maciez, o sabor e a suculência foram os atributos selecionados para serem avaliados no teste pareado de diferença de atributos.

Participaram do teste pareado de diferença de atributos 57 consumidores (Tabela 3). Dos atributos avaliados apenas o sabor das amostras apresentou diferença estatística ($p \leq 0,05$, teste monocaudal), sendo que a amostra normal foi considerada como tendo sabor de frango mais acentuado. Os consumidores não perceberam diferenças entre as amostras em relação a maciez e suculência, apesar das diferenças obtidas nos testes físicos. Para o consumidor, que é um julgador não treinado, foi mais fácil a diferenciação do sabor, que é uma experiência mista, porém unitária de sensações olfativa, gustativas e táteis percebidas durante a degustação e são influenciadas pelos efeitos táteis, térmicos, dolorosos e/ou cinestésicos e pela própria suculência (ABNT, 1993).

Tabela 3 – Número de respostas avaliadas no teste pareado de diferença de atributos

Atributo	Número de Respostas	
	Carne PSE	Carne Normal
Qual é a mais macia?	24 ^a	33 ^a
Qual é a mais suculenta?	29 ^a	28 ^a
Qual tem sabor característico de frango mais acentuado?	17 ^b	40 ^a

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste binomial (monocaudal) $p \leq 0,05$ (Tabelas apropriadas, Meilgaard et al., 1999)

Apesar de não ter ocorrido diferença estatística significativa da maciez e da suculência na avaliação sensorial, estas foram detectadas pelas análises físicas da força de cisalhamento, CRA e PC que apresentaram diferenças estatísticas significativas entre amostras cozidas normais e PSE. A CRA e a PC são índices importantes para averiguar a qualidade de cozimento de produtos cárneos, uma vez que têm uma relação direta com a maciez e suculência, pois o processo de cocção provoca mudanças estruturais na carne e uma carne com características normais consegue manter a sua CRA e ter uma menor PC durante a

coção influenciando positivamente no sabor, na suculência e na maciez (TORNBERG, 2005).

Em estudo sensorial da carne PSE realizado por Garcia *et al.* (2010) com julgadores não treinados, não se encontrou diferença significativa em relação a filés de peito normais na avaliação de atributos como o sabor, maciez, preferências e aspectos gerais. Isso também foi observado por Komiyama (2006) e por Oda (2006), porém com julgadores treinados onde não foram encontradas diferenças significativas para os atributos de sabor e textura (mastigabilidade, maciez, suculência) avaliados nas carnes PSE e normais.

5.3.3 Terceira etapa

A terceira etapa da análise sensorial foi o teste de aceitabilidade. A amostra normal teve maior aceitabilidade (8,5) em relação a PSE (7,5) ($p \leq 0,05$) (Tabela 4). Todas as notas de aceitação das amostras normal foram iguais ou superiores a 7,0 (gostei moderadamente). E para as amostras PSE apesar da maioria (82,7%) das avaliações também ter sido iguais ou superiores a 7,0 (gostei moderadamente), 7% dos provadores deram nota 6,0 (gostei ligeiramente), 8,6% foram indiferentes e 1,7% deram a nota 2,0 (desgostei muito) (Figura 8).

A carne PSE apresenta perdas de propriedades sensoriais e tecnológicas, tornando estas carnes com qualidade inferior ao de uma carne normal que são perceptíveis no momento da compra, durante o preparo e degustação.

Tabela 4 – Valores hedônicos médios das amostras de filés PSE e normal do teste de aceitabilidade

Filé grelhado	Avaliação
Normal	8,5 ^a
PSE	7,5 ^b

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$) (1= desgostei muitíssimo e 9= gostei muitíssimo).

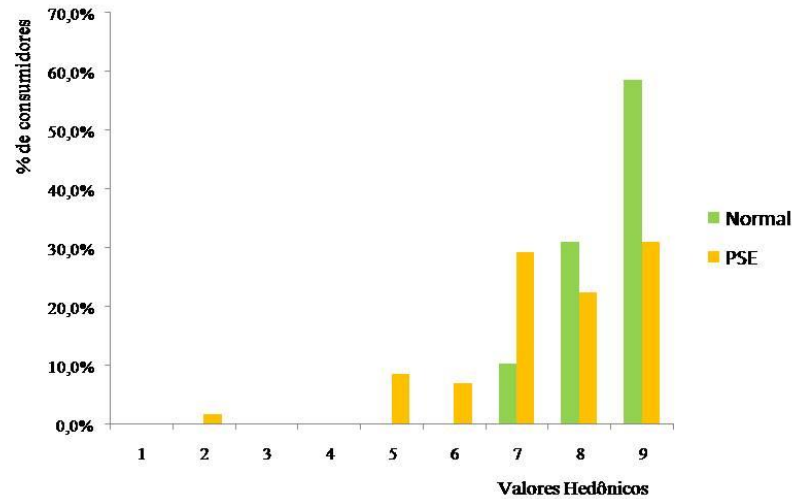


Figura 8 – Frequência dos valores hedônicos para carne normal e PSE de frango

As figuras 9 e 10 indicam a caracterização dos consumidores participantes dos testes sensoriais das etapas 1, 2 e 3 em relação ao sexo e a faixa etária (Anexo 4).

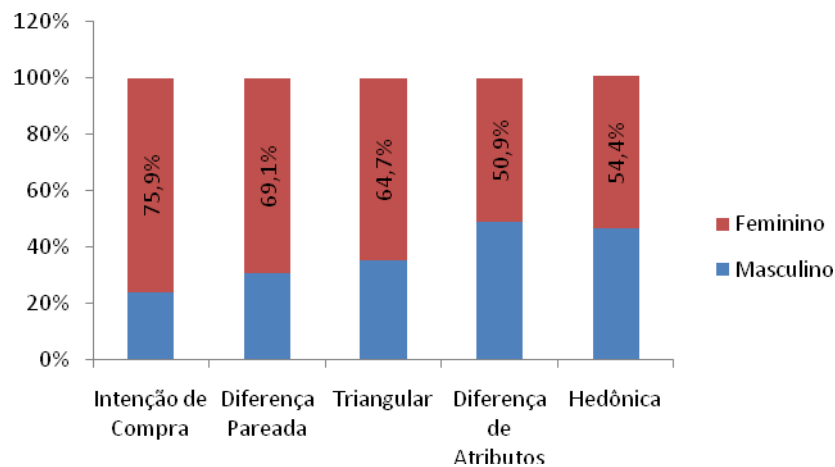


Figura 9 – Frequência do sexo dos consumidores participantes dos testes sensoriais

Na Figura 9 observa-se que predominou a participação de mulheres em todos os testes sensoriais desenvolvidos, principalmente nos dois primeiros testes da primeira etapa (Intenção de compra e o Diferença pareada) realizados no supermercado. Verifica-se que ainda predomina a participação da mulher na aquisição de alimentos. Segundo Persona (2008) as mulheres são responsáveis pela maior parte das decisões de compra de uma família, sendo uma tendência crescente, devido a sua participação maior no mercado de trabalho com aumento do seu ganho individual que reflete o seu poder de compra. Em relação a faixa etária nos testes realizados no supermercado (intenção de compra e diferença pareada) a maioria dos entrevistados tinha idade entre 26 a 35 anos e 36 a 45 anos. E nos demais testes realizados (triangular, pareado de diferença de atributos e escala hedônica) predominaram as faixas etárias de 15 a 25 e de 26 a 35 anos (Figura 10).

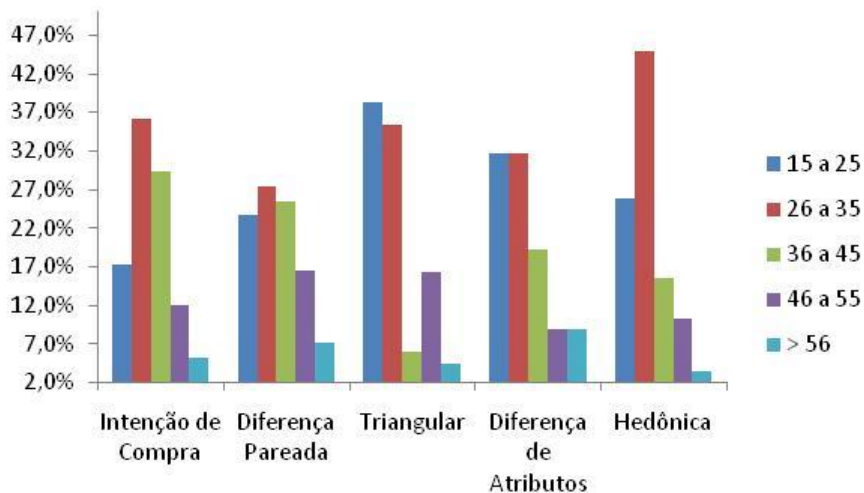


Figura 10 – Frequência da faixa etária dos consumidores participantes das análises sensoriais

Os resultados apresentados no capítulo 1 deste trabalho geraram um artigo científico que está apresentado conforme segue no item 9 e que será submetido no periódico *Food Chemistry*.

6 CONCLUSÃO

O consumidor conseguiu distinguir diferenças de coloração entre filés *in natura* PSE e normal e têm preferência pela compra de carne normal. No entanto, no produto grelhado o consumidor teve habilidade para distinguir somente o sabor não distinguindo maciez e suculência entre filés PSE e normal, mas a sua aceitabilidade foi maior para os filés normais.

Na avaliação dos parâmetros físicos os filés normais apresentaram melhores características em relação aos PSE.

7.0 REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Análise sensorial dos alimentos e bebidas – Terminologia – NBR 12806. São Paulo: ABNT, 1993.

ANADÓN, H. L. S. **Biological, nutritional, and processing factors affecting breast meat quality of broilers**. 171p. Tese (University of Virginia - Polytechnic Institute and State University), 2002.

BARBUT, S. Estimates and detection of the PSE problem in young turkey breast meat. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.76, n.3, p.455-457, 1996.

BARBUT, S. Occurrence of pale soft exudative meat in mature turkey hens. **British Poultry Science**, Edinburgh, v. 38, n. 1, p. 74-77, 1997.

BENDALI, J. R.; WISMER-PEDERSEN, J., Some properties of the fibrillar proteins of normal and watery pork muscle. **Journal of Food Science** 27, 1962.144p.

BRATZLER, L. J. Determining the tenderness of meat by use of the Warner-Bratzler method. **Proceedings of the Reciprocal Meat Conference**, 1949, 2:114.

BRESSAN, M. C.; BERAQUET, N., J. Efeito de fatores pré-abate sobre a qualidade da carne de peito de frango. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.26, n.5, p.1049-1059, 2002.

BREWER, M. S.; McKEITH, F. K. Consumer-rated quality characteristics as related to purchase intent of fresh pork. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.1, p. 171-174, 1999.

CANDEK-POTOKAR, M.; ZLENDER, B.; LEFAUCHEUR, L.; BONNEAU, M., Effects of age and/or weight at slaughter on longissimus dorsi muscle: Biochemical traits and sensory quality in pigs. **Meat Science**, 48, 1998, 287-300.

CHEAH, K. S.; CHEAH, A. M. Skeletal muscle mitochondrial phospholipase A₂ and the interaction of mitochondrial and sarcoplasmic reticulum in porcine malignant hyperthermia. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v.638, p.40-49, 1981.

DE SOUZA, H. B. A. Parâmetros físicos e sensoriais utilizados para avaliação de qualidade da carne de frango. 2005. Acesso em: 30 de Julho de 2007. Disponível em: http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_v0b5311x.pdf.

DRANSFIELD, E.; SOSNICKI, A. A. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. **Poultry Science**, Savoy, v. 78, p. 743-746, 1999.

FLETCHER, D. L. Poultry meat quality. **World's Poultry Science Journal**. Ithaca, v. 58, n. 2, p. 131-145, 2002.

FRONING, G.W.; BABJI, A.S.; MATHER, F.B. The effect of preslaughter temperatures, stress, struggle and anesthetization on color and textural characteristics of turkey muscle. **Poultry Science**, v.57, n.3, p.630-633, 1978.

FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; LEON, S.; KHANNA, V.K.; WEILER, J.E.; O'BRIEN, P.J.; MACLENNAN, D.H. Identification of mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, 253:448-451, 1991.

GARCIA, RG; FREITAS LW; SCHWINGEL AW; FARIAS RM; CALDARA, F.R.; GABRIEL, A.M.A.; GRACIANO, J.D.; KOMIYAMA, C.M.; ALMEIDA PAZ, I.C.L. Incidence and Physical Properties of PSE Chicken Meat in a Commercial Processing Plant. **Revista Brasileira de Ciência Avícola/ Brazilian Journal Poultry Science**, 12(4):233-237, 2010.

GREASER, M.L. Conversion of muscle to meat. 37102p. In: Muscle as Food. P.J., BECHTEL, ed. Academic Press, New York, NY. 1986.

GUARNIERI, P.D.; OLIVO, R.; SOARES, A.; IDA, E.I.; LARA, J.A.F.; SHIMOKOMAKI, M. Bem estar animal e qualidade da carne de aves: uma exigência dos consumidores. **Revista Nacional da Carne**, ano XXVI, nº 301, p. 36-44, 2002.

GUERRERO, L. Estudios de consumidores: Análisis de los errores más habituales. In: ALMEIDA, T. C. A.; HOUGH, G.; DAMÁSIO, M. H.; SILVA, M. A. A. P. **Avanços em análise sensorial**. São Paulo: Varela, 1999. p.121-129.

HONIKEL, K.O. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. **Meat Science**, 49 (4), 1998, p. 447-457.

KISSEL, C.; SOARES, A. L.; ROSSA, A.; SHIMOKOMAKI, M. Functional properties of PSE (Pale, Soft, Exudative) broiler meat in the production of mortadella. **Brazilian Archives of Biology and Technoogy**, 52, 213-217, 2009.

KOMIYAMA, C.M.; MENDES, A.A.; TAKAHASHI, S. E.; MOREIRA, J.; BORBA, H.B.A.; LEONEL, F.R.; ROÇA, R.O. ALMEIDA PAZ, I.C.L.; NETO, A.B. Características

qualitativas de produtos elaborados com carne de frango pálida e normal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas 29(1):38-45, 2009.

KOMIYAMA, C.M. Caracterização e ocorrência de carne pálida em frango de corte e seu efeito na elaboração de produtos industrializados. **Dissertação** de Mestrado, FMVZ/UNESP-Botucatu-SP, 2006, 89p.

LANGER, R. O. S., SIMÕES, G. S., SOARES, A. L., OBA, A., ROSSA, A., SHIMOKOMAKI, M., IDA, E. I. Broiler transportation conditions in a Brazilian commercial line and the occurrence of breast PSE (Pale, Soft, Exudative) meat and DFD-like (Dark, Firm, Dry) meat. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p.1161-1167, 2010.

LARA, J. A. F.; LEDUR M.C.; NEPOMUCENO, A. L.; SHIMOKOMAKI, M. Estresse Térmico e Incidência de Carne PSE em Frangos. **Brazilian Journal of Poultry Science** supl. 4, Campinas, p. 15, 2002.

MA, R.T-I; ADDIS, P.B. The association of struggle during exsanguination to glycolysis, protein solubility and shear in turkey pectoralis muscle. **Journal of Food Science**, v.38, p.995-997, 1973.

MANCINI, R. A.; HUNT, M.C. Current research in meat color. **Meat Science**, 71: 100-121, 2005.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory evaluation techniques. 3° ed., Flórida – USA: CRC Press, 1999, 281p.

McCURDY, R.D., BARBUT,S., QUINTON, M. Seasonal effects on pale, soft exudative (PSE) occurrence in young turkey breast meat. **Food Research**. Int., Essex,, v.29, p.363-366, 1996.

McKEE, S. R.; SAMS, A. R. Rigor mortis development at elevated temperatures induces pale exudative turkey meat characteristics. **Poultry Science**, Champaign, v.77, n.1, p.169-174, 1998.

MICKELSON, J. R.; LOUIS, C. F. Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca²⁺ regulation defects. **Physiological Review** , Baltimore, v. 76, n. 2, p. 537-592, 1996.

MITCHELL, G.; HEFFRON, J.J.A. Porcine stress syndromes. **Advance in Food Research**, v.28, p.167-279, 1982.

MUCHENJE, V.; DZAMA, K.; CHIMONYO,M.; STRYDOM, P.E.; HUGO, A.; RAATS, J.G. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: A Review. **Food Chemistry**, 112:279-289, 2009.

MUÑOZ, A.M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory evaluation in quality control. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. 240 p

NORONHA, R. L. F.; DELIZA, R.; SILVA, M. A. P. A expectativa do consumidor e seus efeitos na avaliação sensorial e aceitação de produtos alimentícios. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.16, n.3, p.299-308, 2005.

NORTHCUTT, J. K. Preslaughter factors affecting poultry meat quality. In: A. R. SAMS, **Poultry Meat Processing**, ed. CRC Press, Boca Raton, p.5-18, 2001.

OBA, A.; ALMEIDA, M. PINHEIRO, J. W.; IDA, E. I.; MARCHI, D. F.; SOARES, A. L.; SHIMOKOMAKI, M. The Effect of Management of Transport and Lairage Conditions on Broiler Chicken Breast Meat Quality and DOA (Death on Arrival). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p.205-211, 2009.

ODA, S.H.I. **Análises moleculares do gene codificador da proteína receptora de rianodina e ocorrência de carne PSE (*Pale, Soft, Exudative*) em frangos**. 167p, 2006 (Tese de doutorado em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, Brasil).

OLIVO R. O mundo das carnes: Ciência, Tecnologia & Mercado. 3ªed. Criciúma: Ed. do autor, 2006.

OLIVO, R.; SOARES, A.L.; IDA, E.I.; SHIMOKOMAKI, M. Dietary vitamin e inhibits poultry pse and improves meat functional properties. **Journal of Food Biochemistry**, v.25, n. 4, 271-283, 2001.

OLIVO, R. **Carne PSE em frangos**. 97p. , 1999. (Tese de doutorado em Ciência de Alimentos - Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brasil).

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M.; FUKUSHIMA, S. Carne PSE em frangos. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, v. 27, n. 252, p. 32-34, 1998.

OLIVEIRA, H. P. S. **O consumo de alimentos funcionais: Atitudes e comportamentos**. 2008, 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Comunicação) - Universidade Fernando Pessoa, Porto.

PARDI, M.C. SANTOS, I. F.SOUZA, E. R. PARDI, H. S. Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne. Vol I 1º edição. Editora UFG, Goiânia, 596 p, 1995.

PERSONA, M. Poder de compra das mulheres. Entrevista concedida ao Portal Vila Mulher, 2008. Disponível no site: <http://www.mariopersona.com.br/entrevista-compras-vilamulher.html>, pesquisado em: 13/01/2011.

PRICE, J. F. SCHWEIGERT, B. S. Ciencia de la Carne y de los Productos Carnicos. Editora Acribia, S.A. 2º edição, Zaragoza/ España, 581p., 1994.

PRODUÇÃO MUNDIAL DE CARNE DE FRANGO. Pesquisado no site Avicultura Industrial: WWW.aviculturaindustrial.com.br em 01 de agosto de 2010.

SANTÉ, V.; BIELICKI,G.; RENERRE, M.; LACOURT, A. Post mortem evolution in the Pectoralis superficialis muscle from two turkey breeds: Relationship between pH and colour changes. Page 465-468 in: 37th International Congress of Meat and Technology, v.1, Kulmbach, Germany. Federal Center for Meat research, Kulmbach, Germany. 1991.

SARCINELLI, M.F.; VENTURINI, K.S.; SILVA, L.C. Produção de frango de corte. **Boletim Técnico da Universidade Federal do Espírito Santo**: PIE-UFES:00107, editado em 25/05/2007. Pesquisado no site: www.agais.com em 01 de agosto de 2010.

SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N. N.; FRANCO, B.D.C.M. Atualidades em ciência e tecnologia de carnes. Editora Varela, São Paulo, 2006. 236p.

SILVA, J.G., O crescimento da população e a demanda por alimentos. Disponível no site: <http://www.nftalliance.com.br/producao-de-alimentos-qual-o-papel-da-america-latina-ate-2050/>, pesquisado em: 01/02/2011.

SIMÕES, G.S.; OBA, A.; MATSUO, T.; ROSSA, A.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I. Vehicle thermal microclimate evaluation during brazilian summer broiler transport and the occurrence of PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52, 2009, 195-204.

SIMÕES, G. S. **Microambiente térmico no transporte de frangos no verão e inverno e ocorrência de pse (*pale, soft, exudative*) e análogo ao dfd (*dark, firm, dry*) em filés de peito (*pectoralis major*)**. 123p, 2009 (Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, Brasil)

SWATLAND, H.J. How pH causes paleness or darkness in chicken meat. **Meat Science**, 80, 2008, 396-400.

SOARES, A., L.; IDA, E. I.; MIYAMOTO, S.; BLAZQUEZ, F. J. H.; OLIVO, R.; PINHEIRO, J.W.; SHIMOKOMAKI, M. Phospholipase A2 activity in poultry PSE, Pale, Soft, Exudative, **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 309-319, 2003.

SOARES, A.L.; LARA, J.A.F.; IDA, E.I.; GUARNIERI, P.D.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Variation in the colour of brazilian broiler breast fillet. In: **Proceedings 48th International Congress of Meat Science and Technology**.48, 2002. 540- 541.

SBCTA - Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. **Análise sensorial – testes discriminativos e afetivos. Manual** – Série qualidade. 1º Ed., 2000, 127p.

SOLOMON, M. B.; VAN LAACK, R. L. J. M.; EASTRIDGE, J. S. Biophysical basis of pale, soft, exsudative (PSE) pork and poultry muscle: a review. **Journal Muscle Food, Trumbull**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 1998.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows**: computer program manual. Versão 7.1. Tulsa: Software Inc., 2006.

STRASBURG, G.M.; CHIANG, W. Pale,Soft, exudative turkey – The role of ryanodine receptor variation in meat quality. **Poultry Science**,**88**, 2009. 1497-1505.

STRASBURG, G. M.; CHIANG, W.,Genetic Basis for Pale, Soft and Exudative Turkey meat. Proceedings of the 56th American **Meat Science** Association Reciprocal Meat Conference. 15-18 de junho. 2003.Colúmbia, Missouri.

TORNBERG, E. Effects of heat on meat proteins - Implications on structure and quality of meat products. **Meat Science**, v. 70, n. 3, p. 493-508, 2005.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. **A indústria avícola – História**. Disponível no site: www.brazilianchicken.com.br, acesso em: 29/11/2010.

VIEIRA, S.L. Considerações sobre as características de qualidade de carne de frango e fatores que podem afetá-la. In: **Anais** da 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 1999; Porto Alegre, RS. Brasil. p.81-7.

8 ANEXOS

8.1 ANEXO 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido na forma de convite para avaliadores da carne de frango no teste da aparência visual realizada no supermercado

“Estudo sensorial e físico da carne de frango”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “Estudo sensorial e físico da carne de frango”, de minha tese de doutorado junto ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UEL, LONDRINA/PR. O objetivo da pesquisa é realizar uma avaliação sensorial e física da carne de peito de frango originário de diferentes espécies de frangos. A sua participação é muito importante e você participará como integrante de uma equipe de consumidores que irá avaliar a aparência da cortes de carne de peito de frango cru e indicar se existe diferença na cor e que amostra compraria. O teste sensorial não tomará muito seu tempo e não envolverá nenhuma tarefa difícil, apresentando um tempo de análise estimado de 10 minutos. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é voluntária, podendo recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo pessoal. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Os benefícios esperados são informação para a continuação de um estudo da carne de frango que vem sendo realizada por um grupo na área de carnes da UEL, e isso irá ajudar a esclarecer dúvidas relevantes aos problemas de tecnologia no processamento de produtos a base de carne de frango. Informamos que você não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa. Caso dúvidas ou necessite de esclarecimentos pode nos contatar (Prof. Massami Shimokomaki, DCTA/UEL, mshimo@uel.br, (43) 3371-4987), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371–2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 2010.

Pesquisador Responsável: Adriana Aparecida Droval

RG: 6.199.835-7

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa),
tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

8.2 ANEXO 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido na forma de convite para provedores da carne de frango no teste triangular e pareado de diferença de atributos

“Estudo sensorial e físico da carne de frango”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “ESTUDO SENSORIAL E FÍSICO DA CARNE DE FRANGO”, de minha tese de doutorado junto ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UEL, LONDRINA/PR. O objetivo da pesquisa é realizar uma avaliação sensorial e física da carne de peito de frango originário de diferentes espécies de frangos. A sua participação é muito importante e você participará como integrante de uma equipe que irá degustar amostras de filés de peito de frango grelhadas e será solicitado a avaliar diferenças globais e atributos entre as amostras apresentadas. Os filés serão preparados de forma similar ao uso doméstico, com adição apenas de sal de cozinha e serão grelhados. A análise sensorial levará em torno de 15 minutos, e você poderá fazê-la no horário que tiver maior disponibilidade. A ingestão de tal produto não trará nenhum risco à sua saúde por se tratar de um alimento seguro. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo pessoal. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Os benefícios esperados são informação para a continuação de um estudo da carne de frango que vem sendo realizada por um grupo na área de carnes da UEL, e isso irá ajudar a esclarecer dúvidas relevantes aos problemas de tecnologia no processamento de produtos a base de carne de frango. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa. Caso tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contatar (Prof. Massami Shimokomaki, DCTA/UEL, mshimo@uel.br, (43) 3371-4987), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371-2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ____ de _____ de 2010.

Pesquisador Responsável: Adriana Aparecida Droval

RG: 6.199.835-7

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa),
tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

8.3 ANEXO 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido na forma de convite para provedores da carne de frango no teste de aceitação

“Estudo sensorial e físico da carne de frango”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “ESTUDO SENSORIAL E FÍSICO DA CARNE DE FRANGO”, de minha tese de doutorado junto ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UEL, LONDRINA/PR. O objetivo da pesquisa é realizar uma avaliação sensorial e física da carne de peito de frango originário de diferentes espécies de frangos. A sua participação é muito importante e você participará como integrante de uma equipe que irá degustar amostras de filés de carne de frango grelhada e será solicitado a dar sua opinião sobre o quanto gosta dos produtos. Os filés de peito de frango serão preparados de forma similar ao uso doméstico, com adição apenas de sal de cozinha e serão grelhados. A análise sensorial levará em torno de 15 minutos, e você poderá fazê-la no horário que tiver maior disponibilidade. A ingestão de tal produto não trará nenhum risco à sua saúde por se tratar de um alimento seguro. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é voluntária, podendo recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo pessoal. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Os benefícios esperados são informação para a continuação de um estudo da carne de frango que vem sendo realizada por um grupo na área de carnes da UEL, e isso irá ajudar a esclarecer dúvidas relevantes aos problemas de tecnologia no processamento de produtos a base de carne de frango. Informamos que você não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa. Caso dúvidas ou necessite de esclarecimentos pode nos contatar (Prof. Massami Shimokomaki, DCTA/UEL, mshimo@uel.br, (43) 3371-4987), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371-2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 2010.

Pesquisador Responsável: Adriana Aparecida Droval

RG: 6.199.835-7

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa),
tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

8.4 ANEXO 4 – Caracterização dos Julgadores

Caracterização dos julgadores

Por favor, preencha os dados abaixo:

Nome: _____ Data: _____

Sexo: () feminino () masculino

Faixa etária:

() 15 a 25 anos () 26 a 35 anos () 36 a 45 anos () 46 a 55 anos () acima de 56 anos

Obrigada!!

9 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo Científico que será submetido ao periódico *Food Chemistry*.
As normas da revista encontram-se colocadas após apresentação do artigo

Avaliação sensorial de filés PSE (Pale, Soft, Exudative) de frangos por consumidores

¹Adriana Aparecida Droval, ³Vera de Toledo Benassi, ⁴Alessandro Rossa, ¹Sandra Helena Prudencio, ²Massami Shimokomaki*

¹ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimento; Centro de Ciências Agrárias; Universidade Estadual de Londrina; C. P.: 6001; 86051-970; Londrina, PR, Brasil.

² Present address *Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus de Londrina, Av dos Pioneiros, 3131, CEP Londrina, Paraná, Brasil. Email mshimo@utfpr.edu.br

³ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Soja, Londrina, PR, Brasil.

⁴ Rua Carlos Zatta, 35; Cafelândia – PR – Brasil.

Resumo

O objetivo do trabalho foi verificar a percepção de consumidores em relação a carnes PSE de frangos *in natura* e grelhadas e avaliar a sua aceitação. Os filés foram caracterizados pelas medidas de pH, luminosidade (L*), capacidade de retenção de água (CRA), perda por cozimento (PC) e força de cisalhamento (FC). Os valores de pH e L* para filés normais foram de 5,96 e 49,24 e para PSE, 5,61 e 59,20, respectivamente ($p \leq 0,05$). Os filés normais apresentaram CRA de 14,50% maior, PC de 30,92% menor e FC da carne cozida de 65,41% menor que as PSE. Os filés PSE foram identificados sensorialmente como sendo os mais claros e a preferência de compra foram para os normais. Dos atributos de maciez, sabor e suculência de filés grelhados, apenas o sabor diferiu estatisticamente ($p \leq 0,05$) e filés normais foram os que apresentaram maior aceitabilidade ($p \leq 0,05$).

Palavras-chaves: qualidade tecnológica, maciez, suculência, cor e capacidade de retenção de água

1. Introdução

As características sensoriais são aspectos considerados importantes pelo consumidor no momento da compra e do consumo da carne de frango (Zamudio, Junqueira & Almeida, 2010). Segundo Bliska (2000), a qualidade de um produto pode ser definida como o conjunto de atributos que satisfaçam o consumidor ou até mesmo que superem suas expectativas iniciais. A aceitação pelo consumidor é uma das formas mais eficientes de medir o sucesso de um produto. Os principais atributos de qualidade considerados para a carne são aparência, textura, suculência, sabor, propriedades funcionais e tecnológicas, dentre os quais o que mais chama a atenção do consumidor para a seleção inicial, é a aparência e a textura. A aparência geralmente está relacionada à cor, e a textura à maciez (Fletcher, 2002). Bressan e Beraquet (2002) verificaram que a importância desses dois parâmetros é observada em momentos distintos, onde a cor do filé de frango está associada à aceitabilidade no momento da compra, e a maciez à aceitabilidade global no momento do consumo.

Os testes sensoriais são incluídos nas indústrias de alimentos como uma garantia de qualidade por ser uma medida multidimensional integrada e possuir vantagens tais como, capacidade de identificar a presença ou ausência de diferenças perceptíveis, definir características sensoriais importantes em um produto, detectar particularidades que não podem ser detectadas por outros procedimentos analíticos, como os físico-químicos e capacidade de avaliar a aceitação de produtos (Muñoz, Civille & Carr, 1992). Os métodos sensoriais discriminativos, como o teste triangular e o pareado de diferença, geralmente são utilizados para diferenciar sensorialmente duas amostras de um produto, em termos globais ou em relação a um atributo específico, e os de aceitabilidade são utilizados quando se necessita conhecer o *status* afetivo dos consumidores com relação a um produto (Meilgaard, Civille & Carr, 1999).

Problemas relacionados com a qualidade da carne têm preocupado a indústria de frango. Um deles é o desenvolvimento da carne PSE (*Pale, Soft e Exsudative*), observada principalmente em músculos do peito, e significa uma carne pálida, flácida ou mole e exsudativa ou molhada/úmida (Komiyama et al., 2009; Olivo, Shimokomaki & Fukushima, 1998; Barbut, 1997). Em aves as causas da anomalia PSE não estão totalmente esclarecidas. Na prática, condições de manejo *ante-mortem* mal conduzidos e estressantes a que são submetidos os animais, podem provocar um *rigor mortis* acelerado, induzindo ao PSE (Simões et al., 2009; Guarnieri et al., 2002; Lara, Ledur, Nepomuceno & Shimokomaki, 2002). A carne PSE possui um pH baixo, em geral menor do que 5,8, devido ao rápido declínio do pH *post-mortem* enquanto a temperatura da carcaça está elevada, resultando na desnaturação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, comprometendo as propriedades funcionais da carne e a sua qualidade final (Kissel et al., 2009; Olivo, Soares, Ida & Shimokomaki, 2001; Barbut, 1997). Alguns estudos de avaliação sensorial da carne PSE em frango já foram realizados empregando julgadores treinados e não-treinados (Garcia et al., 2010; Komiyama, 2006; Oda, 2006), mas são escassos os estudos mostrando a percepção do fenômeno por consumidores. Assim o trabalho teve por objetivo verificar a percepção de consumidores em relação a carnes PSE de frangos *in natura* e grelhados e avaliar a sua aceitação.

2. Material e Métodos

2.1. Abate dos frangos

Foram utilizados 262 frangos (*Ross*) com idade de 42 dias. Os frangos foram abatidos em uma linha de processamento comercial, seguindo as etapas de pendura, insensibilização elétrica, escaldagem, depenagem, evisceração e resfriamento. Após aproximadamente 90 minutos coletou-se o filé do peito (*Pectoralis major*) dos frangos abatidos que foram utilizados para a

caracterização da carne PSE. As amostras foram coletadas e cedidas gentilmente por um abatedouro localizado no município de Cafelândia/PR.

2.2. Caracterização da carne PSE

A caracterização da carne PSE deu-se pela determinação do pH e luminosidade (L^*), realizadas 24h *pós-mortem*. As medidas de pH foram realizadas em triplicata diretamente no filé com auxílio do potenciômetro de contato (marca Testo), conforme descrito por Olivo, Soares, Ida e Shimokomaki (2001). As medidas de luminosidade foram realizadas na face ventral do filé tomando três pontos diferentes de leitura por amostra. Os valores de luminosidade (L^*) foram expressos no sistema de cor CIELAB proposto pela *Commission Internationale de l'Eclairage* (CIE) em 1971. Os parâmetros de L^* foram fornecidos pelo colorímetro de bancada da marca Minolta, em que L^* define a luminosidade ($L^*= 0$ preto e $L^*= 100$ branco). Foram selecionadas 20 amostras de filés de peito, sendo 10 de frangos PSE e 10 de frangos normais para a determinação das análises físicas de CRA, PC e FC.

2.3. Capacidade de retenção de água (CRA)

A determinação da CRA foi realizada nas amostras coletadas 24 horas *post-mortem* de acordo com o método descrito por Barbut (1996).

2.4. Força de cisalhamento (FC)

A determinação da FC (maciez) foi realizada nas amostras de filés de peito *in natura* e grelhadas (temperatura interna 72°C), utilizando-se o texturômetro Texture Analyser TA-TX2i, equipado com lâmina Warner-Bratzler e regulado para a velocidade de 5 mm/s (Bratzler, 1949). Os resultados foram expressos em Newton da força máxima necessária para o corte das amostras. A amostragem retirada das amostras de filés foi na forma de paralelepípedos com 1,0 x 1,0 x 2,0 cm³ (altura, largura, comprimento) de acordo com método descrito por Froning, Babji e Mather (1978).

2.5. Perda por cozimento (PC)

A determinação da PC foi realizada de acordo com método de Honikel (1998). Os filés foram pesados, ainda íntegros, antes e após a cocção, com a finalidade de se conhecer a perda de peso durante o cozimento (*cooking loss*). Primeiramente, os filés foram grelhados em chapa elétrica, previamente aquecida a 140 °C, até atingirem a temperatura interna de 72 °C (± 2 °C) (aproximadamente 10 minutos, 5 minutos/lado). A seguir, foram resfriados a 40 °C (± 2 °C) e novamente pesados. Os resultados foram expressos em porcentagem, baseando-se na diferença entre as pesagens.

2.6. Avaliação sensorial

Para a realização dos testes sensoriais o trabalho foi aprovado (Parecer n° 232/10) pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. A avaliação sensorial, executada em três etapas, dos filés de peito de frango caracterizados como PSE e Normal foi realizada empregando-se consumidores. Na primeira etapa foi avaliada a aparência de cortes crus de filés de peito de frango, e foram aplicados dois testes sensoriais (Intenção de compra e Pareado de diferença em relação à cor em conjunto com a Intenção de compra). Esta etapa foi desenvolvida em um supermercado localizado na

região noroeste do Paraná. A segunda e a terceira etapas, Testes Triangular e Pareado de diferença de atributos, e a terceira, Teste de Aceitabilidade, respectivamente, foram realizadas com amostras de filé de peito de frango grelhadas, e as análises desenvolvidas no Laboratório de Análise Sensorial da Cozinha Experimental da EMBRAPA-soja, Londrina – Paraná.

2.6.1. Primeira etapa

2.6.1.1. Preparo da amostra

As amostras de filé de peito de frango cru acondicionadas em bandejas de isopor e polietileno cobertos com filmes plásticos foram mantidas resfriadas a 5°C e expostas à luz branca com intensidade de aproximadamente 500 lux durante a aplicação dos testes. Foram apresentadas ao consumidor duas amostras (normal e PSE), em ordem aleatória, identificadas com códigos numéricos de três dígitos aleatórios.

2.6.1.2. Teste de intenção de compra

Participaram do teste 58 consumidores de diferentes idades residentes no município de Campo Mourão/PR. Após explicar o procedimento do teste, aos participantes foi solicitado avaliar as amostras utilizando a Ficha demonstrada na Figura 1.

2.6.1.3. Teste pareado de diferença em relação à cor e intenção de compra

Participaram do teste 55 consumidores de diferentes idades residentes no município de Campo Mourão/PR. Após explicar o procedimento do teste, aos participantes foi solicitado avaliar as amostras utilizando a Ficha demonstrada na Figura 2.

2.6.2. Segunda etapa

2.6.2.1. Preparo da amostra

Após adição de 1,8% de cloreto de sódio, as amostras de filés de carne de peito resfriadas (5°C) foram grelhadas em chapa elétrica a 140°C, para auxiliar no processo foram adicionados 2,0 mL de óleo de soja para cada 100g de filé. As amostras permaneceram na chapa durante 5 minutos de cada lado do filé, até a temperatura interna atingir 72°C. Em seguida, as amostras foram cortadas em fatias de aproximadamente 5g com as dimensões de 1,5x1,5x1,0 cm³ (altura, comprimento e largura). A porção de cada amostra apresentada ao consumidor foi composta de três fatias, servida a temperatura de 40°C. As análises foram realizadas em cabines individuais sob luz branca e oferecida água potável à temperatura ambiente para lavar a boca antes e entre as avaliações.

2.6.2.2. Teste triangular

As amostras de carne PSE e normal grelhadas de frango, sendo duas iguais e uma diferente, codificadas com números de três dígitos aleatórios foram apresentadas em todas as combinações possíveis à equipe composta por 68 consumidores. Após explicar o procedimento do teste, foi solicitado aos participantes avaliar as amostras utilizando a Ficha demonstrada na Figura 3.

2.6.2.3. Teste pareado de diferença de atributos

Participaram do teste 57 consumidores, para os quais foram apresentadas, em ordem aleatória, duas amostras grelhadas (normal e PSE) codificadas com números de três dígitos aleatórios. Após explicar o procedimento do teste e indicar o protocolo de avaliação, [morder as amostras com os dentes incisivos (da frente), mastigar com os molares (do fundo), sendo uma mastigada por segundo, prestando atenção na maciez, suculência e sabor, e após engolir responder], foi solicitado aos participantes proceder a análise utilizando a ficha de avaliação (Figura 4).

2.6.3. Terceira etapa

2.6.3.1. Preparo da amostra

As amostras foram preparadas conforme o procedimento feito na segunda etapa.

2.6.3.2. Teste de aceitabilidade

Foi utilizado o teste de escala hedônica de 9 pontos (Figura 5). A equipe foi composta por 58 consumidores, as amostras grelhadas foram codificadas com números de três dígitos aleatórios e apresentadas aos julgadores em ordem aleatória de forma monádica.

2.7. Análise estatística

Os resultados dos testes pareado de diferença e triangular foram avaliados pelo teste estatístico binomial utilizando tabelas apropriadas (Meilgaard, Civille & Carr, 1999). Resultados do teste de aceitabilidade e dos testes físico-químicos foram submetidos a ANOVA e teste de comparação de médias de t de Student. O nível de significância utilizado para os testes estatísticos foi de 5%. Utilizou-se o programa Statistica 7.0 (STATSOFT, 2006).

3. Results and discussion

3.1. Caracterização da carne PSE

O índice de carne PSE observado nas amostras coletadas foi de 12,60%, resultado semelhante ao encontrado por Garcia et al. (2010) onde a incidência de PSE em frango foi de 10,20%. Os valores de classificação para a carne PSE e normal obtidos em relação ao pH e a luminosidade (L^*) (Tabela 1) estão de acordo com Soares et al. (2002) e Barbut (1997), cujos critérios são: valor de pH para as carnes PSE em frango deve ser menor que 5,8 e para carnes normais entre 5,8 a 6,0, e o valor de L^* deverá ser maior que 53, pois para valores de $L^* < 44$, o corte é classificado como análogo ao DFD (*Dry, Firm, Dark*) e para valores intermediários, $44 \leq L^* \leq 53$, considera-se como carne normal. Segundo Shimokomaki, Olivo, Terra e Franco (2006), existe uma correlação inversa entre os valores de pH e de L^* , ou seja, quanto menor o pH, maior será o valor de L^* , ou vice-versa.

Na tabela 1 também estão apresentados os valores médios das análises físicas de CRA, PC e FC. Observa-se que não houve diferença entre amostras PSE e normal apenas para a medida de força de cisalhamento nas amostras cruas ($p \leq 0,05$), enquanto que os demais testes indicaram diferenças entre os tratamentos ($p \leq 0,05$). As amostras normais apresentaram maior CRA (14,50%), menor PC (30,92%) e menor força de cisalhamento após o cozimento

(65,41%) em relação às amostras PSE. Esses resultados corroboram com os parâmetros físicos estudados em amostras de filés de peito de frango PSE por Garcia et al. (2010). A carne PSE apresenta desnaturação e degradação protéica mais intensa que a normal devido a queda brusca do pH durante a glicólise *post-mortem*, e isso, posteriormente, causará a redução na capacidade de retenção de água (CRA), maiores perda de peso durante o cozimento (PC) e aumento na rigidez da carne (Garcia et al., 2010, Olivo, Soares, Ida & Shimokomaki, 2001, Vieira, 1999, Barbut, 1997).

3.2. Análise sensorial

3.2.1. Primeira etapa

A primeira etapa da análise sensorial teve como objetivo verificar a percepção do consumidor em relação à carne de frango PSE por meio de sua intenção de compra e discriminação da cor. No teste de intenção de compra, 50 dos 58 consumidores participantes escolheram os cortes de carne “*in natura*” classificado como normal, indicando diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste bicaudal). As principais respostas do “por que” da preferência pelas amostras controle foram aparência, melhor consistência e textura, cor mais atrativa (mais rosada) e viva, aparência saudável e característica de carne fresca, e menor quantidade de líquido na bandeja. No segundo teste da primeira etapa (pareado de diferença quanto à cor e intenção de compra) verificou-se que 43 dos 55 participantes indicaram os cortes de carne PSE como sendo as amostras mais claras ($p \leq 0,05$, teste monocaudal) e em relação à intenção de compra, dos 55 consumidores, 42 comprariam as amostras normais, indicando também diferenças significativas ($p \leq 0,05$, teste bicaudal).

Os testes da primeira etapa foram realizados em dois momentos, com grupos de consumidores diferentes e com as perguntas elaboradas de formas diferentes (teste 2.6.1.2 e 2.6.1.3) para evitar efeito psicológico no participante e obter respostas mais seguras. Os resultados indicam que os consumidores, mesmo sem treinamento, diferenciam as amostras de carnes PSE das amostras normais, por meio da cor e outros atributos (aparência, textura, consistência, entre outros) e opta pela compra da carne considerada normal (controle). Em um estudo realizado por Oda (2006) com julgadores treinados também foi possível detectar a diferença visual na intensidade da coloração de filés de peito PSE em relação aos normais. Segundo Brewer e Mckeith (1999), Candek-Potokar, Zlender, Lefaucheur e Bonneau (1998) e Barbut (1997) a carne PSE é uma carne pálida, ou seja, menos rosada e vivaz do que a normal. A palidez está associada à desnaturação protéica causada pelo baixo pH e pela elevada temperatura da carcaça durante o *rigor mortis*. A cor observada na superfície das carnes é o resultado da absorção seletiva da mioglobina, provocada pela distribuição da luz que emerge da carne. O pH ácido aumenta a interação proteína-proteína e ocorre maior expulsão da água, conseqüentemente aumentando a birrefringência, com menos luz sendo transmitida através das fibras e mais luz sendo dispersa (Swatland, 2008; Olivo, 2006; Shimokomaki, Olivo, Terra & Franco, 2006).

3.2.2. Segunda etapa

A segunda etapa teve como objetivo verificar a percepção dos consumidores em relação às amostras grelhadas. No teste triangular (avaliação da diferença global) houve 38 respostas corretas para 68 participantes, indicando diferença sensorial entre os cortes ($p \leq 0,05$, teste monocaudal). As principais características indicadas pelos consumidores como responsáveis pelas diferenças foram maciez (30,5%), sabor (25,3%), suculência (19%) e outras (25,2%), Assim, a maciez, o sabor e a suculência foram os atributos selecionados para serem avaliados

no teste pareado de diferença de atributos, e verificou-se que as amostras PSE e normais diferenciaram-se somente pelo o sabor ($p \leq 0,05$, teste monocaudal), sendo a amostra normal considerada como tendo sabor característico de frango mais acentuado. Os consumidores não perceberam diferenças ($p \leq 0,05$) entre as amostras em relação à maciez e suculência, apesar das diferenças nos testes físicos. Para o consumidor, que é um julgador não treinado, foi mais fácil a diferenciação do sabor, que é uma experiência mista, porém unitária de sensações olfativa, gustativas e táteis percebidas durante a degustação e são influenciadas pelos efeitos táteis, térmicos, dolorosos e/ou cinestésicos e pela própria suculência (ABNT, 1993). Em estudo semelhante realizado com a carne PSE de frango por Garcia et al. (2010) com julgadores não treinados não foram observadas diferenças significativas entre carnes PSE e normais para os atributos maciez, sabor, suculência, preferência e aspectos gerais. Isso também foi observado por Komiyama (2006) e por Oda (2006), porém com julgadores treinados onde não foram encontradas diferenças significativas para os atributos de sabor e textura (mastigabilidade, maciez, suculência) avaliados nas carnes PSE e normais.

3.2.3. Terceira etapa

Na terceira etapa da análise sensorial, verificou-se que as amostras normais apresentaram maior aceitabilidade (valor médio de 8,5) que as PSE (valor médio de 7,5), diferindo estatisticamente pelo teste t de *Student* ($p \leq 0,05$). Todos consumidores atribuíram notas de aceitação superiores ou iguais a 7,0 (gostei moderadamente) para amostras normais grelhadas. Para as amostras PSE, apesar da maioria (82,7%) das avaliações também ter sido superiores ou iguais a 7,0 (gostei moderadamente); 7,0% dos julgadores atribuíram nota 6,0 (gostei ligeiramente), 8,6% foi indiferente e 1,7% deram nota 2,0 (desgostei muito). Esses resultados confirmam a percepção dos consumidores em relação à carne de frango PSE e sua preferência pela carne classificada como normal. A carne PSE apresenta perdas de propriedades sensoriais e tecnológicas, tornando-as com qualidades inferiores a carne normal, sendo que essas propriedades são perceptíveis no momento da compra, durante o preparo e na degustação.

4. Conclusões

O consumidor diferencia filés de frango PSE e normal na forma *in natura* e grelhada e prefere a carne classificada como normal.

Agradecimentos

Ao CNPq (Processos n 558819/2008-7 e 479738/2007-6).
À Copacol pelo fornecimento da matéria-prima.

Referências

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (1993). Análise sensorial dos alimentos e bebidas – Terminologia – NBR 12806, São Paulo: ABNT.
- Barbut, S. (1996). Estimates and detection of the PSE problem in young turkey breast meat. *Canadian Journal of Animal Science*, 76(3), 455-457.
- Barbut, S. (1997). Occurrence of pale soft exudative meat in mature turkey hens. *British Poultry Science*, 38(1), 74-77.
- Bendali, J. R., Wismer-Pedersen, J. (1962). Some properties of the fibrillar proteins of normal and watery pork muscle. *Journal of Food Science*, 27, 144.

- Bratzler, L. J. (1949). Determining the tenderness of meat by use of the Warner-Bratzler method. *Proceedings of the Reciprocal Meat Conference*, 2:114.
- Bliska, F. M. M. (2000). Qualidade na cadeia produtiva da carne bovina: elaboração e implementação de um sistema de controle. *Boletim de Conexão Industrial do Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 9(10),12-16.
- Bressan, M. C.; Beraquet, N., J. (2002). Efeito de fatores pré-abate sobre a qualidade da carne de peito de frango. *Revista Ciência e Agrotecnologia*, 26(5),1049-1059.
- Brewer, M. S.; Mckeith, F. K.(1999). Consumer-rated quality characteristics as related to purchase intent of fresh pork. *Journal of Food Science*, 64 (1), 171-174.
- Candek-Potokar, M.; Zlender, B.; Lefaucheur, L.; Bonneau, M. (1998). Effects of age and/or weight at slaughter on longissimus dorsi muscle: Biochemical traits and sensory quality in pigs. *Meat Science*, 48, 287-300.
- Dransfield, E.; Sosnicki, A. A. (1999). Relationship between muscle growth and poultry meat quality. *Poultry Science*, 78, 743-746.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira... (2010),Gado de Corte. Noções de ciência da carne. Disponível no site: <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc77/03nocoescarne.html>, acesso em 25/11/2010.
- Fletcher, D. L.(2002). Poultry meat quality. *World's Poultry Science Journal*, 58(2), 131-145.
- Froning, G.W.; Babji, A.S.; Mather, F.B.(1978). The effect of preslaughter temperatures, stress, struggle and anesthetization on color and textural characteristics of turkey muscle. *Poultry Science*, 57(3),630-633.
- Garcia, R.G., Freitas, L. W., Schwingel, A.W., Farias, R. M., Caldara F.R.,Gabriel, A.M.A. et al. (2010), Incidence and Physical Properties of PSE Chicken Meat in a Commercial Processing Plant. *Brazilian Journal Poultry Science*, 12(4), 233-237.
- Guarnieri, P. D., Olivo, R., Soares, A. L., Ida, E. I., Lara, J. A. F., Shimokomaki M. (2002). Bem estar animal e qualidade da carne de aves: uma exigência dos consumidores. *Revista Nacional da Carne*, 301, 36-44.
- Honikel, K.O. (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49 (4), 447-457.
- Kissel, C., Soares, A. L., Rossa, A., Shimokomaki, M. (2009). Functional properties of PSE (Pale, Soft, Exudative) broiler meat in the production of mortadella. *Brazilian Archives of Biology and Technoogy*, 52, 213-217.
- Komiyama, C.M., Mendes, A.A., Takahashi, S. E., Moreira, J., Borba, H.B.A., Leonel, F.R. et al. (2009). Características qualitativas de produtos elaborados com carne de frango pálida e normal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29(1), 38-45.
- Komiyama, C.M. (2006), Caracterização e ocorrência de carne pálida em frango de corte e seu efeito na elaboração de produtos industrializados. *Dissertação de Mestrado*, FMVZ/UNESP-Botucatu-SP, 89p.
- Lara, J. A. F., Ledur M.C., Nepomuceno, A. L., Shimodomaki, M.(2002). Estresse Térmico e Incidência de Carne PSE em Frangos. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 4, 15.
- Meilgaard, M.; Civille, G.V.; Carr, B.T. (1999). Sensory evaluation techniques. 3º ed., Flórida – USA: CRC Press, 281p.
- Muñoz, A.M.; Civille, G.V.; Carr, B.T. (1992). Sensory evaluation in quality control. New York: Van Nostrand Reinhold, 240 p.
- Oda, S.H.I. (2006). Análises moleculares do gene codificador da proteína receptora de rianodina e ocorrência de carne PSE (*Pale, Soft, Exudative*) em frangos. 167p, *Tese de doutorado* em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina.
- Olivo, R., Soares, A.L., Ida, E.I., Shimokomaki, M. (2001). Dietary vitamin e inhibits poultry pse and improves meat functional properties. *Journal of Food Biochemistry*, 25(4), 271-283.

- Olivo, R.; Shimokomaki, M.; Fukushima, S. (1998). Carne PSE em frangos. *Revista Nacional da Carne*, 27(252), 32-34.
- Shimokomaki, M., Olivo, R., Terra, N. N., Franco, B.D.C.M. (2006). Atualidades em ciência e tecnologia de carnes. Editora Varela, São Paulo, 236p.
- Simões, G.S., Oba, A., Matsuo, T., Rossa, A., Shimokomaki, M. Ida, E. I. (2009), Vehicle thermal microclimate evaluation during brazilian summer broiler transport and the occurrence of PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 195-204.
- Soares, A.L., Lara, J.A.F., Ida, E.I., Guarnieri, P.D., Olivo, R., Shimokomaki, M. (2002). Variation in the colour of brazilian broiler breast fillet. In: *Proceedings 48th International Congress of Meat Science and Technology*. 48, 540- 541.
- Swatland, H.J. (2008). How pH causes paleness or darkness in chicken meat. *Meat Science*, 80: 396-400.
- STATSOFT. (2006). *STATISTICA for Windows: computer program manual*. Versão 7.1. Tulsa: *Software Inc.*
- Vieira S. L.(1999). Considerações sobre as características de qualidade de carne de frango e fatores que podem afetá-la. In: *Anais da 36º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*; Porto Alegre, RS. Brasil, 81-7.
- Zamudio, L.H.B., Junqueira, A.M.R.; Almeida, I.L. (2010). Caracterização do consumidor e avaliação da qualidade da carne de frango comercializada em Brasília – DF. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/13/1275.pdf>, acesso em: 06/12/2010.

Figure captions

Fig.1. Ficha de avaliação para o teste de intenção de compra

Fig.2. Ficha de avaliação para o teste pareado de diferença e intenção de compra.

Fig.3. Ficha de avaliação para o teste triangular.

Fig.4. Ficha de avaliação para o teste pareado de diferença de atributos.

Fig.5. Ficha de avaliação para o teste de aceitação utilizando escala hedônica de 9 pontos.

Tables Caption

Table 1.

Valores médios das análises físicas realizadas nos filés PSE e normais de frangos.

Teste de Intenção de Compra	
Nome: _____	Data: _____
Observe da esquerda para a direita, as duas amostras codificadas de filé de peito de frango cru e indique, com um círculo no código, “Qual amostra você compraria?”	
Por que? _____	_____
Comentários: _____	

Fig. 1. Ficha de Avaliação para o teste de intenção de compra

Teste Pareado de Diferença e Intenção de Compra	
Nome: _____	Data: _____
Observe, da esquerda para a direita, as duas amostras codificadas de filé de peito de frango cru e avalie a cor e indique qual amostra é a mais clara.	
Qual amostra você compraria? _____	
Comentários: _____	

Fig. 2. Ficha de Avaliação para o teste pareado de diferença e Intenção de Compra

Teste Triangular	
Nome: _____	Data: _____
Você está recebendo 3 amostras de filé de frango codificadas. Duas amostras são iguais e uma é diferente. Por favor, avalie as amostras, da esquerda para a direita, e circule o código da amostra DIFERENTE.	
— — —	
Em quais características as amostras são diferentes?	
<input type="checkbox"/> aparência <input type="checkbox"/> cor <input type="checkbox"/> sabor <input type="checkbox"/> maciez <input type="checkbox"/> succulência <input type="checkbox"/> Outra (s).	
Qual(is) _____	

Fig. 3 – Ficha de Avaliação para o teste triangular

Teste Pareado de Diferença de Atributos	
Nome: _____	Data: _____
Avalie, da esquerda para a direita, as duas amostras codificadas de filé de peito de frango grelhado e responda:	
Amostras ___ ___	
Qual é a mais macia? _____	
Qual é a mais suculenta? _____	
Qual tem sabor de frango mais acentuado? _____	
Comentários: _____	

Fig. 4 – Ficha de Avaliação para o teste pareado de diferença de atributos

Teste de Escala Hedônica	
Nome: _____	Data: _____
Avalie a amostra codificada e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou.	
9 – gostei muitíssimo	
8 –	
7 –	
6 –	
5 – nem gostei/nem desgostei	
4 –	
3 –	
2 –	
1 – desgostei muitíssimo	
Comentários: _____	

Fig. 5. Ficha de Avaliação para o teste de aceitação utilizando escala hedônica de 9 pontos.

Table 1.

Valores médios das análises físicas realizadas nos filés PSE e normais de frangos

Filés	pH_{24h}	L (0 a 100)	CRA (%)	PC (%)	FC - filé <i>in</i> <i>natura</i> (N)	FC – filé grelhado (N)
Normal (n=10)	5,96 ^a ± 0,08	49,24 ^b ± 3,47	69,28 ^a ± 5,67	26,84 ^b ± 5,68	14,96 ^a ± 3,35	24,66 ^b ± 5,72
PSE (n=10)	5,61 ^b ± 0,19	59,20 ^a ± 1,97	59,23 ^b ± 5,09	35,14 ^a ± 2,62	11,98 ^a ± 3,11	40,79 ^a ± 11,24

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de t de *Student* ($p \leq 0,05$)

FOOD CHEMISTRY - AUTHOR INFORMATION PACK

Food Chemistry publishes original research papers dealing with the chemistry and biochemistry of foods and raw materials covering the entire food chain from 'farm to fork.'

Topics include:

- Chemistry relating to major and minor components of food, their nutritional, physiological, sensory, flavour and microbiological aspects;
- Bioactive constituents of foods, including antioxidants, phytochemicals, and botanicals. Data must accompany sufficient discussion to demonstrate their relevance to food and/or food chemistry;
- Chemical and biochemical composition and structure changes in molecules induced by processing, distribution and domestic conditions;
- Effects of processing on the composition, quality and safety of foods, other bio-based materials, by-products, and processing wastes;
- Chemistry of food additives, contaminants, and other agro-chemicals, together with their metabolism, toxicology and food fate.

Analytical Section

Analytical papers related to the microbiological, sensory, nutritional, physiological, authenticity and origin aspects of food. Papers should be primarily concerned with new or novel methods (especially instrumental or rapid) provided adequate validation is described including sufficient data from real samples to demonstrate robustness. Papers dealing with significant improvements to existing methods, or data from application of existing methods to new foods, or commodities produced in unreported geographical areas, will also be considered.

- Methods for the determination of both major and minor components of food especially nutrients and non-nutrient bioactive compounds (with putative health benefits) will be considered.
- Results of method inter-comparison studies and development of food reference materials for use in the assay of food components;
- Methods concerned with the chemical forms in food, nutrient bioavailability and nutritional status;
- General authentication and origin [e.g. Country of Origin Labelling (COOL), Protected Designation of Origin (PDO), Protected Geographical Indication (PGI), Certificate of Specific Character (CSC)] determination of foods (both geographical and production including commodity substitution, and verification of organic, biological and ecological labelling) providing sufficient data from authentic samples should be included to ensure that interpretations are meaningful.

AUDIENCE

Food technologists, scientists and chemists

IMPACT FACTOR

2009: 3.146 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2010

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1. Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

2. Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations).

3. Rapid communications - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.

4. Short communications - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.

5. Viewpoints - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.

6. Letters to the Editor - Letters are published from time to time on matters of topical interest.

7. Book reviews

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:
Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.
After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color

charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Authors are required to submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Review Policy

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is

- 1) on a topic outside the scope of the Journal;
- 2) lacking technical merit;
- 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance;
- 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or
- 5) is poorly written.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of white paper. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double

name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters per bullet point including spaces). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please insert the following text before the standard text - Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. No more than 30 references should be cited in your manuscript. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK. Details concerning this referencing style can also be found at <http://linguistics.byu.edu/faculty/henrichsenl/apa/apa01.html>. *List:* references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2000). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (1979). *The elements of style*. (3rd ed.). New York: Macmillan, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (1994). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing

Inc.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author: • E-mail address; • Full postal address; • Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

• Keywords; • All figure captions; • All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Additional information

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991.

The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and ' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full. Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*): doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/systemreqs>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one

communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS EM FRAGMENTOS LOCALIZADOS EM REGIÕES *HOTSPOTS* DO GENE α RyR DE FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS AO TESTE HALOTANO QUE DESENVOLVERAM CARNES PSE

1 INTRODUÇÃO

As proteínas receptoras de rianodina (RYR) são proteínas reguladoras do fluxo de Ca^{2+} , presentes no retículo endoplasmático das células musculares e apresenta participação conhecida na regulação da contração muscular, sendo expressas também em outros tecidos onde eventualmente múltiplas isoformas podem ser co-expressas (ROSSI & SORRENTINO, 2004). Nos mamíferos são conhecidos três tipos de rianodinas reguladoras de Ca^{2+} : RYR1, encontrado no músculo esquelético; RYR2, no tecido cardíaco e RYR3, no tecido cerebral (SUTKO & AIREY, 1996).

Em suínos uma mutação genética no nucleotídeo 1843 do gene que codifica a proteína receptora de rianodina 1 (RyR1) ocasiona a substituição de uma citosina por uma timina. Essa substituição provoca uma mudança na seqüência do gene e também na seqüência de aminoácidos da proteína por ele codificada (Arg615Cys), causando por sua vez uma alteração na atividade desta proteína. A RYR1 é uma proteína presente no retículo endoplasmático do músculo esquelético e a mutação nesta proteína interfere na homeostase do cálcio, que é o elemento essencial da contração do músculo esquelético, acarretando a síndrome denominada PSS (*Porcine Stress Síndrome*). Animais, em especial os suínos com essa síndrome estão mais propensos a desenvolver carnes PSE, pois há uma intensa contração muscular, hipermetabolismo, aceleração da glicólise *post mortem*, queda drástica do pH muscular em temperatura elevada da carcaça (aproximadamente 35 °C) causando

desnaturação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas ocorrendo a perda de exsudato (BENDALL & WISMER-PERDERSEN, 1962), e por consequência comprometimento das propriedades funcionais das proteínas da carne, como a CRA (LOUIS *et al.*, 1993; FUJII *et al.*, 1991).

Essa mesma mutação no gene RyR1 foi observada em humanos sensíveis a anestésicos, principalmente os halogenados como o halotano e que desenvolveram uma doença conhecida como Hipertermia Maligna (HM) (MICKELSON & LOUIS, 1996). Na isoforma tipo 1 da RYR (RYR1) foram identificadas outras mutações importantes, que estão localizadas em três principais regiões denominadas de *hotspots* 1, 2 e 3. A *hotspot* 1 é identificada na região N-terminal, entre os aminoácidos 1 a 614, a 2 na região central entre os aminoácidos 2162 a 2458 e a terceira *hotspot* na C-terminal entre os aminoácidos 4800 a 4900 (HAMILTON, 2005; BRINI, 2004). As *hotspots* 1 e 2 são regiões que contém alta densidade de mutações em humanos e suínos, como por exemplo a responsável pela ocorrência da PSS em suínos e HM em humanos (STRASBURG & CHIANG, 2009; BRINI, 2004; FUJII *et al.*, 1991).

No tecido muscular esquelético das aves foi identificada a presença de duas isoformas da RYR, denominadas de α RYR e β RYR, que são similares a RYR1 e RYR3 em mamíferos, respectivamente (OTTINI *et al.*, 1996). Vários estudos que identificaram mutações no gene que codifica a proteína receptora de rianodina em aves ainda não puderam ser correlacionados ao fenômeno PSE, como em suínos (ZIOBER *et al.*, 2010; STRASBURG & CHIANG, 2009; ZIOBER *et al.*, 2009; CHIANG *et al.*, 2008; ODA, 2006; CHIANG *et al.*, 2004; DROVAL, 2004; LARA, 2003; STRASBURG & CHIANG, 2003; OWENS *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 1999). Assim, o objetivo do presente trabalho foi clonar e seqüenciar fragmentos localizados em regiões *hotspots* do gene α RyR do DNA genômico de frangos (*Gallus gallus*) de corte e identificar polimorfismos de nucleotídeos

único (SNPs) em animais que foram submetidos ao teste halotano e que desenvolveram carne PSE.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se há ocorrência de polimorfismos no DNA genômico de frangos PSE e normais em regiões específicas, denominadas de *hotspots* do gene α RyR.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade de frangos ao halotano e classificá-los em sensíveis (HAL⁺) e não sensíveis (HAL⁻) ao anestésico
- Determinar as análises físicas de CRA (Capacidade de retenção de água), pH e luminosidade (valor de L*) em amostras de filés de frango para a caracterização da carne PSE
- Amplificar, clonar e sequenciar fragmentos localizados em regiões *hotspots* do gene α RyR e identificar possíveis polimorfismos em frangos de corte submetidos ao teste halotano e caracterizados como PSE.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TRANSFORMAÇÕES BIOQUÍMICAS DO MÚSCULO EM CARNE

O músculo é constituído por uma unidade estrutural, a fibra, e por uma unidade funcional, o sarcômero. A fibra é formada por feixes de células muito longas, cilíndricas, multinucleadas e contendo muitos filamentos, as miofibrilas. Nas fibras musculares esqueléticas os numerosos núcleos se localizam na periferia das fibras, nas proximidades do sarcolema (Figura 1) (LAWRIE, 1991).

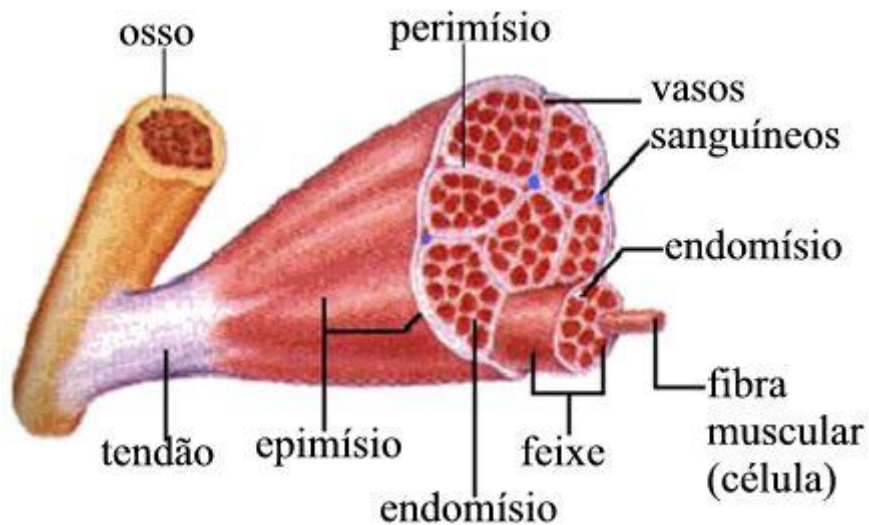


Figura 1 – Representação esquemática do tecido muscular esquelético (MENDES, 2010)

O músculo de um animal no momento do abate é um tecido vivo com complexas propriedades bioquímicas e fisiológicas, as funções vitais do sistema muscular não cessam no momento da morte. O processo de conversão dos tecidos, principalmente o muscular em carne, é complexo e envolve uma série de alterações no metabolismo e na estrutura física das

células. As modificações bioquímicas e estruturais ocorrem simultaneamente e são dependentes dos tratamentos *ante-mortem*, do processo de abate e das técnicas de armazenamento da carne (PEARSON, 1994; LAWRIE, 1991). Os principais eventos observados são: a perda do suprimento de oxigênio, esgotamento das reservas de energia das células, formação e acúmulo de ácido lático, queda do pH e temperatura, aumento da concentração de íons de Ca^{2+} no citosol, aparecimento do *rigor mortis*, que resulta no encurtamento dos sarcômeros, oxidação do ferro das mioglobinas e oxidação dos ácidos graxos insaturados. A combinação destes eventos determina a qualidade final da carne e suas propriedades como cor, maciez, sabor, odor e capacidade de retenção de água (DAMODARAN, et.al., 2010; OLIVO & SHIMOKOMAKI, 2006).

A transformação do músculo em carne compreende três fases bioquímicas (*pré-rigor*, *rigor* e *post-rigor*) que se diferenciam com relação às reservas de energia e produtos finais destas reações. As reações químicas no músculo vivo e após o sacrifício são similares, porém deve-se considerar que, após a morte fisiológica, os tecidos são incapazes de sintetizar e eliminar metabólitos (PEARSON, 1994). Com a morte do animal, o suprimento de oxigênio para as células é suspenso, entretanto o metabolismo celular continua até as reservas de energia se esgotar. As fontes intracelulares de energia disponível para o metabolismo são: o ATP (adenosina trifosfato), a fosfocreatina e o glicogênio. Porém, tanto o ATP como a fosfocreatina encontram-se em baixas concentrações no músculo, sendo, portanto o glicogênio que se encontram armazenado no interior das células em torno de 1,5%, a principal fonte de energia para a glicólise. O ATP é importante nos processos de contração muscular porque provoca o deslize das proteínas contráteis (miosina e actina) e ativa a bomba ATP-dependente que leva o Ca^{2+} do citoplasma para o interior do retículo sarcoplasmático. Quando acabam as reservas de ATP celular, o músculo não consegue mais relaxar (*rigor mortis*) e a concentração de Ca^{2+} no citoplasma permanece alta. A glicólise *post mortem* (*post*

rigor) ocorre em um ambiente celular anaeróbico, onde o glicogênio é transformado em ácido pirúvico e este é convertido em ácido lático. Considerando inicialmente o animal vivo, este processo é um meio rápido de obtenção de ATP. Estas reações ocorrem no sarcoplasma e as enzimas que catalisam cada uma das reações são proteínas sarcoplasmáticas solúveis. Como cessou a circulação sanguínea, o lactato formado fica acumulado dentro das células, causando queda do seu pH. O rendimento líquido da glicose anaeróbica é de 2 moles de ATP e 4 íons de hidrogênio por molécula de glicose-1-fosfato, proveniente do glicogênio. Esta série de doze reações químicas é denominada via glicolítica de Embden-Meyerhof (PEARSON, 1994; FORREST *et al.*, 1979). Dessa maneira, o acúmulo de ácido lático e a queda do pH devido à liberação de íons H^+ no *post mortem* dependem fundamentalmente da quantidade de glicogênio no momento do sacrifício. Segundo Forrest *et al.* (1979), baixas reservas de glicogênio são responsáveis por uma baixa extensão da glicólise, instalação do *rigor mortis* superficial e pH final elevado. No músculo vivo, o lactato é transportado pelo sistema circulatório ao fígado, onde é convertido em glicose na via da neoglicogênese (PEARSON, 1994). A quantidade de glicogênio armazenado no músculo no momento do abate é, portanto, decisivo no valor final de pH alcançado na carne. Normalmente, o valor de pH do músculo no momento do abate encontra-se entre 6,9 a 7,2 e se estabiliza em torno de 5,5-5,8 em 24 horas quando se esgotam as reservas de ATP e se estabelece o *rigor mortis* (CULAU, 1991). Em carne de aves, este processo é relativamente rápido. Os músculos de frango podem atingir o *rigor mortis* 1 hora após o abate, podendo ocorrer variações em um mesmo lote (OLIVO *et al.*, 2001). Entretanto, a extensão e a velocidade do declínio do pH no *post mortem* dependem de inúmeros fatores, enumerados anteriormente.

3.1.1 Excitação-contração do músculo esquelético

A contração é definida como a ativação das fibras musculares com a tendência destes se encurtarem. A contração e o *rigor mortis* são mudanças estruturais importantes em nível muscular no *post-mortem* que podem ser considerados dois processos diferentes. No músculo vivo, a contração muscular ocorre devido a uma neuroestimulação através da placa motora terminal, que libera cálcio do retículo sarcoplasmático para o sarcoplasma. O sarcolema é despolarizado por um potencial de ação que se propaga para o interior da fibra muscular pelos túbulos-T, onde os receptores de dihidropiridina (DHPR), indicados na Figura 2 têm a sua conformação alterada e transmitida aos podócitos (projeções citoplasmática dos receptores de rianodina) resultando, finalmente, na abertura do canal iônico (FERREIRA, 2005).

A mudança de conformação dos receptores de rianodina (RYR) é transmitida à outra proteína ligada a este receptor, chamada triadina. A triadina mobiliza o cálcio ligado a parvalbumina, calsequestrina e reticulina, todas localizadas do retículo sarcoplasmático (RS) e em contato entre si. Com a abertura do canal da RYR, há liberação de íons de Ca^{2+} do RS para o citoplasma da fibra muscular, elevando a concentração de 10^{-8} moles/L para 10^{-6} moles/L, ou mais, em poucos milisegundos. O Ca^{2+} inativa o sistema troponina-tropomiosina por ligação do cálcio à troponina C e, conseqüentemente há a reação entre actina e miosina que resulta na contração muscular. Durante esta fase de contração, os filamentos de actina deslizam ao longo dos filamentos de miosina por meio de uma série de interações rápidas entre os filamentos e o comprimento do sarcômero diminui. A presença de ATP é necessária para a contração, porque a energia utilizada para o processo de deslizamento é derivada da desfosforilação do ATP em ADP. Quando finaliza o estímulo nervoso, os íons Ca^{2+} são transportados novamente para o retículo sarcoplasmático através de uma bomba iônica

denominada de bomba de cálcio, que requer energia na forma de ATP (DAMODARAN, *et.al.*, 2010; FERREIRA, 2005; HONIKEL & HAMM, 1985).

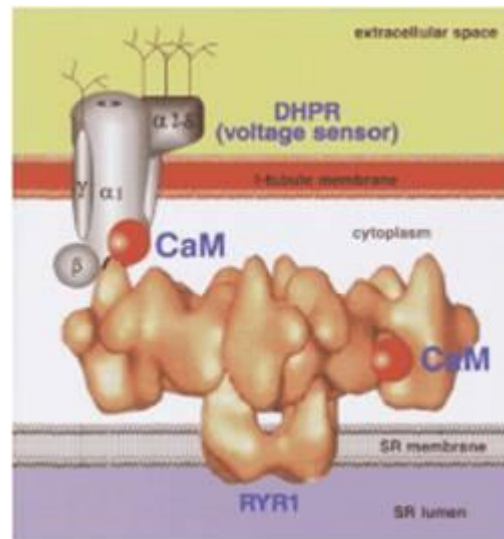


Figura 2 - Mecanismo de excitação-contracção do músculo esquelético de mamíferos. Um impulso nervoso percorre os túbulos T sendo captado pelo receptor de dihidropiridina (DHPR), uma proteína heterotetramérica que ativa o canal da rianodina (RYR1). A porção da RYR1 que está no citoplasma se liga a calmodulina (CaM). Sob despolarização dos túbulos T a DHPR sofre mudança na sua conformação e transmite a RYR1 que se abre permitindo que o Ca^{2+} previamente capturado pela calsequestrina seja liberado no citoplasma, induzindo o músculo a contracção (STRASBURG & CHIANG, 2003).

Na contracção muscular *post-mortem*, enquanto uma reserva energética na forma de ATP for suficiente, os miofilamentos mantêm-se móveis e por esta razão o músculo é elástico. Quando o nível de ATP vai se exaurindo, ou seja, diminui a energia para o processo de deslizamento dos miofilamentos, começa a formação de enlaces ou pontes permanentes entre actina e miosina e o músculo vai perdendo a elasticidade e entra em *rigor-mortis* (DAMODARAN, *et.al.*, 2010; HONIKEL & HAMM, 1985).

Desta forma, o *rigor-mortis* de um músculo normal é definido como o início da diminuição de sua elasticidade, quando o pH atinge valores em torno de 5,9, o que corresponde à concentração de ATP de 1 uMol/g de músculo e continua até à queda do nível de ATP a 0,1 uMol/g e pH 5,5. A avaliação destas alterações pode ser realizada através da determinação do pH, ATP, elasticidade do músculo, ou comprimento do sarcômero, com a utilização de difratômetro computadorizado a laser (HONIKEL & HAMM, 1985).

O estabelecimento do *rigor-mortis* está intimamente relacionado com o valor de pH. Inicia-se mais rapidamente e tem maior duração em pH alcalino do que em pH ácido. A velocidade de queda do pH extremamente rápida ou extremamente lenta conduz ao desenvolvimento rápido do *rigor-mortis*, enquanto que em músculo com declínio do pH considerado normal, o *rigor* se desenvolverá lentamente (HONIKEL & HAMM, 1985).

O funcionamento do mecanismo de excitação-contração muscular pode ser influenciado por inúmeros fatores, como a presença de halotano, cafeína, íons cálcio e magnésio, procaína e espermina (MICKELSON & LOUIS, 1996). E vários outros que podem determinar a velocidade da queda do pH, o início e duração do *rigor-mortis* e as propriedades da carne. Podem ser citados: estresse causado por fatores ambientais como temperatura, umidade, luz, espaço, ruído, e por fatores intrínsecos (como resistência ou susceptibilidade do próprio animal ao estresse, temperatura *post-mortem* e localização anatômica do músculo) procedimentos realizados imediatamente após o abate e antes da rigidez. Aspectos da produção animal como herança genética, manejo antes do abate (transporte, descanso, atordoamento e sangria) e nutrição também podem influenciar as propriedades musculares (SIMÕES *et al.*, 2009; LARA *et al.*, 2002). A resposta que o animal apresentará a cada fator ambiental dependerá da espécie, peso, idade, sexo e resistência do animal aos agentes estressantes, bem como o estado emocional do próprio animal (OLIVO *et al.*, 2001).

A resistência ou susceptibilidade ao estresse determina as reações do animal frente ao agente estressante. E eventuais falhas no processo de contração muscular relacionadas a distúrbios na liberação do cálcio e consumo elevado de glicogênio causada pelo agente estressor em animais sensíveis que podem apresentar temperaturas altas, glicólise acelerada e rápido aparecimento do *rigor-mortis*, podem ser susceptíveis ao desenvolvimento de um fenômeno que afeta as propriedades funcionais da carne influenciando na sua qualidade final, conhecido como PSE, onde as siglas vem das palavras em inglês *Pale*, *Soft* e *Exudative*, respectivamente, que significam pálida, flácida ou mole e exudativa ou molhada, respectivamente. Os animais resistentes ao estresse, para manter a temperatura e as condições homeostáticas musculares em níveis normais utilizam suas reservas energéticas, apresentando uma glicólise *post-mortem* lenta com limitada produção de ácido lático (BENDALL & WISMER-PEDERSEN, 1962).

3.2 CARNE PSE

A carne PSE apresenta características de cor pálida, textura macia e pobre capacidade de retenção de água (CRA) na sua superfície. As condições PSE resultam de uma taxa de glicólise *post mortem* extremamente acelerada, que causa um valor de pH muscular muito baixo, geralmente inferior a 5,8, enquanto a carcaça ainda está quente, por volta de 35°C aos 45 minutos *post mortem*. A rápida queda do pH causa a desnaturação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas, levando a excessiva perda de exsudato (BENDALL & WISMER-PEDERSEN, 1962), prejudicando as propriedades funcionais, tecnológicas e sensoriais da carne (BREWER & McKEITH, 1999; CANDEK-POTOCAR *et al.*, 1998).

O PSE tem sido estudado em suínos há mais de 40 anos e as características destas carnes são resultados da manifestação da síndrome “*Porcine Stress Syndrome*” (PSS – Síndrome do Estresse Suíno) (CHEAH *et al.*, 1984) cujos sintomas são semelhantes a anomalia acometida em humanos conhecida como Hipertermia Maligna (HM) (FUJII *et al.*, 1991). A HM é uma miopatia hereditária e pode ser desencadeada por indução com halotano (2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoroetano), um anestésico gasoso, ou com relaxantes musculares como succinilcolina (FUJII *et al.*, 1991; MITCHELL & HEFFRON, 1982) e tem como sintomas, a rigidez muscular generalizada, o rápido aumento da temperatura corporal, a taquicardia, a hiperventilação, a acidose metabólica severa e elevados níveis de metabólitos no soro (CHEAH *et al.*, 1984). A sensibilidade ao halotano também foi observada em suínos que apresentavam a sintomatologia de HM quando expostos ao anestésico (MACLENNAN & PHILLIPS, 1992; FUJII *et al.*, 1991)

A predisposição à produção de carnes PSE e o desencadeamento da síndrome PSS em suínos está relacionado a fatores genéticos, onde uma mutação de ponto na posição 1843 de uma base C (citosina) para uma base T (timina), no gene que codifica a proteína receptora de rianodina tipo 1 (RYR1), resulta na substituição de um resíduo de arginina (Arg) na posição 615 da seqüência normal da proteína para um resíduo de cisteína (Cys) na seqüência mutante, produzindo uma alteração na atividade da RYR1 (FUJII *et al.*, 1991). Em 95 % dos suínos que apresentavam a sensibilidade ao halotano eram portadores da mutação na RYR1, e deste modo o teste halotano começou a ser utilizado como uma ferramenta para selecionar indivíduos que teriam uma predisposição ao desenvolvimento da carne PSE. Porém, o teste halotano diferencia indivíduos sensíveis dos não-sensíveis e não seleciona os indivíduos heterozigotos. Em decorrência disto foi desenvolvido um teste molecular não-invasivo, baseado em PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase - polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição), que permite diferenciar os três genótipos: Hal NN (normal,

dominante), Hal Nn (heterozigoto) e Hal nn (sensível, recessivo). O gene rianodina 1 (RyR1) foi estabelecido como o gene suspeito da PSS, e foi mapeado na mesma região do cromossomo 6 que contém o grupo ligado ao gene HAL (HARBITZ *et al.*, 1990). A mutação nesta proteína resulta em alterações no acoplamento excitação-contração levando a distúrbios na liberação do Ca^{2+} pelo elevado consumo de glicogênio e mudanças secundárias na estrutura e função da proteína receptora de rianodina (RYR1) do músculo suíno (MICKELSON & LOUIS, 1996; FUJII *et al.*, 1991).

A condição inicial para o desencadeamento dos sintomas que conduzem ao PSS é a liberação do excesso do Ca^{2+} na musculatura, o qual prolonga a atividade contrátil muscular e a quebra do glicogênio, levando ao aumento da produção de calor (MITCHELL, 2007; MICKELSON & LOUIS, 1996), com a manifestação de sinais como perda do controle da glicólise com conseqüente produção de ácido láctico, dispnéia progressiva, hipertermia, vasoconstrição disseminada e rápido início do *rigor mortis* após a morte (MITCHELL, 2007; CHEAH & CHEAH, 1981).

Anomalias e características bioquímicas semelhantes ao PSE foram descritas em aves, como perus e frangos de corte. Após um longo período, foram realizados os primeiros trabalhos com perus demonstrando que fatores estressantes, como aquecimento e agitação, influenciavam diretamente o declínio de pH e a qualidade final da carne de peito (STRASBURG & CHIANG, 2009; FRONING *et al.*, 1978; MA & ADDIS, 1973).

Os mecanismos que conduzem a ocorrência do PSE na carne de frango ainda não estão esclarecidos e podem realmente estar relacionado com alterações no gene do receptor de rianodina, considerando-se que ele é altamente conservado entre as espécies (ODA *et al.*, 2009; ZIOBER *et al.*, 2009; STRASBURG & CHIANG, 2003; OLIVO, 1999; BARBUT, 1997; McCURDY *et al.*, 1996; SANTÉ *et al.*, 1991; GREASER, 1986).

A sensibilidade ao halotano também foi observada em aves, Owens *et al.* (2000) avaliaram a sensibilidade do anestésico para identificar perus sensíveis ao estresse. Aproximadamente 10% dos animais testados apresentaram rigidez muscular, e o halotano se mostrou um bom identificador dos animais susceptíveis ao estresse térmico e que apresentaram um desenvolvimento de *rigor mortis* acelerado. Carnes com características PSE foram encontradas em 47% dos perus considerados halotano positivo.

Em um estudo realizado por Marchi *et al.* (2010) verificaram uma relação direta entre a sensibilidade ao halotano e a ocorrência de filés PSE em frango de corte, e o halotano mostrou ser um agente estressor desencadeando alterações bioquímicas nos músculos das aves semelhantes às desencadeadas pelo estresse térmico pré-abate em frangos caracterizados PSE. Soares *et al.* (2007) também verificaram que 13,6% dos frangos de linhagem comercial demonstravam reação ao halotano, sendo que 42,1% desses animais reativos produziram carnes PSE.

Em outro estudo realizado por Ziober (2009) em frangos de corte verificou-se que o estresse térmico em conjunto a exposição ao halotano poderia ter influenciado no aparecimento de códons sem sentido da α R_{YR} (proteínas truncadas) e de carnes PSE.

Em razão dos estudos já realizados em aves foi utilizado nesta pesquisa o teste halotano como uma possível ferramenta para selecionar animais que teriam uma predisposição ao desenvolvimento de carne PSE.

3.3 PROTEÍNA RECEPTORA DE RIANODINA (R_{YR})

As R_{YR} são homotetraméricas (Figura 3), compostas de subunidades polipeptídicas de 560 KDa que fazem parte do canal de liberação de Ca⁺² localizado no

retículo sarcoplasmático presente nos tecidos musculares e não musculares (SORRENTINO & VOLPE, 1993; FUJII *et al.*, 1991).

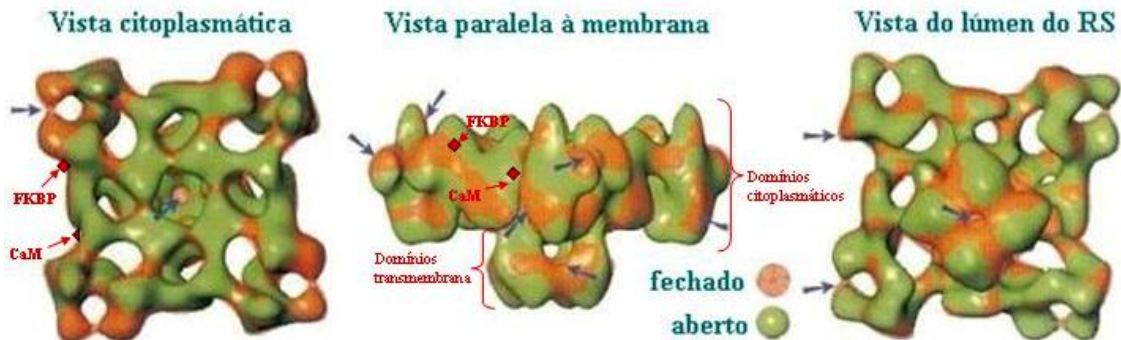


Figura 3 - Estrutura esquemática tridimensional da RYR1 e principais domínios estruturais. As setas pretas indicam os pontos de variação de densidade nas conformações aberta (verde) e fechada (marrom) (SORRENTINO & REGGIANI, 1999)

As proteínas receptoras de rianodina formam um componente importante do complexo liberador de cálcio que controla a contração do músculo esquelético.

Nos mamíferos há três isoformas geneticamente distintas da rianodina: RYR1 predominante no tecido muscular esquelético, RYR2 presente no tecido cardíaco e a RYR3 no tecido cerebral. Existem traços da RYR1 no cérebro e a RYR3 pode estar distribuída em vários tecidos, como o esquelético e ser co-expressada juntamente com a RYR1 e com a RYR2 em outros tecidos. No músculo esquelético dos mamíferos RYR3 pode apresentar concentrações de 20 a 50 vezes menor do que RYR1 (FRANZINI-ARMSTRONG & PROTASI, 1997; SORRENTINO & VOLPE, 1993).

Em um estudo realizado por Ottini *et al.* (1996) foi verificada a presença de duas isoformas a α -RYR e β -RYR no músculo esquelético de aves, estas também foram identificadas no músculo de anfíbios. As isoformas α -RYR e β -RYR possuem estrutura

primária similar as isorfomas RYR1 e RYR3, respectivamente, apresentando um grau de similaridade de 65 a 70% entre as sequências. Portanto, sendo verificado que existem diferenças nos mecanismos de excitação-contração muscular dos músculos esqueléticos de aves em relação a dos mamíferos. No caso das aves (Figura 4), a despolarização dos túbulos-T induz a liberação dos íons de Ca^{2+} através da αRYR , que está fisicamente ligada à proteína receptora de dihidropiridina (DHPR). O local de aumento da concentração dos íons de Ca^{2+} resulta na indução e liberação de Ca^{2+} pela βRYR (STRASBURG & CHIANG, 2003; OTTINI *et al.*, 1996).

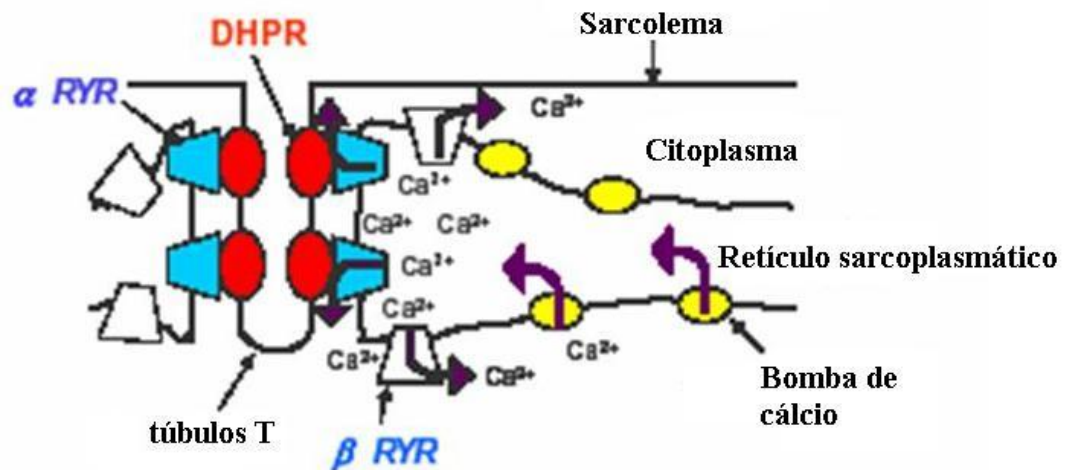


Figura 4 – Mecanismo de excitação-contração muscular nas aves. A αRYR (azul) é ativada a partir da despolarização do túbulo-T e da alteração de conformação da DHPR. O aumento da concentração local de íons Ca^{2+} resulta na indução e liberação de Ca^{2+} pela βRYR (branco), na periferia do RS. O Ca^{2+} é sequestrado durante o relaxamento muscular pelas bombas de Ca^{2+} (amarelo) (STRASBURG & CHIANG, 2003).

De acordo com Ottini *et al.* (1996) as áreas que apresentam maior variação significativa entre as sequências estão localizadas em três regiões conhecidas como regiões divergentes 1, 2 e 3 (DR1, DR2 e DR3). As regiões divergentes das RYR apresentam diferenças funcionais entre as isoformas (HAMILTON, 2005; DU *et al.*, 2000). As diferenças

funcionais entre as isoformas das RYR são reconhecidas pelo mecanismo de liberação de cálcio. As isoformas RYR2, RYR3 e β -RYR operam completamente o mecanismo Ca^{2+} -induzido e Ca^{2+} -liberado (CICR). A RYR1 e α -RYR operam primeiramente despolarização-indução do Ca^{2+} e após Ca^{2+} -liberado (DICR), mas as mesmas podem exibir também a atividade CICR (MURAYAMA & OGAWA, 2001).

No músculo esquelético das aves, onde as duas isoformas podem coexistir, a atividade de CICR da α RYR é significativamente suprimida. Entretanto, a existência da isoforma α -RYR é essencial para a função das células musculares. Na ausência da isoforma α RYR, ambas as atividades de CICR e contração muscular, ou seja, o desenvolvimento funcional da α RYR pode ser compensado pela isoforma β RYR. Já ausência da α RYR durante o desenvolvimento embrionário das aves pode ser letal. Isso significa que a funcionalidade normal do canal onde as duas isoformas α RYR e β RYR atuam são importantes durante o desenvolvimento e contração muscular (MURAYAMA & OGAWA 2001, 2004; IVANENKO *et. al.*, 1995 e AIREY *et al.*, 1993).

Já nos mamíferos, o fluxo dos íons de Ca^{2+} é controlado pelos receptores de rianodina tipo 1 (RYR1) (STRASBURG & CHIANG, 2003). Assim, diz-se que a ativação do canal de cálcio da RYR1 é feita por um mecanismo dependente de voltagem, enquanto a ativação do canal de cálcio da RYR3 se faz pela presença, em determinadas concentrações, de íons cálcio no sarcoplasma (CICR) (SUTKO & AIREY, 1996). O controle do fluxo de cálcio e a conseqüente ocorrência ou não de PSE em aves, pode ser regulado pelas duas isoformas, diferindo-se da anomalia clássica estudada em suínos, que por sua vez, é originada unicamente pela mutação encontrada na proteína receptora de rianodina 1. Provavelmente outras regiões cromossômicas e proteínas estejam envolvidas nesta função de controle e de liberação de cálcio do RS para o lúmem, que precisam ser exploradas e estudadas.

Em humanos algumas mutações importantes, como a que deu origem a HM são conhecidas no gene RyR1, baseado na seqüência da proteína (~5038 aminoácidos) estas mutações mais importantes estão localizadas em três principais regiões, chamadas *hotspots* 1, 2 e 3, que estão localizadas como N-terminal (entre aminoácidos 1–614), central (entre aminoácidos 2162–2458) e C-terminal (entre aminoácidos 4800–4900), respectivamente (Figura 5) (BRINI, 2004). A mutação da HM está localizada na região N-terminal do gene RyR1 assim como a PSS em suínos (mutação no aminoácido 615). Já para perus, Strasburg e Chiang (2009) definem que *hotspots* 1, 2 e 3 para a isoforma α RyR estão compreendidos entre os aminoácidos 1 a 1000, 2000 a 3000 e 4000 a 5000, respectivamente.

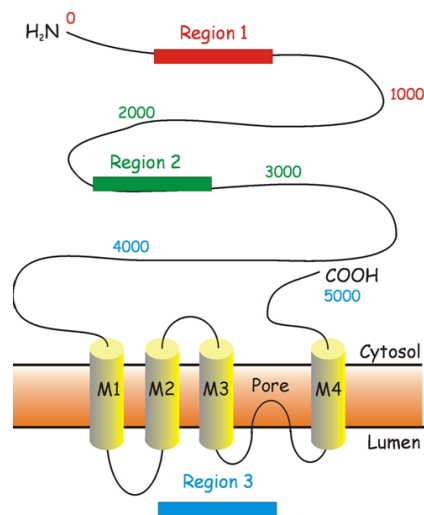


Figura 5 – Diagrama esquemático da RYR1 em humanos, mostrando as regiões *hotspots* 1 (N-terminal), 2 (central) e 3 (C-terminal, juntamente com os domínios de transmembranas M1, M2, M3 e M4) (BRINI, 2004).

Chiang e Strasburg (2003), estudando o gene e transcritos do gene RyR1 de perus, identificaram a presença de três variantes de transcritos desse gene, referidos como W, AS-81 e AS-193, onde a variante W partilhou 70% de semelhança ao cDNA da RYR1 de mamíferos, e as demais variantes foram caracterizadas pela deleção de 81 pares de base (pb) (variante

AS-81, nucleotídeos de número 1350-1430) e 193 pb (variante AS-193, nucleotídeos de número 1350-1542). Estes pesquisadores propuseram a existência de 2 alelos que poderiam ser expressos em qualquer uma das três variantes. Estas variantes poderiam estar associados a alterações funcionais da proteína RYR, como a regulação anormal do Ca^{+2} no músculo esquelético durante a glicólise, levando a alterações no metabolismo *postmortem*.

Embora em perus já tenham sido localizados *hotspots* e verificados transcritos variantes da RYR1 em aves que desenvolveram PSE, não foram identificadas mutações relacionadas à ocorrência do fenômeno (CHIANG et al., 2004), assim como em um estudo realizado por Ziober et al.(2009) com frangos, em que foi verificada a ocorrência de transcritos nonsense, “sem sentido” e com stop códon prematuro do gene αRyR de animais que desenvolveram carnes PSE e que foram previamente submetidos ao halotano e estresse térmico. Até o momento não se tem informações suficientes para abordar as causas genéticas e desenvolver reprodução seletiva de aves resistentes a síndrome, pois além dos fatores genéticos os fatores ambientais são extremamente relevantes (OWENS, 2009).

O grupo de Ciência e Tecnologia de Carnes e Derivados sob coordenação do Professor Dr. Massami Shimokomaki vem pesquisando mutações nas isoformas αRYR e βRYR do músculo esquelético de frango de corte há aproximadamente 10 anos e até o momento foram seqüenciados aproximadamente 7,02% da isoforma βRYR (ODA, 2006; DROVAL, 2004; LARA, 2003) e 7,4 % da isoforma αRYR (ZIOBER, 2009) incluindo o presente estudo.

Lara (2003) encontrou mutações de ponto em dois fragmentos avaliados no gene βRyR , onde apesar das mesmas não terem resultado em alterações na estrutura da proteína βRYR , comprovou a variabilidade genética presente neste gene em frangos, e também sugeriu a possibilidade de que mutações em outros genes possam estar relacionadas à ocorrência da síndrome.

Assim, ainda que tenha sido comprovada a existência de polimorfismos nos frangos utilizados em seu estudo, Lara (2003) não pôde relacioná-la a ocorrência da anomalia PSE. Oda (2006) também observou variabilidade nas seqüências obtidas de um mesmo indivíduo, possivelmente resultado da população de frangos utilizadas no experimento, que provavelmente apresentou heterozigose para o alelo estudado, o que explicaria os polimorfismos encontrados dentro de indivíduos. E Droval (2004) avaliou outros 2 fragmentos de um domínio do gene β RyR e as mutações encontradas nos exons analisados não foram conclusivos para explicar o fenômeno em carne de aves, uma vez que não houve diferenciação entre os indivíduos PSE e normais.

Oda (2006) ainda estudou por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) quantitativo a expressão gênica das isoformas α RyR e β RyR em duas linhagens de frangos, e observou que os animais predispostos ao PSE apresentaram maior expressão gênica da β RyR no tecido muscular esquelético.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIA-PRIMA

Foram utilizados frangos da linhagem *Ross* com idade entre 42 a 45 dias. A criação, o abate e a coleta das amostras foram realizados em três etapas. A primeira coleta foi desenvolvida no mês de junho de 2007, na fazenda escola da Universidade Estadual de Londrina e foram utilizados 352 frangos. Uma segunda coleta foi realizada no mês de agosto de 2007, na Universidade de São Paulo (USP) no campus de Pirassunga/SP e foram utilizados 298 frangos. Por fim, uma terceira foi feita no mês de fevereiro de 2008 em uma granja da empresa Big Frango na cidade de Rolândia/PR e foram utilizados 201 frangos, totalizando 851 animais.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Teste halotano e abate dos frangos

Os frangos de corte foram inicialmente submetidos ao teste com o anestésico halotano. Em número de quatro animais por sessão foram colocados em uma cuba hermeticamente fechada e vaporizado o anestésico halotano, com auxílio de aparelho de anestesia para vaporizar o gás. Os frangos permaneceram na câmara expostos por 5 min. a 3% de halotano com um fluxo de 6L/minutos e posteriormente avaliou-se a rigidez muscular nos membros inferiores. Os animais que apresentaram rigidez muscular foram classificados como

sensíveis ao halotano (HAL^+) com predisposição a desenvolvimento de carne PSE e os animais que não mostraram alteração ao serem expostos ao halotano foram considerados insensíveis ao halotano (HAL^-) (Figura 6) (MARCHI *et al.*, 2009).



Figura 6 – Foto dos frangos expostos ao halotano na câmara de vaporização. **b.** sensível ao halotano (HAL^+) e **c.** Não responde ao halotano (HAL^-) (MARCHI *et al.*, 2009).

Após 48 horas de submissão ao anestésico halotano os frangos foram abatidos, seguindo as etapas de insensibilização, escaldagem, depenagem, evisceração e resfriamento (GUARNIERI *et al.*, 2004). No momento do abate, minutos antes da sangria, foram retiradas alíquotas de aproximadamente 2,0 mL de sangue da artéria jugular e acondicionados em tubos de 4,5 mL contendo K_3 EDTA (Marca: *Labor Import*), armazenados a $-20^{\circ}C$ até a etapa de extração do DNA.

4.2.2 Caracterização da carne PSE

Foram selecionados 154 filés de peito para a caracterização da carne PSE, oriundos dos frangos HAL^+ e HAL^- . A identificação do PSE deu-se pela determinação do pH,

da luminosidade (valor de L^*) e da capacidade de retenção de água (CRA) com 24h *pós-mortem*. Foram consideradas PSE as amostras que apresentaram o valor de pH_{24h} inferior a 5,8, valor de L^*_{24h} maior que 54 (SOARES *et al.*, 2002; BARBUT, 1997).

4.2.2.1 Determinação do pH

As medidas de pH foram realizadas em triplicata diretamente no filé com auxílio do potenciômetro de contato (Marca: Testo) com 24h *post mortem*. O ponto de incisão do eletrodo foi na parte cranial ventral do filé conforme descrito por Boulianne e King (1995) e adaptado por Olivo *et al.* (2001).

4.2.2.2 Medida da luminosidade (L^*)

As medidas de luminosidade foram realizadas na face ventral do filé após 24h *post mortem*, tomando três pontos diferentes de leitura por amostra. Os valores de luminosidade (L^*) foram expressos no sistema de cor CIELab proposto pela *Comission Internationale de l'Eclairage* (CIE) em 1971. Os parâmetros de L^* foram fornecidos pelo colorímetro da marca Minolta, em que L^* define a luminosidade ($L^*= 0$ preto e $L^*=100$ branco), a^* (componente vermelho-verde) e b^* (componente amarelo-azul).

4.2.2.3 Capacidade de retenção de água (CRA)

A medida de capacidade de retenção de água foi realizada triplicata em amostras do músculo do peito com 24 h *post-mortem* de acordo com o método descrito por Barbut (1996).

4.2.2.4 Análise estatística

Os resultados das análises físicas de pH, luminosidade e CRA foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e teste t de *Student* de comparação de médias. O nível de significância utilizado para os testes estatísticos foi de 5%. Utilizou-se o programa Statistica 7.0 (STATSOFT, 2006).

4.2.3 Extração de DNA total

Foram selecionadas 50 amostras de sangue, sendo 25 amostras oriundas de animais caracterizados como PSE e 25 caracterizados como normais, de acordo com as análises químicas de pH, luminosidade (L^*) e CRA para a extração do DNA.

A etapa de extração do DNA foi realizada no Laboratório de Imunologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina. A extração do DNA das amostras de sangue, deu-se utilizando o reagente DNAzol BD (GIBCO BRL), seguindo-se o protocolo de acordo com o fabricante, com algumas modificações. Em tubos de 1,5 μL , foram adicionados 500 μL de DNAzol BD e 5,0 μL de

sangue. Agitou-se com auxílio do vórtex até que todo o resíduo de sangue desaparecesse. Em seguida adicionaram-se 200 μ L de isopropanol P.A. Misturou-se vigorosamente e deixou-se descansando a temperatura ambiente por 5 minutos. Centrifugou-se a 7.000 giros por 5 min. Removeu-se o sobrenadante e adicionaram-se novamente 200 μ L de DNAzol BD. Agitou-se com auxílio do vórtex até dissolver o precipitado. Centrifugou-se novamente a 7.000 giros por 5 min. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado de DNA com 600 μ L de etanol a 75%. Centrifugou-se a 7000 giros por 5 min. Removeu-se todo o etanol com auxílio de pipeta e deixou-se o DNA secando à temperatura ambiente até o precipitado ficar transparente. Adicionaram-se 200 μ L de água Milli Q autoclavada e deixou-se em repouso por 24h a temperatura de 5°C. Após, armazenou-se à temperatura de -20°C até o momento das análises de biologia molecular.

4.2.4 Etapas de biologia molecular

Os procedimentos a seguir foram realizados na Embrapa-Soja em Londrina-PR, no Laboratório de Biotecnologia Vegetal.

4.2.4.1 Seleção da região gênica

Inicialmente foram selecionados seis pares de *primers* que foram denominados de 1RyR₁, 11 RyR₁; 2 RyR₁, 21 RyR₁, 3 RyR₁ e 31 RyR₁, como o citado em Chiang *et al.* (2007) desenhados para perus (Tabela 1) que correspondiam as regiões *hotspots* 1, 2 e 3, para a amplificação de regiões similares no gene α RyR em frango.

Tabela 1 – *Primers Forward e Reverse* selecionados para a amplificação das regiões *hotspot* 1, 2 e 3 em frango com o tamanho aproximado dos fragmentos esperados em pares de base (pb)

Ident.	Primer Forward (5' – 3')	Primer Reverse (5' – 3')	Hotspot/ pb
1RyR ₁	CATGCAGACCCTGTGGAACATGAACC	CTGCTGGAAGAGGTCCTGGCGGCGC	1/855
11RyR ₁	CCAGGAGAACCACATCAAGTCCATCA	CTGGTCGGGGGCTCGATGTTGTAGC	1/1440
2RyR ₁	CATCGCCTGGGCATGCAGGGCTCCAC	GGAGGAGTAGCTGGCGTCCACGTAGTCGG	2/1380
21RyR ₁	CAGATGAAGTTGCCAGAGTCTGTGAAG	GTGGAGCCCTGCATGCCCAGGCCGATG	2/1030
3RyR ₁	TGCAGCGTCTGGACCTGAAC	CTCCTCCTTCTGCGGTTCTCCA	3/1970
31RyR ₁	ATCCTGAAGAGGAAGATCGGG	GAAGTTGATGGCGAAGGCGAGGAAGAG	3/332

No entanto, não foi possível a obtenção de fragmentos amplificados por PCR com o uso dos iniciadores 1RyR₁, 11 RyR₁; 2 RyR₁, 21 RyR₁, 3 RyR₁ e 31 RyR₁. Sendo assim, partiu-se para uma nova estratégia para a seleção da região gênica, sendo então realizada uma busca no *GeneBank/NCBI* de sequências genômicas para frangos, tendo sido identificados quatro fragmentos (*contigs*) de *Gallus gallus* (NW_001476149, NW_001476304, NW_001479482, NW_001484776), e estes foram localizados na sequência do transcrito da α RyR de peru (EU177005.1), utilizando-se o programa BLAST (ALTSHUL *et al.*, 1997). O *contig* NW_001476149 (Anexo 1) foi localizado no intervalo de 6506 a 7405 do transcrito da α RyR de peru, dentro da região descrita como *hotspot* 2 segundo Strasburg e Chiang (2009). Sendo assim, a sequência do *contig* NW_001476149 foi utilizada para a seleção de mais dez novos pares de *primers* que foram denominados de 1_2RyR, 2_2RyR, 3_2RyR, 4_2RyR, 5_2RyR, 6_2RyR, 7_2RyR, 8_2RyR, 9_2RyR e 10_2RyR (Tabela 2) utilizando o programa *Primer3Plus* (UNTERGASSER *et al.*, 2007).

Tabela 2 – *Primers Forward e Reverse* desenhados para a amplificação de fragmentos na região *hotspot* 2 do gene α RyR em frango baseando-se na sequência do *contig* NW_001476149, com o tamanho do fragmento esperado em pares de base (pb)

Ident.	Primer Forward (5' – 3')	Primer Reverse (5' – 3')	Tam. (pb)
1_2RyR	CAGAGCATCGGGAACATCAT	GGTGACCATTTGGGGAAG	153
2_2RyR	GCTTCCCCAAAATGGTCAC	CTGTTCTCCAGCAGGTAGCC	112
3_2RyR	CCGCTTCTCTGCTACTTCT	CCAACCTCGTTGTTGTGCGATG	161
4_2RyR	ACAACAACGAGTTGGCACTG	CTCACCGTTGACGAAGACG	188
5_2RyR	CAAGGGTTACCCCGACATC	GTTTTCTCCACGCTCTCAC	103
6_2RyR	GTGAGAGCGTGGAGGAAAAC	CCCTCCTCCTCTCCTTCTTG	183
7_2RyR	GCCATTAAGATCAGCGAGGA	GCTTGGATCAGGTGCATTTC	191
8_2RyR	GAAATGCACCTGATCCAAGC	CACCACGTTCCCGTCTTT	144
9_2RyR	AGGAAGCCGACCTCCAAC	TGGGGGTCATCAGCCTTC	604
10_2RyR	CTCACCATCACCTGCATGAC	TCTTACAGCCGTCCTGATC	193

4.2.4.2 Amplificação da região estudada

Após a realização dos gradientes de temperatura de pareamento dos *primers* 1_2RyR, 2_2RyR, 3_2RyR, 4_2RyR, 5_2RyR, 6_2RyR, 7_2RyR, 8_2RyR, 9_2RyR e 10_2RyR, foi realizada a amplificação das amostras de DNA através da análise de PCR em termociclador (Veriti™/Modelo 96-Well Thermal Cycler –Applied Biosystems). A reação de PCR consistiu em um volume final de 25 µL, correspondendo a 50 ng do DNA da amostra, 10 µM de *primers forward e reverse*, 0,1 mM de dNTP, 2,5 mM de MgSO₄, 1U da enzima *Platinum® High Fidelity Taq DNA polimerase* (Invitrogen), e tampão de PCR 1x (60 mM Tris-SO₄/pH 8,9 e 18 mM Sulfato de amônio). As temperaturas e número de ciclos utilizadas no Termociclador foram de 2 minutos a 95 °C para desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos (desnaturação), 65 °C (pareamento) por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos (extensão) e uma extensão final a 72 °C por 8 minutos.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) a 5 v/cm por 2 horas em tampão TBE 1X (Tris, Ácido Bórico, EDTA). A seguir o gel foi fotografado em fotodocumentador (sistema KODAK Eletctrophoresis Documentation and Anlysis System 290) e os produtos de PCR foram recortados e purificados com a utilização do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo o protocolo do fabricante.

4.2.4.3 Obtenção de clones recombinantes

Os produtos de PCR purificados foram ligados ao vetor TOPO TA *Cloning®* (Invitrogen), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Após a ligação dos produtos de PCR, células eletrocompetentes de *E. coli* (DH5α) foram transformadas com plasmídeo

contendo inserto via eletroporação segundo Miller e Nickoloff (1995). Foram então aliqüotados 3,0 μL da reação de ligação e adicionados a 50 μL de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* (DH5 α). Em seguida realizou-se a descarga elétrica em Eletroporador Micropulse (*Bio Rad*) ajustado para 2,5 KV e controlador de pulso 200 Ω (AUSUBEL *et al.*,1995). Após a descarga elétrica adicionou-se 1,0 mL de meio de cultura SOC previamente preparado e acondicionado em tubos *falcon* e incubou-se a 37 °C com agitação de 190 rpm (rotação por minuto) por 1 hora.

Passado este tempo, 400 μL do meio contendo as células crescidas foram semeadas em placas contendo ágar LB com ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) e 50 μL de IPTG (Isopropil- β -thiogalactopiranoside 100 mM) e 10 μL de X-GAL (5-Bromo-4cloro-3indodil- β D-galactoside 50 mg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A seleção de clones transformantes contendo o inserto se deu, sendo que colônias brancas indicam que o inserto foi inserido e as colônias azuis que o inserto não se ligou ao vetor (Figura 7). Em seguida, foram isolados três clones recombinantes de cada amostra e procedeu-se a extração de plasmídeos em microplacas para posterior seqüenciamento de DNA.

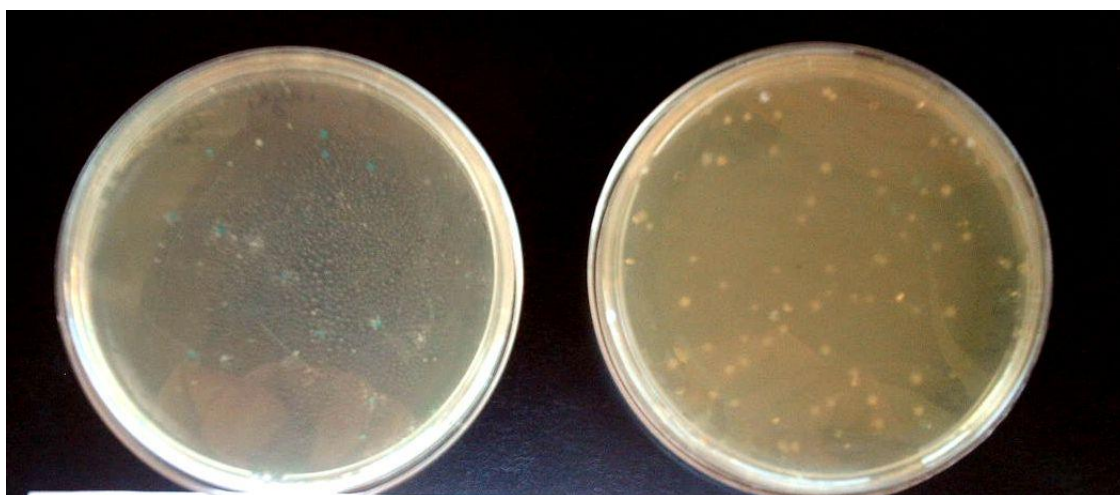


Figura 7 – Placas de petri com crescimento de colônias de *E. coli* transformadas (brancas) e não transformadas (azuis).

4.2.4.4 Extração do DNA plasmidial

A extração dos plasmídios foi realizada conforme Sambrook et al. (1989), pelo método miniprep em microplacas que foi compatível e indicado para o equipamento usado no seqüenciamento de DNA, ABI 3100 (Applied Biosystems, E.U.A).

As microplacas consistem de 96 poços. A cada poço foi adicionado 1 mL de meio de cultura *Circle Grow* (CG) contendo 100 µg/mL de ampicilina e foram inoculadas as colônias brancas individualmente com auxílio de palitos de madeira esterilizados. Após inoculação a microplaca foi selada com adesivo e pequenos furos foram feitos com auxílio de uma agulha flambada para permitir a aeração. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 a 18 horas com agitação.

Após incubação, as microplacas foram submetidas à centrifugação a 4.000 giros por 6 min. à 10 °C. O sobrenadante foi descartado e a microplaca invertida em um papel absorvente por 5 minutos. Posteriormente adicionou-se a cada poço 200 µL de uma solução de ressuspensão celular contendo 1% de glicose, 0,01M de EDTA e 0,026 M de Tris-HCl (solução GET). Os poços foram novamente selados e agitados vigorosamente por 2 minutos com auxílio do vortex. Em seguida a microplaca foi centrifugada a 4.000 giros por 9 min. à 10 °C para a sedimentação das células. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida em papel absorvente por 5 minutos. Adicionou-se a cada poço 65 µL contendo 6 mL de solução GET e 250 µL de RNase A (20 mg/mL). Todo o material foi transferido para uma nova microplaca de fundo em U e então foram acrescentados em cada poço 65 µL de uma solução de NaOH 0,2 N/SDS 1%, a placa foi selada e invertida manualmente de 5 a 10 vezes. O sistema foi incubado por 10 min. em gelo e centrifugado (4.000 giros) por alguns segundos. Adicionou-se após a neutralização 60 µL em cada poço de acetato de potássio 3M e a placa

selada com adesivo e agitada 10 vezes por inversão. Em seguida foi incubado por 10 minutos em gelo e centrifugado a 4.000 rpm por 15 min. à 4 °C.

Uma placa *Millipore* (MAGV N22) foi fixada em uma microplaca em fundo V, e transferiu-se 100 µL do sobrenadante obtido na microplaca em U. Após foi centrifugado a 4.000 rpm por 5 min. à 4 °C até que todo o volume foi filtrado para a microplaca em fundo V. A placa de *millipore* foi removida e descartada e pipetou-se 80 µL de isopropanol (Merck) ao filtrado para a precipitação do DNA, o qual foi centrifugado a 4.000 giros por 45 min. a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. Em seguida foram adicionados a cada poço 150 µL de etanol 70% (Merck, E.U.A.) e novamente centrifugado (4.000 rpm, 5 minutos, 4 °C).

A microplaca foi invertida e deixada à temperatura ambiente por 60 minutos. As amostras de DNA foram então ressuspensas em 30 µL de água ultra pura e deixadas em repouso por 12h a temperatura ambiente e finalmente foram armazenadas a -20°C para utilização posterior no seqüenciamento do DNA.

4.2.4.4.1 Digestão

Para confirmar a presença do inserto optou-se pela digestão prévia de alíquotas das amostras com a enzima de restrição *EcoRI*. Foram transferidos 5,0 µL dos plasmídios extraídos pelo método de microplacas para uma placa 96-poços contendo 10 µL de mistura com a reação de transcrição. A mistura foi preparada previamente e composta de 1,5 µL de tampão da enzima (*React 3*) (10X), 5U da enzima *EcoRI* e 8,0 µL de água *MilliQ*. A reação foi incubada à 37 °C por 2 h. Após a digestão, foram adicionados 2,0 µL de tampão de amostra (Sacarose 40% e Azul de Bromofenol 0,25%) em cada poço da placa. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1 % contendo 4,0 µL de brometo de etídio e procedeu-se a

eletroforese em tampão TBE (Tris, Ácido Bórico e EDTA) 1X, a 120 V (5V/cm) durante duas horas. Após a eletroforese, os fragmentos foram visualizados em luz ultravioleta e fotografados.

4.2.4.5 Sequenciamento

Foi utilizado o método PCR *cycle sequencing*, sistema *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle sequencing Kit*, versão 2 (*Applied Biosystems Corp.*, Califórnia, USA). Foram utilizados os *primers* universais M13 (5'TGTAACGACGGCCAGT 3') que possibilitam a amplificação a partir de uma região plasmidial localizada próxima ao inserto. Cada reação foi montada da seguinte forma: 3,7 µL de água destilada; 2,0 µL de solução (0,2M Tris-HCl pH 9 e MgCl₂ a 5mM) ; 2,0 µL de *mix terminator*; 0,8 µL de *primer* M13 (2 pmol/µL) e 1,5 µL de DNA. As temperaturas do ciclo de PCR foram: 96 °C por 2 minutos mais 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Após a reação de PCR as amostras amplificadas foram submetidas a precipitação alcoólica em placa. Foram então adicionados 80 µL de isopropanol 75% a cada amostra e centrifugados a 4.000 giros por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida em papel absorvente. Em seguida 100 µL de etanol 70% foram aplicados e o sistema centrifugado a 4.000 giros por 15 min. O sobrenadante novamente foi descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente e protegido da luz.

Após a precipitação do DNA, foram adicionados em cada amostra 10 µL de formamida e as placas foram levadas ao termociclador a 95°C e imediatamente colocadas no gelo. O objetivo desse procedimento foi promover nova desnaturação do DNA expondo as fitas da hélice, melhorando a eficiência na leitura do seqüenciador. A separação dos

fragmentos de PCR marcados foi realizado em seqüenciador automático ABI 3100 (*Applied Biosystems*). As seqüências foram nomeadas conforme o nome da placa e posição do clone na mesma.

Os cromatogramas foram analisados visualmente e os *contigs* montados através do programa *ContigExpress* do pacote Vector NTI Suite 8 (InforMax). Para verificar a possível similaridade das sequências obtidas com as sequências de outros organismos no *GenBank*, foram utilizadas as ferramentas BLASTN e BLASTX (ALTSHUL *et al.*, 1997).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste Halotano e Caracterização da Carne PSE

Das 851 aves utilizadas no experimento, um total de 94 aves foram sensíveis ao anestésico halotano. Após o teste halotano os animais foram abatidos e selecionados 154 filés para a caracterização da carne PSE, oriundos de 94 frangos sensíveis ao halotano (HAL⁺) e de 60 frangos não sensíveis ao halotano (HAL⁻). Destas amostras, 42,2% foram caracterizadas como PSE, sendo 64,6% dos filés PSE procedentes de aves sensíveis ao halotano (HAL⁺). E dos filés normais, 58,4 % foram de aves também sensíveis ao halotano (Figura 8).

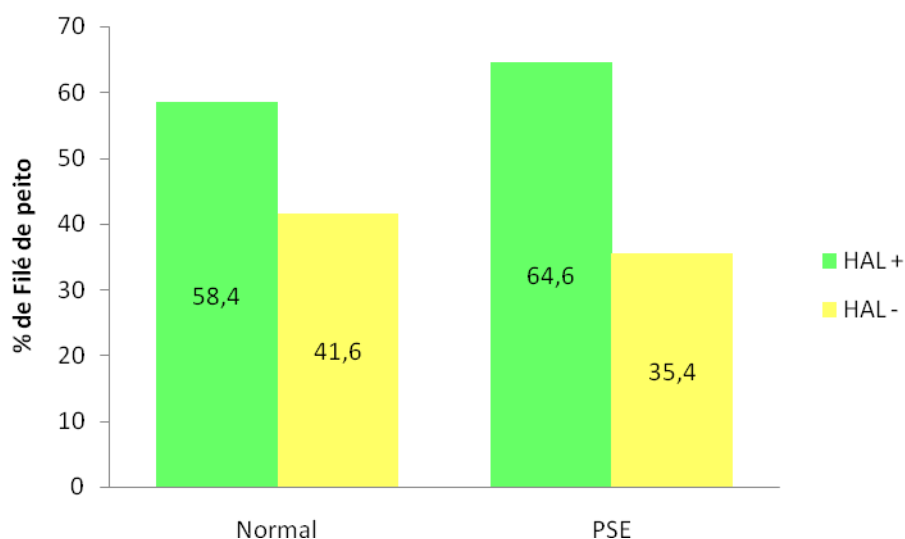


Figura 8 – Frequência da sensibilidade das aves ao anestésico halotano e caracterização da carne PSE de filés de (n=154) de frangos.

Após a caracterização do PSE, selecionou-se 50 amostras de sangue, obtida dos frangos abatidos e caracterizados para a extração do DNA, sendo 25 oriundas de frangos

caracterizados como PSE e todos sensíveis ao gás halotano (HAL⁺), e 25 dos frangos do grupo normal sendo que dois animais dos 25 normais apresentaram sensibilidade ao halotano (HAL⁺), e o restante (23) foi insensível ao anestésico (HAL⁻). Em perus de acordo com estudos realizados por Owens *et al.* (2000) 47 % das aves PSE foram sensíveis ao anestésico halotano. Marchi *et al.* (2010) verificaram também uma relação direta entre a sensibilidade ao halotano e a ocorrência de filés PSE em aves, demonstrando que o halotano mostrou ser um agente estressor desencadeando alterações bioquímicas nos músculos das aves semelhantes às desencadeadas pelo estresse térmico pré-abate em aves caracterizadas PSE. Contudo, no presente estudo o halotano não se mostrou tão eficiente quanto em suínos para determinação do fenótipo PSE.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados dos valores médios das análises físicas de pH, luminosidade (valor de L*) e CRA das 50 amostras de carne de peito dos frangos PSE e normais utilizados na extração do DNA. Todas as análises físicas de pH, L* e CRA indicaram diferença estatística pelo teste t de *Student* ($p \leq 0,05$) entre as amostras de carnes PSE e normais. A caracterização da carne PSE pode ser obtida pela mensuração de dois parâmetros, o valor de pH, que indicará PSE em valores abaixo de 5,8 e a obtenção do valor colorimétrico da luminosidade (L*) que são considerados valores maiores que 54 (SOARES *et al.*, 2002; BARBUT, 1997). Além dessas duas medidas, considerou-se um terceiro parâmetro, a capacidade de retenção de água (CRA), conforme Olivo *et al.* (2001) e Barbut (1997), as carnes PSE apresentam uma CRA menor do que as carnes normais. Segundo Shimokomaki *et al.* (2006), com a diminuição do pH, ocorre aumento da birrefringência, com menos luz sendo transmitida através das fibras e mais luz sendo dispersa. Existindo então, uma correlação inversa entre os valores de pH e de L*, ou seja, quanto menor o pH, maior será o valor de L*, ou vice-versa. Como as propriedades funcionais da carne dependem do seu pH final, assim quanto maior for o valor de L*, menor será a capacidade de

retenção de água (CRA), um parâmetro importante para a qualidade da carne. Os valores obtidos de pH, L* e CRA corroboram com os autores acima na caracterização da carne PSE.

Tabela 3 - Valores de pH, cor (L*) e CRA de filés PSE e Normais de frango:

Filés	pH	L* (0 a 100)	CRA (%)
PSE (n=25)	5,73 ^b ± 0,03	57,19 ^a ± 0,51	68,67 ^b ± 0,80
Normal (n=25)	5,97 ^a ± 0,03	51,39 ^b ± 0,37	73,11 ^a ± 0,75

*Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste t de *Student* ($p \leq 0,05$)

5.2 Extração do DNA Total e Seleção da Região Gênica

Foi possível a extração do DNA total de todas as 50 amostras de sangue, obtidas dos frangos estudados. Na abordagem inicial do trabalho considerando-se a proximidade evolutiva entre frangos e perus, foram utilizados pares de *primers* desenhados para amplificação do gene α RyR de peru, sendo eles: 1RyR₁, 11 RyR₁; 2 RyR₁, 21 RyR₁, 3 RyR₁ e 31 RyR₁, obtidos do estudo realizado por Chiang *et. al* (2007). Contudo, não foi possível a amplificação das diferentes regiões *hotspot* estudadas em frangos utilizando estes *primers* desenhados para peru.

Na tentativa de se resolver este problema, a seqüência do gene α RyR de frangos foi pesquisada no banco de dados, a fim de que se pudesse desenhar *primers* específicos para frangos. Contudo, apesar do sequenciamento quase completo do genoma de *Gallus gallus* (http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Info/Index), a seqüência do gene α RyR não foi identificada. Estando disponível apenas parte da seqüência codificadora desse gene, ou seja, apenas 2031pb (OTTINI *et al.*, 1996). Essa região do cDNA disponível em frangos corresponde à porção C terminal da proteína, lembrando que as regiões que contém mutações relevantes em suínos e humanos estão contidas nas regiões N terminal e central.

Para se buscar a seqüência de DNA de frangos, a seqüência de perus foi submetida ao programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997), que procura seqüências similares

disponíveis no *Genbank* (NCBI), e foram encontrados quatro *contigs* genômicos, NW_001476149, NW_001476304, NW_001479482 e NW_001484776, que foram então localizados na sequência de cDNA do gene α RyR de peru (EU177005.1). Destes quatro, o *contig* NW_001476149 (Anexo 1) foi localizado no intervalo 6506 a 7405 da α RyR de peru, situada na região central da proteína, sendo utilizado para a síntese de mais dez pares de *primers*, sendo eles: 1_2RyR, 2_2RyR, 3_2RyR, 4_2RyR, 5_2RyR, 6_2RyR, 7_2RyR, 8_2RyR, 9_2RyR e 10_2RyR. Destes, apenas o par de *primer* 9_2RyR (*forward*: 5'-AGGAAGCCGACCTCCAAC-3' e *reverse*: 5'-TGGGGGTCATCAGCCTTC-3') amplificou a região *hotspot* 2 de frango (Figura 9).

O gene que codifica para a RyR1 em humanos se destaca pelo seu grande tamanho (153.865 pares de base), pelo número de *exons* e de *íntrons*. Menos de 10 % de sequências (15.114 pb) se distribuem entre os mais de 90 *exons* que codificam para a proteína (NCBI, 2010). Destaca-se também o grande tamanho dos *íntrons*, o que dificulta o sequenciamento a partir do conhecimento de partes da sequência do transcrito. No caso de peru tem-se a sequência completa do transcrito do gene α RyR (EU177005.1), com aproximadamente 15.153 pb, mas não se tem a sequência completa do gene α RyR (CHIANG *et al.*, 2007).



Figura 9 – Sequência parcial do cDNA do gene α RyR de peru (EU177005.1) com a localização da região *hotspot 2* e do *contig* NW_00147614 (nucleotídeos em vermelho). Localização do fragmento estudado em frango (nucleotídeos verde) e localização dos iniciadores (nucleotídeos na caixa em destaque amarelo).

5.3 Amplificação da Região Estudada e Sequenciamento

O PCR com os *primers* selecionados a partir da sequência de *Gallus gallus*, *contig* NW_001476149, geraram amplificações de fragmentos de aproximadamente 604 nucleotídeos (nt) nas 50 amostras de DNA obtidas a partir dos grupos de frangos PSE e Normais (Figuras 10 e 11 e Anexo 2).

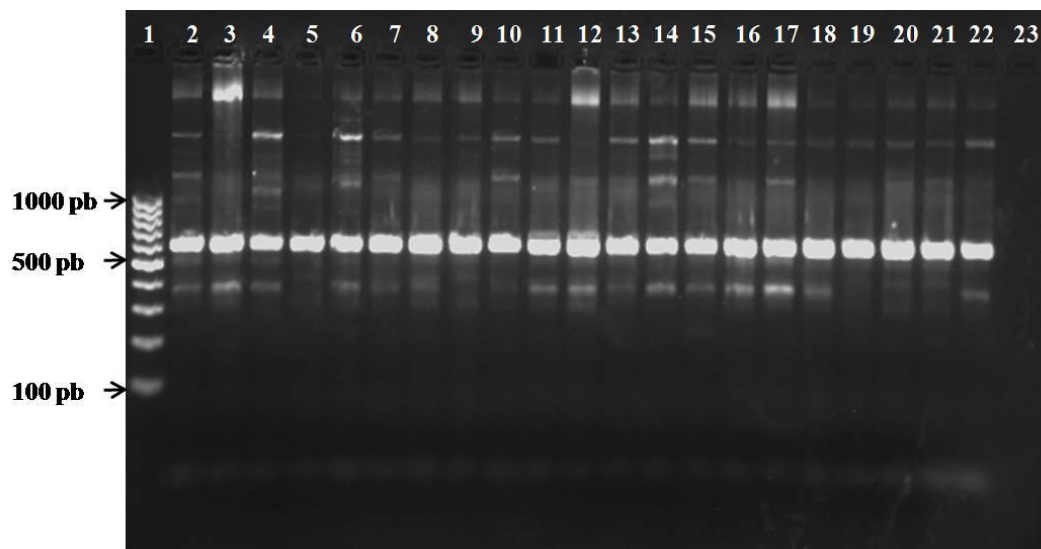


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação dos frangos PSE. Linha 1: Marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen); Linhas 2 a 22: amostras de DNA de frangos PSE; Linha 23: Branco (sem DNA).

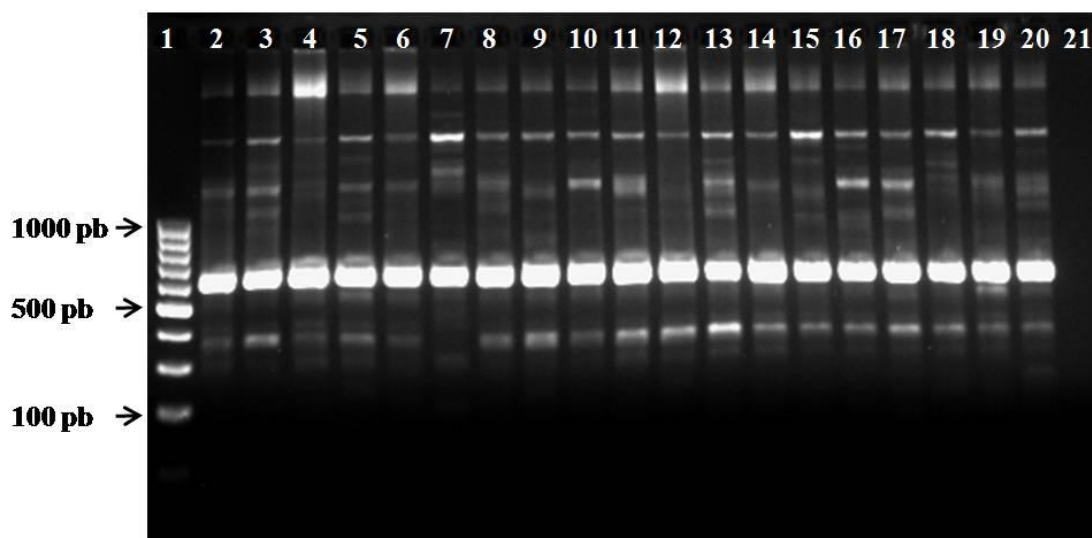


Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação dos frangos normais. Linha 1: Marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen); Linhas 2 a 20: amostras de DNA de frangos normais; Linha 21: Branco (sem DNA).

Analisando as sequências gênicas dos 50 animais, identificou-se em frangos com e sem PSE um polimorfismo na posição 585 caracterizado pela substituição de um nucleotídeo, uma G (Guanina) para uma A (Adenina), ou vice versa, sugerindo como em

perus a existência de dois alelos (sequência genômica I e II) desse gene. Essas sequências genômicas, I e II, foram depositados no *GenBank*, com os números de acesso HN153277 e HR30866, respectivamente. A sequência genômica I contendo o nucleotídeo G (Guanina) na posição 585 ocorreu com maior frequência (82%) nas aves estudadas. Enquanto que nove animais (18%) foram heterozigotos e apresentaram ambas sequências genômicas (Figuras 12 e 13). Essa substituição não sinônima foi observada tanto em animais PSE como em normais, fato também observado para perus, que possuem dois alelos e nenhum deles foi relacionado com a ocorrência de PSE nestas aves (CHIANG *et al.*, 2004).

Sequência genômica II, com a substituição do nucleotídeo A por G na posição 585 levou a alteração na sequência de aminoácidos em relação a I e a sequência de α RYR de perus depositada no *GenBank* (EU177005.1), trocando-se uma Valina por uma Metionina (Figura 13). Com auxílio do programa SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*/<http://sift.jcvi.org/>), verificou-se que essa substituição pode ocasionar alteração na estrutura da proteína, mas que essa alteração pode ser tolerável.

		571	585	604
Frango 09_PSE	Clone 1	AGTTCCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Frango 10_PSE	Clone 1	AGTTCCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Frango 17_PSE	Clone 1	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Frango 18_PSE	Clone 1	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Frango 19_PSE	Clone 1	AGTTCCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Frango 20_PSE	Clone 1	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Frango 40_Nor	Clone 1	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Frango 45_Nor	Clone 1	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Frango 50_Nor	Clone 1	AGTTCCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		

Figura 12 – Alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos dos nove frangos que apresentaram polimorfismo (sequências genômicas I e II) na posição 585 do fragmento obtido do gene α RyR em frango. Em negrito: a identificação do nucleotídeo alterado na sequência do fragmento.

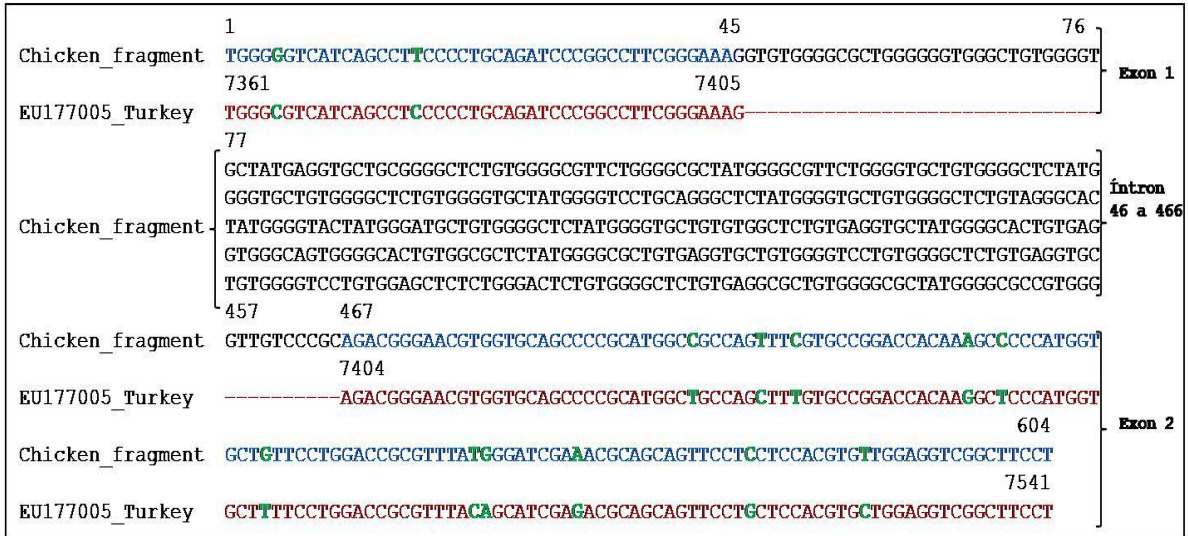


Figura 14 – Alinhamento do fragmento com 604 pb sequenciado com a sequência de cDNA do gene α RyR de peru. E localização dos *exons* 1 e 2 do fragmento de frango confrontado com a sequência de peru. Letras azuis: Região CR da sequência do fragmento obtido em frango. Identificação dos *exons* 1 (1 a 45) e 2 (467 a 604); Letras vermelhas: sequência parcial do cDNA do gene α RyR de peru; Letras verdes: Diferenças observadas entre a sequência do fragmento obtido em frango e a sequência de mRNA da α RyR de peru.

Foram identificadas diferenças em 13 posições com mutações silenciosas (Figura 14), porém o alinhamento da proteína predita a partir da CR apresenta 100% de identidade com a sequência da proteína do gene α RyR de peru (EU177005.1) (Figura 15). Além da similaridade com a sequência de peru, observou-se a similaridade da α RyR com outras espécies, como rã, rato, suíno, humano e coelho disponíveis no *GenBank* (NCBI). O grau de identidade com essas espécies foi de 84% para a Rã e 81% para as outras espécies de mamíferos (Figura 15).

BAA04646_Bullfrog	2454	GVISLPLQIPAFGKDGNTIEPKMSASFVPDHKAPMVLFLDRVYGIENQDFLLQVLEVGF	2512
NP_033135_Mouse	2469	GIISLPLQIPTLGKDGALVQPKMSASFVPDHKASMVLFLDRVYGIENQDFLLHVL DVGF	2527
AAA31119_Pig	2469	GIISLPLQIPTLGKDGALVQPKMSASFVPDHKASMVLFLDRVYGIENQDFLLHVL DVGF	2527
NP_000531_Human	2468	GIISLPLQIPTLGKDGALVQPKMSASFVPDHKASMVLFLDRVYGIENQDFLLHVL DVGF	2526
P11716_Rabbit	2468	GIISLPLQIPTLGKDGALVQPKMSASFVPDHKASMVLFLDRVYGIENQDFLLHVL DVGF	2526
EU177005_Turkey	2455	GVISLPLQIPAFGKDGNNVQPRMAASFVPDHKAPMVLFLDRVYGIETQQFLHVL DVGF	2513
Chicken_CR	3	GVISLPLQIPAFGKDGNNVQPRMAASFVPDHKAPMVLFLDRVYGIETQQFLHVL DVGF	179

Figura 15 - Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína α RyR de frango com a sequência da mesma proteína de outros organismos. Colunas em branco indicam identidade completa e colunas em verde e amarelo indicam identidade parcial entre a CR do fragmento obtido e a α RyR das demais espécies.

A região estudada quando comparada a outros organismos se localiza na região final *hotspot 2* da α RyR de peru. As regiões 1 (1 a 1000 aminoácidos); região 2 (2000 a 3000) e região 3 (4000 a 5000) são regiões conservadas entre as espécies, tornando-se com isso importantes focos de estudo (STRASBURG E CHIANG, 2009; CHIANG et al., 2007; BRINI, 2004). Muitas doenças principalmente a Hipertermia Maligna (HM) em humano têm sido relacionadas à mutações localizadas nas regiões 1 e 2 do gene RyR1 (BRINI, 2004) e de acordo com Chiang *et al.* (2004) mais de vinte mutações foram localizadas nestas regiões.

A CR do fragmento estudado está localizada entre dois domínios na sequência de aminoácidos da proteína α RyR de peru (EU177005.1), o pFam01365 (RIH-RYDR_ITPR) e o pFam02026 (Figura 16). Essa localização corrobora com a RyR1 de suíno e de humanos. O pFam01365 (localização em peru: 2143-2351) é um dos domínios extracelulares dos dois tipos de canais de cálcio, ou seja, esta região é encontrada nos receptores de rianodina e no receptor inositol 1,4,5-trifosfato. O domínio pode formar um sítio de ligação para o IP3. Já o pFam02026 (2721-2815aa) não apresenta função definida. Mas a região CR estudada encontra-se mais próxima do domínio pFam01365, ou seja, está a aproximadamente 102 aminoácidos de distância do fim do domínio, entre os aminoácidos 2453 a 2513.

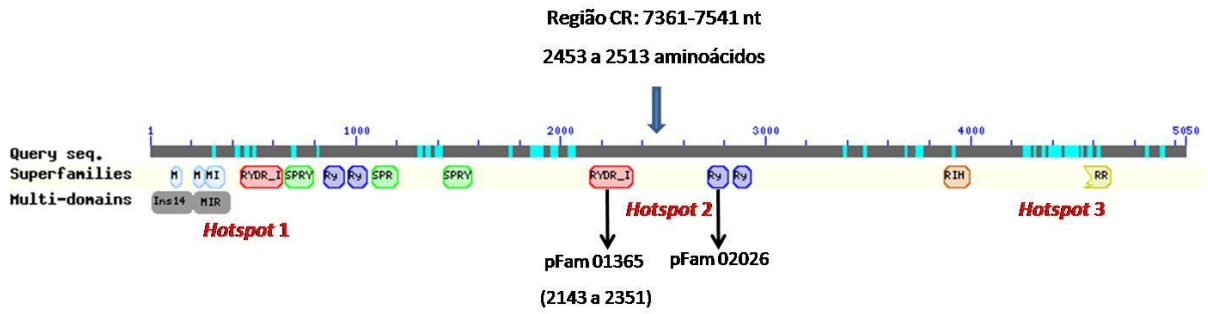


Figura 16 – Identificação de domínios da sequência de cDNA do gene α RyR de peru (EU177005.1). Localização em peru da região codante do fragmento estudado em frango.

Os resultados apresentados no capítulo 2 deste trabalho geraram um artigo científico que está apresentado conforme segue no item 9 e que foi submetido ao periódico *Genetics and Molecular Research*.

6 CONCLUSÃO

O teste halotano utilizado não foi eficaz para a seleção do fenótipo PSE nas aves estudadas. Foi possível a amplificação de um fragmento de 604 nucleotídeos que apresentou similaridade com a proteína receptora de rianodina tipo 1 de outros organismos, tendo maior similaridade com a isoforma alfa de peru sendo localizado especificamente no final da região *hotspot 2*. No entanto, o fragmento estudado dentro da região *hotspot 2* não foram encontradas mutações relevantes que pudessem alterar a atividade da proteína α RYR causando o PSE.

7 REFERÊNCIAS

AIREY, J.A.; BARING, M.D.; BECK, C.F.; CHELLIAH, Y.; DEERINCK, T. J.; ELLISMAN, M. H.; HOUENOU, L. J.; McKEMY, D.D.; SUTKO, J.; TALVENHEIMO, J. Failure to make normal alpha ryanodine receptor is an early event associated with the crooked neck dwarf (cn) mutation in chicken. **Developmental Dynamics**, 197:169–188, 1993.

ALTSCHUL, S.F.;MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI_BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25, 3389-3402, 1997.

AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, D.; SMITH, J. A.; STRUL, K. Short Protocols in **Molecular Biology**, John Wiley e Sons, 809 p., 1995.

BARBUT, S., Occurence of pale soft exudative meat in mature turkey hens. **British Poultry Science**, 38, 74-77, 1997.

BARBUT, S. Estimates and detection of the PSE problem in young turkey breast meat. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.76, n.3, p.455-457, 1996.

BENDALL, J. R.; WISMER-PEDERSEN, J., Some properties of the fibrillar proteins of normal and watery pork muscle. **Journal of Food Science**, 27, 144, 1962.

BOULIANNE, M.; KING, A.J. Biochemical and color characteristics of skinless boneless pale chicken breast. **Poultry Science**, v.74, 1693-1698p. 1995.

BREWER, M.S. E MCKEITH, F.K., Consumer-rated quality characteristics as related to purchase intent of fresh pork. **Journal of Food Science**, 64, 171- 174, 1999.

BRINI, M., Ryanodine receptor defects in muscle genetic diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 322, 1245-1255, 2004.

CANDEK-POTOKAR, M.; ZLENDER, B.; LEFAUCHEUR, L.; BONNEAU, M., Effects of age and/or weight at slaughter on longissimus dorsi muscle: Biochemical traits and sensory quality in pigs. **Meat Science**, 48, 287-300, 1998.

CHEAH, K.S.; CHEAH, A.M.; CROSLAND, A.R.; CASEY, J.C.; WEBB, A.J. Relationship between Ca^{2+} release, sarcoplasmic Ca^{2+} , glycolysis end meat quality in halothane-sensitive and halothane-insensitive pigs. **Meat Science**, Barking, v.10, n.2, p.117-130, 1984.

CHEAH, K. S.; CHEAH, A. M. Skeletal muscle mitochondrial phospholipase A_2 and the interaction of mitochondrial and sarcoplasmic reticulum in porcine malignant hyperthermia. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v.638, p.40-49, 1981.

CHIANG, W.; ALLISON, C.P.; LINZ, J.E; STRASBURG, G.M., Identification of two alpha RyR alleles and characterization of alpha RyR transcript variants in turkey skeletal muscle. **Gene**, 330, 177-184, 2004.

CHIANG, W.; BOOREN, A.; STRASBURG, G., The effect of heat stress on thyroid hormone response and meat quality in turkeys of two genetics lines. **Meat Science**, 80, 615-622, 2008.

CHIANG, W.; YOON, H-J.; LINZ, J.E.; AIREY, J.A.; STRASBURG, G.M., Divergent mechanisms in generating molecular variations of α RyR and RyR β in turkey skeletal muscle. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, 28, 343-354, 2007.

CULAU, P. O. V. Efeito da distância criação-abatedouro e temperatura de descanso pré-abate sobre a qualidade da carne suína. 132 p. 1991. (**Dissertação** de Mestrado-Universidade Federal do Rio Grande do Sul).

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de alimentos de Fennema**, 4º Ed., 2010, 900p.

DROVAL, A.A. **Carne PSE (Pale, Soft, Exudative): mutações no gene receptor da rianodina tipo 3 e alterações no perfil de ácidos graxos**. 118p. 2004. (Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos- Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil).

DU, G.G.; KHANNA, V.K.; MACLENNAN, D.H., Mutation of divergent region 1 alters caffeine and Ca²⁺ sensitivity of the skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor). **Journal of Biological Chemistry**, 275:11778–11783, 2000.

FERREIRA, A.T. Fisiologia da contração muscular. **Revista Neurociências**, v.13, n.3 (supl-versão eletrônica), 61-63p. 2005.

FORREST, J.C.; ABERLE, E.D.; HEDRICK, H.B.; JUDGE, M.D.; MERKEL, R.A. **Fundamentos de ciência de la carne**. Ed. Acribia. 363 p. 1979.

FRÖMMING, G.R.; OHLENDIECK, K., Isoform-Specific interactions between halothane and the ryanodine receptor Ca^{+2} – release channel: implications for malignant hyperthermia and the protein theory of anaesthetic action. **Naturwissenschaften**, 86, 584-587, 1999.

FRONING, G.W.; BABJI, A.S.; MATHER, F.B. The effect of preslaughter temperatures, stress, struggle and anesthetization on color and textural characteristics of turkey muscle. **Poultry Science**, v.57, n.3, p.630-633, 1978.

FRANZINI-ARMSTRONG, C.; PROTASI, F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. **Physiology Review**, Baltimore, v. 77, n. 3, p. 699-729, 1997.

FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; LEON, S.; KHANNA, V.K.; WEILER, J.E.; O'BRIEN, P.J.; MACLENNAN, D.H. Identification of mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, Washington, 253, 448-451, 1991.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; COSTA, M.J.R.P. Bem-estar das aves e suas implicações sobre o desenvolvimento e produção. In: Forum Internacional de Avicultura, 1., 2005, Foz do Iguaçu. **Anais**, Foz do Iguaçu: animal world, 2005, p.60-68.

GREASER, M.L. Conversion of muscle to meat. 37102p. In: **Muscle as Food**. P.J., BECHTEL, ed. Academic Press, New York, NY. 1986.

GUARNIERI, P. D., SOARES, A.L., OLIVO, R., SCHNEIDER, J. P., MACEDO, R. M., IDA, E. I. e SHIMOKOMAKI, M. Preslaughter handling with water shower spray inhibits

PSE (Pale, Soft, Exudative) broiler breast meat in a commercial plant. Biochemical and Ultrastructural observations. **Journal of Food Biochemistry**, 28, 269-277, 2004.

HAMILTON, S.L., Ryanodine receptors. **Cell Calcium**, 38:253–260, 2005.

HARBITZ, I.; CHOWDHARY, B.P.; CHOWDHARY, R.; KRAN, S.; FRENGEN, E.; GUSTAVSSON, I.; DAVIES, W. Isolation, characterization and chromosomal assignment of a partial cDNA for porcine 6-phosphogluconate dehydrogenase. **Hereditas**, 112:83-88, 1990.

HONIKEL, K.O., HAMM, R. Enfriado, congelado y descongelado. Aspectos coloidoquímicos de la calidad de la carne. **Fleischwirtsch.**, espanol, Frankfurt, v.1, p.46-53, 1985.

IVANENKO, A.; MCKEMY, D.D.; KENYON, J.L.; AIREY, J.A.; SUTKO, J.L. Embryonic chicken skeletal muscle cells fail to develop normal excitation-contraction coupling in the absence of the alpha ryanodine receptor. Implications for a two-ryanodine receptor system. **Journal of Biological Chemistry** 270:4220–4223, 1995.

LARA, J.A.F. **Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) em frangos. Ocorrência de mutações no gene receptor da rianodina.** 101p. 2003. (Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos- Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil).

LARA, J. A. F. ; M. C. LEDUR ; A. L.NEPOMUCENO ; SHIMOKOMAKI, M., Estresse Térmico e Incidência de Carne PSE em Aves. In: Conferência APINCO, Campinas. *Anais. Campinas : Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas*, 04,. 15-15, 2002.

LAWRIE, R.A. **Meat Science**. 5th ed. Pergamon Press, New York, NY. 293p. 1991.

LOUIS, C.F.; REMPEL, W.E; MICKELSON, J.R., Porcine stress syndrome: biochemical and genetic basis of this inherited syndrome of skeletal muscle. Proc. Annu. Reciprocal Meat Conf., Am. **Meat Science**, Assoc., Chicago, 46, 89-96, 1993.

MA, R.T-I; ADDIS, P.B. The association of struggle during exsanguination to glycolysis, protein solubility and shear in turkey pectoralis muscle. **Journal of Food Science.**, v.38, p.995-997, 1973.

MAcLENNAN, D.H.; PHILLIPS, M.S. Malignant hyperthermia. **Science**, Washington, v.256, p.789-794, 1992.

MARCHI, D.F.; OBA, A.; SANTOS, G.R., SOARES, A. L.; SHIMOKOMAKI, M. Avaliação do halotano como agente estressor em frangos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, 2010.

MARCHI, D.F.; TRINDADE, M.A.; OBA, A.; SOARES, A.L.; IDA, E. I.; FERRAZ, J.B.S. MICHELAN-FILHO, T; ZIOBER, I.L.; SHIMOKOMAKI, M. Sensitivity to halothane and its relationship to the development of PSE (Pale, Soft, Exudative) meat in female lineage broilers. **Brazilian Archives of Biology and Technology.**, 52, 219-223, 2009.

McCURDY, R.D., BARBUT,S., QUINTON, M. Seasonal effects on pale, soft exudative (PSE) occurrence in young turkey breast meat. **Food Research**. Int., Essex., v.29, p.363-366, 1996.

MENDES, S. **Tecido muscular.** Disponível no site: <http://yannaspinola.blogspot.com/2010/06/tecido-muscular-parte-1.html>, acesso em: 02/12/2010.

MICKELSON, J. R.; LOUIS, C. F. Malignant hyperthermia: excitation-contraction coupling, Ca²⁺ regulation defects. **Physiological Review** , Baltimore, v. 76, n. 2, p. 537-592, 1996.

MILLER, E.M.; NICKOLOFF, J.A., Escherichia coli electrotransformation. In: Nickoloff JÁ, editor: **Electroporation Protocols for Microorganisms., Human Press.** 105-114, 1995.

MITCHELL, M.A. Muscle abnormalities: pathophysiological mechanisms (Capítulo 3) Disponível em <<http://www.cabi-publishing.org/Bookshop/Redingroom/0851992374/2374ch03.pdf>>. Acesso em 04 ago. 2007.

MITCHELL, G.; HEFFRON, J.J.A. Porcine stress syndromes. **Advances in Food Research**, New York, v.28, p.167-230, 1982.

MURAYAMA, T.; OGAWA, Y. Selectively suppressed Ca²⁺-induced Ca²⁺-release activity of α -ryanodine receptor (α -RyR) in frog skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.4, 2953–2960p. 2001.

MURAYAMA, T.; OGAWA, Y. RyR1 exhibits lower gain of CICR activity than RyR3 in the SR: evidence for selective stabilization of RyR1 channel. **American Journal of Physiology**, v.287, C36-C45. 2004.

NCBI – National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em Janeiro de 2010.

ODA, S.H.I.; NEPOMUCENO, A.L. LEDUR, M.C.; OLIVEIRA, M.C.N.; MARIN, S.R.R.; IDA, E. I.; SHIMOKOMAKI, M. Quantitative differential expression of alpha and beta ryanodine receptor genes in PSE (Pale, Soft, Exudative) meat from two chicken lines: broiler and layer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1519-1525, 2009.

ODA, S.H.I. **Análises moleculares do gene codificador da proteína receptora de rianodina e ocorrência de carne PSE (*Pale, Soft, Exudative*) em frangos**. 167p, 2006 (Tese de doutorado em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, Brasil).

OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Carnes PSE em frangos. In: Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes. SHIMOKOMAKI, M.; SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N.N.; FRANCO, B.D.G.M. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. São Paulo: Varela, p. 85-94, 2006.

OLIVO, R.; SOARES, A.L.; IDA, E.I.; SHIMOKOMAKI, M. Dietary vitamin E inhibits poultry PSE and improves meat functional properties. **Journal of Food Biochemistry**, v.25, n. 4, 271-283, 2001.

OLIVO, R. **Carne PSE em frangos**. 97p. , 1999. (Tese de doutorado em Ciência de Alimentos- Universidade de São Paulo-SP, Brasil).

OTTINI, L.; MARZIALI, G.; CONTI, A.; CHARLESWORTH, A. E.; SORRENTINO, V. Alpha and beta isoforms of ryanodine receptor from chicken skeletal muscle are the homologues of mammalian RyR1 and RyR3. **Journal Biochemistry**, v. 315, 207-216, 1996.

OWENS, C. M.; ALVARADO, C. Z.; SAMS, A. R. Research developments in pale, soft, and exudative turkey meat in North America. **Poultry Science**, 88, 1513-1517, 2009.

OWENS, C. M.; MATTHEWS, N. S.; SAMS, A. R., The use of halothane gas to identify turkeys prone to developing pale, exudative meat when transported before slaughter. **Poultry Science**, 79, 789-795, 2000.

PEARSON, A. M. La función muscular y los cambios postmortem. In: PRICE, J. F.; SCHWEIGERT, B. S. **Ciencia de la carne y de los productos carnicos**. Zaragoza: Acribia, 1994. p. 139-174.

ROSSI, D.; SORRENTINO, V. The ryanodine receptors gene family: expression and functional meaning. **Basic Applied Myology**, v.14, n.5, 323-343p. 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1659 p. ISBN 0-87969-309-6, 1989.

SANTÉ, V.; BIELICKI, G.; RENERRE, M.; LACOURT, A. Post mortem evolution in the Pectoralis superficialis muscle from two turkey breeds: Relationship between pH and colour

changes. Page 465-468 in: 37th **International Congress of Meat and Technology**, v.1, Kulmbach, Germany. Federal Center for Meat research, Kulmbach, Germany. 1991.

SHIMOKOMAKI, M.; OLIVO, R.; TERRA, N.N.; FRANCO, B.D.G.M. **Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes**. Editora Varela, São Paulo, 236p, 2006.

SIMÕES, G.S.; OBA, A.; MATSUO, T.; ROSSA, A.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I. Vehicle thermal microclimate evaluation during brazilian summer broiler transport and the occurrence of PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52, 195-204, 2009.

SOARES, A.L.; LARA, J.A.F.; IDA, E.I.; GUARNIERI, P.D.; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Variation in the colour of brazilian broiler breast fillet. In: Proceedings 48th International Congress of Meat Science and Technology, 48, 540- 541, 2002.

SORRENTINO, V.; REGGIANI, C. Expression of the Ryanodine Receptor Type 3 in Skeletal Muscle. A New Partner in Excitation-Contraction Coupling? **TCM**, v.9, n.1/2, 54-61p. 1999.

SORRENTINO, V.; VOLPE, P. Ryanodine receptors: How many, Where and Why? **Trends in Pharmacology Science**, 14(3):98-103, 1993.

STATSOFT. STATISTICA for Windows: computer program manual. Versão 7.1. Tulsa: Software Inc., 2006.

STRASBURG, G.M.; CHIANG, W., Pale, Soft, exudative turkey – The role of ryanodine receptor variation in meat quality. **Poultry Science**, 88, 1497-1505, 2009.

STRASBURG, G. M.; CHIANG, W., Genetic Basis for Pale, Soft and Exudative Turkey meat. Proceedings of the 56th **American Meat Science** Association Reciprocal Meat Conference. 15-18 de junho. Colúmbia, Missouri, 2003.

SUTKO, J. L.; AIREY, J. A., Ryanodinereceptor Ca^{2+} release channels: does diversity in form equal diversity in function. *Physiological Review*, **Baltimore**, 76, 1027-1071, 1996.

UNTERGASSER, A.; HARM NIJVEEN, H., XIANGYU RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R. LEUNISSEM, J.A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, 2007, 35: W71-W74.

WANG, L. J.; BYREM, T. M.; ZAROSLEY, J.; BOOREN, A. M.; STRASBURG, G. M. Skeletal muscle calcium channel ryanodine binding activity in genetically unimproved and commercial turkey populations. **Poultrty Science**, v. 78, n. 6, p. 792-797, 1999.

ZHANG, H.; BYREM, T. M.; OWENS, C. M.; SAMS, A. R. et al., Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel differences in turkey skeletal muscle from genetically unimproved and commercial populations. In: **Annual Meeting of IFT, Proceedings**, 2000.

ZIOBER, I.L.; PAIÃO, F.G.; MARCHI, D.F.; COUTINHO, L.L.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A. L.; SHIMOKOMAKI, M. Heat and chemical stress modulate the

expression of the α RyR gene in broiler chickens. **Genetics and Molecular Research**. 9(2): 1258-1266, 2010.

ZIOBER, I.L.; PAIÃO, F.G.; MARIN, S. R.R.; MARCHI, D.F.; BINNECK, E.; NEPOMUCENO, A.L.; COUTINHO, L.L.; SHIMOKOMAKI, M. Molecular cloning of α RyR hotspot region 1 from broiler chicken. **Brazilian Archives of Biology and Technology**., 52, 225-231, 2009.

ZIOBER, I.L. **Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative de frangos: Análise dos transcritos do gene codificador da proteína α RyR**. 111p. 2009. (Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos- Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil).

8 ANEXOS

9 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo Científico submetido ao periódico *Genetic and molecular research*. As normas para publicação estão anexadas após o artigo.

Identificação de polimorfismos de nucleotídeo único no gene α RyR em músculo esquelético de frango de corte

A. A. Droval¹, E. Binneck², S. R. R. Marin², F. G. Paião¹, A. Oba¹, A. L. Nepomuceno² e M. Shimokomaki¹

¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina; Londrina, PR, Brasil.

²Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-Soja, Londrina, PR, Brasil.

Autor para Correspondência: M. Shimokomaki

E-mail: mshimo@uel.br

ABSTRACT. A partir da hipótese de que alguma variação no gene que codifica a α RyR em *gallus* possa estar relacionada com a ocorrência de PSE ou servir como marcador genético para determinação deste tipo de carne, foi realizado o sequenciamento de parte deste gene. Por se tratar de um gene com cerca de 15.000 pb foram desenhados *primers* para amplificar um fragmento da região *hotspot* 2 (região que contém alta densidade de mutações em humanos, suínos e perus). Para isso foram utilizados 50 frangos, 25 que desenvolveram carnes PSE e 25 que não desenvolveram este tipo de carne. O DNA total foi extraído a partir do sangue dos animais, a seguir amplificado por PCR, clonado, sequenciado e utilizado para identificação da existência de polimorfismos de nucleotídeos único (SNP's) nos grupos normais e PSE. O fragmento de α RyR amplificado apresentou 604 nucleotídeos (nt), e um trecho de 181 nt desse fragmento foi localizado dois exons hipotéticos na sequência de cDNA da α RyR de peru. Essa sequência codificadora (CR) apresentou na posição 585 uma substituição não sinônima G/A em pelo menos um dos três clones sequenciados, obtidos a partir de nove aves, seis PSE (HAL+) e três normais (HAL-), apresentando heterozigose. Essa substituição significa uma mudança Met/Val na sequência da proteína codificada. Contudo, a alteração não é considerada suficiente para alterar a estrutura/função da proteína.

Key words: mutation, meat quality, SNP e ryanodine receptor protein

INTRODUÇÃO

Carnes PSE (*Pale, Soft e Exsudative*) são caracterizadas por uma cor pálida, consistência flácida e baixa capacidade de retenção de água (CRA) (Candek-Potokar et al., 1998; Brewer e Mckeith, 1999). No Brasil a incidência de carnes PSE na indústria avícola é de aproximadamente 15,86% (Soares et al., 2002). Até a última década, a qualidade da carne de frango tinha apenas atributos estéticos, como cortes da pele, hematomas e outras manchas, pois predominava a comercialização dos cortes "in natura". Nos últimos tempos a produção de industrializados a base de carne de frango fez com que o PSE ganhasse importância e as propriedades tecnológicas da carne afetadas por esse fenômeno fossem estudadas (Shimokomaki, et al., 2006). Dentre os fatores que desencadeiam o PSE têm-se os ambientais estressantes como o manejo, transporte, temperaturas elevadas, aglomeração dos animais

durante o transporte, entre outros (Lara et al, 2002; Simões et al., 2009) e também os genéticos.

Já foi comprovada que o PSE em suínos está relacionado a fatores genéticos, onde, por exemplo, sabe-se que a substituição de uma citosina por uma timina na posição 1843 do gene que codifica a proteína rianodina do tipo 1 (RyR1) e, por consequência, a substituição do resíduo de aminoácido 615 (de Arginina para Cisteína) leva à alteração da atividade desta proteína, ocasionando o PSE (Fujii et al., 1991; Louis et al., 1993). A RYR1 é uma proteína canal de cálcio, presente no retículo endoplasmático do músculo esquelético e a mutação nesta proteína leva uma alteração da homeostase do cálcio acarretando uma síndrome chamada PSS (*Porcine Stress Síndrome*). Animais com essa síndrome estão mais propensos a desenvolver carnes PSE, pois há uma intensa contração muscular, hipermetabolismo, aceleração da glicólise *post mortem*, queda drástica do pH muscular em temperatura elevada da carcaça (aproximadamente 35 °C) causando desnaturação das proteínas miofibrilares e sarcoplasmáticas ocorrendo a perda de exsudato (Bendeal e Wismer-Perdersen, 1962), e por consequência comprometimento das propriedades funcionais das proteínas da carne, como a CRA.

Essa mesma anomalia foi observada também em humanos que apresentam sensibilidade a anestésicos halogenados, sofrendo um enrijecimento muscular conhecido como Hipertermia Maligna (HM). O anestésico halotano tem sido aplicado em testes para detecção de suínos propensos a desenvolver carnes PSE (Louis et al., 1993). A intensa contração muscular durante a exposição ao halotano também foi verificada em cães, perus e frangos (Ohnishi e Ohnishi, 1994; Owens et al., 2000). Em aves acredita-se que o PSE tenha uma origem genética como em suínos, contudo, até o momento, nenhuma mutação relacionada ao PSE foi identificada nesses animais (Owens et al., 2000; Strasburg e Chiang, 2003; Chiang et al., 2004).

As RYRs apresentam três isoformas em mamíferos: RYR1, RYR2 e RYR3, que são expressas em diferentes tecidos. A RYR1 é predominantemente expressa nas células musculares, a RYR2 no tecido cardíaco e a RYR3 no tecido cerebral (Sutko e Airey, 1996; Chiang et al., 2008). Já no músculo esquelético de aves foi identificada a expressão em igual abundância de duas isoformas, a α RYR e a β RYR, que são homólogas a RYR1 e RYR3, respectivamente (Ottini et al., 1996). Em aves ambas as isoformas participam no processo de excitação-contração muscular, enquanto que em mamíferos tem-se apenas a RYR1 atuando no músculo. Oda et al. (2009), quantificando por PCR quantitativo a expressão gênica das isoformas α RYR e β RYR em duas linhagens de frangos, observaram que os animais predispostos ao PSE apresentaram maior expressão gênica da β RYR no tecido muscular esquelético.

Algumas mutações importantes são conhecidas no gene RyR1. Baseado na sequência da proteína (~5038 aminoácidos), em humanos as mutações mais importantes estão localizadas em três principais regiões, chamadas *hotspots* 1, 2 e 3. Em humanos essas regiões são localizadas como N-terminal (entre aminoácidos 1–614), central (entre aminoácidos 2162–2458) e C-terminal (entre aminoácidos 4800–4900) (Brini, 2004). Já para perus, Strasburg e Chiang (2009) define que *hotspots* 1, 2 e 3 estão compreendidos entre os aminoácidos 1 a 1000, 2000 a 3000 e 4000 a 5000, respectivamente. Essas regiões são descritas como cruciais para o funcionamento correto das RYRs e contém domínios altamente conservados, responsáveis pela interação da proteína rianodina com outras proteínas regulatórias e também compõe a parte interna do canal de cálcio. A *hotspot* 1 é a região da RYR1 que apresenta a mutação responsável pelo PSE em suíno e pela HM em humanos. Já na *hotspot* 2 também foram identificadas muitas mutações que em humanos estão associadas a doenças como HM e doenças do núcleo central (miopatias congênitas) (Brini, 2004; Strasburg e Chiang, 2009).

Nenhuma mutação no DNA da α RyR de aves que possa estar associada com aparecimento de carnes PSE foi descrita até o momento. Em perus, embora tenham sido localizados *hotspots* e verificados transcritos variantes da RYR1 em aves que desenvolveram PSE, não foram identificadas mutações relacionadas a ocorrência do fenômeno (Chiang et al., 2004). O mesmo foi observado por Ziober et al. (2010 e 2009) num estudo com frangos, em que foi verificada a ocorrência de transcritos “sem sentido” e com stop códon prematuro em animais PSE submetidos ao halotano e estresse térmico na região *hotspot1* do gene α RyR. Embora o genoma do frango já esteja quase completamente seqüenciado (http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/Info/Index), resta ainda conhecer a seqüência genômica e do transcrito completo da α RyR nessa espécie. Alguns fragmentos do gene já foram seqüenciados, entre eles o mais conhecido é um fragmento de 2031 pb da região C-terminal, disponível no *GenBank* (X95266.1), resultado de um estudo realizado por Ottini et al. (1996). Para os *hotspots* 1 e 2, onde se espera encontrar mutações relacionadas com o PSE, pouco se conhece até o momento. Sendo assim o presente trabalho teve por objetivo clonar e seqüenciar um fragmento localizado na região *hotspot 2* do DNA genômico de frangos, e identificar polimorfismos único de nucleotídeos (SNPs) em animais que foram submetidos ao teste halotano e que desenvolveram PSE, que pudessem explicar a alteração fenotípica, como ocorre em suínos ou que pudesse atuar como marcador genético.

MATERIAL E MÉTODOS

Teste halotano e abate das aves

Foram utilizados 851 frangos da linhagem *Ross*, com idades entre 42 a 45 dias. As aves foram mantidas até o momento do abate dentro dos padrões e normas técnicas de acordo com a portaria número 210 de 10/11/1998-Regulamento Técnico de Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves (Brasil, 2010a), levando também em consideração a instrução normativa número 3 de 17/01/2000 do abate humanitário (Brasil, 2010b). As aves foram submetidas ao teste halotano 48 horas antes do abate, segundo Marchi et al. (2009). Animais que apresentaram rigidez muscular foram classificados como sensíveis ao halotano (HAL+) com predisposição a desenvolvimento de PSE e animais que não mostraram alteração foram considerados insensíveis ao halotano (HAL-). O abate foi realizado em uma linha comercial seguindo as etapas de insensibilização, escaldagem, depenagem, evisceração e resfriamento (Guarnieri et al., 2004). Minutos antes da sangria foram retiradas alíquotas de aproximadamente 2,0 mL de sangue da artéria jugular e acondicionadas em tubos de 4,5 mL contendo K₃ EDTA (marca: *Labor Import*), armazenados a -20°C para a extração do DNA.

Caracterização da carne PSE

Uma amostragem de aproximadamente 154 filés de peito de frango dos animais classificados pelo teste halotano e abatidos foram selecionados para a caracterização do PSE, que foi realizada com base na determinação do pH, luminosidade (valor de L* - sistema CIELAB) e CRA. Carne do peito com valores de pH_{24h} inferior a 5,8 e valor de L*_{24h} maior que 53 foram classificadas como PSE (Barbut, 1997; Soares et al., 2002). As medidas de pH foram realizadas diretamente na parte cranial ventral do filé, conforme descrito por Olivo et al. (2001), com auxílio do potenciômetro de contato (marca: Testo 205). Para a determinação do valor de L* (luminosidade) utilizou-se o colorímetro Minolta. E a CRA foi realizada de acordo com o método descrito por Barbut (1997).

Extração do DNA genômico

Foram selecionadas amostras de sangue de 50 aves, após a caracterização da carne PSE, e as aves foram separadas em dois grupos, PSE (25) e Normais (25). As amostras de sangue foram submetidas à extração do DNA com a utilização do reagente DNAzol BD (Invitrogen), seguindo-se especificações do fabricante.

Seleção da região gênica

Foram identificados quatro *contigs* de *gallus* obtidos do *GenBank/NCBI* (NW_001476149, NW_001476304, NW_001479482, NW_001484776), e estes foram localizados na sequência do transcrito da α RyR de peru (EU177005.1), utilizando-se o programa BLAST (Altshul et al., 1997). O *contig* NW_001476149 foi localizado no intervalo de 6506 a 7405 do transcrito da α RyR de peru, dentro da região descrita como *hotspot 2* segundo Strasburg e Chiang (2009). Sendo assim, a sequência do *conting* NW_001476149 foi utilizada para a seleção dos *primers forward* (5'-AGGAAGCCGACCTCCAAC-3') e *reverse* (5'-TGGGGGTTCATCAGCCTTC-3'), utilizando o programa *Primer3Plus* (Untergasser et al., 2007).

Verificação da amplificação

A amplificação de uma região de 604 pares de base (pb) deu-se por PCR (Reação em cadeia da polimerase), com volume final de 25 μ L, que consistiram de 50 ng da amostra de DNA, 10 μ M de *primers forward e reverse*, 0,1 mM de dNTP's, 2,5 mM de MgSO₄, 1U da enzima Platinum® High Fidelity Taq DNA polimerase (Invitrogen), e tampão de PCR (60 mM Tris-SO₄/pH 8,9 e 18mM Sulfato de amônio). A programação utilizada no Termociclador (Veriti™/Modelo 96-Well Thermal Cycler –*Applied Biosystems*) foi de 2 minutos a 95 °C para desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos (desnaturação), 65 °C (pareamento) por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos (extensão) e uma extensão final a 72 °C por 8 minutos.

O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (m/v) a 5 v/cm por 2 horas. A seguir o gel foi fotografado em fotodocumentador (sistema KODAK Eletrophoresis Documentation and Analysis System 290) e os produtos de PCR foram recortados e purificados com a utilização do kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega), seguindo o protocolo do fabricante.

Obtenção de clones recombinantes

Os produtos de PCR purificados foram ligados ao vetor TOPO TA *Cloning*® (Invitrogen), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Após a ligação dos produtos de PCR, células eletrocompetentes de *E. coli* (DH5 α) foram transformadas com plasmídeo contendo inserto via eletroporação segundo Miller e Nickoloff (1995). Foram isolados três clones recombinantes de cada amostra e procedeu-se a extração de plasmídeos em microplacas para posterior sequenciamento.

Sequenciamento e análise dos resultados

Para o sequenciamento foram utilizados os *primers* universais M13 e o kit BigDye® Terminator v3.1 (*Applied Biosystems*). O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI 3100 (*Applied Biosystems*). Os cromatogramas foram analisados visualmente e as sequências

comparadas através do programa *ContigExpress* do pacote Vector NTI Suite 8 (InforMax). Para verificar a possível similaridade das sequências obtidas com as sequências de outros organismos no *GenBank*, foram utilizados os programas BLASTN e BLASTX (ALTSHUL et al., 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 851 aves utilizadas no experimento, 94 animais foram sensíveis ao anestésico halotano (HAL +) e dos 154 filés avaliados na caracterização da carne PSE, 42,2% foram PSE e destes, 64,6% foram HAL+. Já dos 50 animais selecionados para a extração do DNA, os 25 caracterizados como PSE, todos foram sensíveis ao gás halotano (HAL+). E entre as aves do grupo normal (Controle), dois animais apresentaram sensibilidade ao halotano (HAL+), e o restante (23) foi insensível ao anestésico (HAL-). Contudo, o teste do halotano em aves não é tão eficiente quanto em suínos para determinação do fenótipo PSE. Em perus de acordo com estudos realizados por Owens et al. (2000) não é um método tão eficaz, gerando dúvidas no momento da sua avaliação. Na Tabela 1 estão apresentados os resultados dos valores médios das análises físicas de pH, luminosidade (valor de L*) e CRA das cinquenta amostras de carne de peito dos frangos PSE e normais utilizados na extração do DNA.

Inserir Tabela 1

A caracterização da carne PSE pode ser obtida pela mensuração de dois parâmetros, o valor de pH, que indicará PSE em valores abaixo de 5,8 e a obtenção do valor colorimétrico da luminosidade (L*) que são considerados valores iguais ou maiores que 54,0 (Barbut, 1997). Além desses dois, considerou-se um terceiro parâmetro, a capacidade de retenção de água (CRA), conforme Barbut (1997) e Olivo et al. (2001), as carnes PSE apresentam uma CRA menor do que as carnes normais. Segundo Shimokomaki et al. (2006), com a diminuição do pH, ocorre aumento da birrefringência, com menos luz sendo transmitida através das fibras e mais luz sendo dispersa. Existe uma correlação inversa entre os valores de pH e de L*, ou seja, quanto menor o pH, maior será o valor de L*, ou vice-versa. Como as propriedades funcionais da carne dependem do seu pH final, assim quanto maior for o valor de L*, menor será a capacidade de retenção de água (CRA), um parâmetro importante para a qualidade da carne. Os valores obtidos de pH, L* e CRA corroboram com os autores acima na caracterização da carne PSE e conforme pode ser observado na tabela 1, os dados mostram que as três análises físicas diferiram estatisticamente pelo teste t de *Student* ($p \leq 0,05$) entre os grupos de animais estudados (PSE e normais).

O gene que codifica para a RyR1 em humanos se destaca pelo seu grande tamanho (153865 pares de base), pelo número de exons e de introns. Menos de 10 % da sequência do gene (15114 pb) se distribui entre os mais de 90 exons que codificam para a proteína. Destaca-se também o grande tamanho dos introns, o que dificulta o seqüenciamento a partir do conhecimento de partes da sequência do transcrito apenas. No caso de peru tem-se a sequência completa do transcrito do gene α RyR (EU177005.1), com 15.153 pb, já em frango, apenas 2031 pb do gene α RyR foi seqüenciado (Ottini et al., 1996). O PCR com os *primers* selecionados a partir da sequência de *gallus*, *contig* NW_001476149, geraram ampliações de fragmentos de aproximadamente 600 nucleotídeos nas 50 amostras de DNA obtidas a partir dos grupos de aves PSE e Normais (Figura 1).

Inserir Figura 1

Analisando as sequências dos 50 animais avaliados, identificou-se em frangos com e sem PSE a ocorrência de duas sequências genômicas, depositados no *GeneBank*, com os números de acesso HN153277 e HR30866, que foram designados de sequências genômicas I e II, respectivamente. Na posição 585 da sequência de DNA do fragmento obtido verificou-se a substituição de um nucleotídeo, uma A (Adenina) para uma G (Guanina), ou vice versa. A sequência genômica I contendo o nucleotídeo G (Guanina) na posição 585 ocorreu com maior (82%) frequência nas aves estudadas, enquanto que nove animais (18%) foram heterozigotos e apresentaram ambas as sequências (Figuras 2 e 3). Essa substituição foi observada tanto em animais PSE como em normais (controle), fato também observado para perus, onde foi identificada a existência de dois alelos e nenhum deles foi relacionado com a ocorrência de PSE nestas aves (Chiang et al., 2004).

A sequência genômica II, com a substituição do nucleotídeo A por G na posição 585 levou a alteração na sequência de aminoácidos em relação ao I e a sequência de cDNA do gene α RyR de peru depositada no *GeneBank* (EU177005.1), trocando-se uma Valina por uma Metionina (Figura 3). Com auxílio do programa SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*/http://sift.jcvi.org/), verificou-se que essa substituição pode ocasionar alteração na estrutura da proteína e que essa alteração pode ser tolerável.

Inserir Figura 2

Inserir Figura 3

Alinhando o fragmento da sequência genômica I que foi o de maior ocorrência nas aves avaliadas, com a sequência de cDNA do gene α RyR de peru (EU177005.1) pelo programa *bl2seq* (Altschul et al., 1997) foram localizados pelo menos 2 exons parciais (1 a 45 e 467 a 604) e um intron completo (46 a 466) (Figura 4). A sequência que compreende os exons concatenados (181 nt) foi designada como região codificadora (CR). Conforme o alinhamento mostra na figura 4, há uma alta similaridade na sequência desse gene com o gene α RyR de peru.

Inserir Figura 4

Foram identificadas diferenças em 13 nucleotídeos (Figura 4), porém o alinhamento da proteína predita a partir da região CR apresenta 100% de identidade com a sequência de proteínas do gene α RyR de peru (EU177005) (Figura 5). Além da similaridade com a sequência de peru, observou-se a similaridade da α RyR com outras espécies, como rã, rato, suíno, humano e coelho disponíveis no *GenBank* ([NCBI](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). O grau de identidade com essas espécies foi de 84% para a Rã e 81% para as outras espécies de mamíferos (Figura 5).

Inserir Figura 5

A região estudada quando comparada a outros organismos se localiza na região final *hotspot 2* da α RyR de peru, sendo esta uma região conservada. As regiões 1 (1 a 1000 aminoácidos); região 2 (2000 a 3000) e região 3 (4000 a 5000) são regiões conservadas entre as espécies, tornando-se com isso importantes focos de estudo (Strasburg e Chiang, 2009; Chiang, Yoon e Linz, 2007; Brini, 2004). Muitas doenças principalmente a Hipertermia Maligna (HM) em humano tem sido relacionadas a mutações localizadas nas regiões 1 e 2 do gene RyR1 (Brini, 2004) e de acordo com Chiang et al. (2004) mais de vinte mutações que resultam em troca de aminoácidos, além de uma deleção de aminoácido foram localizadas nestas regiões.

A CR do fragmento estudado está localizada entre dois domínios, o pFam01365 (RIH-RYDR_ITPR) e o pFam02026 (RyR) na sequência mRNA do gene α RyR de peru (EU177005). Essa localização está de acordo com a RyR1 de suíno e de humanos. O pFam01365 (localização em peru: 2143-2351) é um dos domínios extracelulares dos dois tipos de canais de cálcio, ou seja, esta região é encontrada nos receptores de rianodina e no receptor inositol 1,4,5-trifosfato. O domínio pode formar um sítio de ligação para o IP3. Já o pFam02026 (2721-2815aa) não apresenta função definida. Mas a região CR estudada encontra-se mais próxima do domínio pFam01365, ou seja, está a aproximadamente 102 aminoácidos de distância do fim do domínio, entre os aminoácidos 2453 a 2513.

CONCLUSÃO

O fragmento obtido de 604 nucleotídeos (nt) apresentou similaridade com outros organismos com a proteína receptora de rianodina tipo 1, tendo maior similaridade com a isoforma alfa de peru sendo localizado no final da região *hotspot* 2 desta sequência. A identificação de duas seqüências polimórficas ocorreu em ambos os grupos, PSE e normais, e não foram conclusivos para a determinação do PSE em frangos. Porém estes resultados adicionam novas informações em regiões desconhecidas do genoma de *Gallus gallus*.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Processos n 558819/2008-7 e 479738/2007-6) e Fundação Araucária/ Pronex (Protocolo número 09.277) pelo financiamento do trabalho. À EMBRAPA-Soja pelo apoio e parceria no desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS

- Altschul, S.F.;Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. (1997), Gapped BLAST and PSI_BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Barbut, S.(1997), Occurrence of pale soft exudative meat in mature turkey hens. *British Poultry Science*, 38, 74-77.
- Bendall, J. R.; Wismer-Pedersen, J. (1962), Some properties of the fibrillar proteins of normal and watery pork muscle. *J. Food Sci.* 27, 144.
- BRASIL (2010a), Ministério da Agricultura, agropecuária e abastecimento. Portaria número 210 de 10 de novembro de 1998 Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/> online>. Acesso em: 30 de junho de 2010.
- BRASIL (2010b), Ministério da Agricultura, agropecuária e abastecimento. Instrução Normativa número 3 de 17 de janeiro de 2000. Regulamento técnico de métodos de insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/> online>. Acesso em: 30 de junho de 2010.
- Brewer, M.S. e McKeith, F.K. (1999), Consumer-rated quality characteristics as related to purchase intent of fresh pork. *J. Food Sci.* 64, 171- 174.
- Brini, M.(2004), Ryanodine receptor defects in muscle genetic diseases. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 322, 1245-1255.
- Candek-Potokar, M.; Zlender, B.; Lefaucheur, L.; Bonneau, M. (1998), Effects of age and/or weight at slaughter on longissimus dorsi muscle: Biochemical traits and sensory quality in pigs. *Meat Science*, 48, 287-300.
- Chiang, W.; Allison, C.P.; Linz, J.E; Strasburg, G.M.(2004), Identification of two alpha RyR alleles and characterization of alpha RyR transcript variants in turkey skeletal muscle. *Gene*, 330, 177-184.
- Chiang, W.; Yoon, H-J.; Linz, J.E.; Airey,J.A.; Strasburg, G.M. (2007), Divergente mechanisms in generating molecular variations of α RyR and RyR β in turkey skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 28, 343-354.
- Chiang, W.; Booren, A.; Strasburg, G.(2008), The effect of heat stress on thyroid hormone response and meat quality in turkeys of two genetics lines. *Meat Science*, 80,. 615-622.
- Frömming, G.R.; Ohlendieck, K. (1999), Isoform-Specific interactions between halothane and the ryanodine receptor Ca^{+2} – release channel: implications for malignant hyperthermia and the protein theory of anaesthetic action. *Naturwissenschaften*, 86, 584-587.

- Fujii, J.; Otsu, K.; Zorzato, F.; Leon, S.; Khanna, V.K.; Weiler, J.E.; O'Brien, P.J.; MacLennan, D.H. (1991), Identification of mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, Washington, 253, 448-451.
- Guarnieri, P.D.; Olivo, R.; Soares, A.; Ida, E.I.; Lara, J.A.F.; Shimokomaki, M. (2002), Bem estar animal e qualidade da carne das aves: uma exigência dos consumidores. *Revista Nacional da Carne*, 301, 36-44.
- Guarnieri, P. D., Soares, A.L., Olivo, R., Schneider, J. P., Macedo, R. M., Ida, E. I. E Shimokomaki, M. (2004), Preslaughter handling with water shower spray inhibits PSE (Pale, Soft, Exudative) broiler breast meat in a commercial plant. Biochemical and Ultrastructural observations. *Journal Food Biochemistry*, 28, 269-277.
- Lara, J. A. F. ; M. C. Ledur ; A. L. Nepomuceno ; Shimokomaki, M. (2002), Estresse Térmico e Incidência de Carne PSE em Aves. In: Conferência APINCO, Campinas. *Anais. Campinas : Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas*, 04, 15-15.
- Louis, C.F.; Rempel, W.E; Mickelson, J.R. (1993), Porcine stress syndrome: biochemical and genetic basis of this inherited syndrome of skeletal muscle. *Proc. Annu. Reciprocal Meat Conf., Am. Meat Science, Assoc.*, Chicago, 46, 89-96.
- Marchi, D.F.; Trindade, M.A.; Oba, A.; Soares, A.L.; Ida, E.I.; Ferraz, J.B.S.; Filho, T. M.; Ziober, I.L.; Simokomaki, M., (2009), Sensitivity to halothane and its relationship to the development of PSE (Pale, Soft, Exudative) meat in female lineage broilers. *Braz. Arch. of Biol. And Technol.*, 52, 213-223.
- Miller, E.M.; Nickoloff, J.A. (1995), *Escherichia coli* electrotransformation. In: Nickoloff JÁ, editor: *Electroporation Protocols for Microorganisms.*, Human Press. 105-114.
- Mills, L.; Mitchell, M.A.; Mahon, M. (1999), Susceptibility to heat stress in fast and slow growing turkey lines. *Poultry Science*, 78.
- NCBI – National Center for Biotechnology Information (NCBI). Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em Janeiro de 2010.
- Oda, S.H.I; Nepomuceno, A.L. Ledur, M.C.; Oliveira, M.C.N.; Marin, S.R.R.; Ida, E. I.; Shimokomaki, M. (2009), Quantitative differential expression of alpha and beta ryanodine receptor genes in PSE (Pale, Soft, Exudative) meat from two chicken lines: broiler and layer. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 52, 1519-1525.
- Ohnishi, S.T.; Ohnishi, T. (1994), Malignant hyperthermia. A genetic membrane disease. 1st edition. *Boca Raton, Florida: CRC*.
- Ottini, L., Marziali, G., Conti, A., Charlesworth, A. E Sorrentino, V. (1996), Alpha and beta isoforms of ryanodine receptor from chicken skeletal muscle are the homologues of mammalian RyR1 and RyR3. *Journal Biochem. J.* 315, 207-216.
- Owens, C.M.; Matthews, N.S.; Sams, A.R. (2000), The use of halothane gas to identify turkeys prone to developing pale, exudative meat when transported before slaughter. *Poultry Science*, 79, 789-795.
- Shimokomaki, M.; Olivo, R.; Terra, N.N.; Franco, B.D.G.M (2006), *Atualidades em Ciência e Tecnologia de Carnes*. Editora Varela, São Paulo, 236p.
- Simões, G.S.; Oba, A.; Matsuo, T.; Rossa, A. et al. (2009), Vehicle thermal microclimate evaluation during brazilian summer broiler transport and the occurrence of PSE (Pale, Soft, Exudative) meat. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 52, 195-204.
- Soares, A.L.; Lara, J.A.F.; Ida, E.I.; Guarnieri, P.D.; Olivo, R.; Shimokomaki, M. (2002), Variation in the colour of brazilian broiler breast fillet. In: *Proceedings 48th International Congress of Meat Science and Technology*. 48, 540- 541.
- Strasburg, G. M.; Chiang, W. (2003), Genetic Basis for Pale, Soft and Exudative Turkey meat. *Proceedings of the 56th American Meat Science Association Reciprocal Meat Conference*. 15-18 de junho. Colúmbia, Missouri.
- Strasburg, G.M.; Chiang, W. (2009), Pale, Soft, exudative turkey – The role of ryanodine receptor variation in meat quality. *Poultry Science*, 88, 1497-1505.
- Sutko, J. L.; Airey, J. A. (1996), Ryanodine receptor Ca²⁺ release channels: does diversity in form equal diversity in function. *Physiological Review, Baltimore*, 76, 1027-1071.
- Untergasser, A.; Harm Nijveen, H., Xiangyu Rao, X.; Bisseling, T.; Geurts, R.; Leunissen, J.A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 2007 35: W71-W74.
- Ziober, I.L.; Paião, F.G.; Marchi, D.F.; Coutinho, L.L.; Binneck, E.; Nepomuceno, A.L.; Shimokomaki, M. (2010), Heat and chemical stress modulate the expression of the α RyR gene in broiler chickens. *Genetics and molecular research*. 9(2): 1258-1266, 2010.
- Ziober, I.L.; Paião, F.G.; Marin, S. R.R.; Marchi, D.F.; Binneck, E.; Nepomuceno, A.L.; Coutinho, L.L.; Shimokomaki, M. (2009), Molecular cloning of α RyR hotspot region 1 from broiler chicken. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 52, 225-231.

Tabela 1 - Valores médios de pH, cor (L*) e CRA dos filés PSE e Normais das aves estudadas:

Filés	pH	L* (0 a 100)	CRA (%)
PSE (n=25)	5,73 ^b ± 0,03	57,19 ^a ± 0,51	68,67 ^b ± 0,80
Normal (n=25)	5,97 ^a ± 0,03	51,39 ^b ± 0,37	73,11 ^a ± 0,75

*Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste t de *Student* ($p \leq 0,05$)

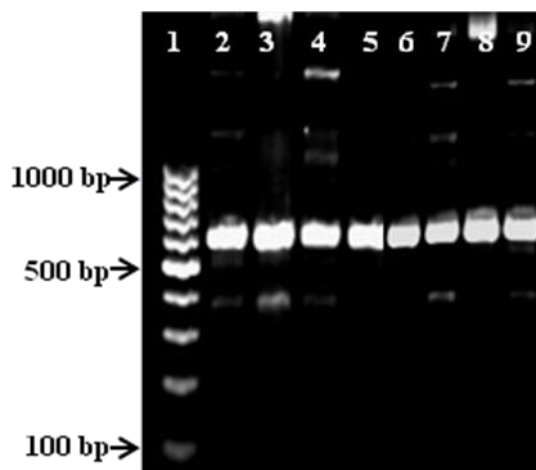


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1% do produto de amplificação. Linha 1: Marcador de massa molecular de 100pb (Invitrogen); Linhas 2-5: amostras de DNA de frangos PSE; Linhas 6-9: amostras de DNA de frangos Normais

		571	585	604
Chicken 09_PSE	Clone 1	AGTTCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Chicken 10_PSE	Clone 1	AGTTCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Chicken 17_PSE	Clone 1	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Chicken 18_PSE	Clone 1	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Chicken 19_PSE	Clone 1	AGTTCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Chicken 20_PSE	Clone 1	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Chicken 40_Nor	Clone 1	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Chicken 45_Nor	Clone 1	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
Chicken 50_Nor	Clone 1	AGTTCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 2	AGTTCCTCCTCCAC G TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		
	Clone 3	AGTTCCTCCTCCAC A TGTTGGAGGTCGGCTTCCT		

Figura 2. Alinhamento da sequência parcial de nucleotídeos dos nove frangos que apresentaram poliformismo (seqüências genômicas I e II) na posição 585 do fragmento obtido do gene α RyR em frango. Em negrito: a identificação do nucleotídeo alterado na seqüência do fragmento.

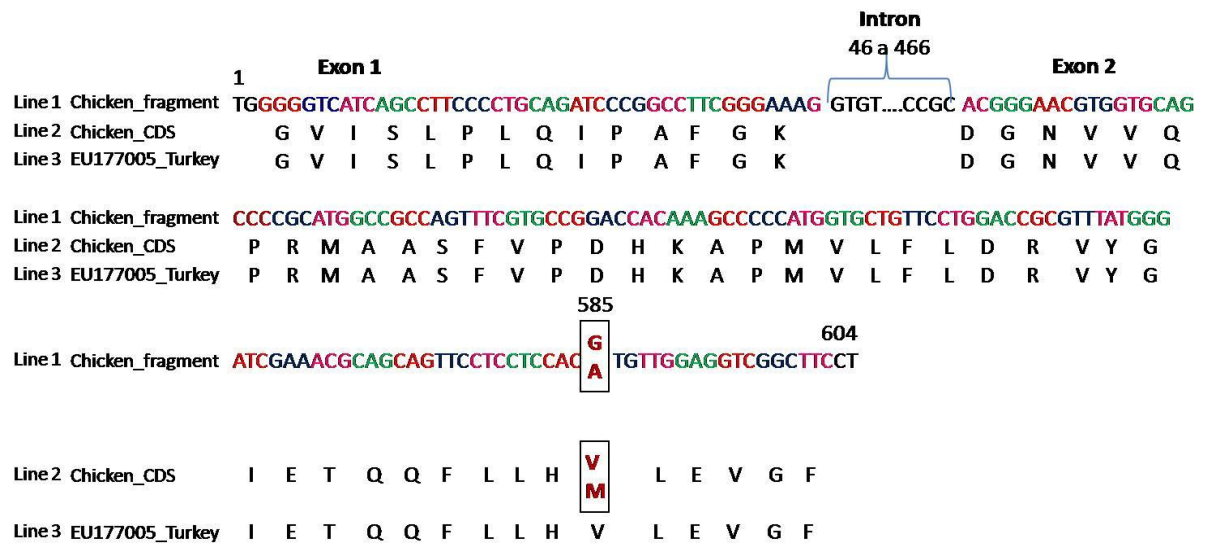


Figura 3. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do fragmento obtido em frango com a tradução da sequência de aminoácidos, indicando o nucleotídeo (posição 585) e o aminoácido alterado na CR. Linha 1: Nucleotídeos coloridos em vermelho, azul, pink e verde correspondem aos códons da CR e pretos a região não codificadora. Linha 2: Letras pretas sequências de aminoácidos e em vermelho aminoácido alterado da sequência de proteínas do gene α RyR em frango. Linha 3: Sequência de aminoácidos do gene α RyR de peru (2455 a 2513)

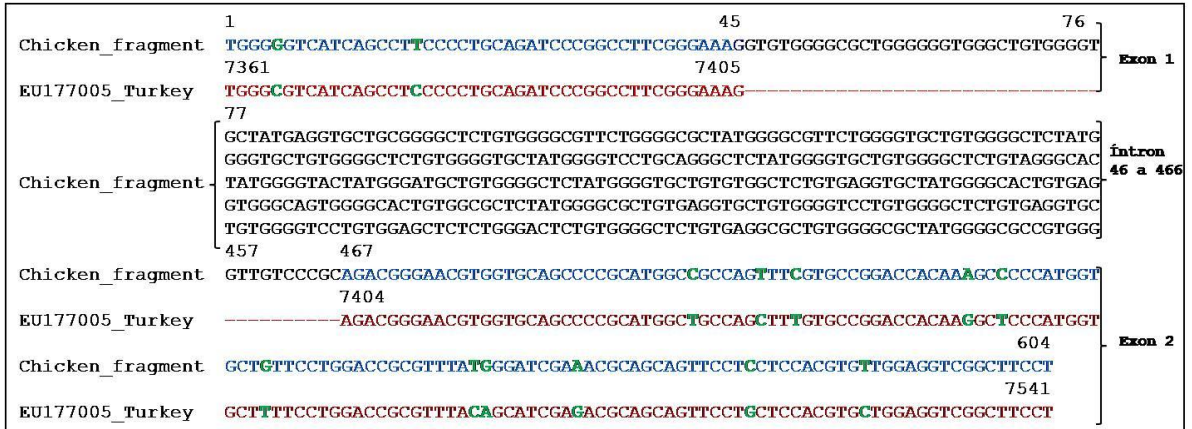


Figura 4. Alinhamento do fragmento com 604 pb seqüenciado (seqüência genômica I) com a seqüência de dDNA do gene α RyR de peru. E localização dos exons 1 e 2 do fragmento na seqüência de peru. Letras azuis: CR da seqüência do fragmento obtido em frango. Identificação dos exons 1 (1 a 45) e 2 (467 a 604); Letras vermelhas: seqüência parcial de cDNA do gene α RyR de peru; Letras verdes: Diferenças observadas entre a seqüência do fragmento obtido em frango e a seqüência de cDNA da α RyR de peru.

BAA04646_Bullfrog	2454	GVISLPLQIPAFGKDGNTIEPKMSASFVPDHKAPMVLFLDRVYGIENQDFLLQVLEVGF	2512
NP_033135_Mouse	2469	GIISLPLQIPTLGKDGALVQPKMSASFVPDHKASMVLFLDRVYGIENQDFLLHVL DVGF	2527
AAA31119_Pig	2469	GIISLPLQIPTLGKDGALVQPKMSASFVPDHKASMVLFLDRVYGIENQDFLLHVL DVGF	2527
NP_000531_Human	2468	GIISLPLQIPTLGKDGALVQPKMSASFVPDHKASMVLFLDRVYGIENQDFLLHVL DVGF	2526
P11716_Rabbit	2468	GIISLPLQIPTLGKDGALVQPKMSASFVPDHKASMVLFLDRVYGIENQDFLLHVL DVGF	2526
EU177005_Turkey	2455	GVISLPLQIPAFGKDGNNVQPRMAASFVPDHKAPMVLFLDRVYGIETQQFLHVL DVGF	2513
Chicken_CR	3	GVISLPLQIPAFGKDGNNVQPRMAASFVPDHKAPMVLFLDRVYGIETQQFLHVL DVGF	179

Figura 5. Alinhamento das proteínas da CR com outros organismos. Colunas em branco indicam identidade completa e colunas em verde e amarelo indicam identidade parcial entre a CR do fragmento obtido e a α R_{YR} das demais espécies.

Instructions for Authors

Genetics and Molecular Research (GMR) publishes research articles, research reports, technical notes, scientific commentaries, news, views, and review articles with regard to genetics, evolution, molecular biology, and bioinformatics. Review articles are normally received by invitation only. If you would like for us to consider a review article, please consult the editor first; send a proposed title, a brief outline and a list of papers relevant to the review submitted by the author(s). GMR is an exclusively online journal.

The journal is maintained by the not-for-profit scientific foundation **Ribeirão Preto Foundation for Scientific Research (FUNPEC-RP)**. **The fee per accepted submission is R\$ 1.000.00 for Brazilian authors and US\$500.00 for authors from other countries. The US dollar amount reflects the approximate current foreign exchange rate and is subject to change.** This fee covers part of the expenses for final language and technical revision, for page setup, and for publishing online.

Payment of the publishing fee should be made by the authors only after receiving a letter of acceptance. After payment is received by our office, the manuscript will be processed further for publication.

Payment, both from within or outside Brazil, should be made by bank transfer (Banco do Brasil or Commerce Bank) or by credit card (Visa). Instructions for payment of the publishing fee will be sent together with the letter of acceptance for publication.

Please contact the editorial office [gmr@funpecrp.com.br] if you have any questions.

All GMR articles must meet the highest standards of scientific quality, both in terms of originality and significance, and the research findings reported should make substantial advances. As it is a journal serving a wide and varied scientific community, article abstracts, introductions and conclusions should be comprehensible to the non-specialist, stressing any wider implications of the work. However, the papers should not compromise on the scientific rigor and detail demanded by an international research journal. The broad readership that GMR attracts gives authors an opportunity to convey to a large audience, as well as to specialists, the importance of their work. The journal is currently indexed in over 64 services; see [<http://www.funpecrp.com.br/gmr/indexers.htm>].

Contributions should be sent either by e-mail as attachments to [gmr@funpecrp.com.br] or by regular mail to: Prof. Dr. Francisco A. Moura Duarte, Editor. Av. Presidente Vargas, 2627, 2º andar - Condomínio Itamarati, 14020-260 Ribeirão Preto, SP, Brazil.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been previously published and will not be simultaneously published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries. The use of registered names, trademarks, etc., in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.²

All papers should be prepared in U.S. English. An initial evaluation of the language will be made upon receipt of each manuscript. Those that are considered inadequate for initial review will be returned or sent out for correction, at the discretion of the author. The manuscript will be considered officially received when the corrected version is ready to be sent to the referees.

Before final acceptance, a submission letter with the title of the article and names and signatures of all the authors should be posted to the above address or faxed to the journal at 55 (16) 3621-1991. Galley proofs will be sent in “pdf” form via e-mail for final revision. All authors are co-responsible for their submissions and they should make every effort to check the paper before this final step to avoid costly reformatting and possible introduction of new errors.

GMR articles have no rigid length restrictions. They should contain sufficient technical detail for an expert reader to understand and assess the methods and results. There is no page limit for GMR articles, but authors should still be concise, for two main reasons. First, our electronic refereeing system relies on e-mail, and very large files occasionally cause problems. Second, lengthy manuscripts can be cumbersome to read and study. Referees tend to dislike them, and they take longer to process. In addition, readers of electronic journals often print articles to read them. Remember that a 10,000-word article takes up around 11 pages.

How many pages would you be willing to read on-screen or print out?

Editorial policies: GMR is a refereed journal. Only original manuscripts will be considered for publication. Manuscripts will be reviewed by at least two independent reviewers before a decision is made on publication. The whole process is conducted electronically to speed progress and final publication. Papers will be published (placed online) within two months after final acceptance. Papers accepted in their final form from January 1 to March 31 constitute the first issue of each volume, and so on. There are four issues per year.

Manuscripts (in U.S. English), together with a cover letter from the author responsible for all correspondence, should be submitted to the Editor at [gmr@funpecrp.com.br] in electronic format as .doc files saved in Microsoft Word 97 for Windows, or later version. Do not use formatting such as Word’s “Heading” or “Style Sheets”. Spelling, punctuation, sentence structure, spacing, length, and consistency of usage in form and descriptions should be checked before submission. Please also check references for accuracy. Ensure that all

figures and tables are mentioned in the text, and that all references are cited in the text. Figure and table files (see below) should be separate.

Submission information

Authors are required to provide the following information with their electronic submissions:

Author submitting the article; article title; authors (full list); article type and session; status of article (e.g., new, revised, etc.); postal address; e-mail address; phone number; fax number; names and types of the files sent.

Brazilian authors should not translate their institutional addresses. These should remain in the original (Portuguese) language.

Revised versions: Authors submitting a revised version of an article, must remember to include a list of changes, and replies to the referees (or technical editor). All the files, not just those revised, for the final draft of paper should be sent.

Acknowledgment of electronic submissions: Successful receipt and processing of the author's submission will be acknowledged by e-mail when the submitted manuscript has been 3

checked. If no reply has been received within one week, the author should contact the editor at [gmr@funpecrp.com.br].

Review: Articles are reviewed anonymously by independent referees. Authors are encouraged to suggest names of expert reviewers, but selection remains the prerogative of the editors. To facilitate the review process, the authors can send supplementary material, such as cited accepted but not yet published papers, which may be important for assessment of the manuscript.

A review article should contain: an abstract of 250 words or less, no more than 6 key words, a running title and no more than 60 references. It should be divided into sections with appropriate titles and subtitles.

Preparation of the manuscript

Order the sections comprising the manuscript as follows: title, running title, author, address, abstract, key words, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgments, and references.

Title Page: The title page should include the title of the article, authors' names, and authors' affiliation. The affiliation should comprise the department, institution (usually university or company), city, and state (or nation). The title page should include the name and complete mailing address, telephone number, fax number, and e-mail address of the author designated to review proofs. The title page should start below the top margin, be single-spaced, and have no space left before the Summary/Abstract. A running title of no more than 60 characters (including spaces) should be provided.

Abstract: An abstract of up to 250 words, single-spaced, is required of research articles and reports and should be arranged in one paragraph. The following information (without headings) should be included: purpose, methods, results, and conclusions. Review articles also require an abstract, which need not include all of these items.

Key words: A list of key words or indexing terms (up to six) should be included.

Text

Format: Headings should be bold, and first letters capitalized and left-aligned. All text should be set in Times New Roman font, 12 point, left-aligned, single-spaced. Do not justify the right margin. Leave only one (1) space after periods. Paragraphs should not be indented; there should not be any blank lines between them. Use line returns only at the end of paragraphs. Do not use tabs or spaces to create indents. Use the Symbol font for symbols and special characters. Do not use equation editors or footnoting utilities. Save equations as images. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page.

Footnotes: Footnotes should be avoided. When their use is absolutely necessary, footnotes should be numbered consecutively using Arabic numerals and should be placed at the bottom of the page to which they refer. Place a line above the footnote, so that it is set off from the text.

Tables/Charts: Special care should be taken to ensure that all tables are properly formatted. Scientific symbols used should be in Symbol or Times New Roman. Tables should 4 be on a separate page, numbered consecutively (with Arabic numerals) referred to by number in the text and designed to fit the column or page size of the journal. Use tables with cells to separate columns. Do not use spaces, tabs or vertical lines. Left justify the title above the table. Indicate each table's location within the manuscript.

Illustrations: Illustrations/figures (photographs, drawings, diagrams, and charts) should each be in a single file, numbered in a consecutive series of Arabic numerals in the order in which they are cited in the text. Illustrations must be submitted as separate files. All illustrations are to be supplied in JPEG (jpg) format in either color or black and white. Images must be saved as separate, stand-alone files. The image resolution should be 300 dpi. Do not embed images within the text file. The placing of graphics in the paper should be indicated in the text and should include the captions for the figures. The authors should also send, by mail, a printed version of the figures. These should be at least 10 x 15 cm, up to US letter size, so that figures can be scanned to guarantee good quality for publishing online.

Abbreviations: Try to use abbreviations in the text sparingly. Write out abbreviations in full before the first time they are used in the text. Use the metric system for all measurements without periods (cm, mL, s). Define all symbols used in equations and formulas. Do not abbreviate the word “Figure” or “Table” in titles or text.

Acknowledgments: All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one paragraph directly preceding the reference section. Authors of manuscripts submitted to GMR are requested to state the source of all funding that enabled the described research to be undertaken.

Reference: References in the text should include the name of the author and the year in parentheses, e.g. (Searle, 1961) or (King and Wilson, 1975). When a reference with more than two authors is cited, only the first author is named, e.g. (Comstock et al., 1958). The references must be cited in the text in chronological order, e.g. (Ideber, 2001; Uetz, 2002; Ottavai, 2004). References to “unpublished results” and “submitted papers” should appear in the text in parentheses following the name(s) of the individual(s). Example: (Pereira KS, Martins PK and Silva TM, unpublished results). **No more than 40 references should be cited in a Full-length paper, 20 references in a Short Communication and 60 references in a Review article.**

Reference, under the heading “References”, should include only works referred to in the text. It should be arranged in alphabetical order under the first author’s last name. References should be cited as follows: journal papers - names and initials of the first four authors (after that using et al.), year, full title, journal abbreviated according to PubMed or Web of Science, volume number, first and last page numbers; books - names of authors, year, full title, edition, publishers, address (city); articles published in symposia - names of authors, year, full title of book, name(s) of editor(s) in parentheses, publisher, address (city), first and last page numbers.

The references should consist of indexed articles only. References for techniques that are essential for understanding or repeating the methods should always be in easily accessible journals.

Reference style: The list of references at the end of the paper should follow the format requested by GMR. The link below can be accessed to see how the references should appear.

Examples of reference style