



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

IOLANDA CRISTINA CEREZA ZAGO

**APROVEITAMENTO DE FILÉS *WOODEN BREAST*
PARA ELABORAÇÃO DE UM PRODUTO TIPO PEITO DE
FRANGO SALGADO COZIDO COM APLICAÇÃO DE
ENZIMA ALCALASE**

Londrina
2020

IOLANDA CRISTINA CEREZA ZAGO

**APROVEITAMENTO DE FILÉS *WOODEN BREAST*
PARA ELABORAÇÃO DE UM PRODUTO TIPO PEITO DE
FRANGO SALGADO COZIDO COM APLICAÇÃO DE
ENZIMA ALCALASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Adriana Lourenço Soares Russo.

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Z18a Zago, Iolanda Cristina Cereza.

Aproveitamento de Filés Wooden Breast para a elaboração de um produto tipo de frango salgado cozido com a aplicação de enzima alcalase. / Iolanda Cristina Cereza Zago. - Londrina, 2020.
94 f.

Orientador: Adriana Lourenço Soares Russo.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Textura - Tese. 2. Colágeno - Tese. 3. Hidrólise proteica - Tese. 4. Cor - Tese.
I. Russo, Adriana Lourenço Soares . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641.1

IOLANDA CRISTINA CEREZA ZAGO

**APROVEITAMENTO DE FILÉS *WOODEN BREAST*
PARA ELABORAÇÃO DE UM PRODUTO TIPO PEITO DE
FRANGO SALGADO COZIDO COM APLICAÇÃO DE
ENZIMA ALCALASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dr^a. Adriana Lourenço
Soares Russo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Marta de Toledo Benassi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Londrina, 15 de junho de 2020.

A Deus que me deu condições e forças para concluir este sonho.

Aos meus pais Sonia e Heitor, pelo suporte e amor incondicional que me acompanham por toda a vida.

A minha irmã Mariana, pelo incentivo e por estar sempre ao meu lado.

A vocês dedico!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Adriana Lourenço Soares Russo por todos ensinamentos, orientação, companheirismo e ajuda tanto no meu desenvolvimento profissional quanto pessoal.

A todos os mestres que passaram pela minha vida e me auxiliaram na construção de meus conhecimentos. Em especial, aos que pertencem ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, onde pude desenvolver todo o projeto de mestrado.

Aos colegas de mestrado e doutorado, especialmente a Caroline Zanon, Andressa Oliveira, Fernanda Mendonça, Juliana Morilha, Nathália Hata, Bianca Garcia, Luma Oliveira, Daniele Savoldi, Bárbara Vicenzi, Ana Clara Pavanello, Denis Marchi, Bruna Yoshida. E a todos os demais colegas e amigos pelo incentivo e apoio que recebido.

A concessão da bolsa recebida Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Universidade Estadual de Londrina, Universidade Tecnológica Federal do Paraná- Campus Londrina.

Aos demais professores e aos técnicos de laboratórios pelo ensinamento e apoio.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.” **Cora Coralina**

ZAGO, I. C. C. **Aproveitamento de filés *wooden breast* para elaboração de um produto tipo peito de frango salgado cozido com aplicação de enzima alcalase.** 2020. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A seleção genética das aves proporcionou um aumento da taxa de crescimento e rendimento de carcaça, principalmente do filé, simultaneamente surgiram miopatias que levam a modificações histológicas e bioquímicas do músculo, dentre estas destaca-se o *Wooden breast*. O filé *Wooden breast* apresenta cor acastanhada na superfície do músculo acompanhada de endurecimento dos filés, com aparência rígida e textura extremamente dura, no entanto, a origem desta miopatia ainda não foi totalmente esclarecida. Filés *Wooden breast* apresentam propriedades funcionais e sensoriais comprometidas ocasionando diminuição na qualidade e baixa aceitação, acarretando em perdas econômicas a indústria avícola. As proteases, como a alcalase, hidrolisam as proteínas da carne aumentando suas funcionalidades e proporcionando amaciamento, mostrando-se como uma alternativa viável para aplicação na tentativa de melhorar o valor agregado destes filés. Assim, este estudo teve como objetivo, avaliar a utilização de enzima alcalase em filés de frango com miopatia *Wooden breast* para elaboração de um novo produto tipo peito salgado cozido. Os filés *Wooden breast* (WB), coletados de uma linha comercial de abate foram divididos em dois grupos, originando dois produtos: Peito de Frango Salgado Cozido tratado enzimaticamente (*Wooden breast* com alcalase) e Peito de Frango Salgado Cozido Controle (*Wooden breast* sem alcalase). Os filés foram adicionados de 20% de salmoura (89% de água, 2% de tripolifosfato de sódio, 8% de NaCl, 0,5% de glutamato monossódico e 0,5% de eritorbato de sódio), imersos em solução aquosa com ou sem adição da enzima alcalase, aquecidos a 55°C por 15 min, em seguida a temperatura foi elevada para 85°C até completa cocção (temperatura interna dos filés 75°C). O tratamento com a enzima não promoveu alterações na cor, composição química e capacidade de retenção de água. Os filés *Wooden breast* com alcalase apresentaram menores valores de pH, de colágeno total e solúvel, da razão colágeno/proteína, da força de cisalhamento que filés *Wooden breast* sem alcalase. Ainda, os filés tratados com a alcalase tiveram valores de oxidação lipídica e da alteração total de cor menores quando comparados com os filés *Wooden breast* sem alcalase em 2 dias de armazenamento a -18°C. Conclui-se que a aplicação da alcalase em filés *Wooden Breast* na elaboração de um produto salgado e cozido é viável e melhorando a textura, minimizando os prejuízos causadas por esta miopatia.

Palavras-chave: textura; colágeno; hidrólise proteica; cor.

ZAGO, I. C. C. **Use of wooden breast filets for the preparation of a product type of salted chicken cooked broiler fillets with application of alcalase enzyme.** 2020. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The genetic selection of the poultry provided an increase in the growth rate and carcass yield, mainly of the fillet, simultaneously myopathies that led to histological and biochemical changes of the muscle appeared, among which the Wooden breast stands out. The Wooden breast fillet has a brownish color on the muscle surface followed by hardening of the fillets, with a rigid appearance and extremely hard texture, however, the origin of this myopathy has not been fully clarified. Wooden breast fillets have compromised functional and sensory properties, causing a decrease in quality and low acceptance, promoting economic losses for the poultry industry. Proteases, such as alcalase, hydrolyze meat proteins increasing their functionality and providing tenderization, showing themselves as a viable alternative for application in an attempt to improve the added value of these fillets. Thus, this study aimed to evaluate the use of alcalase enzyme in chicken fillets with Wooden breast myopathy for the production of a new cooked salty breast product. The Wooden breast (WB) fillets, collected from a commercial slaughter line, were divided into two groups, giving rise to two products: Enzyme-treated Cooked Salted Chicken Breast (Wooden breast with alcalase) and Control Cooked Salted Chicken Breast (Wooden breast without alcalase). The fillets were added with 20% brine (89% water, 2% sodium tripolyphosphate, 8% NaCl, 0.5% monosodium glutamate and 0.5% sodium erythorbate), immersed in aqueous solution with or without the addition of the alcalase enzyme, heated to 55°C for 15 min then the temperature was raised to 85 ° C until complete cooking (internal temperature of the fillets 75 ° C). The treatment with the enzyme did not promote changes in color, chemical composition and water retention capacity. Wooden breast fillets with alcalase showed lower pH values, total and soluble collagen, collagen / protein ratio, shear strength than Wooden breast fillets without alcalase. Also, fillets treated with alcalase had lower lipid oxidation and color change values when compared to Wooden breast fillets without alcalase in 2 days of storage at -18°C. It is concluded that the application of alcalase in Wooden breast fillets in the preparation of a salted and cooked product, minimizing the damage caused by this myopathy.

Keywords: texture; collagen; protein hydrolysis; color.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Estrutura do músculo esquelético.....	15
Figura 2	– Estrutura hierárquica do músculo	16
Figura 3	– Processo de formação, organização e estrutura do colágeno.....	19
Figura 4	– Fotografias de filés peitos de peitos de frango: (1) Normal; (2) <i>Wooden breast</i> (A protuberância “tipo crista” pode ser vista onde há indicação pela seta).....	22
Figura 5	– Peitos de frango: (1) Grau WB0; (2) Grau WB1 (localização focal indicada pelas pontas de setas) e presença de <i>White Striping</i> (é apontada pelas setas e segue orientação da fibra muscular). (3) Grau WB1 com manifestação difusa e presença de WS de largura variável (indicada por uma ponta de seta).....	23
Figura 6	– Análise histológica das amostras representativas de <i>Pectoralis major</i> acometidas com <i>Wooden breast</i> . (a): Não <i>Wooden breast</i> (WB). (b): WB moderado. (c): WB severo. Sendo m: tecido muscular; a: tecido adiposo; f: fibrose; n: necrose	24
Figura 7	– Fluxograma dos procedimentos metodológicos para a elaboração do produto peito de frango tipo salgado cozido e tratamentos.....	32
 ARTIGO		
Figura 1	– Diferença total de cor (ΔE) do Peito de Frango Salgado Cozido tratado enzimaticamente (<i>Wooden breast</i> com alcalase) e Peito de Frango Salgado Cozido Controle (<i>Wooden breast</i> sem alcalase), durante o armazenamento por 15, 30 e 45 dias a -18°C	65

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Parâmetros de pH, cor (L^* , a^* , b^*), capacidade de retenção de água e força de cisalhamento dos produtos Peito de Frango Salgado Cozido tratado enzimaticamente (*Wooden breast* com alcalase) e Peito de Frango Salgado Cozido Controle (*Wooden breast* sem alcalase) 62
- Tabela 2** – Composição química aproximada dos produtos Peito de Frango Salgado Cozido tratado enzimaticamente (*Wooden breast* com alcalase) e Peito de Frango Salgado Cozido Controle (*Wooden breast* sem alcalase)..... 63
- Tabela 3** – Acompanhamento da oxidação lipídica do Peito de Frango Salgado Cozido tratado enzimaticamente (*Wooden breast* com alcalase) e Peito de Frango Salgado Cozido Controle (*Wooden breast* sem alcalase), durante o armazenamento por 2, 15, 30 e 45 dias a -18°C 64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1	PRODUÇÃO AVÍCOLA	13
3.2	ESTRUTURA MUSCULAR	14
3.3	COLÁGENO.....	18
3.5	PROTEASES	26
3.6	SALMOURA.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	MATERIAL	30
4.2	ELABORAÇÃO DO PRODUTO PEITO DE FRANGO TIPO SALGADO COZIDO E TRATAMENTOS	31
4.3	DETERMINAÇÃO DE PH.....	32
4.4	MEDIDA DE COR	32
4.5	MEDIDA DE CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA (CRA).....	33
4.6	FORÇA DE CISALHAMENTO	33
4.7	COMPOSIÇÃO QUÍMICA APROXIMADA.....	33
4.8	TEOR DE COLÁGENO TOTAL (TC) E COLÁGENO SOLÚVEL (SC).....	33
4.9	ANÁLISE DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	34
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
	REFERÊNCIAS	36
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6.1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	43
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67

ANEXO	68
Anexo A.....	68
Anexo B – Instruções aos autores – Poultry Science.....	69

1 INTRODUÇÃO

No Brasil é abundante a produção de milho e soja, grãos que são a base da alimentação avícola. Existem aproximadamente 150 mil famílias de pequenos produtores na base da produção destas aves. As regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste apresentam a maior concentração da avicultura, os frigoríficos nacionais preparam os mais variados cortes e exportam para mercados muito exigentes. A carne de frango é consumida mundialmente e em mais de 150 países há a presença da carne de frango brasileira (FERREIRA; VIEIRA FILHO, 2019).

Em 2017, o Brasil produziu aproximadamente 13,5 milhões de toneladas de carne de frango, liderando a exportação mundial e arrecadando US\$ 7,2 bilhões. O estado do Paraná tem maior atuação neste ramo, seguido dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (FERREIRA; VIEIRA FILHO, 2019).

A expansão da demanda por carne de frango nos últimos anos é potencializada por sua alta qualidade nutricional, baixo custo econômico e o fácil preparo (PETRACCI et al., 2015). Cabe ressaltar que, as características da carne de frango são altamente herdáveis, sugerindo a seleção como a melhor ferramenta para o aprimoramento da qualidade do produto. A seleção genética das aves proporcionou um aumento da taxa de crescimento e rendimento de carcaça, no entanto, simultaneamente surgiram modificações histológicas e bioquímicas do músculo que levaram a diferentes tipos de miopatias (MUDALAL et al., 2015).

Wooden breast é uma das miopatias que tem preocupado as indústrias da carne de frango. Segundo Sihvo, Immonen e Puolanne (2013), a maioria dos filés com *Wooden breast* analisados apresentaram endurecimento, palidez, presença de um material turvo levemente viscoso em sua superfície e hemorragias pontuais, afetando diretamente a aparência visual do filé.

O consumidor avalia a qualidade do produto pela aparência, sendo assim, qualquer alteração nas características do produto tende a afetar a intenção de compra e interferir na comercialização *in natura*, gerando perdas econômicas elevadas (KUTTAPPAN et al., 2012).

Trabalhos envolvendo o efeito de enzimas proteolíticas na carne de frango ainda são escassos, conseqüentemente a divulgação científica é limitada. É de extrema relevância o desenvolvimento de estudos aprofundados sobre a aplicação enzimática no desenvolvimento de novas tecnologias, tanto em cortes nobres quanto

em resíduos dos processos industriais, para diminuir os prejuízos econômicos e para obtenção de produtos com maior valor agregado (SCHMIDT;SALAS-MELLADO, 2009).

Nesta perspectiva, o presente trabalho buscou avaliar a utilização da enzima protease em filés de frango com miopatia *Wooden breast* para elaboração de um produto do tipo peito salgado cozido, afim de melhorar o aproveitamento deste filé, agregando maior valor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a utilização da enzima protease alcalase em filés de frango com miopatia *Wooden breast* para elaboração de um produto tipo peito de frango salgado cozido.

2.2 Objetivos específicos

Desenvolver um novo produto de frango tipo peito salgado e cozido elaborado com filés *Wooden breast*.

Avaliar a composição centesimal e conteúdo de colágeno total e solúvel do peito *Wooden breast* salgado e cozido tratado com enzima protease (*Wooden breast* com alcalase) e compará-lo com filés de frango *Wooden breast* salgado e cozido sem tratamento enzimático (*Wooden breast* sem alcalase).

Investigar a força de cisalhamento do produto salgado e cozido tratado com enzima protease (*Wooden breast* com alcalase) e compará-lo com o produto salgado e cozido sem tratamento enzimático (*Wooden breast* sem alcalase).

Avaliar a capacidade de retenção de água, a oxidação lipídica e a composição química aproximada do peito *Wooden breast* salgado e cozido tratado com enzima protease (*Wooden breast* com alcalase), frente a filés de frango *Wooden breast* salgado e cozido sem tratamento enzimático (*Wooden breast* sem alcalase).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção avícola

O número de aves domésticas quintuplicou nos últimos 50 anos em todo o mundo (FAOSTAT, 2016). Carnes de aves e ovos destacam-se como os alimentos de origem animal mais consumidos, emergindo como o subsetor mais eficiente para suprir a crescente demanda global por proteínas (MOTETT; TEMPIO, 2017).

Fatores como preço relativamente baixo, teor proteico satisfatório e ausência de conflito religioso no consumo, são os principais responsáveis pelo aumento na demanda do consumo frente à carne bovina e suína (KUTTAPPAN, 2012).

Estima-se que entre os anos de 2005-2050, a demanda por carne de aves aumente cerca de 121%, e a demanda por ovos cresça cerca de 65%, caracterizando esse subsetor agrícola como o de maior crescimento global (MONETT; TEMPIO, 2017). A carne de frango é amplamente consumida na América e na Europa Ocidental, contudo, o mercado Asiático apresenta grande potencial de expansão nos próximos anos, estima-se que as importações para esta região serão responsáveis por cerca de 66% do aumento pela demanda de carne de aves até 2025 (MONETT; TEMPIO, 2017; FERREIRA; VIEIRA FILHO, 2019).

A carne de frango brasileira é comercializada em aproximadamente 150 países, sendo as regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste encarregadas pela maior atividade avícola, os frigoríficos nacionais preparam os mais variados cortes e exportam para mercados muito exigentes (FERREIRA; VIEIRA FILHO, 2019).

De acordo com o Sindicato de Produtos Avícolas do Estado do Paraná (SINDIAVIPAR), o Brasil exportou em 2017, aproximadamente 4,3 bilhões de toneladas de carne de frango, liderando a exportação mundial e arrecadando US\$ 7,2 bilhões. O estado do Paraná tem maior atuação neste ramo, seguido dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (SINDIAVIPAR, 2018).

Confirmando as estimativas, em 2019 o estado do Paraná registrou um aumento de 55,8% nos embarques de carne de frango para a China, frente ao mesmo período de 2018 (SINDIAVIPAR, 2019). Sendo assim, os embarques do Paraná para a China passaram a representar metade das exportações avícolas do Brasil para o país asiático.

O aumento da exportação reflete diretamente em medidas rigorosas de

segurança alimentar, desta forma, a integração dos mercados pode ser traduzida em inúmeras normas e regulamentos. No intuito de potencializar a produção e mitigar os prejuízos/riscos aos consumidores, surge o conceito de *One Health*, o qual integra diversos aspectos da saúde humana e animal, tal como a diminuição da sensibilidade aos antibióticos, sendo extensivamente discutido nos últimos anos, a fim de contribuir positivamente com a saúde humana e reduzir os impactos negativos a saúde animal (FAO-AGAL, 2016).

A produção de carne de frango destaca-se neste contexto em decorrência do emprego de substâncias antimicrobianas na ração dos animais, os quais são responsáveis por matar parte do microbioma gastrointestinal das aves, melhorando o ganho de peso. No entanto, estudos apontam que o uso de antibióticos na produção de proteína animal favorece o avanço da pressão seletiva na promoção de linhagens resistentes, tornando os animais, reservatórios de bactérias resistentes a antibióticos, as quais podem ser transferidas para humanos, promovendo infecções graves, de controle dificultado e com altos índices de morbidade e mortalidade (SOUZA et al, 2020).

A segurança alimentar é uma questão de saúde pública, altamente dinâmica, que atua coletivamente com o objetivo de diminuir os riscos de doenças a nível regional e global, para tal, são considerados aspectos como: contaminação microbiológica, utilização de produtos químicos e outras substâncias prejudiciais à saúde, alterações de aspectos visuais da carcaça, da carne e de órgãos internos, miopatias, temperatura de armazenamento e cozimento (MONETT; TEMPIO, 2017). Além disso, o cumprimento de tais regulamentações propicia melhora na saúde e bem-estar humano, animal e ambiental, vislumbrando avanços econômicos no setor, com o alcance de novos mercados.

Ademais, a aparência, textura, suculência, odor e sabor são as mais importantes características da carne que influenciam o julgamento final da qualidade pelos consumidores, antes e depois compra do produto. O consumidor atua também como fiscal da qualidade dos produtos ofertados, identificando com facilidade eventuais miopatias, decorrentes de modificações histológicas e bioquímicas, as quais não afetam apenas a aparência do produto, mas também a intenção de compra, gerando prejuízos econômicos (MUDALAL et al., 2015).

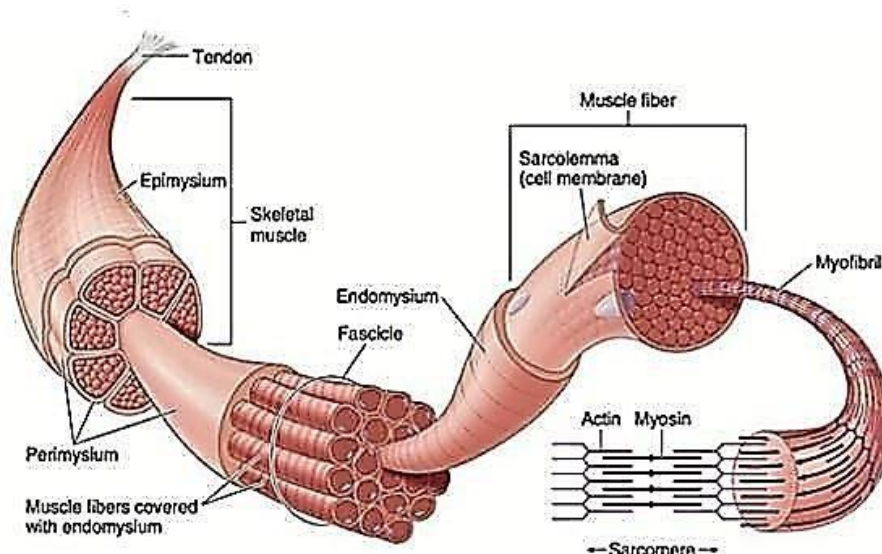
3.2 Estrutura Muscular

Para compreender as alterações histológicas da carne, é primordial conhecer as propriedades e proporções dos tecidos que a compõe e que estão associados a maciez e qualidade. Estes tecidos são basicamente: muscular, nervoso, epitelial e conectivo (GUIMARÃES; ADELL, 1995). A composição da carne varia de acordo com a espécie do animal, sexo, raça, *status* nutricional, idade e nível de atividade, além destes fatores, em um único animal pode ter alterações de acordo com a área anatômica do corte, forma de cocção e armazenamento (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A organização do músculo esquelético acontece de modo hierárquico de acordo com apresentada na Figura 1. O primeiro tecido conjuntivo é o epimísio, que envolve todo o músculo, o segundo é o perimísio, que contém os nervos e vasos sanguíneos e envolve o feixe de fibras ou fascículos. A partir deste, é formado o endomísio, uma rede fina de tecido conjuntivo que envolve cada fibra individualmente (LAWRIE, 2005).

A fibra muscular, unidade básica do músculo, é uma célula cilíndrica, multinucleada, coberta por uma membrana externa denominada sarcolema e possuium citoplasma, cujo nome específico é sarcoplasma. Este é constituído por mitocôndria, enzimas, glicogênio, adenosina trifosfato (ATP), creatinae mioglobina. As fibras podem atingir o comprimento de 34 cm, embora tenham somente 10 a 100 µm de diâmetro (LAWRIE, 2005) e são associadas em feixes (ESKIN & SHAHIDI, 2015).

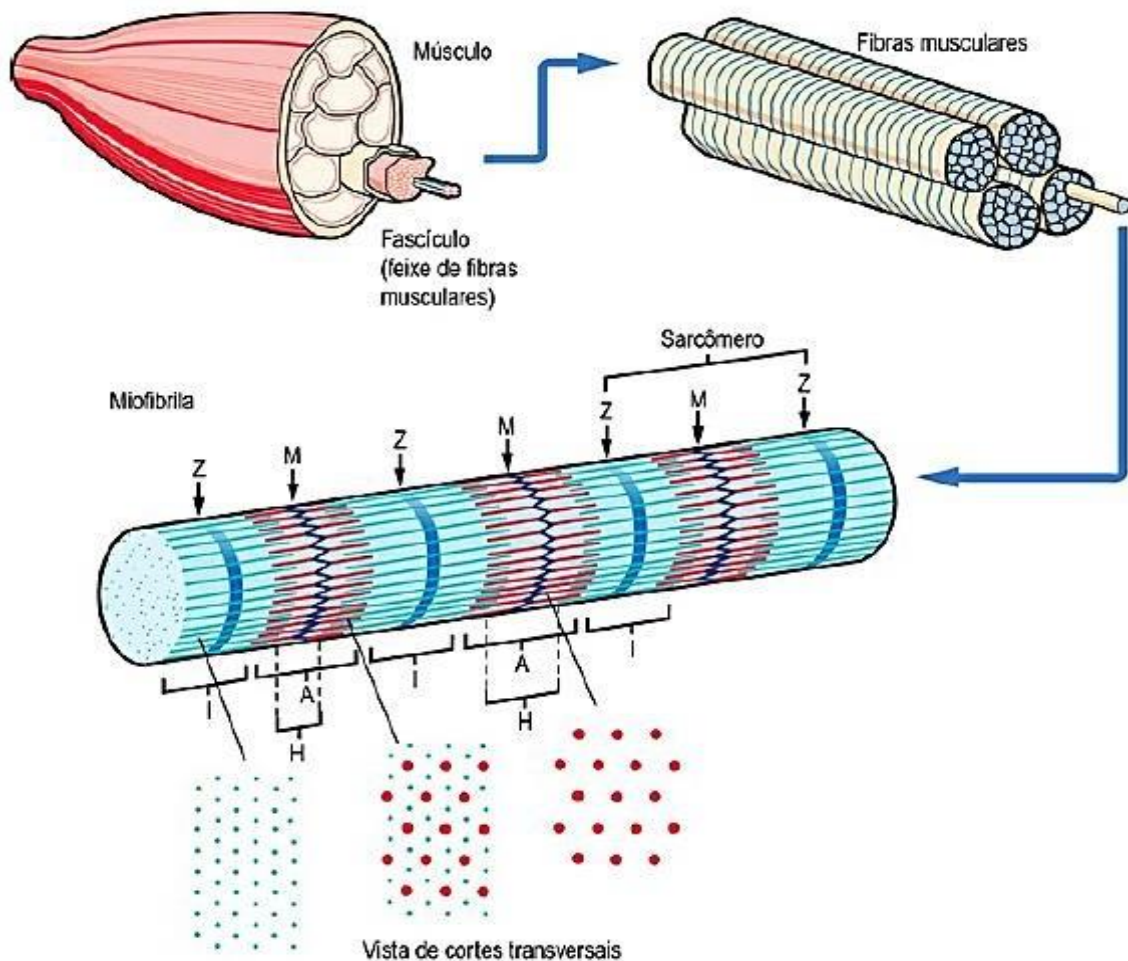
Figura 1. Estrutura do músculo esquelético.



Fonte: AGUR; DALLEY, 1995.

As miofibrilas são compostas por proteínas miofilamentosas, principalmente, miosina e actina e que formam o sarcômero. Além disso, é possível observar uma repetição de regiões de cores escuras e claras nestas miofibrilas, conforme esquematizado na Figura 2. Essas regiões são denominadas de bandas A e I, respectivamente. Na banda A, existe uma zona H juntamente com uma linha M que fica em seu centro, já no centro da banda I, há uma linha Z que delimita o sarcômero. O sarcômero tem no seu centro a linha M e se estende de uma linha Z até a próxima linha Z (BAYNES, DOMINICZAK, 2000). A banda I é composta pelos filamentos finos, estes são constituídos basicamente por três proteínas (actina, tropomiosina e troponina), e são sensíveis aos íons Ca^{2+} , participando assim do processo de contração muscular. Os filamentos grossos que constituem a banda A são feixes de moléculas que possuem alto peso molecular, a miosina, que contém um sítio que se liga ao ATP que é responsável pela sua hidrólise e um sítio de ligação com a actina (COSTANZO, 2014).

Figura 2. Estrutura hierárquica do músculo.



Fonte: BAYNES *et al*, 2000

No entanto, alterações na rigidez e elasticidade do músculo são factíveis de acontecer ao longo do processamento da carne, afetando diretamente a qualidade do produto. Durante a sangria, em decorrência da glicólise anaeróbica, há uma diminuição acentuada do glicogênio e um aumento no acúmulo de ácido láctico, resultando em pH baixos. Em razão, da redução deste potencial hidrogeniônico da carne, as enzimas que produzem ATP são inativadas, podendo promover a formação do complexo actomiosina, o qual é responsável pela contração muscular irreversível, rigidez e perda de elasticidade, tal fenômeno é denominado de *rigor mortis* (ESKIN; SHAHIDI, 2015; RAMOS; GOMIDE, 2017).

O *rigor mortis* interfere diretamente nas características de consumo da carne de frango, como suculência, rigidez e sabor. Tais alterações físico-químicas são atribuídas a glicólise *postmortem*, a temperatura e ao pH, determinando a qualidade da carne ao longo da conversão do músculo em carne (MIR *et al*, 2017).

A alimentação do animal, bem como as variações genéticas das aves contribuem de forma distinta no desenvolvimento do *rigor mortis*. Cabe ressaltar que, as características da carne de frango são altamente herdáveis, sugerindo a seleção como a melhor ferramenta para o aprimoramento da qualidade do produto (MIR *et al*, 2017).

Além disso, fatores como maturidade dos tecidos conjuntivos, o estado contrátil das proteínas miofibrilares, juntamente com o estresse ambiental, as altas temperaturas, a idade das aves, a taxa de desenvolvimento, o tempo de refrigeração e a filetagem, afetam a maciez e a qualidade da carne das aves (MIR *et al*, 2017).

O desenvolvimento do *rigor mortis* interfere também no estado das proteínas miofibrilares. As proteínas do músculo podem ser classificadas de um modo geral, em proteínas sarcoplasmáticas que são solúveis em água ou soluções salinas diluídas, proteínas miofibrilares (solúveis em soluções salinas concentradas) e também em proteínas do tecido conjuntivo (proteínas insolúveis em soluções salinas concentradas, pelo menos em baixas temperaturas) (LAWRIE, 2005).

As proteínas mais abundantes são as miofibrilares, pois constituem de 65 a 75% do total das proteínas musculares. Do total destas proteínas, a miosina e actina correspondem a percentuais de 50-58% e 15-20%, respectivamente (LAWRIE, 2005; ZHANG *et al*, 2020). As proteínas sarcoplasmáticas constituem cerca de 30 a 35% do total das

proteínas e são solúveis em água ou em tampões de pouca força iônica (igual ou menor do que 0,1 em pH neutro). Dois principais tipos de proteínas pertencem a este grupo e são: substâncias que influenciam na cor da carne, como a mioglobina e hemoglobina, e as enzimas (ORDÓÑEZ et al., 2005; TASONIERO et al, 2019).

As proteínas insolúveis são as fibras extracelulares de colágeno que, fazem parte do tecido conectivo típico que recobre os feixes musculares e as fibras. A quantidade dessas fibras aumenta com a idade das aves, portanto, a carne dura é encontrada em aves mais velhas (ORDÓÑEZ et al., 2005).

3.3 Colágeno

O colágeno representa uma família de 27 proteínas isoformas, encontradas no tecido conjuntivo. Por ser o composto mais abundante neste tecido, o colágeno consiste em um elemento estrutural de grande importância (SILVA; PENNA, 2012).

Colágeno é o nome dado a uma proteína fibrosa que é encontrada em todo o reino animal, contém cadeias polipeptídicas dos aminoácidos: glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina. A organização dessas cadeias é formada paralelamente a um eixo, organizando-se assim em fibras de colágeno, que tem capacidade para proporcionar elasticidade e resistência a fibra presente. (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; SILVA; PENNA, 2012).

Proteínas colagenosas formam agregados supramoleculares (filamentos ou fibras, fibrilas), que podem formar sozinhas ou em conjunto, outras matrizes extracelulares ou ajudar a fixar células na matriz. O colágeno é quimicamente inerte e possui propriedades mecânicas singulares (WOLF; SOBRAL; TELIS, 2009).

A molécula de colágeno tem massa molecular de 300.000 Da e 280 nm de comprimento, é estabilizada por pontes de hidrogênio e por ligações intermoleculares. A sequência de aminoácidos, no colágeno, é em geral uma unidade tripeptídica, glicina-X-hidroxiprolina ou glicina-X-prolina onde o X pode ser qualquer um dos 20 aminoácidos padrão. Uma molécula de colágeno pode ter até três cadeias diferentes, que se unem na formação do pro-colágeno (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

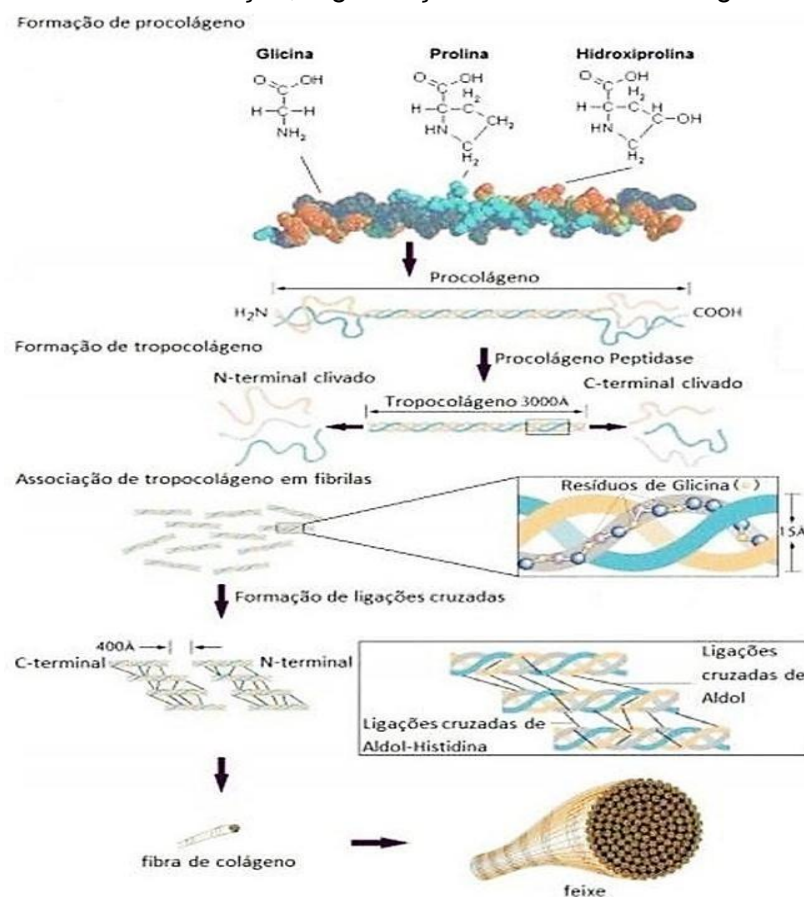
Para que o colágeno seja quantificado, ele tem que ser extraído da carne. Esta

quantificação é obtida pela solubilização em solução aquosa e longo aquecimento. Logo após a solubilização, este é hidrolisado para que haja a liberação da hidroxiprolina, que pode ser quantificada em sua forma livre por espectrofotometria (RAMOS; GOMIDE, 2012).

Na proteína de colágeno a hidroxiprolina é encontrada em elevadas concentrações (em média 13%), já em outras proteínas é encontrada em quantidades muito pequenas (elastina contém cerca de 1% de hidroxiprolina). Isto faz com que a hidroxiprolina seja um marcador ideal de colágeno (RAMOS; GOMIDE, 2012).

A formação e organização do colágeno é apresentada na Figura 3, tal formação acontece durante o desenvolvimento do tecido embrionário e do preparo da regeneração do músculo. As moléculas de colágeno são secretadas por meio dos fibroblastos na forma de pro-colágeno solúvel, que possui em sua lateral duas estruturas globulares contendo terminais de carbono (C-) e nitrogênio (N-) (CANTY; KADLER, 2005).

Figura 3. Processo de formação, organização e estrutura do colágeno.



Fonte: Adaptado de Damodaran; Parkin; Fennema (2010).

O pro-colágeno é formado dentro do aparelho de Golgi e secretado dentro das vesículas, na sequência é secretado para a matriz extracelular. Nesta matriz, acontece a ação das C- e N-peptidases, para clivar duas estruturas globulares que são ligadas as extremidades do pro-colágeno. Para que a produção do colágeno se inicie, é necessário a ação dessas duas enzimas, pois as estruturas globulares que são quebradas pela atividade enzimática ocupam grande espaço em torno da molécula. O processo de clivagem é necessário para que seja formado o tropocolágeno, que se une com outras moléculas de tropocolágeno formando as fibrilas (SILVA; PENNA, 2012). Estes tropocolágenos se unem na forma de conformação torsa por meio de associações lado a lado, estabilizadas pelas interações eletrostáticas e hidrofóbicas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Nas formações das ligações cruzadas covalentes intermoleculares entre as cadeias existe a presença das ligações peptídicas, resultando da interação entre grupos aminos livres e grupos aldeídos. As ligações cruzadas sedem a força tensora necessária e a estabilidade à estrutura supramuscular (Figura 3). Para que aconteça o início das ligações das cadeias do tropocolágeno, existem quatro resíduos chaves envolvidos: dois resíduos de lisina ou hidroxilisina de peptídeos, contendo o C-terminal e dois resíduos de lisina ou hidroxilisina de peptídeos, contendo o N-terminal. O tropocolágeno tem o arranjo cabeça-cauda- torso que permite a interação entre os peptídeos contendo peptídeos adjacentes com o C-terminal e o N-terminal (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

O percurso dessa estrutura dá-se no sentido oposto ao enrolamento das hélices peptídicas individuais. Por conta disso, o enrolamento das múltiplas cadeias peptídicas é o mais apertado possível. O enrolamento da tripla hélice fornece uma resistência ao estriamento. O colágeno então apresenta uma resistência mecânica que é aumentada por este enrolamento (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Pela hidroxilação da prolina e da lisina são formados os aminoácidos hidroxiprolina e hidroxilisina, respectivamente que se inicia nos ribossomos durante a tradução do mRNA em colágeno. Após a formação da estrutura linear é concluído o processo de hidroxilação (NEKLYUDOV, 2003).

Agregados de moléculas de colágeno ao longo de um eixo paralelo formam as fibrilas, mas suas extremidades são igualmente sobrepostas para produzir bandas de 70 nm. A junção das fibrilas forma a molécula de colágeno, que é organizada por

feixes.

Devido à grande concentração de aminoácidos hidrofóbicos, tanto no interior da proteína, quanto na superfície, a molécula de colágeno é hidrofóbica. O núcleo hidrofóbico contribui pouco para a estabilidade estrutural da molécula, enquanto as ligações covalentes possuem grande importância na estabilidade (LEHNINGER, 2001).

Os colágenos são denominados por algarismos romanos que vão do tipo I ao XXVIII. Na família dos colágenos estriados, estão os tipos I, III e V. O colágeno do tipo I está associado ao epimísio e os tipos I, III e em parte o tipo V, estão relacionados ao perimísio (RICARD-BLUM, 2011).

Uma cadeia de polipeptídios comum, no colágeno tipo I, existe aproximadamente 1000 resíduos de aminoácidos, com sequência repetida pela cadeia de (Gly-X-Y). O resíduo Y é hidroxiprolina ou hidroxilisina e o resíduo X quase sempre é prolina (PEARSON et al 1985; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Outros aminoácidos são gerados pela hidroxilação pós - translacional de prolina e lisina pela prolil hidroxilase e pela lisil hidroxilase, respectivamente (BAILEY, 1989). De um modo geral, a molécula de colágeno contém em torno de 33% de glicina, 12% de prolina, 11% de alanina, 10% de hidroxiprolina, 1% de hidroxilisina e baixas quantidades de aminoácidos polares e carregados (STRASBURG et al, 2010).

3.4 *Wooden breast* em Frangos

A indústria avícola tem enfrentado nos últimos anos a incidência recorrente de uma anomalia muscular denominada como *Wooden breast (WB)*, com elevados percentuais em filés de peito (TIJARE et al., 2016).

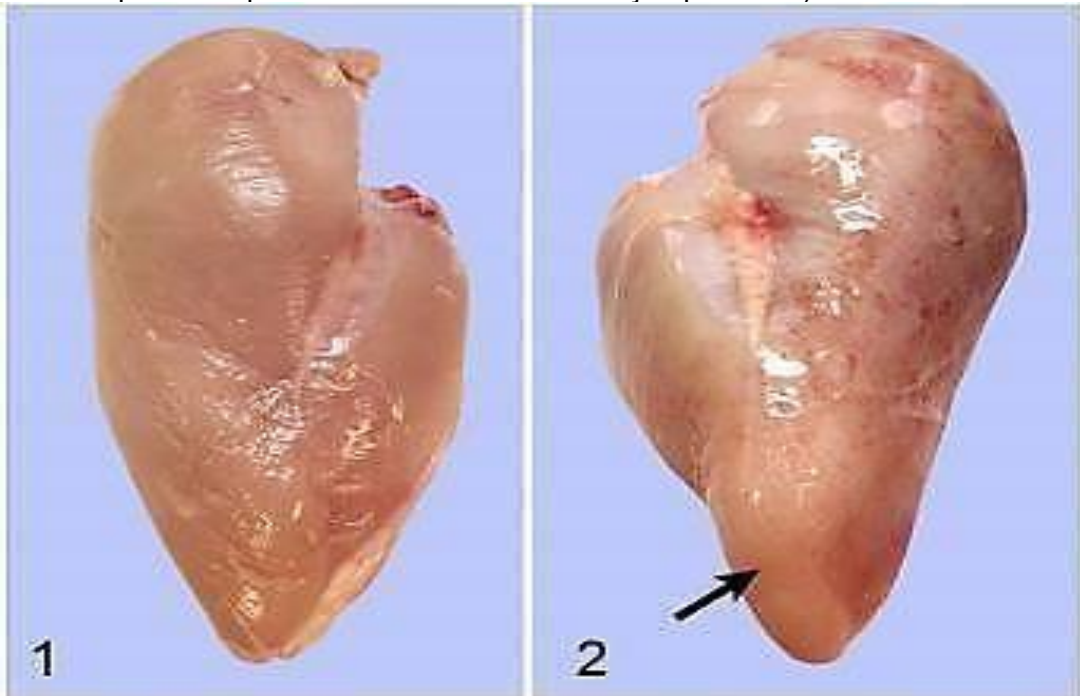
Esta anomalia afeta o músculo *Pectoralis major*, promovendo alterações macroscópicas, como alta rigidez palpável, que pode ser identificada por palpação do músculo do peito de aves vivas que tenham a partir de 3 semanas de idade (MUTRYN et al., 2015), além de promover a palidez, abaulamento de áreas duras e acúmulo de um fluido viscoso sob o músculo, amarelado e translucido observadas após o abate (SIHVO et al., 2014) (Figura 4).

Ademais, em alguns casos o músculo afetado pelo *Wooden breast* vem acompanhado de estrias brancas (SIHVO et al., 2014), podendo apresentar fragmentação das fibras musculares, inchaço da miofibrila, hialinização, infiltração de

macrófagos, presença de manchas irregulares de tecido adiposo, fibra muscular necrótica e substituição do tecido muscular por tecido fibrótico e adiposo (BAILEY, 2015; RADAELLI et al., 2017).

Estas características implicam tanto na qualidade dos produtos frescos, quanto dos produtos processados (DALGAARD et al, 2018). A miopatia em estudo, foi relatada pela primeira vez por Sihvo et al. (2014), o qual atribuiu a esta, perdas econômicas notáveis e prejuízo no bem estar das aves. Acredita-se que o crescimento acelerado das aves esteja relacionado com incidência deste problema (SIHVO et al, 2014).

Figura 4. Fotografias de filés peitos de peitos de frango: (1) Normal; (2) *Wooden breast* (A protuberância “tipo crista” pode ser vista onde há indicação pela seta).



Fonte: Sihvo et al. (2014)

Trocino et al. (2015), analisaram os fatores que podem influenciar o desenvolvimento desta anomalia dos frangos de corte desde o nascimento até o abate, tais como gênero, regime alimentar e genótipo. Machos apresentaram maior peso vivo final (3.492 vs. 2.845 g) e conversão alimentar menor (1,54 vs. 1,63) do que as fêmeas ($P < 0,001$), respectivamente. A Restrição alimentar diminuiu o peso vivo final (3.194 vs. 3.142 g; $P < 0,01$) e conversão alimentar (1,60 vs. 1,57; $P < 0,01$) em comparação com a alimentação sem restrições. Gênero e restrição de alimento afetaram o desempenho, qualidade e anomalias mamárias. Foi observado que o gênero masculino, quando comparado com o feminino apresentou maior influência na incidência do *WB*, com percentuais de 16,3%, 8,0%, respectivamente.

Sihvo et al. (2016) avaliaram e classificaram os filés de peito de frango macroscopicamente por palpação da seguinte forma (Figura 5): grau *WB0*: músculo com consistência normal e macroscopicamente não afetado (1) e grau *WB1*: presença de *Wooden breast* com consistência endurecida (2 e 3), incluindo subcategorias *WB1mild*: consistência levemente endurecida e *WB1hard*: consistência endurecida.

Quanto a localização da miopatia *Wooden breast* pode ser classificada como focal (presença pontual na região cranial e caudal dos filés, cercada por músculo não afetado) ou como difusa (presença em toda a região do músculo), os músculos poderiam apresentar concomitantemente o *White Striping (WS)*, presença de estrias brancas. A manifestação focal foi mais comum na fase inicial, enquanto as aves que estavam mais perto da idade de abate apresentaram lesão grave e difusa. Também foi observado o aumento da incidência da anomalia *WB* com influência do tempo de abate nas idades de 10, 18, 24, 35 e 42 dias (SIHVO et al, 2016).

Figura 5. Peitos de frango: (1) Grau *WB0*; (2) Grau *WB1* (localização focal indicada pelas pontas de setas) e presença de *White Striping* (é apontada pelas setas e segue orientação da fibra muscular). (3) Grau *WB1* com manifestação difusa e presença de *WS* de largura variável (indicada por uma ponta de seta).



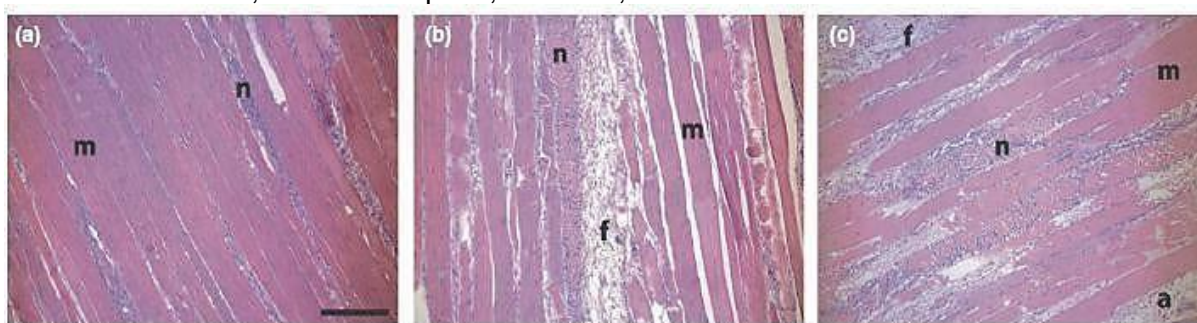
Fonte: Sihvo et al. (2016)

Embora estudos anteriores tenham relatado a ocorrência do *Wooden breast*, os métodos de identificação da ocorrência e severidade desta miopatia em filés de frango

foram desenvolvidos recentemente por Dalgaard *et al* (2018), os quais estabeleceram um método de classificação e identificação do grau de incidência da miopatia em filés baseado na medida de compressão, medindo-se a força máxima à compressão, o teor de umidade, a perda por gotejamento, a perda de cocção, e o pH intramuscular, que são características reconhecidas da qualidade da carne.

Considerando os resultados obtidos ao longo do estudo, a miopatia *Wooden Breast*, foi subdividida em três categorias: não *WB*, *WB* moderado e *WB* severo (DALGAARD *et al*, 2018). Para cada categoria foi realizado um teste de compressão, sendo que para a compressão de 10 mm houve a necessidade de uma força de 2,2 N, 6,1 N e 34,9 N, para os graus não *WB*, *WB* moderado e *WB* severo, respectivamente. Foi realizada análise histológica para amostras de filés de peito representativas de cada categoria *WB*, onde observou-se que os graus moderado e severo contiveram maior percentual de tecido adiposo ($2,4 \% \pm 0,5$; $3,0 \% \pm 0,3$), tecido fibrótico ($13,8 \% \pm 1,5$; $16,0 \pm 1,4$) e necrótico ($23,8 \% \pm 2,0$; $28,2 \% \pm 1,9$) e menor presença de tecido muscular ($60,0 \pm 2,5$; $53,1 \pm 1,4$) quando comparados com o músculo não afetado pelo *WB* que conteve percentuais de $1,7 \% \pm 0,3$ de tecido adiposo, $4,7 \% \pm 0,4$, de tecido fibrótico, $13,4 \% \pm 2,8$ de tecido necrótico e $80,3 \% \pm 2,8$ de tecido muscular. A Figura 6 apresenta imagens das análises histológicas das três categorias estudadas.

Figura 6. Análise histológica das amostras representativas de *Pectoralis major* acometidas com *Wooden breast*. (a): Não *Wooden breast* (*WB*). (b): *WB* moderado. (c): *WB* severo. Sendo m: tecido muscular; a: tecido adiposo; f: fibrose; n: necrose.



Fonte: Dalgaard *et al* (2018)

Aves de grande porte (maiores de 3,6 kg), são mais propensas a desenvolverem miopatias e anomalias da carne (LORENZI, 2014). Existe uma hipótese de que em aves selecionadas para a produção de carne, o crescimento do tecido conjuntivo do músculo não acompanha o crescimento da fibra muscular, levando assim aos danos musculares (MAZZONI *et al*, 2015).

Soglia et al (2018), estudaram os processos proteolíticos em filés acometidos com *WB* durante armazenamento por 7 dias à temperatura constante de 20 ± 1 °C, foram avaliados concentração de cálcio livre, atividade de calpaína e proteólise de filés *WB* e filés normais, considerando camadas superficiais e profundas dos músculos. Quando comparados com os filés normais, os filés *WB* tiveram maior concentração de cálcio livre a 168 horas *postmortem*, tanto na camada superficial ($96\mu\text{M} \pm 43$; $20\mu\text{M} \pm 7$) quando na camada profunda ($88\mu\text{M} \pm 29$; $53\mu\text{M} \pm 13$). A ocorrência do *WB* não teve efeito sobre a atividade da calpaínas. Foi verificada a falta de nebulina (proteína ligante de actina) nas camadas superficiais dos casos *WB* às 10 h *postmortem* e também o aumento de desmina (proteína do tecido muscular) tanto nas camadas superficiais, quanto profundas 10 h *postmortem*. Evidenciando que o aumento da dureza nos músculos afetados por *Wooden breast* pode não ser atribuído exclusivamente aos processos proteolíticos que ocorrem no período *postmortem*.

Em seu trabalho, Mazzoni et al (2015) observaram um decréscimo do teor de proteínas e minerais de carnes que possuíam a miopatia *WB* e um aumento simultâneo de umidade e lipídios, o que pode ser devido ao processo de degeneração das fibras musculares. Nesta miopatia, é provável que o ácido láctico produzido a partir da respiração anaeróbica não seja eficientemente removido, diminuindo o pH e causando danos ao músculo, degenerando as células adjacentes (VELLEMAN; CLARK, 2015; ZAMBONELLI et al, 2016). Graus severos de filés de peito acometidos com *Wooden breast* podem impactar negativamente na qualidade da carne, especialmente nos atributos de capacidade de retenção de água, perda de água por cozimento e absorção de sólidos e líquidos em filés de peitos marinados (TIJARE et al, 2016). A perda da capacidade de retenção de água pode ser atribuída a redução do teor de proteínas, sendo as proteínas miofibrilares as principais responsáveis pela retenção de água na carne (MAZZONI et al 2015).

Wooden breast causa um aumento da altura do filé devido à presença da protuberância tipo crista na extremidade caudal dos filés, como descrito por Sihvo, Immonen e Puolanne (2013). Redução da taxa de crescimento e alimentação de baixa energia são técnicas para controlar a ocorrência desta anomalia (KUTTAPPAN et al., 2012).

Segundo o predisposto no Artigo 175, do decreto 9.013/2017 pelo Presidente da República do Brasil (2017), sobre a inspeção *postmortem* de aves e lagomorfos, deve ser considerado que:

Art. 175. As carcaças de aves ou os órgãos que apresentem evidências de processo inflamatório ou lesões características de artrite, aerossaculite, coligranulomatose, dermatose, dermatite, celulite, pericardite, enterite, ooforite, hepatite, salpingite, síndrome ascítica, miopatias e discondroplasia tibial devem ser julgados de acordo com os seguintes critérios:

I - quando as lesões forem restritas a uma parte da carcaça ou somente a um órgão, apenas as áreas atingidas devem ser condenadas; ou

II - quando a lesão for extensa, múltipla ou houver evidência de caráter sistêmico, as carcaças e os órgãos devem ser condenados.

Parágrafo único. Para os estados anormais ou patológicos não previstos no caput a destinação será realizada a critério do SIF.

Portanto, devido as alterações tecnológicas e de aparência, filés com a miopatia *WB* tendem a ser encaminhados para produção de derivados e não são comercializados *in natura* (TROCINO et al., 2015; ZANETTI et al, 2018), causando prejuízos à indústria.

3.5 Proteases

A hidrólise proteica se trata da clivagem química ou enzimática de moléculas de proteínas em peptídeos de diversos tamanhos e, conseqüentemente, em aminoácidos (ADLER-NISSEN, 1985).

Em processos industriais, o uso de enzimas é de grande interesse, por conta da facilidade de obtenção (através da biotecnologia) e das vantagens em relação aos catalisadores químicos. A catálise enzimática tem como benefício a redução de custos de maquinário e de laboratório, visando a melhoria e/ou obtenção de produtos diferenciados na indústria (MUSSATTO et al, 2007). Segundo He *et al* (2013), a hidrólise enzimática apresenta vantagens quando comparada a hidrólise ácida e alcalina, tais como: produtos mais homogêneos com baixo teor de sal e menor amargor.

Proteases são enzimas utilizadas em várias atividades industriais, como o processamento de bebidas, alimentos, processamento de couro e pele, formulação de detergentes, de medicamentos e no amaciamento de carne. O uso dessas enzimas corresponde a 40% do mercado mundial de biocatalisadores (SOARES et al., 1999). Vegetais, animais e microrganismos (fungos e bactérias) são reconhecidos com as principais fontes de proteases (RODRIGUES et al, 2001). Algumas proteases apresentam especificidade de ligações peptídicas, das quais participam certos resíduos de aminoácidos e outros atuam mais amplamente.

As enzimas são classificadas de acordo com o mecanismo de ação, assim são denominadas de endo ou exopeptidases. As endopeptidases hidrolisam o interior da molécula da proteína, criando geralmente resíduos específicos e as exopeptidases hidrolisam as extremidades N terminais da proteína (YANG et al 2011). Quanto a natureza de seu sítio catalítico, existe outra classificação das proteases, dividindo-as em 4 grupos descritos a seguir.

O primeiro é representado pelo complexo Serina-proteases (alcalase, tripsina, quimotripsina e elastase), no qual, a seletividade é conferida pelo reconhecimento tanto do resíduo N-terminal como do C-terminal da ligação peptídica a ser hidrolisada (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

O segundo, por Cisteína-proteases, para o qual existem mais de 130 enzimas conhecidas presentes em microrganismos, plantas e animais. É predominante neste grupo as enzimas pertencentes a família da papaína, entre outras como ficina (proveniente do látex do figo), bromelina (presente no abacaxi). As enzimas desta classe têm atividade ótima em pH 6,0–7,5 e podem atuar em temperaturas de até 60–80°C (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

O terceiro grupo é representado pelas Metaloproteases. A maioria das metaloproteases de importância para a qualidade e processamento de alimentos é constituída de exoenzimas e requerem zinco como metal. As enzimas pertencentes a este grupo são: exoprotease carboxipeptidase; endoprotease termolisina e a endoprotease neutra de *Bacillus amyloliquefaciens* (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

O quarto e último grupo é constituído pelas proteases aspárticas, apresentando dois resíduos de proteases aspárticas altamente conservados como unidade catalítica, sendo que a maioria trabalha sob condições ácidas (pH 1–6) com pH ótimo próximo de 3–4. Pepsina, renina e catepsina fazem parte desta classe (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A hidrólise pelas proteases é influenciada pelo estado estrutural da proteína. Proteínas em estado nativo costumam ter hidrólise menos completa, quando comparada a proteínas parcialmente desnaturadas. As propriedades funcionais da proteína são alteradas quando acontece a hidrólise por proteases. Um exemplo de hidrólise não específica, extensiva, acontece com a papaína quando atua nas carnes, esta causa solubilização até mesmo de proteínas pouco solúveis. Os seus hidrolisados costumam ter peptídeos de baixo peso molecular, contendo ordem de dois a quatro resíduos de aminoácidos. A hidrólise extensiva causa prejuízo a várias propriedades

funcionais, como a formação de espuma, gelificação e emulsificação. Na maioria dos casos, por conta da estabilidade térmica das endopeptidases, grande parte do amaciamento das carnes acontece durante o cozimento, armazenamento refrigerado ou manipulação (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A alcalase é uma enzima produzida através de fermentação submersa do microrganismo *Bacillus licheniformis*, e apresenta resultados promissores para a preparação de diversos hidrolisados protéicos. Schmidt e Salas- Mellado et al (2009) estudaram a influência da ação das enzimas alcalase 2.4L[®] e Flavourzyme 1000L[®] no grau de hidrólise das proteínas de carne de peito e coxa de frango e apontaram que as duas enzimas hidrolisaram a carne em diferentes graus. Para a carne de peito como substrato, a melhor condição de hidrólise para ambas as enzimas foi a de concentração de substrato 3,3% (m.v⁻¹), concentração de enzima de 6% (m.m⁻¹) e tempo de 90 min e temperatura de 50-55 °C. A condição de maior grau de hidrólise para a carne decoxa foi obtida através de uma concentração de substrato de 5% (m.v⁻¹), concentração de enzima de 8% (m.m⁻¹) e um tempo de 120 min de hidrólise e temperatura de 50-55 °C, para os dois tipos de enzimas.

Kurozawa, Park e Hubinger (2008) otimizaram o uso da protease comercial alcalase 2.4L para que fosse atingido o maior grau de hidrólise das proteínas da carne de peito de frango. As condições ótimas determinadas foram: 52,5°C, 4,2% (m.m⁻¹) relação de enzima substrato e pH de 8,00. Por conta da baixa rentabilidade dos produtos *in natura*, agregar valor tem sido uma saída das grandes empresas do segmento (MATIAS; MEIRELLES; CALDEIRA, 2006). É escassa a divulgação científica em relação a hidrólise das proteínas da carne de frango. Como o Brasil é um dos maiores produtores desta carne, o estudo da aplicação enzimática contribuirá com o conhecimento para o desenvolvimento de novas tecnologias tanto em cortes nobres quanto em resíduos dos processos industriais, para a obtenção de produtos de maior valor agregado (SCHMIDT; SALAS- MELLADO, 2009).

3.6 Salmoura

A adição de salmoura em carnes é uma técnica que vem sendo praticada desde a antiguidade com o intuito de aumentar a conservação e atenuar sabores indesejáveis. Estas podem ser aplicadas através de tambeamento, imersão ou injeção por um tempo determinado. Salmouras, ao contrário dos marinadores, não adicionam

sabor a carne, porém podem conter alguns realçadores de sabor (OWENS et al 2010; VIANA, 2005).

O cloreto de sódio, principal componente no processo de salga, quando adicionado aos produtos cárneos e carnes ajuda a manter capacidade de retenção de água, diminui a atividade de água e aumenta a pressão osmótica, melhorando as características sensoriais e de conservação do alimento (CHOI et al., 2014).

Os fosfatos, assim como o Cloreto de sódio, colaboram com a retenção de água de carnes cruas e cozidas, também tem ação sequestrante de metais que catalisam reações de oxidação lipídica, onde o tripolifosfato de sódio é o mais utilizado em carnes processadas, frango e frutos do mar. O aumento da hidratação das carnes pode decorrer de mudanças de pH, efeitos de força iônica e interações específicas de fosfatos com proteínas miofibrilares e cátions divalentes. Acredita-se que o enfraquecimento da estrutura do tecido e a complexação do cálcio sejam as principais funções dos polifosfatos. Quando a água exterior está acessível ela pode ser absorvida de forma imobilizada para dentro da rede proteica que foi enfraquecida. Por conta do aumento da força iônica, a interação entre as proteínas pode ser reduzida de forma que as proteínas miofibrilares formem uma solução coloidal. Se a solubilização é induzida por fosfatos, esta acontece mais na superfície dos tecidos, como no caso dos frangos, mariscos e filés de peixe (solução de 6–12% m.m⁻¹, com aumento de retenção de água de 0,35–0,50%), onde é formada uma camada de proteína coagulada durante o cozimento, melhorando a capacidade de retenção de água (VIANA, 2005; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Froning e Sackett (1985), apontaram em seu trabalho que existe um sinergismo entre o Cloreto de sódio e o fosfato, que favorece a diminuição da perda de água durante o processo de cozimento, contribuindo para a textura e a capacidade de retenção de água.

O glutamato é amplamente usado na produção de alimentos como realçador de sabor (JINAP; HAJEB, 2010). Sua forma mais utilizada é através do sal sódico do aminoácido, ácido glutâmico, mais comumente chamado por glutamato monossódico. Esse componente é produzido, nos dias de hoje, por fermentação de açúcares, principalmente do milho e cana-de-açúcar. Quando adicionado nos alimentos, o glutamato monossódico é dissociado e torna-se livre (forma encontrada naturalmente em alguns alimentos) produzindo o sabor Umami, que harmoniza e realça o sabor de produtos cárneos, sopas, molhos, caldos, entre outros (SANO, 2009).

O eritorbato de sódio é um estereoisômero do ácido ascórbico e ascorbato de

sódio, doa átomos de hidrogênio, atua como agente redutor e possui propriedade antioxidante pelo seu mecanismo de desativação de oxigênio singlete (REISCHE, 2002). Quando comparado aos seus isômeros no parâmetro de custo, é muito mais acessível, além disso, sua adição não interfere no pH do alimento (SEPE et al; 2004).

A quantidade de solução salgada absorvida nos cortes cárneos depende do músculo usado no processamento. Chen (1982) demonstrou que os peitos de aves absorvem uma quantidade maior de solução do que as coxas.

Kim et al (2019) estudaram o efeito da concentração de fosfato e cloreto de sódio no samgyetang (sopa coreana de galinha e ginseng) e concluíram que ao adicionar NaCl houve um aumento do teor de cinzas e umidade, capacidade de retenção de água e oxidação lipídica (TBARS), enquanto diminuiu o teor de proteínas e promoveu perdas de peso por cozimento, além de tornar a carne mais macia. A adição de fosfato à salmoura aumentou a capacidade de retenção de água e pH.

Visto que a adição de fosfato e a concentração de sal à salmoura de samgyetang interferiram positivamente na qualidade geral do peito de frango, é factível que o emprego desta técnica em filés de peito com algum tipo de mioatía, pode ser uma alternativa para para amenizar os danos no produto final, minimizando os prejuízos da indústria avícola.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foram coletados 70 filés de frango (*Pectoralis major*) da linhagem Cobb MV de ambos os sexos abatidos com idade de 47 dias e peso médio de 3,141 kg, provenientes de um frigorífico localizado na região oeste do Paraná. O abate seguiu as etapas convencionais de pendura, insensibilização elétrica, sangria, escaldagem, depenagem, evisceração em chiller e desossa.

O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) conforme Ofício CEUA número 10416.2018.56 (Anexo A).

Os filés foram classificados como *Wooden breast* conforme proposto por Kuttappan et al. (2012), Sihvo et al. (2014) e Mudalal et al. (2015), com algumas adaptações. A detecção consistiu na palpação manual (teste de compressão) e visualização do músculo *Pectoralis major*, sendo considerados como *Wooden breast*, filés com maior dureza, pálidos e com presença de transudato cor citrino e/ou

hemorragias. Estes apresentaram peso médio de $364,42 \pm 56,02$ g, comprimento de $187,60 \pm 12,29$ mm, altura cranial de $37,43 \pm 5,01$ mm, altura caudal de $27,11 \pm 6,56$ mm, valor de L^* de $56,22 \pm 3,25$, valor de a^* de $3,23 \pm 1,55$ e valor de b^* $6,59 \pm 2,52$.

A protease comercial, alcalase (Alcalase 2.4 L FG) foi fornecida gentilmente pela *Tovani Benzaquen Ingredientes*. A qual quando apresentada na forma líquida, é uma serina endo-peptidase, com temperatura ótima de trabalho de 30–65°C, faixa de pH em torno de 7–9 e atividade equivalente a 2.4 AU-A/g (AU- Unidade Anson). O tripolifosfato de sódio, glutamato monossódico e o eritorbato foram cedidos pela empresa Duas Rodas e o cloreto de sódio foi adquirido comercialmente.

4.2. Elaboração do produto peito de frango tipo salgado cozido e tratamentos

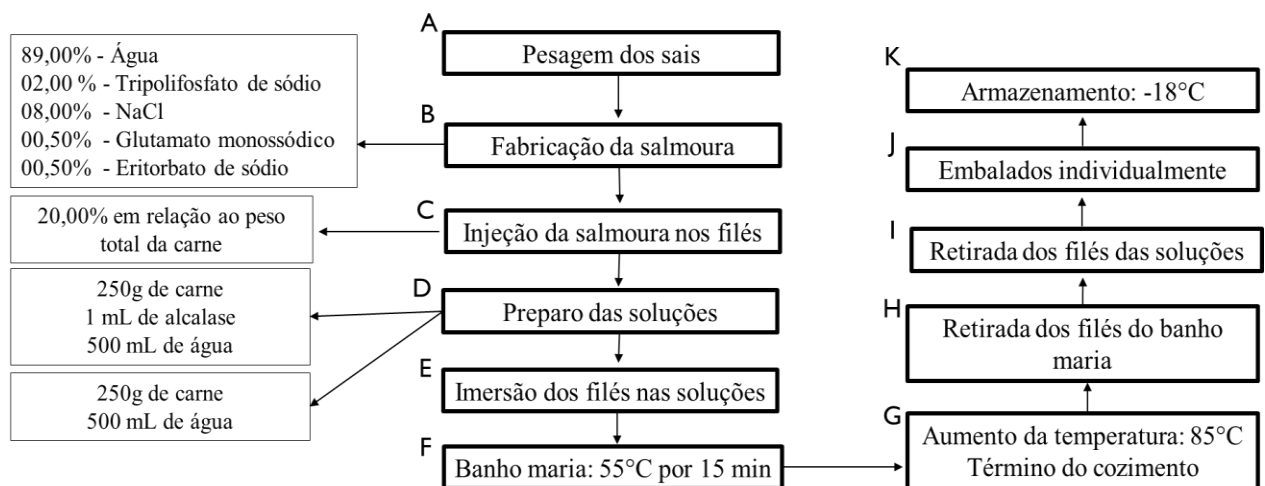
As amostras *Wooden breast* foram aleatoriamente divididas em dois grupos, que originaram posteriormente dois produtos: Peito de Frango Salgado Cozido tratado enzimaticamente (*Wooden breast* com alcalase), no qual os filés receberam aplicação da salmoura e da enzima alcalase e Peito de Frango Salgado Cozido Controle (*Wooden breast* sem alcalase), no qual não houve aplicação da enzima, somente a aplicação da salmoura e da água para cozimento.

Foi preparada uma salmoura contendo 89% de água, 2% de tripolifosfato de sódio, 8% de NaCl, 0,5% de glutamato monossódico e 0,5% de eritorbato de sódio (Figura 7, A-B). A salmoura foi aplicada em todas as amostras por injeção manual, ao longo de toda extensão dorsal, não ultrapassando o limite máximo de 20% em relação ao peso da carne (Figura 7, C), conforme o Regulamento Técnico n. 89 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2003).

Posteriormente a injeção de salmoura, para os filés *Wooden breast* com alcalase foi realizada a aplicação da enzima da seguinte maneira: para cada 250g de filé foi preparada uma solução contendo 1 mL de enzima e 500 mL de água (Figura 7, D), a hidrólise ocorreu pela imersão dos filés nesta solução em um banho-maria a 55°C (temperatura ótima da enzima) por 15 minutos (Figura 7, E-F). Após este período, a temperatura do banho-maria foi elevada para 85°C até que a temperatura interna dos filés atingisse 75°C, garantindo seu cozimento (Figura 7, G). Nos filés do tratamento *Wooden breast* sem alcalase não houve adição da enzima, para cada 250g de carne foi adicionado 500mL de água, os filés foram imersos em água e deixados em banho-maria a 55°C por 15 minutos e posteriormente a temperatura do banho-maria foi elevada para 85°C até que a temperatura interna dos filés atingisse 75°C, garantindo seu cozimento.

Após o cozimento os filés foram acondicionados individualmente em embalagens plásticas, os filés utilizados para as análises de 24 h, não foram congelados, sendo mantido sob refrigeração (4 ° C), enquanto os demais filés empregados em análises mais tardias seguiram para o congelamento (-18°C) até a realização das respectivas análises (Figura 7, H-I-J-K).

Figura 7. Fluxograma dos procedimentos metodológicos para a elaboração do produto peito de frango tipo salgado cozido e tratamentos.



Fonte: Do autor (2020).

4.3 Determinação de pH

As medidas de pH, em triplicata, foram realizadas após 24h da fabricação do produto com auxílio de um potenciômetro de inserção portátil da marca Testo (Modelo 205 AG Germany),

4.4 Medida de cor

As análises de cor foram realizadas após a fabricação do produto utilizando o colorímetro Minolta® CR- 400 com iluminante D65 e ângulo de visão de 10°, tomando três pontos diferentes de leitura na região ventral, considerando três leituras crânio-médio- caudais em 15 amostras de cada tratamento (SOARES et al., 2002). Os resultados foram expressos nos parâmetros L*, a* e b* do sistema CIELAB. A diferença total da cor (ΔE) foi calculada de acordo com a equação: $\Delta E = [(L^*_{t_0} - L^*_t)^2 + (a^*_{t_0} - a^*_t)^2 + (b^*_{t_0} - b^*_t)^2]^{1/2}$, onde t_0 representa os filés no tempo zero de cozimento e t representa os filés após 15, 30 e 45 dias de fabricação do produto cozido, foram avaliadas um total de 12 amostras por tratamento.

4.5 Medida de capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada em triplicata, após 24h da fabricação do produto, de acordo com a metodologia de Troy, Desmond e Buckley (1999). Basicamente, foram pesadas 10 g da amostra levada a um banho-maria (Marconi, MA 127/BO) a 90°C por 10 minutos e resfriadas a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita a centrifugação a 8200 rpm em uma centrífuga refrigerada (Eppendorf, 5810 R, Germany) por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi pesado. Os resultados foram expressos em porcentagem de água retida, calculados pela diferença de peso de acordo com a seguinte equação: $CRA = 1 - (P_i - P_f/U) \times 100$, onde P_i e P_f são os pesos inicial e final da amostra, respectivamente, e U é a umidade da amostra.

4.6 Força de cisalhamento

A medida de força de cisalhamento foi realizada no peito salgado cozido seguindo as instruções de Bratzler (1949). As amostras foram cortadas no sentido da fibra da carne em pedaços de 1 x 1 x 2 cm (altura, largura, comprimento) e submetidas ao teste de cisalhamento com a lâmina Warner Bratzler com velocidade 5,0 mm.s⁻¹, acoplada ao texturômetro universal TA- XT2i. Foram avaliadas um total de 15 amostras por tratamento e os cortes foram feitos somente na região cranial (local mais afetado) onde cada amostra teve o máximo de repetições possíveis. Os resultados foram expressos em Newton, correspondente à força máxima necessária para o corte das amostras no sentido transversal às fibras.

4.7 Composição química aproximada

A composição química aproximada foi realizada conforme as metodologias descritas pela A.O.A.C (1995). A umidade foi determinada por secagem a 105°C até peso constante, cinzas por incineração em mufla a 550°C; os lipídios foram extraídos em extrator tipo Soxhlet com éter de petróleo, após hidrólise ácida. O conteúdo de nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando o fator de conversão em proteína de 6,25.

4.8 Teor de colágeno total (TC) e colágeno solúvel (SC).

O teor total de colágeno (TC) foi determinado conforme descrito por por

Woessner (1962). Basicamente, 1,0 g de amostra foi adicionada de 15 mL de ácido clorídrico mol.L^{-1} e hidrolisada por 15h a 105°C . O hidrolisado foi filtrado e o pH ajustado entre 6,0 e 7,0 com solução de NaOH 33% (m.v^{-1}) e então diluído com água destilada para 250 mL. Uma alíquota de 2,0 mL de amostra hidrolisada e 1,0 mL de solução de cloramina T foram homogeneizadas em um tubo de ensaio e deixadas por 20 minutos à temperatura ambiente, na sequência 1,0 mL de ácido perclórico $3,15 \text{ mol.L}^{-1}$ foi adicionado e deixado durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 1,0 mL de 4-dimetil-aminobenzaldeído foi adicionado e as soluções foram agitadas e aquecidas a 60°C por 20 min. As amostras foram resfriadas durante 5 minutos em água a temperatura ambiente e a absorvância medida em espectrofotômetro (Libra S22, Biochrom, England) a 557 nm. A quantidade de colágeno total foi determinada a partir de uma curva padrão, utilizando solução de hidroxiprolina de concentração de 1,5 a $4,5 \mu\text{g/ml}$ e coeficiente para o cálculo de conversão de 8,0 (WOESSNER, 1962).

O colágeno solúvel (SC) foi extraído de acordo com o método modificado de Oliveira, Soares e Antunes (1998). As amostras (2,5 g) foram homogeneizadas durante 1 minuto com 20 mL de água deionizada e aquecidas a 80°C durante 60 minutos. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em Ultra Turrax a 22000 rpm e centrifugadas a 4000rpm (Eppendorf, 5810 R, Germany) durante 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado e 30 mL de ácido clorídrico 6 mol.L^{-1} foi adicionado para a hidrólise por 15h a 105°C seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

4.9 Análise de oxidação lipídica

A oxidação lipídica do filé de peito salgado cozido foi determinada nos tempos de 2, 15, 30 e 45 dias de armazenamento a -18°C , utilizando a metodologia descrita por Tarladgis et al. (1964) e modificada por Crackel et. al. (1988).

Neste procedimento, foram pesadas 10 g de amostra trituradas e acrescentadas de 15 mL de ácido tricloroacético 7,5% e homogeneizadas em turrax a 7000 rpm por 1 min, então, centrifugadas a 6000 rpm em centrífuga refrigerada (Eppendorf, 5810 R, Germany) a 20° por 10 min e em seguida filtrados em papel filtro. Em 5mL do sobrenadante foram adicionados 5mL de ácido tiobarbitúrico $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$. Os tubos foram colocados em banho – maria a 85°C por 35 minutos. Em seguida, foram resfriadas e a absorvância lida em espectrofotômetro (Libra S22, Biochrom, England) a 530 nm. Foi utilizada uma curva padrão com solução de 1,1,3,3,- tetraetoxipropano

de $4 * 10^{-10}$ a $4,40 * 10^{-9}$ mol.L⁻¹. Os resultados foram expressos em mg de malonaldeído por quilo de amostra (CRACKEL et. al, 1988).

4. 10 Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando o programa Statistica 7,0 for Windows. O teste t de *Student* a 5% de significância foi aplicado para comparação entre o tratamento *Wooden breast* com alcalase e o *Wooden breast* sem alcalase, foi aplicado também o teste de *Tukey* a 5% de significância para comparação dos resultados em relação aos tempos de armazenamento.

REFERÊNCIAS

ADLER-NISSEN, J. Enzymic hydrolysis of food protein. **London: Elsevier Applied Science Publishers**, 1985.

BAILEY, R.A.; WATSON, K.A.; BILGILI, S.F.; AVENDANO, S. The genetic basis of pectoralis major myopathies in modern broiler chicken lines. **Poultry Science**, v. 00, p. 0-10, 2015.

BAILEY, A.J. The chemistry of collagen cross-links and their role in meat texture. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, Bristol, v.42, p.127-135, 1989.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. 1 ed. São Paulo: Manole, p. 566, 2000.

BRASIL. Gabinete do Presidente da República. Decreto 9013 de 29 de março de 2017 - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 2017.

BRASIL. Instrução Normativa N°26 de 23 de abril de 2003. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Aves Temperadas. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento/(MAPA), Secretaria de defesa agropecuária (SDA).

BRATZLER, L. J. Determining the tenderness of meat by use of the Warner-Bratzler method. **Proceedings of the Second Annual Reciprocal Meat Conference**. National Livestock and Meat Board, Chicago, IL. AMSA, Savoy, IL, p. 117, 1949.

CANTY, E. G.; KADLER, K. E. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. COSTANZO, L. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

CHOI, Y. M. et al. Combined effects of potassium lactate and calcium ascorbate as sodium chloride substitutes on the physicochemical and sensory characteristics of low-sodium frankfurter sausage. **Meat Science**, v. 96, n. 1, p. 21-25, 2014.

COSTANZO, L. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

CRACKEL, R.L.; GRAY, J.I.; PEARSON, A.M.; BOOREN, A. M.; BUCKLEY, D.J. **Food Chem**. 1988.

DAMODARAN S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R.; **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre (RS): Artmed; 2010.

DALGAARD L. B.; RASMUSSEN M. K.; BERTRAM H. C.; JENSEN J. A.; MØLLER H. S.; AASLYNG M. D.; HEJBØL E. K.; PEDERSEN J. R.; ELSSER-GRAVESEN D.; YOUNG J. F. Classification of *Wooden breast* myopathy in chicken *Pectoralis major* by a standardised method and association with conventional quality assessments. **International Journal of Food Science and Technology**, p. 1-9, 2018.

ESKIN, M.; SHAHIDI, F. **Bioquímica de Alimentos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Campus Elsevier, 2015.536p.

FAOSTAT-FAO statistical database, 2016. Acessado em Fev, 2020.

FRONING, G.W., SACKETT, B. Effect of salt and phosphates during tumbling of turkey breast muscle on meat characteristics. **Poultry Science**, n.64, p. 1328- 1333, 1985.

GUIMARÃES, J.L., ADELL, E.A.A. **Estrutura e bioquímica do músculo**. Apostila do Laboratório de Carnes. DTA-FEA-UNICAMP, Junho de 1995.

JINAP, S.; HAJEB, P. Glutamate. Its applications in food And contribution to health. **Appetite**. v.55, n.1, p.1-10. 2010.

HE, Shan; FRANCO, Chris; ZHANG, Wei. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 289-297, 2013.

KIM, Tae-Kyung et al. Quality Characteristics of Samgyetang according to the Sodium Chloride Level and with/without Phosphate in Broth. **Food Science of Animal Resources**, v. 39, n. 1, p. 102-113, 2019.

KUROZAWA, L. E.; PARK, K. J.; HUBINGER, M. D. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. *Journal of Food Science*, v. 73, n. 5, p. C405-C412, 2008.

KUTTAPPAN, V. A. et al. Consumer acceptance of visual appearance of broiler breast meat with varying degrees of white striping. **Poultry Science**, v.91, p.1240-1247, 2012.

LAWRIE, R.A. **Ciência da carne**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384 p.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 2001.

LORENZI, M.; MUDALAL S.; CAVANI C.; PETRACCI M. Incidence of white striping under commercial conditions in medium and heavy broiler chickens in Italy. **J. Appl. Poult. Res.** 23:754–758, 2014.

MATIAS, A. B.; MEIRELLES, J. L. F.; CALDEIRA, L. M. Estratégia, investimento e competitividade da indústria avícola brasileira. 2006.

MAZZONI, M.; PETRACCI, M.; MELUZZI, A.; CAVANI, C.; CLAVENZANI, P.; SIRRI, F. Relationship between pectoralis major muscle histology and quality traits of chicken meat. **Poultry Science**, v. 94, n.1, p. 123– 130, 2015.

MIR, N. A.; RAFIQ, A.; KUMAR, F.; SINGH, V.; SHUKLA, V. Determinants of broiler chicken meat quality and factors affecting them: a review. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 10, p. 2997-3009, 2017.

MOTTET, A.; TEMPIO, G. Global poultry production: current state and future outlook and challenges. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, n. 2, p. 245-256, 2017.

MUDALAL, S.; LORENZI, F.; SOGLIA, C.; CAVANI, C.; PETRACCI, M. Implications of White striping and *Wooden breast* abnormalities on quality traits of raw and marinated chicken meat. **Animal**, v.9, p. 728-734, 2015.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F. Biotecnologia – enzimas ferramentas na indústria. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 242, out. 2007.

MUTRYN, M. F. et al. Characterization of a novel chicken muscle disorder through differential gene expression and pathway analysis using RNA- sequencing. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 1-19, 2015.

NEKLYUDOV AD. Nutrtive fibers of animal origin: collagen and its fractions as essential components of new and useful food products. **Applied Biochemistry Microbiology**. 2003;39(3):229-38.

OLIVEIRA, L. B., SOARES, G. J. D.; ANTUNES, P. L. Influência da maturação de carne bovina na solubilidade do colágeno e perdas de peso por cozimento. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 4, 166–171, 1998.

ORDOÑEZ PEREDA, J. A.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ALVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. F. et al. **Tecnologia de alimentos – Alimentos de origem animal**, Porto Alegre: Artmed, 2v., v. 2 , 2005, 279p.

OWENS, C. M.; SAMS, A. R.; ALVARADO, Christine. **Poultry meat processing**. CRC Press, 2010.

PETRACCI, M.; MUDALAL, S.; SOGLIA, F.; CAVANI, C. Meat quality in fast-growing broiler chickens. **World's Poultry Science Journal**, v.71, n.2, p.363- 374, 2015.

PETRACCI, M.; CAVANI C. 2012. Muscle growth and poultry meat quality issues. **Nutrients** 4:1–12.

PEZOA, V. G.; MELLADO, M. S. Estudo das condições ótimas de pH e temperatura para atividade enzimática de estratos dos componentes do aparelho digestivo de corvina (*Micropogon furnieri*) e castanha (*Umbrina canosai*). **Obtenção de um concentrado de proteínas de pescado para alimentos pelo método enzimático, utilizando as próprias enzimas do pescado**. Rio Grande: Editora FURG, 1979. p. 5-38.

PLUMMER, D. T. The Folin-Lowry method of protein assay. In: **An Introduction to Practical Biochemistry**. McGraw-Hill Book Co London, 1978. p. 156-157.

RADAELLI, G.; PICCIRILLO, A.; BIROLO, M.; GRATTA F.; BALLARIN C.; VASCELLARI M.; XICCATO G.; TROCINO A. Effect of age on the occurrence of muscle fiber degeneration associated with myopathies in broiler chickens submitted to feed restriction. **Poultry Science**, 96, p. 309–319, 2017.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. **Avaliação da Qualidade de Carnes: Fundamentos e Metodologia**. Viçosa: UFV, 2012. 599 p.

RAMOS, E.M.; GOMIDE, L.A.M. **Avaliação da qualidade de carnes – Fundamentos e metodologias**: Textura e maciez da carne. Viçosa: UFV, 2017.

REISCHE, David W.; LILLARD, Dorris A.; EITENMILLER, Ronald R. Antioxidants. In: **Food lipids**. CRC Press, 2002. p. 506-533

RICARD-BLUM, S. The Collagen Family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, p. 1-19, 2011.

RODRIGUES, A. N.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 21 (1): 63-66, 2001

SANO, C. History of glutamate production. **The American Journal Clinical Nutrition**, 90: 728S- 32S. 2009.

SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas Alcalase e Flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1144-1150, 2009.

SIHVO, H.K.; IMMONEN, K.; PUOLANNE, E. Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the *Pectoralis major* muscle of broilers. **Veterinary Pathology**, v.51, p. 619-623, 2013.

SIHVO, H.-K.; IMMONEN, K.; PUOLANNE, E. Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 3, p. 619-623, 2014.

SIHVO, H.K.; LINDÉN, J.; AIRAS, N.; IMMONEN, K.; VALAJA, J.; PUOLANNE, E. *Wooden breast* Myodegeneration of *Pectoralis major* Muscle Over the Growth Period in Broilers. **Veterinary Pathology**, v.54, n.1, p. 119-128, 2016.

SILVA, T. F; PENNA, A. L. B. Chemical **Characteristics and functional properties of collagen**. Rev. Inst. Adolfo Lutz, vol.71 no.3, p 530-539, São Paulo, 2012.

SINDIAVIPAR. Sindicato das Indústrias de Produtos avícolas do Estado do Paraná. Disponível em: <<https://www.sindiavipar.com.br/index.php?modulo=8&acao=detalhe&cod=177308>>. Acesso em: 16 fev. 2018.

SINDIAVIPAR. Sindicato das Indústrias de Produtos avícolas do Estado do Paraná. Disponível em: <https://sindiavipar.com.br/blog/2019/09/25/pr-e-responsavel-por-metade-das-exportacoes-avicolas-brasileiras-para-a-china/>. Acesso em: 19 de Março de 2020..

SOARES, V. F.; FERREIRA, V. S.; BON, E. P. S. Produção de Proteases de *Bacillus subtilis* usando óleo de soja como fonte de carbono. In: **4º Seminário Brasileiro de**

Tecnologia Enzimática. Resumos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 98pp, 1999.

SOARES, A. L.; LARA, J. A. F.; IDA, E. I.; GUARNIERI, P. D; OLIVO, R.; SHIMOKOMAKI, M. Variation in the color of Brazilian broiler breast fillet. Proceedings of International **Congress of Meat Science and Technology**, Roma, v.48, p.540-541, 2002.

SOGLIA F, ZENG Z, GAO J, PUOLANNE E, CAVANI C, PETRACCI M, ERTBJERG P. Evolution of proteolytic indicators during storage of broiler *Wooden breast* meat. **Poultry Science**, 97(4), p. 1448-1455, 2018.

SOUZA, M. M. S., ROCHA-DE-SOUZA, C. M., DE MELO, D. A., DA MOTTA, C. C., PIMENTA, R. L., DA SILVA COELHO, I., & DE OLIVEIRA COELHO, S. D. M. Of Animal and Men: The Importance of Animal Environment to Antimicrobial Resistance: A One Health Approach. **Antimicrobial Resistance**, 2020.

TASONIERO, G; BOWKER, B; STELZLENI, A; ZHUANG, H; RIGDON, M; THIPPAREDDI, H. Use of blade tenderization to improve wooden breast meat texture. **Poultry science**, v. 98, n. 9, p. 4204-4211, 2019.

TIJARE, Vishwesh Vijay et al. Meat quality of broiler breast fillets with white striping and woody breast muscle myopathies. **Poultry Science**, v. 95, n. 9, p. 2167-2173, 2016.

TROCINO, A.; PICCIRILLO, A.; BIROLO, M.; RADAELLI, G.; BERTOTTO, D.; FILIOU, E.; PETRACCI, E.; XICCATO, G. Effect of genotype, gender and feed restriction on growth, meat quality and the occurrence of white striping and *Wooden breast* in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 94, n. 12, p. 2996 – 3004, 2015.

TROY, D. J., DESMOND, E. M.; BUCKLEY, D. J. Eating quality of low-fat beef burgers containing fat-replacing functional blends. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 79, 507-516, 1999.

AGUR, A. M. R.; DALLEY, A. F. **Essential clinical anatomy**. Williams & Wilkins, 1995.

VELLEMAN, S. G.; CLARK, D. L. Histopathologic and myogenic gene expression changes associated with *Wooden breast* in broiler breast muscles. **Avian Diseases**, v. 59, n. 3, p. 410-418, 2015.

VIANA, A.G. Tecnologia de marinados, glazes e rubs. **Revista Nacional da Carne**, n.335, 2005.

WOESSNER, J. F. Catabolism of collagen and non-collagen protein in the rat uterus during post-partum involution. **Biochemical Journal**, v. 83, n. 2, p. 304, 1962.

WOLF, K. L.; SOBRAL, P. J. A.; TELIS, V. R. N. Physicochemical characterization of collagen fibers and collagen powder for self-composite film production. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1886-1894, 2009.

YANG, Bao et al. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. **Food Chemistry**, v. 124, n. 2, p. 551-555,

2011.

ZANETTI, M. A; TEDESCO, D. C; SCHNEIDER, T; TEIXEIRA, S. T. F; DAROIT, L; PILOTTO, F; DOS SANTOS, L. R. Economic losses associated with Wooden Breast and White Striping in broilers. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 887-892, 2018.

ZAMBONELLI, P; ZAPPATERRA, M; SOGLIA, F; PETRACCI, M; SIRRI, F; CAVANI, C; DAVOLI, R. Detection of differentially expressed genes in broiler pectoralis major muscle affected by White Striping–Wooden Breast myopathies. **Poultry science**, v. 95, n. 12, p. 2771-2785, 2016.

ZHANG, Y; WANG, P; XU, X; XIA, T; LI, Z; ZHAO, T. Effect of wooden breast myopathy on water-holding capacity, rheological and gelling properties of chicken broiler breast batters. **Poultry Science**, 2020.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram redigidos na forma de artigo científico a ser submetido ao periódico Poultry Science, seguindo as normas para publicação (Anexo B).

6.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Aproveitamento de filés *Wooden breast* para elaboração de um produto tipo peito de frango salgado cozido com aplicação de enzima alcalase.

I. C. C. ZAGO*, F. J. MENDONÇA*, C. Z. BELLUCO*, A. L. G. MENCK*, A. L. SOARES*.

*Universidade Estadual de Londrina, Departamento de ciência e tecnologia de alimentos.

RESUMO

O *Wooden breast*, emerge como uma miopatia que altera as propriedades funcionais e sensoriais dos filés, prejudicando a qualidade dos filés, com baixa aceitação e excessiva dureza, acarretando em perdas econômicas a indústria avícola. As proteases, como a alcalase, hidrolisam as proteínas da carne aumentando suas funcionalidades e proporcionando amaciamento, mostrando-se como uma alternativa viável para aplicação na tentativa de melhorar o valor agregado destes filés. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a aplicação da enzima alcalase em filés de frango com miopatia *Wooden breast* (WB) para elaboração de um novo produto, peito salgado cozido. Os filés *Wooden breast* (WB), coletados de uma linha comercial de abate foram divididos em dois grupos, originando dois produtos: Peito de Frango Salgado Cozido tratado enzimaticamente (*Wooden breast* com alcalase) e Peito de Frango Salgado Cozido Controle (*Wooden breast* sem alcalase). Os filés foram adicionados de 20% de salmoura (89% de água, 2% de tripolifosfato de sódio, 8% de NaCl, 0,5% de glutamato monossódico e 0,5% de eritorbato de sódio), imersos em solução aquosa com ou sem adição da enzima alcalase, aquecidos a 55°C por 15 min, em seguida a temperatura foi elevada para 85°C até completa cocção (temperatura interna dos filés 75°C). O tratamento com a enzima não

promoveu alterações na cor, composição química e capacidade de retenção de água. Os filés *Wooden breast* com alcalase apresentaram menores valores de pH, de colágeno total e solúvel, da razão colágeno/proteína, da força de cisalhamento (-5 Newtons) que filés *Wooden breast* sem alcalase. Ainda, os filés tratados com a alcalase tiveram valores de oxidação lipídica e da alteração total de cor (ΔE) menores quando comparados com os filés *Wooden breast* sem alcalase em 2 dias de armazenamento a -18°C . Conclui-se que a aplicação da alcalase em filés *Wooden breast* na elaboração de um produto salgado e cozido é viável, melhorando a textura e o valor nutricional do produto, minimizando os prejuízos causadas por esta miopatia.

Palavras-chave: Textura. Colágeno. Hidrólise proteica.

INTRODUÇÃO

A alta demanda por carne de aves impulsiona a seleção genética na busca por animais com maiores taxas de crescimento e rendimento de carcaça, contudo, simultaneamente surgem modificações histológicas e bioquímicas do músculo que acarretam em diferentes tipos de miopatias, impactando negativamente na qualidade da carne (PETRACCI et al., 2015; MUDALAL et al., 2015). Entre as miopatias destacamos uma presente no músculo peitoral (*Pectoralis major*), denominado *Wooden breast*, caracterizado por áreas difusas de endurecimento da carne, protuberâncias esbranquiçadas, degeneração vascular, infiltração de células mononucleares, inflamação intersticial, altos níveis de fibrilação de colágeno e gordura no tecido (SIHVO et al., 2014; MUDALAL et al., 2015).

Wooden breast, reduz a capacidade de retenção de água, altera as propriedades reológicas e sensoriais, acarretando em uma perda na cocção dos cortes de peito, com aumento

da resistência ao cisalhamento, concomitantemente ao agravamento da miopatia (ZHANG et al., 2020; XING et al., 2020).

A aplicação de marinados à base de fosfato e sal podem melhorar a umidade, maciez, suculência, sabor e rendimento da carne de aves, no entanto, em filés *Wooden breast* há uma diminuição na capacidade de absorção dos marinados e conseqüentemente perda da suculência dos filés (BOWKER et al., 2018; MUDALAL et al., 2014), devido aos maiores teores de umidade, colágeno e lipídios destes filés (MUDALAL et al., 2014; SOGLIA et al., 2016), agravadas na porção ventral do *Pectoralis major* (BOWKER et al., 2018; MUDALAL et al., 2014).

Os filés *Wooden breast* possuem baixa aceitação pelo consumidor, quando comercializados crus, decorrentes do comprometimento de sua aparência com palidez, protuberâncias esbranquiçadas, transudato cor citrino e hemorragias, sendo destinados a elaboração de produtos moídos e/ou a alimentação animal (MUDALAL et al., 2015; KUTTAPPAN et al., 2016), gerando grandes prejuízos para a indústria avícola, calculados recentemente para o Brasil como sendo em torno de 70.000 dólares por dia (ZANETTI et al., 2018).

As proteases, tal como a alcalase, hidrolisam as proteínas da carne aumentando suas funcionalidades e proporcionando amaciamento, mostrando-se como uma alternativa viável para aplicação na tentativa de melhorar o valor agregado dos filés de frango (SCHMIDT; SALAS- MELLADO., 2009).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação da enzima alcalase em filés de frango com miopatia *Wooden breast* para elaboração de um produto tipo peito de frango salgado cozido, afim de minimizar as perdas econômicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram coletados 70 filés de frango (*Pectoralis major*) da linhagem Cobb MV de ambos os sexos abatidos com idade de 47 dias e peso médio de 3,141 kg, provenientes de um frigorífico localizado na região oeste do Paraná. O abate seguiu as etapas convencionais de pendura, insensibilização elétrica, sangria, escaldagem, depenagem, evisceração em chiller e desossa.

O projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) conforme Ofício CEUA número 10416.2018.56.

Os filés foram classificados como *Wooden breast* conforme proposto por Kuttappan et al. (2013), Sihvo et al. (2014) e Mudalal et al. (2015), com algumas adaptações. A detecção consistiu na palpação manual (teste de compressão) e visualização do músculo *Pectoralis major*, sendo considerados como *Wooden breast*, filés com maior dureza, pálidos e com presença de transudato cor citrino e/ou hemorragias. Os filés apresentaram peso médio de $364,42 \pm 56,02$ g, comprimento de $187,60 \pm 12,29$ mm, altura cranial de $37,43 \pm 5,01$ mm, altura caudal de $27,11 \pm 6,56$ mm, valor de L* de $56,22 \pm 3,25$, valor de a* de $3,23 \pm 1,55$ e valor de b* $6,59 \pm 2,52$.

A protease comercial, alcalase (Alcalase 2.4 L FG) foi fornecida gentilmente pela *Tovani Benzaquen Ingredientes*. A qual na forma líquida, é uma serina endo-peptidase, com temperatura ótima de trabalho de 30–65°C, faixa de pH em torno de 7–9 e atividade equivalente a 2.4 AU-A/g (AU- Unidade Anson). O tripolifosfato de sódio, glutamato monossódico e o eritorbato foram cedidos pela empresa Duas Rodas e o Cloreto de sódio foi adquirido comercialmente.

Elaboração do produto peito de frango tipo salgado cozido e tratamentos

As amostras *Wooden breast* foram aleatoriamente divididas em dois grupos, que originaram posteriormente dois produtos: Peito de Frango Salgado Cozido tratado

enzimaticamente (*Wooden breast* com alcalase), no qual os filés receberam aplicação da salmoura e da enzima alcalase e Peito de Frango Salgado Cozido Controle (*Wooden breast* sem alcalase), no qual não houve aplicação da enzima, somente a aplicação da salmoura e da água para cozimento.

Foi preparada uma salmoura contendo 89% de água, 2% de tripolifosfato de sódio, 8% de NaCl, 0,5% de glutamato monossódico e 0,5% de eritorbato de sódio. Feito isso, a salmoura foi aplicada em todas as amostras por injeção manual, ao longo de toda extensão dorsal, não ultrapassando o limite máximo de 20% em relação ao peso da carne, conforme o Regulamento Técnico n. 89 do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2003).

Posteriormente a injeção de salmoura, para os filés *Wooden breast* com alcalase foi realizada a aplicação da enzima da seguinte maneira: para cada 250g de filé foi preparada uma solução contendo 1 mL de enzima e 500 mL de água, a hidrólise ocorreu pela imersão dos filés nesta solução em um banho-maria a 55°C (temperatura ótima da enzima) por 15 minutos. Após este período, a temperatura do banho-maria foi elevada para 85°C até que a temperatura interna dos filés atingisse 75°C, garantindo seu cozimento. Nos filés do tratamento *Wooden breast* sem alcalase não houve adição da enzima, para cada 250g de carne foi adicionado 500mL de água, os filés foram imersos em água e deixados em banho-maria a 55°C por 15 minutos e posteriormente a temperatura do banho-maria foi elevada para 85°C até que a temperatura interna dos filés atingisse 75°C, garantindo seu cozimento.

Após o cozimento os filés foram acondicionados individualmente em embalagens plásticas, os filés utilizados para as análises de 24 h, não foram congelados, sendo mantido sob refrigeração (4 ° C), enquanto os demais filés empregados em análises mais tardias seguiram para o congelamento (-18°C) até a realização das respectivas análises.

Determinação de pH

As medidas de pH, em triplicata, foram realizadas após 24h da fabricação do produto

com auxílio de um potenciômetro de inserção portátil da marca Testo (Modelo 205 AG Germany).

Medida de cor

As análises de cor foram realizadas após a fabricação do produto utilizando o colorímetro Minolta® CR- 400 com iluminante D65 e ângulo de visão de 10°, tomando três pontos diferentes de leitura na região ventral, considerando três leituras crânio-médio- caudais em 15 amostras de cada tratamento (SOARES et al., 2002). Os resultados foram expressos nos parâmetros L^* , a^* e b^* do sistema CIELAB. A diferença total da cor (ΔE) foi calculada de acordo com a equação: $\Delta E = [(L^*_{t0} - L^*_t)^2 + (a^*_{t0} - a^*_t)^2 + (b^*_{t0} - b^*_t)^2]^{1/2}$, onde t_0 representa os filés no tempo zero de cozimento e t representa os filés após 15, 30 e 45 dias de fabricação do produto cozido, foram avaliadas um total de 12 amostras por tratamento.

Medida de capacidade de retenção de água (CRA)

A capacidade de retenção de água (CRA) foi determinada em triplicata, após 24h da fabricação do produto, de acordo com a metodologia de Troy, Desmond e Buckley (1999). Basicamente, foram pesadas 10 g da amostra levada a um banho- maria (Marconi, MA 127/BO) a 90°C por 10 minutos e resfriadas a temperatura ambiente. Em seguida, foi feita a centrifugação a 8200 rpm em uma centrífuga refrigerada (Eppendorf, 5810 R, Germany) por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi pesado. Os resultados foram expressos em porcentagem de água retida, calculados pela diferença de peso de acordo com a seguinte equação: $CRA = 1 - (P_i - P_f/U) \times 100$, onde P_i e P_f são os pesos inicial e final da amostra, respectivamente, e U é a umidade da amostra.

Força de cisalhamento

A medida de força de cisalhamento foi realizada no peito salgado cozido seguindo as instruções de Bratzler (1949). As amostras foram cortadas no sentido da fibra da carne em pedaços de 1 x 1 x 2 cm (altura, largura, comprimento) e submetidas ao teste de cisalhamento com a lâmina Warner Bratzler com velocidade 5,0 mm.s⁻¹, acoplada ao texturômetro universal TA- XT2i. Foram avaliadas um total de 15 amostras por tratamento e os cortes foram feitos somente na região cranial (local mais afetado) onde cada amostra teve o máximo de repetições possíveis. Os resultados foram expressos em Newton, correspondente à força máxima necessária para o corte das amostras no sentido transversal às fibras.

Composição química aproximada

A composição química aproximada foi realizada conforme as metodologias descritas por Arlington (1995). A umidade foi determinada por secagem a 105°C até peso constante, cinzas por incineração em mufla a 550°C; os lipídios foram extraídos em extrator tipo Soxhlet com éter de petróleo, após hidrólise ácida. O conteúdo de nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando o fator de conversão em proteína de 6,25.

Teor de colágeno total (TC) e colágeno solúvel (SC).

O teor total de colágeno (TC) foi determinado conforme descrito por por Woessner (1962). Basicamente, 1,0 g de amostra foi adicionada de 15 mL de ácido clorídrico mol.L⁻¹ e hidrolisada por 15h a 105°C O hidrolisado foi filtrado e o pH ajustado entre 6,0 e 7,0 com solução de NaOH 33% (m.v⁻¹) e então diluído com água destilada para 250 mL. Uma alíquota de 2,0 mL de amostra hidrolisada e 1,0 mL de solução de cloramina T foram homogeneizadas em um tubo de ensaio e deixadas por 20 minutos à temperatura ambiente, na sequência 1,0 mL de ácido perclórico 3,15 mol.L⁻¹ foi adicionado e deixado durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, 1,0 mL de 4-dimetil-aminobenzaldeído foi adicionado e as soluções foram agitadas e aquecidas a 60°C por 20 min. As amostras foram resfriadas durante 5 minutos em água a temperatura ambiente e a absorvância medida em espectrofotômetro (Libra S22, Biochrom, England) a 557 nm. A quantidade de colágeno total foi determinada a partir de uma curva padrão, utilizando solução de hidroxiprolina de concentração de 1,5 a 4,5 µg/ml e coeficiente para o cálculo de conversão de 8,0 (WOESSNER, 1962).

O colágeno solúvel (SC) foi extraído de acordo com o método modificado de Oliveira, Soares e Antunes (1998). As amostras (2,5 g) foram homogeneizadas durante 1 minuto com 20 mL de água deionizada e aquecidas a 80°C durante 60 minutos. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em Ultra Turrax a 22000 rpm e centrifugadas a 4000rpm (Eppendorf, 5810R, Germany) durante 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado e 30 mL de ácido clorídrico 6 mol.L⁻¹ foi adicionado para a hidrólise por 15h a 105°C seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Análise de oxidação lipídica

A oxidação lipídica do filé de peito salgado cozido foi determinada nos tempos de 02, 15, 30 e 45 dias de armazenamento a -18°C, utilizando a metodologia descrita por Tarladgis et al. (1964) e modificada por Crackel et. al. (1988).

Neste procedimento, foram pesadas 10 g de amostra trituradas e acrescentadas de 15 mL de ácido tricloroacético 7,5% e homogeneizadas em turrax a 7000 rpm por 1 min, então, centrifugadas a 6000 rpm em centrífuga refrigerada (Eppendorf, 5810 R, Germany) a 20° por 10 min e em seguida filtrados em papel filtro. Em 5mL do sobrenadante foram adicionados 5mL de ácido tiobarbitúrico 0,02 mol.L⁻¹. Os tubos foram colocados em banho – maria a 85°C por 35 minutos. Em seguida, foram resfriadas e a absorvância lida em espectrofotômetro (Libra S22,

Biochrom, England) a 530 nm. Foi utilizada uma curva padrão com solução de 1,1,3,3,-tetraetoxipropano de $4 * 10^{-10}$ a $4,40 * 10^{-9}$ mol.L⁻¹. Os resultados foram expressos em mg de Malonaldeído por quilo de amostra (CRACKEL et. al, 1988

Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando o programa Statistica 7,0 for Windows. O teste t de *Student* a 5% de significância foi aplicado para comparação entre o tratamento *Wooden breast* com alcalase e o *Wooden breast* sem alcalase, foi aplicado também o teste de *Tukey* a 5% de significância para comparação dos resultados em relação aos tempos de armazenamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dois produtos, *Wooden breast* com alcalase e *Wooden breast* sem alcalase, não apresentaram diferenças com relação a cor (valores de L*, a* e b*) após 24 horas (Tabela 1). Ambos os produtos foram elaborados com filés *Wooden breast* que possuem uma cor mais pálida, mais avermelhada e mais amarelada que os filés normais (SIHVO et al., 2014 ; ZHUANG; BOWKER, 2018), alterações estas decorrentes do aumento de hemorragias, maior teor de lipídios e menor teor de proteínas que ocasionam o aumento na dispersão da luz devido à baixa capacidade de retenção de água (MUDALAL et al., 2014; SOGLIA et al., 2016, TASONIERO et al., 2019), levando a rejeição dos filés pelo consumidor (ZHUANG; BOWKER, 2018). O processo de cocção em si altera a cor dos filés quando comparados com *in natura* promovendo aumento da luminosidade (L*) e do valor de b*, mascarando em alguns casos as alterações dos filés *Wooden breast* (CHATTERJEE et al., 2016). Contudo, em nosso estudo o tratamento com alcalase não promoveu alterações na cor dos filés, ademais, a influência negativa desta miopatia na cor dos files também não foi amenizada durante o processo de marinação e congelamento, em comparação com filés normais, conforme observado

por Zhuang e Bowker (2018).

Em relação o pH, observou-se que o tratamento com a enzima alcalase (*Wooden breast* com alcalase) promoveu a acidificação do peito salgado cozido quando comparado com peito controle (*Wooden breast* sem alcalase), a alteração foi de apenas 0,08 no valor do pH, não levando a modificações na capacidade de retenção de água do produto ($p < 0,05$) (Tabela 1). Os filés *Wooden breast in natura* apresentam menor capacidade de retenção de água que filés normais, ocasionando perdas de água durante processamento e armazenamento (CHATTERJEE et al, 2016; LIVINGSTON et al, 2019). No caso dos produtos elaborados com filés *Wooden breast* seguidos da adição de salmoura e cocção não foi observado diferença entre os dois tratamentos (Tabela 1), ambos apresentaram valores médios de 95%, indicando que o uso da enzima alcalase não prejudicou esta propriedade.

A aplicação da enzima alcalase foi eficiente para redução na força de cisalhamento dos filés, uma vez que os filés *Wooden breast* com alcalase apresentaram um decréscimo de 5 N na força máxima necessária para o corte quando comparados com os filés *Wooden breast* sem alcalase (Tabela 1). A maciez das carnes é um importante fator de qualidade para o consumidor (MIR et al., 2017) e, portanto, a dureza dos filés *Wooden breast* é um dos maiores problemas desta miopatia. Em seus estudos, Chatterjee et al. (2016) evidenciaram que os filés acometidos por esta miopatia e que passaram pelo processo de cozimento apresentaram uma força de cisalhamento maior que filés normais. Assim, os resultados da utilização da enzima alcalase mostraram-se promissores para diminuição da força de cisalhamento do produto e melhora na maciez. A diminuição na força de cisalhamento provavelmente é consequência da ação da alcalase na fração insolúvel do musculo, bem como da solubilização das proteínas da carne e da solubilização do colágeno (Tabela 2).

A composição química aproximada dos produtos peito de frango salgado cozido tratado enzimaticamente (*Wooden breast* com alcalase) e controle (*Wooden breast* sem alcalase) está apresentada na Tabela 2, onde observa-se que os teores de umidade, cinzas, proteínas e lipídios foram iguais entre os dois produtos. Consolidando a expectativa de que a adição da enzima alcalase, não seria capaz de alterar os macronutrientes dos filés acometidos pela miopatia *Wooden breast*. A miopatia *Wooden breast* promove alterações na composição química da carne, elevando o teor de umidade, gordura, colágeno e diminuindo a quantidade de cinzas e proteínas, prejudicando o teor nutricional, a capacidade de retenção de água e a textura dos filés (SOGLIA et al., 2016; ZAMBONELLI et al., 2016).

Por outro lado, a alcalase atuou de forma efetiva sobre o colágeno, promovendo uma diminuição de aproximadamente 1,70 vezes no teor de colágeno total (Tabela 2). O mesmo ocorreu com o teor de colágeno solúvel, o qual foi de 0,24 % na condição controle (*Wooden breast* sem alcalase) e de 0,18 % para o peito tratado (*Wooden breast* com alcalase)(Tabela 2). Destaca-se que o aumento da fibrose na condição *Wooden breast*, decorre do acréscimo de tecido conjuntivo frouxo, granulação e de um tecido conjuntivo rico em colágeno (SIHVO et al., 2014). O *Wooden breast*, é caracterizado por ter maior teor de colágeno total quando comparado a filés sem a miopatia, tal diferença reflete diretamente na dureza da carne quando cozida (SOGLIA et al., 2016). Tasoniero et al. (2019) apontaram maior quantidade de colágeno insolúvel na condição *Wooden breast*, em razão da alta estabilidade conferida por ligações intermoleculares resistentes ao calor. Nossos resultados indicam que a utilização da enzima alcalase na elaboração do produto salgado cozido de filés *Wooden breast* melhorou consideravelmente a solubilização do colágeno (Tabela 2).

O efeito benéfico da alcalase na diminuição da força de cisalhamento e no teor de colágeno dos filés sugerem a atuação desta enzima a nível molecular nas interações fibrilares

do músculo. Corroborando com esta prerrogativa, Gildberg, Arnesen, Carlehög (2002), descreveram que a alcalase possui atividade proteolítica sobre o colágeno. Para tanto, o decréscimo nos níveis de colágeno total e solúvel no cozimento na presença de alcalase, evidenciados neste estudo, indicam a ação efetiva desta enzima no enfraquecimento destas interações, bem como, na melhora da qualidade nutricional e a maciez dos filés.

A atividade proteolítica da alcalase foi satisfatória nos filés *Wooden breast*, o conteúdo de 5 % de colágeno nos filés testados, favoreceu a atividade proteolítica da enzima (GILDBERG; ARNESEN; CARLEHÖG, 2002; SCHIMID; SALAS-MELLADO, 2009).

Em relação ao valor nutricional, a enzima alcalase promoveu uma diminuição na razão colágeno: proteína de 1,7 vezes quando comparado com o tratamento *Wooden breast* sem alcalase (Tabela 2), evidenciando melhora na qualidade nutricional, uma vez que o colágeno apresenta baixa digestibilidade e ausência de aminoácidos essenciais (ROGOV; TOKAEV; KOVALEV., 1992; ZARKADAS, 1992; TRINDADE; FELÍCIO; CASTILLO., 2004). O comprometimento do valor nutricional com maior razão colágeno: proteína também foi verificado em filés acometidos pela miopatia *White striping* (KATO et al. 2019; PETRACCI et al 2014).

De acordo com Alnahhas et al. (2016), quanto maior a severidade da miopatia *Wooden Breast* em peito de frango maior a quantidade de gordura intramuscular presente, com a substituição de fibras musculares degeneradas por tecido adiposo via lipidose, característica relacionada a tentativa de regeneração do músculo (VELLEMAN; CLARK., 2015; VELLEMAN et al., 2017). Tal aumento associado ao uso de altas temperaturas no processo de cocção na elaboração do produto, podem levar ao desenvolvimento de oxidação lipídica, resultando em compostos indesejáveis e potencialmente tóxicos, alterando as propriedades físico-químicas e sensoriais dos produtos (BALDI et al., 2019). De fato, Soglia et al. (2016), encontraram maior valor de substâncias reativas aos ácido tiobarbitúrico (TBARS) em filés *Wooden breast* em comparação com filés sem miopatia (0,41 vs. 0,22 mg MDA / kg de carne), destacando a importância do emprego de compostos que retardem o avanço da oxidação. Dessa

forma, a oxidação lipídica dos produtos foi acompanhada durante o armazenamento a -18°C nos tempos de 2, 15, 30 e 45 dias (Tabela 3). No tempo de 2 dias de armazenamento, foi observado que o tratamento *Wooden breast* com alcalase apresentou menor valor de oxidação lipídica que o tratamento *Wooden breast* sem alcalase. Nos demais tempo de armazenamento, não foram observadas diferenças entre os dois tratamentos, evidenciando que a enzima protease não levou ao desenvolvimento de processos oxidativos. Em relação a oxidação lipídica durante o tempo de armazenamento, nota-se que se manteve constante para ambos os tratamentos, indicando que o uso do eritorbato na formulação foi capaz de controlar a oxidação.

A diferença total de cor dos produtos também foi acompanhada durante o armazenamento como ilustrado na Figura 1. Os filés *Wooden breast* com alcalase apresentaram ΔE de $0,06 \pm 0,17$ após 15 dias de armazenamento a -18°C , sendo aproximadamente 4 vezes menor que o ΔE do tratamento *Wooden breast* sem alcalase que foi de $4,21 \pm 0,09$. A diferença total de cores é considerada perceptível ao olho humano quando ΔE é maior que 2, considerando os parâmetros de medições instrumentais (MOAREFIAN; BARZEGAR; SATTARI, 2013). Assim, somente nos filés do tratamento *Wooden breast* sem alcalase esta alteração seria perceptível. Após 30 dias de armazenamento, o tratamento *Wooden breast* com alcalase continuou apresentando menor valor de diferença de cor ($\Delta E=2,39$) que o tratamento *Wooden breast* sem alcalase ($\Delta E=4,04$). Contudo, transcorridos 45 dias de estocagem não houveram diferenças significativas entre os dois tratamentos. Normalmente as alterações de cor de carnes e produtos cárneos estão relacionadas a processos de oxidação lipídica e da mioglobina (pigmento responsável pela cor das carnes) (ZHUANG; BOWKER, 2018), o que corrobora com

os valores de oxidação lipídica apresentados na Tabela 3, os filés do tratamento *Wooden breast* com alcalase apresentaram menores valores de oxidação no tempo de 2 dias e também menor alteração na cor total. Estes resultados evidenciam que a enzima alcalase não leva a oxidação da mioglobina atuando apenas na solubilização do colágeno e no amaciamento da carne.

CONCLUSÕES

A elaboração do produto tipo Peito de Frango Salgado Cozido com aplicação da enzima alcalase em filés contendo a miopatia *Wooden breast* mostrou ser viável, minimizando os prejuízos ocasionados por esta miopatia na textura e qualidade nutricional da carne, possibilitando o seu emprego e comercialização.

REFERENCIAS:

- Alnahhas, N., C. Berri, M. Chabault, P. Chartrin, M. Boulay, M. C. Bourin, and E. Le Bihan- Duval. 2016. Genetic parameters of white striping in relation to body weight, carcass composition, and meat quality traits in two broiler lines divergently selected for the ultimate pH of the pectoralis major muscle. *BMC genetics*. 17:61.
- A.O.A.C. V. 1995. Association of official analytical chemists: official methods of analysis of official analytical chemists international.
- Baldi, G., F. Soglia, L. Laghi, S. Tappi, P. Rocculi, S. Tavaniello, D. Prioriello, R. Mucci, G. Maiorano, and M. Petracci. 2019. Comparison of quality traits among breast meat affected by current muscle abnormalities. *Food Res. Int.* 115:369–376.
- Bowker, B., and H. Zhuang. 2019. Detection of razor shear force differences in broiler breast meat due to the woody breast condition depends on measurement technique and meat state. *Poult. Sci.* 98: 6170-6176.
- Bratzler, L. J. 1949. Determining the tenderness of meat by use of the Warner-Bratzler method. *Proc. Recip. Meat Conf.* 2:117-121.
- BRASIL. Instrução Normativa N°26 de 23 de abril de 2003. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Aves Temperadas. Ministério da agricultura, pecuária e

abastecimento/(MAPA), Secretaria de defesa agropecuária (SDA).

Chatterjee, D., H. Zhuang, B. C. Bowker, A. M. Rincon, and G. Sanchez-Brambila. 2016.

Instrumental texture characteristics of broiler pectoralis major with the *Wooden breast* condition.

Poult. Sci. 95:2449-2454.

Crackel, R. L., J. I. Gray, A. M. Pearson, A. M. Booren, and D. J. Buckley. 1988. Some further

observations on the TBA test as an index of lipid oxidation in meats. Food chem. 28: 187-196.

Gildberg, A., J. A. Arnesen, and M. Carlehög. 2002. Utilization of cod backbone by biochemical

fractionation. Process Biochem. 38:475-480.

Kato, T., S. M. Mastelini, G. F. C. Campos, A. P. A. da Costa Barbon, S. H. Prudencio, M.

Shimokomaki, Soares, A. L. and Jr. S. Barbon. 2019. White striping degree assessment using

computer vision system and consumer acceptance test. Asian Austral J Anim. 32(7):1015.

Kuttappan, V. A., Y. S. Lee, G. F. Erf, J. F. Meullenet, S. R. Mckee, and C. M. Owens. 2012.

Consumer acceptance of visual appearance of broiler breast meat with varying degrees of white

striping. Poult. Sci. 91:1240-1247.

Kuttappan, V. A., H. L. Shivaprasad, D. P. Shaw, B. A. Valentine, B. M. Hargis, F. D. Clark, and C. M.

Owens. 2013. Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. Poult. Sci.

92:331-338.

Kuttappan, V. A., B. M. Hargis, and C. M. Owens. 2016. White striping and woody breast myopathies

in the modern poultry industry: a review. Poult. Sci. 95:2724-2733.

- Livingston, M. L., P. R. Ferket, J. Brake, and K. A. Livingston. 2019. Dietary amino acids under hypoxic conditions exacerbates muscle myopathies including *Wooden breast* and white stripping. *Poult Sci.* 98: 1517-1527.
- Mir, N. A., A. Rafiq, F. Kumar, F. Singh, and V. Shukla. 2017. Determinants of broiler chicken meat quality and factors affecting them: a review. *J Food Sci Tech*, 54:2997-3009.
- Moarefian, M., M. Barzegar, and M. Sattari. 2013. *Cinnamomum zeylanicum* essential oil as a natural antioxidant and antibacterial in cooked sausage. *J. Food Biochem.* 37: 62-69.
- Mudalal, S., E. Babini, C. Cavani, and M. Petracci. 2014. Quantity and functionality of protein fractions in chicken breast fillets affected by white striping. *Poult. Sci.* 93:2108–2116.
- Mudalal, S., M. Lorenzi, F. Soglia, C. Cavani, and M. Petracci. 2015. Implications of white striping and wooden breast abnormalities on quality traits of raw and marinated chicken meat. *Animal.* 9:728–734.
- Oliveira, L. B., G. J. Soares, P. L. Antunes. 1998. Influência da maturação de carne bovina na solubilidade do colágeno e perdas de peso por cozimento. *Ver. Bras. Agrociênc.* 4:166-171.
- Petracci, M., S. Mudalal, E. Babini, C. Cavani. 2014. Effect of white striping on chemical composition and nutritional value of chicken breast meat. *Ital J Anim Sci*, 13: 3138.
- Petracci, M., S. Mudalal, F. Soglia, and C. Cavani. 2015. Meat quality in fast-growing broiler chickens. *Worlds Poult. Sci. J.* 71:363– 374
- Plummer, D. T. 1978. The Folin-Lowry method of protein assay. *An Introduction to Practical*

Biochemistry. McGraw-Hill Book Co London. 156-157

Rogov, I. A., E. S. Tokaev, and Y. I. Kovalev. 1992. Collagen and its rational content in meat products: part 1. Analytical studies. *Meat Sci.* 31:35-42.

Schmidt, C. G., and M. Salas-Mellado. 2009. Influência da ação das enzimas Alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. *Quím. Nova.* 32:1144- 1150.

Sihvo, H. K., K. Immonen, and E. Puolanne. 2014. Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. *Vet. Pathol.* 51:619–623.

Soares, A. L., J. A. F. Lara, E. I. Ida, P. D. Guarnieri, R. Olivo, and M. Shimokomaki. 2002. Variation in the color of Brazilian broiler breast fillet. *Proceedings of International Congress of Meat Science and Technology, Roma.* 48:540-541.

Soglia, F., S. Mudalal, E. Babini, M. Di Nunzio, M. Mazzoni, F. Sirri, C. Cavani, and M. Petracchi. 2016. Histology, composition, and quality traits of chicken *Pectoralis major* muscle affected by wooden breast abnormality. *Poult. Sci.* 95:651–659.

Tarladgis, B. G., A. M. Pearson, and L. R. Jr. Dugan. 1964. Chemistry of the 2-thiobarbituric test for determination of oxidative rancidity in foods. Formation of the tba-malonaldehyde complex without acid-heat treatment. *J. Sci. Food Agric.* 5:602-604.

Tasoniero, G., B. Bowker, A. Stelzleni, H. Zhuang, M. Rigdon, and H. Thippareddi. 2019. Use of blade tenderization to improve *wooden breast* meat texture. *Poult. Sci.* 98:4204-4211.

Trindade, M. A., P. E. Felício, and C. J. C. Castillo. 2004. Mechanically separated meat of

broiler breeder and white layer spent hens. *Sci. Agric.* 61(2):234-239.

Troy, D. J., E. M. Desmond, and D. J. Buckley. 1999. Eating quality of low-fat beef burgers containing fat-replacing functional blends. *J. Sci. Food Agric.* 79:507-516.

Velleman, S. G. and D. L. Clark. 2015. Histopathologic and myogenic gene expression changes associated with *wooden breast* in broiler breast muscles. *Avian Dis.* 59:410-418.

Velleman, S. G., D. L. Clark, and J. R. Tonniges. 2017. Fibrillar collagen organization associated with broiler wooden breast fibrotic myopathy. *Avian Dis.* 61:481-490.

Woessner, J. F. 1962. Catabolism of collagen and non-collagen protein in the rat uterus during post-partum involution. *Biochem. J.* 83:304.

Xing, T., X. Zhao, L. Zhang, J. L. Li, G. H. Zhou, X. L. Xu, and F. Gao. 2020. Characteristics and incidence of broiler chicken wooden breast meat under commercial conditions in China. *Poult. Sci.* 99:620-628.

Zambonelli, P., M. Zappaterra, F. Soglia, M. Petracchi, F. Sirri, C. Cavani, and R. Davoli. 2016. Detection of differentially expressed genes in broiler pectoralis major muscle affected

by White Striping–Wooden Breast myopathies. *Poult. Sci.* 95:2771-2785.

Zanetti, M. A., D. C. Tedesco, T. Schneider, S. T. F. Teixeira, L. Daroit, F. Pilotto, E. L. Dickel, S. P. Santos, and L. R. dos Santos. 2018. Economic losses associated with wooden breast and white striping in broilers. *Semina: Ciências Agrárias. Londrina.* 39:887– 892.

Zarkadas, C. G. 1992. Assessment of the protein quality of selected meat products based on their amino acid profiles and their myofibrillar and connective tissue protein contents. *J. Agric. Food Chem.* 40:790-800.

Zhang, Y., P. Wang, X. Xu, T. Xia, Z. Li, and T. Zhao. 2020. Effect of wooden breast myopathy on water-holding capacity, rheological and gelling properties of chicken broiler breast batters. *Poult. Sci.*

Zhuang, H., and B. Bowker. 2018. The wooden breast condition results in surface discoloration of cooked broiler pectoralis major. *Poult. Sci.* 97:4458-4461.

Tabela 1. Parâmetros de pH, cor (L*, a*, b*), capacidade de retenção de água e força de cisalhamento dos produtos Peito de Frango Salgado Cozido tratado enzimaticamente (*Wooden breast* com alcalase) e Peito de Frango Salgado Cozido Controle (*Wooden breast* sem alcalase).

Parâmetros	<i>Wooden breast</i> sem alcalase (n=15)	<i>Wooden breast</i> com alcalase (n=15)	p-valor*
pH	6,57 ± 0,13	6,49 ± 0,09	0,04
L*	73,16 ± 1,71	74,53 ± 2,43	0,47
a*	1,07 ± 0,60	1,78 ± 0,38	0,16
b*	13,95 ± 0,74	14,86 ± 1,12	0,31
CRA (%)	95,95 ± 0,44	95,99 ± 0,46	0,82
FC (N)	25,42 ± 4,92	20,85 ± 3,40	0,01

* teste t student

Tabela 2. Composição química aproximada dos produtos Peito de Frango Salgado Cozido tratado enzimaticamente (*Wooden breast* com alcalase) e Peito de Frango Salgado Cozido Controle (*Wooden breast* sem alcalase).

Composição química	<i>Wooden breast</i> sem alcalase (n=8)	<i>Wooden breast</i> com alcalase (n=8)	p-valor*
Umidade (%)	70,02 ± 1,65	71,23 ± 1,30	0,13
Cinzas (%)	1,28 ± 0,15	1,27 ± 0,27	0,43
Lipídios (%)	2,91 ± 0,45	3,22 ± 0,58	0,4
Proteína total (%)	27,87 ± 1,04	28,14 ± 1,36	0,73
Colágeno total (%)	1,31 ± 0,28	0,78 ± 0,07	0,01
Colágeno solúvel (%)	0,24 ± 0,05	0,18 ± 0,01	0,01
Razão colágeno/proteína	4,69 ± 1,01	2,78 ± 0,25	0,01

*teste *t-student*.

Tabela 3. Acompanhamento da oxidação lipídica do Peito de Frango Salgado Cozido tratado enzimaticamente (*Wooden breast* com alcalase) e Peito de Frango Salgado Cozido Controle (*Wooden breast* sem alcalase), durante o armazenamento por 2, 15, 30 e 45 dias a -18°C.

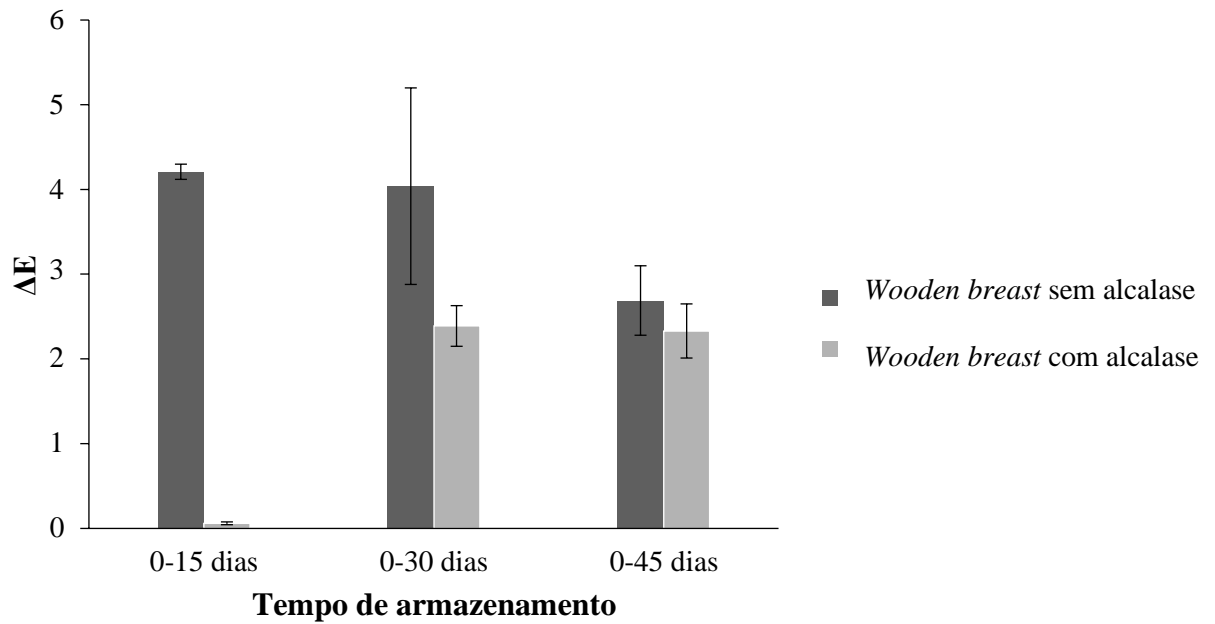
		<i>Tempo (dias)</i>			
		02	15	30	45
Oxidação lipídica (mg de TBARS.kg⁻¹)	<i>Wooden breast</i> sem alcalase	0,33 ^{aA} ± 0,00	0,26 ^{aA} ± 0,10	0,27 ^{aA} ± 0,06	0,25 ^{aA} ± 0,03
	<i>Wooden breast</i> com alcalase	0,21 ^{bA} ± 0,01	0,30 ^{aA} ± 0,02	0,30 ^{aA} ± 0,06	0,29 ^{aA} ± 0,03

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença a 5,0 % de probabilidade

pelo teste t-student.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença a 5,0 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Figura 1. Diferença total de cor (ΔE) do Peito de Frango Salgado Cozido tratado enzimaticamente (*Wooden breast* com alcalase) e Peito de Frango Salgado Cozido Controle (*Wooden breast* sem alcalase) durante o armazenamento por 15, 30 e 45 dias a -18°C



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados obtidos acerca do efeito da alcalase sobre filés de frango acometidos pela miopatia *Wooden breast*, constatamos um efeito positivo da alcalase, melhorando a textura e qualidade nutricional da carne, por meio da diminuição da força de cisalhamento e do teor de colágeno da carne e da razão colágeno:proteína ($p < 0,01$). Sugerindo que o emprego da alcalase em filés *Wooden breast* tende a aumentar o valor agregado do produto, melhorando aspectos primordiais para indústria e consumidor, sendo de grande importância um estudo de viabilidade econômica desta aplicação.

ANEXO A



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 105/2018

Londrina, 28 de Junho de 2018.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto intitulado: "Utilização de enzimas proteases em filés de frango com miopatia Wooden Breast." Protocolo CEUA nº10416.2018.56, sob a responsabilidade de **Adriana Lourenço Soares Russo**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em **26/06/2018**.

O objetivo é avaliar a utilização de enzimas proteases em filés de frango com miopatia *Wooden Breast* para produção de um novo produto. GI:1

Vigência do Projeto	06/08/2018 a 31/07/2019.
Espécie/linhagem	Ave (Cobb).
Nº de animais	150
Peso/Idade	2.300g e 42 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Frigorífico CÔPACOL (cooperativa Agroindustrial Consolata)
Amostras a serem coletadas	Filés de peito de frango

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a). Adriana Lourenço Soares Russo

Responsável pelo projeto

Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/ CCA

C/C para a Chefia do Depto de Ciência e Tecnologia de Alimentos/CCA

C/C para a Direção do CCA

ANEXO B – Instruções aos autores – Poultry Science.

POULTRY SCIENCE

An official journal of the Poultry Science Association.

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

- Description
- Impact Factor
- Abstracting and Indexing
- Editorial Board
- Guide for Authors

ISSN: 0032-5791

DESCRIPTION

First self-published in 1921, Poultry Science is an internationally renowned monthly journal, known as the authoritative source for a broad range of poultry information and high-caliber research. The journal plays a pivotal role in the dissemination of preeminent poultry-related knowledge across all disciplines. As of January 2020, Poultry Science will become an Open Access journal with no subscription charges, meaning authors who publish here can make their research immediately, permanently, and freely accessible worldwide while retaining copyright to their work. Papers submitted for publication after October 1, 2019 will be published as Open Access papers.

An international journal, Poultry Science publishes original papers, research notes, symposium papers, and reviews of basic science as applied to poultry. This authoritative source of poultry information is consistently ranked by ISI Impact Factor as one of the top 10 agriculture, dairy and animal science journals to deliver high-caliber research. Currently it is the highest-ranked (by Impact Factor and Eigenfactor) journal dedicated to publishing poultry research. Subject areas include breeding, genetics, education, production, management, environment, health, behavior, welfare, immunology, molecular biology, metabolism, nutrition, physiology, reproduction, processing, and products.

IMPACT FACTOR.

ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus

ISI Web of Knowledge

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Robert L. Taylor, Jr, West Virginia University, Morgantown, West Virginia, United States

Managing Editor

David Busboom, Poultry Science Association, Champaign, Illinois, United States

Section Editors**Animal Well-Being and Behavior**

Raul Marin, CONICET-Institute of Food Science and Technology, Córdoba, Argentina

Bas Rodenburg, Utrecht University, Utrecht, Netherlands

Genetics, Genomics and Molecular Biology

Huaijun Zhou, University of California Davis, Davis, California, United States

Yuhua Farnell, Texas A&M University, College Station, Texas, United States

Immunology, Health, and Disease

Lisa Bielke, OHIO STATE UNIVERSITY, Columbus, Ohio, United States

Michael Kogut, USDA-ARS Southern Plains Agricultural Research Center, College Station, Texas,
United States

Management and Production

Juan Rodriguez-Lecompte, Atlantic Veterinary College, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada

Elijah Kiarie, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

Metabolism and Nutrition

Sunday Adedokun, University of Kentucky, Lexington, Kentucky, United States

Ken Bafundo, Phibro Animal Health Corp, United States

Rajesh Jha, University of Hawai'i at Manoa, Honolulu, Hawaii, United States

Mojtaba Yegani, Evonik Industries AG, Essen, Germany

Wei Zhai, Mississippi State University, Mississippi State, Mississippi, United States

Microbiology and Food Safety

Richard Gast, USDA-ARS Northeast Area, Beltsville, Maryland, United States

Physiology and Reproduction

Woo Kim, The University of Georgia, Athens, Georgia, United States

Israel Rozenboim, Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel

Processing and Products

Brian Bowker, USDA-ARS Northeast Area, Beltsville, Maryland, United States

Contemporary Issues

Robert L. Taylor, Jr, West Virginia University, Morgantown, West Virginia, United States

GUIDE FOR AUTHORS**SCOPE AND GENERAL INFORMATION AIMS AND SCOPE**

Poultry Science® will move to Gold Open Access (OA) per January 1st, 2020. Note that for manuscripts submitted after September 30th, 2019, an article processing charge (APC) is therefore payable after acceptance for

publication. The APC for Poultry Science is \$1500 for Poultry Science Association members, and \$2000 for non-members per article. It will be requested after peer review and acceptance. For more information please also view the PSA press announcement here and answers to frequently asked questions here.

First self-published in 1921, Poultry Science is an internationally renowned monthly journal, known as the authoritative source for a broad range of poultry information and high-caliber research. The journal plays a pivotal role in the dissemination of preeminent poultry-related knowledge across all disciplines. As of January 2020, Poultry Science will become an Open Access journal with no subscription charges, meaning authors who publish here can make their research immediately, permanently, and freely accessible worldwide while retaining copyright to their work. Papers submitted for publication after October 1, 2019 will be published as Open Access papers.

An international journal, Poultry Science publishes original papers, research notes, symposium papers, and reviews of basic science as applied to poultry. This authoritative source of poultry information is consistently ranked by ISI Impact Factor as one of the top 10 agriculture, dairy and animal science journals to deliver high-caliber research. Currently it is the highest-ranked (by Impact Factor and Eigenfactor) journal dedicated to publishing poultry research. Subject areas include breeding, genetics, education, production, management, environment, health, behavior, welfare, immunology, molecular biology, metabolism, nutrition, physiology, reproduction, processing, and products.

SUBMISSION

All manuscripts are submitted and reviewed via the journal's Editorial Manager manuscripts submission site at <https://www.editorialmanager.com/psj/default.aspx>. New authors should create an account prior to submitting a manuscript for consideration.

The submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submission Checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details: E-mail address Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript: Include keywords All figures (include relevant captions) All tables (including titles, description, footnotes) Ensure all figure and table citations in the text match the files provided Indicate clearly if

color should be used for any figures in print

Supplemental files (where applicable)

Further considerations Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked' 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 Internet) A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare Journal policies detailed in this guide have been reviewed Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

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, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), 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 service Crossref Similarity Check.

CONTACT INFORMATION

For information on the scientific content of the journal, contact the editor-in-chief, Dr. Robert L. Taylor, Division Director and Professor of Animal & Nutritional Sciences, West Virginia University, G038 Agricultural Science Building, P.O. Box 6108, Morgantown, WV 26506-6108; contact at PS- Editor@mail.wvu.edu.

For assistance with Editorial Manager manuscripts and manuscript submission, contact David Busboom at david.busboom@poultryscience.org.

For all other inquiries, visit the Elsevier Support Center. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

TYPES OF ARTICLES

Full-Length Articles

The journal emphasizes the importance of good scientific writing and clarity in presentation of the concepts, apparatus, and sufficient background information that would be required for thorough understanding by scientists in other disciplines. The results of experiments published in Poultry Science must be replicated, either

by replicating treatments within experiments or by repeating experiments. Care should be taken to ensure that experiments are adequately replicated.

Review Papers

Review papers are accepted only if they provide new knowledge or a high-caliber synthesis of important knowledge. Reviews are not exempt from pages charges. All Poultry Science guidelines for style and form apply.

Research Notes

Research Notes report the results of complete experiments but are less comprehensive than full-length articles. These short papers may convey preliminary or final data fulfilling one or more of the following criteria: a single experiment, low sample numbers, or limited replication. Manuscripts should be prepared according to the guidelines for full-length articles. The title of a Research Note must begin with the words "Research Note:". The running head shall be "RESEARCH NOTE." Results and Discussion should be a unified section with concise data interpretation. A conclusions heading is not permitted. Supplementary data are not permitted. These papers are limited to: 1) 3,000 words

or approximately nine typed, double-spaced pages; 2) two tables or figures or one of each; and 3) maximum ten (10) references. Authors must also indicate the section under which the manuscript is to be reviewed on the manuscript title page and on the Manuscript Submission Form. Editors may request that submitted full-length papers be revised for publication as Research Notes.

Symposium Papers

Symposium chair must decide whether or not the symposium is to be published and will inform the editor-in-chief of this decision at the January meeting. If the decision is not to publish the symposium, the individual authors retain the right to submit their papers for consideration for the journal as ordinary manuscripts. If publication is decided upon, all manuscript style and form guidelines of the journal shall be followed. If you are interested in publishing a symposium in Poultry Science, please contact the editor-in-chief for full guidelines.

Invited Papers

Invited papers are subject to review, and all manuscript style and form guidelines of the journal shall be followed. Invited papers are exempt from open access fee.

Invited Reviews

Invited Reviews will be approximately 10 published pages and in review format. Nominations or suggestions for potential timely reviews are welcomed and should be sent directly to the editor-in-chief.

Contemporary Issues

Contemporary Issues will address critical issues facing poultry scientists and the poultry industry. As such, submissions to this section should be of interest to any poultry scientist, to the industry, to instructors and faculty teaching contemporary issues classes, and to undergraduate and graduate students. The section will consist of short papers (approximately 2 published pages) written in essay format and will include an abstract, appropriate subheadings, and references.

Book Reviews

A limited number of book reviews will publish in Poultry Science. Book reviews shall be prepared in accordance to the style and form requirements of the journal, and they are subject to editorial revision. No fees will be assessed.

Letters to the Editor

The purpose of letters will be to discuss, critique, or expand on scientific points made in articles recently published in Poultry Science. Introduction of unpublished data will not be allowed, nor will material based on conjecture or speculation. Letters must be received within 6 months of an article's publication. Letters will be limited to 400 words and 5 references. The author(s) of the original paper(s) will be provided a copy of the letter and offered the opportunity to submit for consideration a reply within 30 days. Replies will have the same page restrictions and format as letters, and the titles shall end with "-Reply." Letters and replies will be published together. Letters and replies shall follow appropriate Poultry Science formatting and may be edited by the editor-in-chief and a technical editor. If multiple letters on the same topic are received, a representative letter concerning a specific article may be published. Letters and replies will be published as space permits.

JOURNAL POLICIES PEER REVIEW PROCESS

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper, frequently under the direction of a section editor with expertise in the manuscript topic. The Editor is responsible for

the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. For more information on the types of peer review, please visit: <https://www.elsevier.com/reviewers/peer-review>.

All submissions to the journal are initially reviewed by the editorial office. At this stage, manuscripts may be rejected without peer review if it is felt that they are not relevant to the journal's scope or do not conform to manuscript formatting requirements. This fast rejection process means that authors are given a quick decision and do not need to wait for the review process.

Manuscripts that pass initial screening will be forwarded to the appropriate section editor. The section editor may suggest rejection based on fatal design flaw, inappropriate replications, lack of novelty, or other major concerns. If appropriate, the paper will be sent out for peer review, usually to 2 independent reviewers who will provide comments. The section editor may recommend rejection or acceptance at this point, after which the manuscript and reviewer comments are made available to the editor-in-chief for a final decision to the authors. The manuscript will be sent back to the corresponding author for revision according to the guidelines of the reviewers. Authors have 6 weeks to complete the revision, which shall be returned to the section editor. Failure to return the manuscript within 6 weeks will lock the author out of re-submitting the revision.

Rejected manuscripts can be resubmitted only with an invitation from the section editor or editor-in-chief. Revised versions of previously rejected manuscripts are treated as new submissions.

PRE-SUBMISSION LANGUAGE EDITING

Please write your text in good English (American usage). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

POST-PRODUCTION CORRECTIONS

No correction to a paper already published will be carried out without an erratum or corrigendum (as applicable), this applies to articles in press and published within an issue. This means that any change carried out to a paper already published online will have a corresponding erratum or corrigendum published with its own separate DOI. Whether as an article in press or in an issue, if an erratum or corrigendum is published, the online version of the original paper will also be corrected online and the correction notice will mention this. Corrections will only be made if the publication record is seriously affected by the academic accuracy of published information.

Authors' corrections to Supplementary Data are made only in exceptional circumstances (for example major errors that compromise the conclusion of the study). Because the Supplementary Data is part of the original paper and hence the published record, the information cannot be updated if new data have become available or interpretations have changed.

ETHICS

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

CARE AND USE OF ANIMALS

Authors must make it clear that experiments were conducted in a manner that avoided unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. Experiments shall be conducted in accordance with the principles and specific guidelines presented in Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching, 3rd edition, 2010 (found here); and, if applicable, Guide for the

Care and Use of Laboratory Animals (United States Department of Human Health and Services, National Institutes of Health, Publication Number ISBN 0-309-05377-3, 1996); or Guide to the Care and Use of Experimental Animals, 2nd ed. Volume 1, 1993 (Canadian Council on Animal Care). Methods of killing experimental animals must be described in the text. In describing surgical procedures, the type and dosage of the anesthetic agent must be specified. Intra-abdominal and intrathoracic invasive surgery requires anesthesia. This includes caponization. The editor-in- chief of Poultry Science may refuse to publish manuscripts that are not compatible with these guides.

If rejected solely on that basis, however, the paper may be resubmitted for reconsideration when accompanied by a written verification that a committee on animal care in research has approved the experimental design and procedures involved.

THIRD PARTY COPYRIGHT

As a general rule, permission should be sought from the rights holder to reproduce any substantial part of a copyrighted work. This includes any text, illustrations, charts, tables, photographs, or other material from previously published sources. For more information on third party permissions, visit <https://www.elsevier.com/about/policies/copyright/permissions>.

DECLARATION OF INTEREST

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted.

2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

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 article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with

their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements: Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

PERMISSIONS REGARDING RE-USE OF ELSEVIER MATERIAL

No part of materials published in Poultry Science may be reproduced without written permission of the publisher.

For information on requesting permission to reuse Poultry Science, click on <https://www.elsevier.com/authors/journal-authors/policies-and-ethics>.

Some requests from other STM signatory publishers qualify for gratis reuse. See the STM website for details: <http://www.stm-assoc.org/permissions-guidelines/>.

Please visit the following website for permission forms and for more information about how to obtain permission to reproduce published data: <https://www.elsevier.com/about/company-information/policies/copyright/permissions>.

Questions about obtaining permission? Contact the Permissions Helpdesk at permissionshelpdesk@elsevier.com or +1-800-523-4069 x 3808.

COPYRIGHT

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). 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.

Author Rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

OPEN ACCESS

This is an open access journal: all articles will be immediately and permanently free for everyone to read and download. To provide open access, this journal has an open access fee (also known as an article publishing charge APC) which needs to be paid by the authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution. Permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Open access fee

The open access publication fee for this journal is USD 2000, excluding taxes. The open access publication fee is USD 1500 if the corresponding author listed on the title page is a member of the Poultry Science Association. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Shortly after acceptance, the corresponding author listed on the title page will be contacted regarding license options, funding information, and payment of the Open Access fee.

PREPARATION OF MANUSCRIPT MANUSCRIPT FORMATTING

General

Papers must be written in English. The text and all supporting materials must use American spelling and

usage as given in The American Heritage Dictionary, Webster's Third New International Dictionary, or the Oxford American English Dictionary. Authors should follow the style and form recommended in *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*. 2006. 7th ed. Style Manual Committee, Council of Science Editors, Reston, VA.

Preparing the manuscript file

Manuscripts should be typed double-spaced, with lines and pages numbered consecutively, using Times New Roman font at 12 points. All special characters (e.g., Greek, math, symbols) should be inserted using the symbols palette available in this font. Please submit math equations as editable text and not as images. Tables and figures should be placed in separate sections at the end of the manuscript (not placed within the text).

Use of word-processing software:

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Headings

Major headings

Major headings are centered (except ABSTRACT), all capitals, boldface, and consist of ABSTRACT, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION (or RESULTS AND DISCUSSION), ACKNOWLEDGMENTS (optional), APPENDIX (optional), and REFERENCES.

First subheadings

First subheadings are placed on a separate line, begin at the left margin, the first letter of all important words is capitalized, and the headings are boldface and italic. Text that follows a first subheading should be in a new paragraph.

Second subheadings

Second subheadings begin the first line of a paragraph. They are indented, boldface, italic, and followed by a period. The first letter of each important word should be capitalized. The text follows immediately after the final period of the subheading.

TITLE PAGE

The title page shall begin with a running head (short title) of not more than 45 characters. The running head is centered, is in all capital letters, and shall appear on the top of the title page. No abbreviations should be used.

The title of the paper must be in boldface; the first letter of the article title and proper names are capitalized, and the remainder of the title is lowercase. The title must not have abbreviations.

Under the title, names of authors should be typed (first name or initial, middle initial, last name). Affiliations will be footnoted using the following symbols: *, †, ‡, §, ¶, ||, and be placed below the author names. Do not give authors' titles, positions, or degrees. Numbered footnotes may be used to provide supplementary information, such as present address, acknowledgment of grants, and experiment station or journal series number. The corresponding author should be indicated with a numbered footnote (e.g., Corresponding author: name@university.edu).

Note that there is no period after the corresponding author's e-mail address. The title page shall include the name and full address of the corresponding author. Telephone numbers and e-mail address must also be provided. The title page must indicate the appropriate scientific section for the paper (i.e., Animal Well-Being and Behavior; Genetics and Genomics; Immunology, Health and Disease; Metabolism and Nutrition; Molecular and Cellular Biology; Physiology and Reproduction; Processing and Products; Microbiology and Food Safety; Management and Production).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, 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.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

ABBREVIATIONS

Author-derived abbreviations should be defined at first use in the abstract and again in the body of the manuscript. The abbreviation will be shown in bold type at first use in the body of the manuscript. Refer to the Miscellaneous Usage Notes for more information on abbreviations.

ABSTRACT

The Abstract disseminates scientific information through abstracting journals and through convenience for the readers. The Abstract, consisting of not more than 325 words, appears at the beginning of the manuscript with the word ABSTRACT without a following period. It must summarize the major objectives, methods, results, conclusions, and practical applications of the research. The Abstract must consist of complete sentences and use of abbreviations should be limited. References to other work and footnotes are not permitted. The Abstract and Key Words must be on a separate sheet of paper.

KEY WORDS

The Abstract shall be followed by a maximum of five key words or phrases to be used for subject indexing. These should include important words from the title and the running head and should be singular, not plural, terms (e.g., broiler, not broilers). Key words should be formatted as follows: Key words: . . .

ARTICLE STRUCTURE

Introduction

The Introduction, while brief, should provide the reader with information necessary for understanding research presented in the paper. Previous work on the topic should be summarized, and the objectives of the current research must be clearly stated.

Materials and methods

All sources of products, equipment, and chemicals used in the experiments must be specified parenthetically at first mention in text, tables, and figures [i.e., (model 123, ABC Corp., Provo, UT)]. Model and catalog numbers should be included. Information shall include the full corporate name (including division, branch, or other subordinate part of the corporation, if applicable), city, and state (country if outside the United States), or Web address. Street addresses need not be given unless the reader would not be able to determine the full address for mailing purposes easily by consulting standard references.

Age, sex, breed, and strain or genetic stock of animals used in the experiments shall be specified. Animal care guidelines should be referenced if appropriate.

Papers must contain analyzed values for those dietary ingredients that are crucial to the experiment. Papers dealing with the effects of feed additives or graded levels of a specific nutrient must give analyzed values for the relevant additive or nutrient in the diet(s). If products were used that contain different potentially active compounds,

then analyzed values for these compounds must be given for the diet(s). Exceptions can only be made if appropriate methods are not available. In other papers, authors should state whether experimental diets meet or exceed the National Research Council (1994) requirements as appropriate. If not, crude protein and metabolizable energy levels should be stated. For layer diets, calcium and phosphorus contents should also be specified.

When describing the composition of diets and vitamin premixes, the concentration of vitamins A and E should be expressed as IU/kg on the basis of the following equivalents:

Vitamin A

1 IU = 0.3 µg of all-trans retinol 1 IU = 0.344 µg of retinyl acetate 1 IU = 0.552 µg of retinyl palmitate

1 IU = 0.60 µg of β-carotene

Vitamin E

1 IU = 1 mg of dl-α-tocopheryl acetate 1 IU = 0.91 mg of dl-α-tocopherol 1 IU = 0.67 mg of d-α-tocopherol

In the instance of vitamin D3, cholecalciferol is the acceptable term on the basis that 1 IU of vitamin D3 = 0.025 µg of cholecalciferol.

The sources of vitamins A and E must be specified in parentheses immediately following the stated concentrations.

- Statistical analysis: Biology should be emphasized, but the use of incorrect or inadequate statistical methods to analyze and interpret biological data is not acceptable. Consultation with a statistician is recommended. Statistical methods commonly used in the animal sciences need not be described in detail, but adequate references should be provided. The statistical model, classes, blocks, and experimental unit must be designated. Any restrictions used in estimating parameters should be defined. Reference to a statistical package without reporting the sources of variation (classes) and other salient features of the analysis, such as covariance or orthogonal contrasts, is not sufficient. A statement of the results of statistical analysis should justify the interpretations and conclusions.

When possible, results of similar experiments should be pooled statistically. Do not report a number of similar experiments separately.

The experimental unit is the smallest unit to which an individual treatment is imposed. For group-fed animals, the group of animals in the pen is the experimental unit; therefore, groups must be replicated. Repeated chemical analyses of the same sample usually do not constitute independent experimental units. Measurements on the same experimental unit over time also are not independent and must not be considered as independent experimental units. For analysis of time effects, use time-sequence analysis.

- Usual assumptions are that errors in the statistical models are normally and independently distributed with constant variance. Most standard methods are robust to deviations from these assumptions, but occasionally data transformations or other techniques are helpful. For example, it is recommended that percentage data between 0 and 20 and between 80 and 100 be subjected to arc sin transformation prior to analysis. Most statistical procedures are based on the assumption that experimental units have been assigned to treatments at random. If animals are stratified by ancestry or weight or if some other initial measurement should be accounted

for, they should include a blocking factor, or the initial measurement should be included as a covariate.

- A parameter [mean (μ), variance (σ^2)], which defines or describes a population, is estimated by a statistic (\bar{x} , s^2). The term parameter is not appropriate to describe a variable, observation, trait, characteristic, or measurement taken in an experiment.

- Standard designs are adequately described by name and size (e.g., "a randomized complete block design with 6 treatments in 5 blocks"). For a factorial set of treatments, an adequate description might be as follows: "Total sulfur amino acids at 0.70 or 0.80% of the diet and Lys at 1.10, 1.20, or 1.30% of the diet were used in a 2 x 3 factorial arrangement in 5 randomized complete blocks consisting of initial BW." Note that a factorial arrangement is not a design; the term "design" refers to the method of grouping experimental units into homogeneous groups or blocks (i.e., the way in which the randomization is restricted).

- Standard deviation refers to the variability in a sample or a population. The standard error (calculated from error variance) is the estimated sampling error of a statistic such as the sample mean. When a standard deviation or standard error is given, the number of degrees of freedom on which it rests should be specified. When any statistical value (as mean or difference of 2 means) is mentioned, its standard error or confidence limit should be given. The fact that differences are not "statistically significant" is no reason for omitting standard errors. They are of value when results from several experiments are combined in the future. They also are useful to the reader as measures of efficiency of experimental techniques. A value attached by " \pm " to a number implies that the second value is its standard error (not its standard deviation). Adequate reporting may require only 1) the number of observations, 2) arithmetic treatment means, and 3) an estimate of experimental error. The pooled standard error of the mean is the preferred estimate of experimental error. Standard errors need not be presented separately for each mean unless the means are based on different numbers of observations or the heterogeneity of the error variance is to be emphasized. Presenting individual standard errors clutters the presentation and can mislead readers.

- For more complex experiments, tables of subclass means and tables of analyses of variance or covariance may be included. When the analysis of variance contains several error terms, such as in split-plot and repeated measures designs, the text should indicate clearly which mean square was used for the denominator of each F statistic. Unbalanced factorial data can present special problems. Accordingly, it is well to state how the computing was done and how the parameters were estimated. Approximations should be accompanied by cautions concerning possible biases.

- Contrasts (preferably orthogonal) are used to answer specific questions for which the experiment was designed; they should form the basis for comparing treatment means. Nonorthogonal contrasts may be evaluated by Bonferroni t statistics. The exact contrasts tested should be described for the reader. Multiple-range tests are not appropriate when treatments are orthogonally arranged. Fixed-range, pairwise, multiple-comparison tests should be used only to compare means of treatments that are unstructured or not related. Least squares means are the correct means to use for all data, but arithmetic means are identical to least squares means unless the design is unbalanced or contains missing values or an adjustment is being made for a covariate. In factorial treatment arrangements, means for main effects should be presented when important interactions are not present. However, means for individual treatment combinations also should be provided in table or text so that future researchers may combine data from several experiments to detect important interactions. An interaction may not be detected in a given experiment because of a limitation in the number of observations.

- The terms significant and highly significant traditionally have been reserved for $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively; however, reporting the P-value is preferred to the use of these terms. For example, use ". . . there was a difference ($P < 0.05$) between control and treated samples" rather than ". . . there was a significant ($P < 0.05$) difference between control and treated samples." When available, the observed significance level (e.g., $P = 0.027$) should be presented rather than merely $P < 0.05$ or $P < 0.01$, thereby allowing the reader to decide what to reject. Other probability (α) levels may be discussed if properly qualified so that the reader is not misled. Do not report P-values to more than 3 places after the decimal. Regardless of the probability level used, failure to reject a hypothesis should be based on the relative consequences of type I and II errors. A "nonsignificant" relationship should not be interpreted to suggest the absence of a relationship. An inadequate number of experimental units or insufficient control of variation limits the power to detect relationships. Avoid the ambiguous use of $P > 0.05$ to declare nonsignificance, such as indicating that a difference is not significant at $P > 0.05$ and subsequently declaring another difference significant (or a tendency) at $P < 0.09$. In addition, readers may incorrectly interpret the use of $P > 0.05$ as the probability of a β error, not an α error.

- Present only meaningful digits. A practical rule is to round values so that the change caused by rounding is less than one-tenth of the standard error. Such rounding increases the variance of the reported value by less than 1%, so that less than 1% of the relevant information contained in the data is sacrificed. Significant digits in data reported should be restricted to 3 beyond the decimal point, unless warranted by the use of specific methods.

Results and discussion

Results and Discussion sections may be combined, or they may appear in separate sections. If separate, the Results section shall contain only the results and summary of the author's experiments; there should be no literature comparisons. Those comparisons should appear in the Discussion section. Manuscripts reporting sequence data must have GenBank accession numbers prior to submitting. One of the hallmarks for experimental evidence is repeatability. Care should be taken to ensure that experiments are adequately replicated. The results of experiments must be replicated, either by replicating treatments within experiments or by repeating experiments.

Acknowledgements

An Acknowledgments section, if desired, shall follow the Discussion section. Acknowledgments of individuals should include affiliations but not titles, such as Dr., Mr., or Ms. Affiliations shall include institution, city, and state.

Appendix A technical Appendix, if desired, shall follow the Discussion section or Acknowledgments, if present. The Appendix may contain supplementary material, explanations, and elaborations that are not essential to other major sections but are helpful to the reader. Novel computer programs or mathematical computations would be appropriate. The Appendix will not be a repository for raw data.

REFERENCES

Citations in text

In the body of the manuscript, refer to authors as follows: Smith and Jones (1992) or Smith and Jones (1990, 1992). If the sentence structure requires that the authors' names be included in parentheses, the proper format is (Smith and Jones, 1982; Jones, 1988a,b; Jones et al., 1993). Where there are more than two authors of one article, the first author's name is followed by the abbreviation et al. More than one article listed in the same sentence of text must be in chronological order first, and alphabetical order for two publications in the same year. Work that has not been accepted for publication shall be listed in the text as: "J. E. Jones (institution, city, and state, personal communication)." The author's own unpublished work should be listed in the text as "(J. Smith, unpublished data)." Personal communications and unpublished data must not be included in the References section.

References section

To be listed in the References section, papers must be published or accepted for publication. Manuscripts submitted for publication can be cited as "personal communication" or "unpublished data" in the text.

In the References section, references shall first be listed alphabetically by author(s)' last name(s), and then chronologically. The year of publication follows the authors' names. As with text citations, two or more publications by the same author or set of authors in the same year shall be differentiated by adding lowercase letters after the date. The dates for papers with the same first author that would be abbreviated in the text as et al., even though the second and subsequent authors differ, shall also be differentiated by letters. All authors' names must appear in the Reference section. Journals shall be abbreviated according to the conventional ISO abbreviations given in journals database of the National Library of Medicine. One-word titles must be spelled out. Inclusive page numbers must be provided. Sample references are given below. Consult recent issues of Poultry Science for examples not included below.

N.B. - The online version of Poultry Science uses a reference format that differs from that prescribed by the journal. The Guide for Authors is the sole source for the reference format. Any papers that do not follow this format risk rejection.

Article:

Bagley, L. G., and V. L. Christensen. 1991. Hatchability and physiology of turkey embryos incubated at sea level with increased eggshell permeability. *Poult. Sci.* 70:1412-1418.

Bagley, L. G., V. L. Christensen, and R. P. Gildersleeve. 1990. Hematological indices of turkey embryos incubated at high altitude as affected by oxygen and shell permeability. *Poult. Sci.* 69:2035- 2039.

Witter, R. L., and I. M. Gimeno. 2006. Susceptibility of adult chickens, with and without prior vaccination, to challenge with Marek's disease virus. *Avian Dis.* 50:354-365. doi:10.1637/7498-010306R.1

Book:

Metcalfe, J., M. K. Stock, and R. L. Ingermann. 1984. The effects of oxygen on growth and development of the chick embryo. Pages 205- 219 in *Respiration and Metabolism of Embryonic Vertebrates*. R. S. Seymour, ed. Dr. W. Junk, Dordrecht, the Netherlands.

National Research Council. 1994. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Federal Register:

Department of Agriculture, Plant and Animal Health Inspection Service. 2004. Blood and tissue collection at slaughtering and rendering establishments, final rule. 9CFR part 71. Fed. Regis. 69:10137-10151.

Other:

Choct, M., and R. J. Hughes. 1996. Long-chain hydrocarbons as a marker for digestibility studies in poultry. *Proc. Aust. Poult. Sci. Symp.* 8:186. (Abstr.)

Dyro, F. M. 2005. Arsenic. WebMD. Accessed Feb. 2006. [http:// www.emedicine.com/neuro/topic20.htm](http://www.emedicine.com/neuro/topic20.htm).

El Halawani, M. E., and I. Rosenboim. 2004. Method to enhance reproductive performance in poultry. Univ. Minnesota, as- signee. US Pat. No. 6,766,767.

Hruby, M., J. C. Remus, and E. E. M. Pierson. 2004. Nutritional strategies to meet the challenge of feeding poultry without antibiotic growth promotants. *Proc. 2nd Mid-Atlantic Nutr. Conf.*, Timonium, MD. Univ. Maryland, College Park.

Luzuriaga, D. A. 1999. Application of computer vision and electronic nose technologies for quality assessment of color and odor of shrimp and salmon. PhD Diss. Univ. Florida, Gainesville.

Peak, S. D., and J. Brake. 2000. The influence of feeding program on broiler breeder male mortality. *Poult. Sci.* 79(Suppl. 1):2. (Abstr.)

TABLES

Tables must be created using the MS Word table feature and inserted in the manuscript after the references section. When possible, tables should be organized to fit across the page without running broadside. Be aware of the dimensions of the printed page when planning tables (use of more than 15 columns will create layout problems). Place the table number and title on the same line above the table. The table title does not require a period. Do not

use vertical lines and use few horizontal lines. Use of bold and italic typefaces in the table should be done sparingly; you must define such use in a footnote. Each table must be on a separate page. To facilitate placement of all tables into the manuscript file (just after the references) authors should use "section breaks" rather than "page breaks" at the end of the manuscript (before the tables) and between tables.

Units of measure for each variable must be indicated. Papers with several tables must use consistent format. All columns must have appropriate headings. Abbreviations not found on the inside front cover of the journal must be defined in each table and must match those used in the text. Footnotes to tables should be marked by superscript numbers. Each footnote should begin a new line. Superscript letters shall be used for the separation of means in the body of the table and explanatory footnotes must be provided [i.e., "Means within a row lacking a common superscript differ ($P < 0.05$)."]; other significant P-values may be specified. Comparison of means within rows and columns should be indicated by different series of superscripts (e.g., a,b, . . . in rows; x-z . . . in columns) The first alphabetical letter in the series (e.g., a or A) shall be used to indicate the largest mean. Lowercase superscripts indicate $P \leq 0.05$. Uppercase letters indicate $P \leq 1.1$ or less.

Probability values may be indicated as follows: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, and † $P \leq 0.10$. Consult a recent issue of Poultry Science for examples of tables.

Generally, results should be presented to the significant figure of the instrument used to collect the data. For example, results should not be presented to 5 digits when the instrument used only reads to 2 digits.

MISCELLANEOUS USAGE NOTES

Abbreviations

- Abbreviations shall not be used in the title, key words, or to begin sentences, except when they are widely known throughout science (e.g., DNA, RNA) or are terms better known by abbreviation (e.g., IgG, CD). A helpful criterion for use of abbreviation is whether it has been accepted into thesauri and indexes widely used for searching major bibliographic databases in the scientific field. Abbreviations may be used in heads within the paper, if they have been first defined within the text. The inside back cover of every issue of the journal lists abbreviations that can be used without definition. The list is subject to revision at any time, so authors should always consult the most recent issue of the journal for relevant information. Abbreviations are allowed when they help the flow of the manuscript;

however, excessive use of abbreviations can confuse the reader. The suitability of abbreviations will be evaluated by the reviewers and editors during the review process and by the technical editor during editing. As a rule, author-derived abbreviations should be in all capital letters. Terms used less than three times must be spelled out in full rather than abbreviated. All terms are to be spelled out in full with the abbreviation following in bold type in parentheses the first time they are mentioned in the main body of the text. Abbreviations shall be used consistently thereafter, rather than the full term.

- The abstract, text, each table, and each figure must be understood independently of each other.

Therefore, abbreviations shall be defined within each of these units of the manuscript.

- Plural abbreviations do not require "s." Chemical symbols and three-letter abbreviations for amino acids do not need definition. Units of measure, except those in the standard Poultry Science abbreviation list, should be abbreviated as listed in the CRC Handbook for Chemistry and Physics (CRC Press, 2000 Corporate Blvd., Boca Raton, FL, 33431) and do not need to be defined.

- The following abbreviations may be used without definition in Poultry Science:

A adenine

ADG average daily gain

ADFI average daily feed intake

AME apparent metabolizable energy

AMEn nitrogen-corrected apparent metabolizable energy ANOVA analysis of variance

B cell bursal-derived, bursal-equivalent derived cell bp base pairs BSA bovine serum albumin

BW body weight C cytosine

cDNA complementary DNA cfu colony-forming units CI confidence interval

CP crude protein

cpm counts per minute

CV coefficient of variation d day df degrees of freedom

DM dry matter

DNA deoxyribonucleic acid

EDTA ethylenediaminetetraacetate

ELISA enzyme-linked immunosorbent antibody assay EST expressed sequence tag

g gram g gravity G guanine

GAT glutamic acid-alanine-tyrosine G:F gain-to-feed ratio

GLM general linear model h hour

HEPES N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-ethane-sulfonic acid HPLC high-performance (high-pressure)

liquid chromatography ICU international chick units

Ig immunoglobulin IL interleukin

IU international units kb kilobase pairs kDa kilodalton L liter*

L:D hours light:hours darkness in a photoperiod (e.g., 23L:1D) m meter

μ micro M molar

MAS marker-assisted selection ME metabolizable energy

MEn nitrogen-corrected metabolizable energy MHC major histocompatibility complex

mRNA messenger ribonucleic acid min minute mo month

MS mean square

n number of observations N normal

NAD nicotinamide adenine dinucleotide

NADH reduced nicotinamide adenine dinucleotide NRC National Research Council

NS not significant

PAGE polyacrylamide gel electrophoresis PBS phosphate-buffered saline

PCR polymerase chain reaction pfu plaque-forming units QTL quantitative trait loci r correlation coefficient

r² coefficient of determination, simple R² coefficient of determination, multiple R² relative humidity

RIA radioimmunoassay

rpm revolutions per minute s second SD standard deviation

SDS sodium dodecyl sulphate SE standard error

SEM standard error of the mean SRBC sheep red blood cells

SNP single nucleotide polymorphism T thymine

TBA thiobarbituric acid

T cell thymic-derived cell

TME true metabolizable energy

TMen nitrogen-corrected true metabolizable energy Tris tris(hydroxymethyl)aminomethane

TSAA total sulfur amino acids U uridine

USDA United States Department of Agriculture UV ultraviolet

vol/vol volume to volume vs. versus

wt/vol weight to volume wt/wt weight to weight wk week

yr year

*Also capitalized with any combination, e.g., mL.

International words and phrases

Non-English words in common usage (defined in recent editions of standard dictionaries) will not appear in italics (e.g., *in vitro*, *in vivo*, *in situ*, *a priori*). However, genus and species of plants, animals, or bacteria and viruses should be italicized. Authors must indicate accent marks and other diacriticals on international names and institutions. German nouns shall begin with capital letters.

Capitalization

Breed and variety names are to be capitalized (e.g., Single Comb White Leghorn). 2

Number style

Numbers less than 1 shall be written with preceding zeros (e.g., 0.75). All numbers shall be written as digits. Measures must be in the metric system; however, US equivalents may be given in parentheses. Poultry Science requires that measures of energy be given in calories rather than joules, but the equivalent in joules may be shown in parentheses or in a footnote to tables. Units of measure not preceded by numbers must be written out rather than abbreviated (e.g., lysine content was measured in milligrams per kilogram of diet) unless used parenthetically. Measures of variation must be defined in the Abstract and in the body of the paper at first use. Units of measure for feed conversion or feed efficiency shall be provided (i.e., g:g).

Nucleotide sequences

Nucleotide sequence data must relate to poultry or poultry pathogens and must complement biological data published in the same or a companion paper. If sequences are excessively long, it is suggested that the most relevant sections of the data be published in Poultry Science and the remaining sequences be submitted to one of the sequence databases. Acceptance for publication is contingent on the submission of sequence data to one of the databases. The following statement should appear as a footnote to the title on the title page of the manuscript. "The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to Embank Submission (Mail Stop K710, Los Alamos National Laboratories, Los Alamos, NM 87545) nucleotide sequence database and have been assigned the accession number XNNNNN." Publication of the description of molecular clones is assumed by the editors to place them in the public sector. Therefore, they shall be made available to other scientists for research purposes.

Nucleotide sequences must be submitted as camera-ready figures no larger than 21.6 x 27.9 cm in standard (portrait) orientation. Abbreviations should follow Poultry Science guidelines.

Gene and protein nomenclature

Authors are required to use only approved gene and protein names and symbols. For poultry, full gene names should not be italicized. Gene symbols should be in uppercase letters and should be in italics. A protein symbol should be in the same format as its gene except the protein symbol should not be in italics.

General usage

- Note that "and/or" is not permitted; choose the more appropriate meaning or use "x or y or both."
- Use the slant line only when it means "per" with numbered units of measure or "divided by" in equations. Use only one slant line in a given expression (e.g., g/d per chick). The slant line may not be used to indicate ratios or mixtures.
- Use "to" instead of a hyphen to indicate a range. Insert spaces around all signs (except slant lines) of operation (=, -, +, x, >, or <, etc.) when these signs occur between two items.
- Items in a series should be separated by commas (e.g., a, b, and c).
- Restrict the use of "while" and "since" to meanings related to time.
- Appropriate substitutes include "and," "but," or "whereas" for "while" and "because" or "although" for "since."
- Leading (initial) zeros should be used with numbers less than 1 (e.g., 0.01).
- Commas should be used in numbers greater than 999.
- Registered (®) and trademark (©) symbols should not be used, unless as part of an article title in the References section. Trademarked product names should be capitalized.

FIGURES/ILLUSTRATIONS

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

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

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, 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 (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), 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 online (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 online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services

Elsevier's Author Services offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

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.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Ensure that the supplementary material is referred to in the main manuscript at an appropriate point in the text. Supplementary material will be available online only and will not be copyedited, so ensure that it is clearly and succinctly presented, and that the style conforms to the rest of the paper. Also ensure that the presentation will work on any Internet browser. It is not recommended for the files to be more than 2 MB each, although exceptions can be made at the editorial office's discretion.

ADDITIONAL INFORMATION ABOUT ACCEPTED MANUSCRIPTS PROOFS

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to their proof. Please annotate and upload your

edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. 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. 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.

ARTICLES IN PRESS

For Poultry Science, manuscripts arrive at Elsevier and go through the production process until the final versions are ready to publish. These are then published on the journal's articles in press page. They will remain on the page up until the issue that they are assigned to is published.

OFFPRINTS

For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services.

Open access

Please visit our Open Access page from the Journal Homepage for more information.

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>