



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ISABELLA GUARTIERI DA SILVA

**DIFERENTES SISTEMAS NUTRICIONAIS INFLUENCIAM NA MACIEZ DA CARNE
DE BORREGAS SEM ALTERAR A EXPRESSÃO GÊNICA**

ISABELLA GUARTIERI SILVA

**DIFERENTES SISTEMAS NUTRICIONAIS INFLUENCIAM NA MACIEZ DA CARNE
DE BORREGAS SEM ALTERAR A EXPRESSÃO GÊNICA**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência Animal

Área de concentração: Nutrição Animal

Orientadora Dra Marilice Zundt

636.308
S586d

Silva, Isabella Guartieri da.

Diferentes sistemas nutricionais influenciam na maciez da carne de borregas sem alterar a expressão gênica / Isabella Guartieri da Silva. – Presidente Prudente, 2021.

66 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2021.

Bibliografia.

Orientador: Marilice Zundt.

1. Caspase-3. 2. μ -Calpaína. 3. Calpastatina. 4. Ovis aries. RT-qPCR. I. Título.

ISABELLA GUARTIERI DA SILVA

**DIFERENTES SISTEMAS NUTRICIONAIS INFLUENCIAM NA MACIEZ DA CARNE
DE BORREGAS SEM ALTERAR A EXPRESSÃO GÊNICA**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de
Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade
do Oeste Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Nutrição Animal

Presidente Prudente, 27 de Setembro de 2021

BANCA EXAMINADORA

Orientador (a) Prof. Dra. Marilice Zundt
Universidade do Oeste Paulista
Presidente Prudente SP

Prof. Dra. Ines Cristina Giometti
Universidade do Oeste Paulista
Presidente Prudente SP

Prof. Dr. Edson Luis de Azambuja Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina
Londrina PR

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista ao meu filho, Bernardo Guartieri, luz da minha vida!
Tudo que faço nesse mundo é para e por você!

À minha amada e querida avó Joaquina (*in memoriam*) que com certeza estaria em festa a me ver concluir mais essa etapa em minha vida. De onde estiver, obrigada por me amar tanto!

Aos meus pais por todo apoio, cuidando do meu filho enquanto eu estava no Campus e todo fomento para eu estudar, durante toda minha vida.

Meu pai por ser um exemplo de homem, me concedendo o direito de escolha em cada âmbito de minha existência e principalmente por fomentar minha vida científica.

À minha orientadora Dra. Marilice Zundt que além de exemplo científico, é um exemplo de mãe, mulher, amiga e ser humano que admiro demais! Não posso deixar de dedicar esse feito a ela, por toda a paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou neste trabalho e em todos aqueles que realizamos durante meu mestrado.

À minha amiga Leticia Jalloul que se mostrou uma irmã durante todo esse período, por todo apoio na minha vida pessoal desde sempre e por tanto carinho e cuidado com meu filho.

A todos os docentes e colaboradores da Unoeste.

E todos os que torceram por mim.

Viva a pesquisa científica!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha orientadora, professora Dra. Marilice Zundt por ter aceitado acompanhar-me neste projeto. O seu empenho foi de suma importância para a minha motivação à medida que as dificuldades foram surgindo ao longo do percurso. Toda sua paciência, dedicação e confiança por ter depositado em minhas mãos, algo tão incrível e inovador para todos nós. Os ensinamentos compartilhados de forma admirável e por ter aceitado me guiar nos primeiros passos da pós-graduação, foi louvável. Muito obrigada por tudo! A gratidão e o amor que tenho por você, transpassa essa vida, pode ter certeza!

Agradeço a todos envolvidos neste projeto, desde sua idealização até sua realização. Minha amiga de caminhada, a doutoranda mais querida que conheço, Letícia Jalloul, por toda ajuda pessoal e científica, não sei o que seria da minha vida dentro e fora da Pós graduação sem você.

À professora Dra. Ines Giometti por ter se dedicado a nossa pesquisa com tanto afinho e paciência, explicado sempre com muita cautela e ter tratado todo mundo com muito carinho. Obrigada por compartilhar seu vasto conhecimento!

À professora Dra. Caliê Castilho que teve a brilhante ideia de realizar essa pesquisa e sempre ter me incentivado demais com palavras incríveis que jamais vou me esquecer.

À Gabriela Soriano que esteve envolvida no início de tudo. Às alunas da graduação que coletaram o material, Gabriella Capitane e Veridiana Paiano, à responsável pelo laboratório de Citogenética e Biologia Molecular, Mayara Vidotto, por todo conhecimento, paciência e carinho. À aluna de doutorado, Aline de Oliveira Souza, que dispôs de seu tempo, realizando as primeiras análises de extração de RNA e a aluna da graduação Mylena Guaberto pelo apoio na realização em alguns procedimentos no laboratório.

À Keid Kruger por toda paciência e socorro toda vez que solicitada.

Às colaboradoras da limpeza Valquiria e Andreia, por passarem o horário de almoço comigo quando eu tinha que ficar o dia todo no Campus II.

À coordenação e todos os professores da Pós Graduação em Ciência Animal, por todo conhecimento agregado em minha vida pessoal e profissional.

EPÍGRAFE

“O conhecimento tem um começo, mas não tem um fim.” (Geeta Iyengar)

RESUMO

Diferentes sistemas nutricionais influenciam na maciez da carne de borregas sem alterar a expressão gênica

A alimentação é fator determinante nas diversas características da carne ovina, sendo que os animais alimentados com maiores proporções de concentrado apresentam carnes com maior teor de gordura, que por sua vez, aumenta a sensação maciez sendo o complexo enzimático calpaína e calpastatina o principal mecanismo que leva ao amaciamento da carne. Os objetivos foram avaliar o efeito da suplementação de borregas terminadas em diferentes planos nutricionais, sobre a expressão gênica da caspase-3, μ -calpaína, m-calpaína e calpastatina e sua possível associação com a qualidade da carne. Foram utilizadas amostras do músculo *Longissimus lumborum* de 24 borregas, distribuídas em 3 grupos: P (pasto - 70 a 80% da exigência nutricional), PS (pasto e suplemento - 100 a 110% da exigência nutricional) e C (confinamento, fornecido 140% da exigência). Foram realizadas análises físico-químicas para análise centesimal, pH, marmoreio, oxidação lipídica e força de cisalhamento e também a RT-qPCR para a análise de expressão gênica relativa dos seguintes genes: CASP3 (caspase 3), CAST (calpastatina), CAPN1 (μ -calpaína) e CAPN2 (m-calpaína). Houve diferença estatística para o extrato etéreo, força de cisalhamento e oxidação lipídica entre os tratamentos, em contrapartida, na expressão dos genes não houve diferença. Há aumento do extrato etéreo na carne dos animais confinados, pois o maior aporte energético na nutrição aumenta esta variável. Os animais mantidos somente a pasto têm menor oxidação lipídica na carne que os outros tratamentos por conta da maior ingestão de vitamina E oriunda do pasto. A força de cisalhamento é consideravelmente maior na carne dos animais mantidos somente a pasto, porém ainda é considerada macia. A nutrição das borregas não interfere na expressão gênica de CASP3, CAPN1, CAPN2 e CAST.

Palavras-chave: μ -Calpaína. Calpastatina. Caspase-3. *Ovis aries*. RT-qPCR.

ABSTRACT

Different nutritional systems influence the tenderness of ewe lamb meat without changing gene expression

Feeding is a determining factor in the various characteristics of sheep meat, and animals fed with higher proportions of concentrate have meats with higher fat content, which in turn increases the tenderness sensation, with the enzyme complex calpain and calpastatin being the main one mechanism that leads to tenderization of the meat. The objective were to evaluate the effect of supplementation of lambs finished in different nutritional plans on the gene expression of caspase-3, μ -calpain, m-calpain and calpastatin and its possible association with meat quality. Samples of the *Longissimus lumborum* muscle from 24 ewes were used, divided into 3 groups: P (pasture - 70 to 80% of the nutritional requirement), PS (pasture and supplement - 100 to 110% of the nutritional requirement) and C (feedlot, provided 140% of the requirement). Physicochemical analyzes were performed for proximate analysis, pH, marbling, lipid oxidation and shear force and also RT-qPCR for the analysis of relative gene expression of the following genes: CASP3 (caspase 3), CAST (calpastatin), CAPN1 (μ -calpain) and CAPN2 (m-calpain). There was statistical difference for ether extract, shear force and lipid oxidation between treatments, on the other hand, there was no difference in gene expression. There is an increase in the ether extract in the meat of confined animals, as the greater energy input in nutrition increases this variable. Animals kept only on pasture have lower lipid oxidation in meat than other treatments due to the higher intake of vitamin E from pasture. The shear force is considerably higher in the meat of animals kept only on pasture, but it's still considered soft. The nutrition of lambs does not interfere with the gene expression of CASP3, CAPN1, CAPN2 and CAST.

Keywords: μ -Calpain. Calpastatin. Caspase-3. *Ovis aries*. RT-qPCR.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Celsius
B2M – β -2-microglobulina
C – Confinamento
CAPN - Calpaína
CAPN1 – Calpaína 1 ou μ -calpaína
CAPN2 – Calpaína 2 ou m-calpaína
CAPNs - calpaínas
CASP3 – Caspase 3
CASPs - Caspases
CAST – Calpastatina
cm - Centímetros
cv – Cultivar
EE – Extrato etéreo
FC – Força de cisalhamento
FDA – Fibra de detergente ácido
FDN – Fibra de detergente neutro
g – grama
GMD – Ganho médio diário
HMBS – Hidroximetilbilanosintase
IATF – Inseminação artificial em tempo fixo
Kg - Quilograma
m² - Metro quadrado
mg – Miligrama
mm – Milímetros
MM – Matéria mineral
NDT – Nutrientes digestíveis totais
N - Newton
Nm – Nanômetros
OPG – Ovos por grama de fezes
P – Pasto
PA – Peso de abate
PCR – Polimerase chain reaction

PB – Proteína bruta

pH - Potencial hidrogeniônico

PI – Peso inicial

PS – Pasto + suplemento

RT-qPCR – Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

T'BARS - Ácido 2-tiobarbitúrico

TBP – Proteína ligadora de TATA BOX

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO	122
ANEXO A - APROVAÇÃO DO CEUA	48
ANEXO B - NORMAS DA REVISTA SEMINA (QUALIS CAPES B1, FATOR DE IMPACTO 0,564).....	55
ANEXO C - NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURA (QUALIS CAPES A2, FATOR DE IMPACTO 2.240).....	65

RNA abundance of genes related to sheep meat quality: a review

Abundância de RNA de genes relacionados à qualidade da carne ovina: uma revisão

Isabella Quartieri Da Silva¹; Ines Cristina Giometti¹; Calie Castilho¹; Leticia Jalloul Guimarães¹; Aline De Oliveira Santos¹; Gabriella Capitane Sena²; Fabiola Cristine De Almeida Rêgo³; Edson Luis de Azambuja Ribeiro⁴; Marilice Zundt¹ *.

Highlights

Different diets act on important variables in meat quality.

Relevance of the association of genes of interest in livestock.

Gene expression related to meat quality may depend on food.

Abstract

The development of strategies that add value to meat can represent opportunities for sheep farming and it is known that food influences different characteristics of meat. The concept of quality meat is complex and with many variables, being mainly influenced by genetics and nutrition. Thus, the strategy of associating genes with characteristics of economic interest is widely discussed in animal production. In the postmortem, proteolytic degradation modifies the architecture and integrity of structural proteins and, consequently, they act on meat tenderness. There is the theory that caspases are the main enzymes involved in the initiation and execution of apoptosis, which is an important process that occurs in multicellular organisms, both during development and for the maintenance of tissue homeostasis. The calpastatin gene (CAST) and the calpain gene (CAPN) are potential genes for meat quality due to their proteolytic activities. To study the expression of these genes, the RT-qPCR technique is widely used to verify gene expression, as it analyzes the RNA responsible for protein synthesis. If there is a specific protein present, it is because its gene is being expressed and giving rise to RNA for that protein. Researches have shown that for years the action of the calpain-calpastatin complex acts directly on muscle proteolysis, actively acting in the transformation of muscle into meat and being directly responsible for its quality.

Keywords: μ -Calpain. Calpastatin. m-Calpain. *Ovis Aries*. RT-qPCR.

Resumo

O desenvolvimento de estratégias que agreguem valor à carne pode representar oportunidades para a ovinocultura e sabe-se que a alimentação influencia diversas características da carne. O conceito de carne de qualidade é complexo e com muitas variáveis, sendo influenciada principalmente pela genética e nutrição. Dessa forma a estratégia de associação de genes com características de interesse econômico é bastante abordada na produção animal. No *post mortem*

a degradação proteolítica modifica a arquitetura e integridade das proteínas estruturais e consequentemente atuam na maciez da carne. Há a teoria que as caspases são as principais enzimas envolvidas no início e na execução da apoptose que é um importante processo que ocorre em organismos multicelulares, tanto durante o desenvolvimento quanto para a manutenção da homeostase do tecido. O gene da calpastatina (CAST) e o gene da calpaína (CAPN), são genes potenciais para a qualidade da carne em função das atividades proteolíticas que desempenham. Para estudar a expressão desses genes, utiliza-se a técnica de RT-qPCR que é amplamente utilizada para verificar a expressão gênica, uma vez que analisa o RNA responsável pela síntese de proteínas. Se há uma proteína específica presente, é porque o gene da mesma está sendo expresso e originando RNA para tal proteína. Pesquisas têm mostrado que há anos a ação do complexo calpaína-calpastatina atua diretamente na proteólise muscular, agindo ativamente na transformação do músculo em carne e sendo diretamente responsável pela qualidade da mesma.

Palavras-chave: μ -Calpaína. Calpastatina. m-Calpaína. *Ovis aries*. RT-qPCR.

1 Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. E-mail: isa.zootecnista@live.com; inesgiometti@yahoo.com.br; calie@unoeste.br; o_aline@hotmail.com; leticia_jg@hotmail.com; marilicezundt@gmail.com*

2 Faculdade de Ciências Agrárias, Curso de Zootecnia, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil. E-mail: gcapitane@hotmail.com.

3 Universidade Norte do Paraná – UNOPAR, Arapongas, Paraná, Brasil. E-mail: fabiolaregogrecco@gmail.com.

4 Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brasil. E-mail: elar@uel.com

*Autor para correspondência

Introduction

The development of differentiation and value-adding strategies for sheep meat in order to meet consumer demands may represent opportunities for the agro-industrial sheep farming system (Deliza *et al.*, 2019). It is known that food influences several characteristics of meat, in which animals fed higher proportions of concentrate tend to have meat with higher fat content, which in turn increases the sensation of juiciness and tenderness (Moreno *et al.*, 2015).

The concept of quality meat is complex and has many variables, being mainly influenced by genetics, and other factors such as sex, age, nutrition, pre and post slaughter management. Among the meat quality characteristics, tenderness is the main one (Anderson *et al.*, 2012). The determination of meat quality comes if becoming more and more objective, based on chemical and physical tests, and the diet directly influences the composition of the meat (Gois *et al.*, 2017).

Improving animal productivity requires a better understanding of the structure and function of animal genomes and how they interact with non-genetic components of production systems (nutrition, environment) so that management practices can be optimized to improve performance, making the association of certain genes with meat quality an important factor (Rexhoad *et al.*, 2019). Recently, the calpain/calpastatin proteolytic systems have been investigated at mRNA level (Rubio-Lozano *et al.*, 2016). However, the mRNA expression of genes does not always explain the differences in myofibrillar proteolysis in skeletal muscle of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle (Giusti *et al.*, 2013).

The qPCR protocol allows for direct quantitative analysis of relative RNA expression, it is of utmost importance that the sample material is of high quality, that is, RNA not degraded or fragmented, for the classical gene expression profile it well documented. Therefore, RNA quality analysis is a valuable tool in the preparation of methods such as RT-qPCR and microarray analysis (Becker *et al.*, 2010).

Meat quality

Consumers are developing new habits related to meat products, conducive to growing demand for sheep meat and its derivatives. For these consumers to have a good acceptance of this product, it is necessary to produce animals that meet the needs of the market and that present quality standards (Guerrero & Sañudo, 2019).

The physicochemical characteristics are those that directly affect the market, being subjected to several factors of variation before mortem and post mortem, including the combination of flavor, juiciness, texture, tenderness and appearance of the product (Gois *et al.*, 2017).

Proximate composition is a chemical-bromatological analysis and defined as a quantification of the chemical components of muscle such as proteins, water, ether extract and

mineral matter (Pitombo *et al.*, 2013). The average proximate composition of sheep meat is 75% moisture, 19% protein, 4% fat and 1.1% mineral matter, being largely influenced by the feeding and finishing of the animals (Lopes, Sales, Azevedo & Oliveira, 2012).

All the agents within the meat chain should be involved so that a quality, like the water it's the most important constituent of meat, this constant concentration from one muscle to another will affect the quality of the meat, whether in juiciness, texture, flavor or color (Guerrero, Valero, Campo & Sañudo, 2013).

According to Costa *et al.* (2011) the final pH of meat around 5.5, close to the isoelectric point of proteins and, with the absence of the attractive force existing between the muscle fibers, provided by the difference in positive and negative charges, favors the distance between the myofilaments that constitute the muscle tissue, increasing the length of the sarcomeres and leading to the tenderness of the meat.

For sheep meat, the final pH is expected to be between 5.5 and 5.8, and a sharp drop in temperature and pH accelerates the biochemical changes at post mortem and the action of proteolytic enzymes on the sensory attributes of the meat (Costa *et al.*, 2011). The pH values for lamb and ewe lamb meat, when kept within the indicated range, demonstrate that slaughter was carried out within the standards of animal welfare, allowing for the correct rigor-mortis (Valadez-Garcia *et al.*, 2021).

Lipidic oxidation affects color, texture, nutritional value, taste, and aroma leading to rancidity, which is responsible for off-flavors and unacceptable taste, which are important reasons for consumer rejection and the diet has a determinant effect of sheep meat by influencing the levels of mono and polyunsaturated fatty acids, and the TBARS values increase with the storage period in the meat of the fed animals with concentrated feed compared to pasture sheep (Lima, Rangel, Urbano, Mitzi & Moreno, 2013).

Pasture has natural antioxidants, and animals that have a diet exclusively on pasture have more vitamin E in meat and the protective effect of tocopherol is exerted by retarding the oxidation of the oxymyoglobin pigment and inhibiting the oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) (González-Calvo, Ripoll, Molino, Calvo & Joy, 2015).

After blood circulation is stopped, the muscle undergoes a series of biochemical changes in processes known as rigor mortis and postmortem. The rigor mortis process can be characterized as the transformation of muscle into meat. In the postmortem, proteolytic degradation modifies the architecture and integrity of structural proteins and consequently occurs the tenderness of the meat (Lana & Zolla, 2016).

μ-calpain and m-calpain

The system of calpains is composed of μ -calpain and m-calpain, the effective calpain involved in postmortem cytoskeletal protein degradation in mammals (Pomponio & Ertbjerg, 2012). This process has a great influence on the final tenderness of the meat.

Some researchers have indicated that μ -calpain has important effects on the postmortem degradation of poultry cytoskeletal proteins (Chang & Chou, 2012; Liao, Chang, Yang & Chou, 2016), and other scholars have reported that μ /m-calpain is crucial for postmortem degradation of poultry cytoskeletal proteins (Huang *et al.*, 2014).

The enzymatic system of CAPNs is formed by two calpains: μ -calpain was more sensitive to Ca^{2+} than that in livestock and its activation and autolysis have been reported and play an important role in the main intracellular processes. With emphasis on cytoskeleton restructuring, cell cycle regulation, apoptosis and muscle tissue formation (Chang *et al.*, 2013).

Unlike most proteases, calpains do not destroy but cleave their substrates in limited places to modulate their function. They are activated by micromolar and millimolar calcium concentrations, respectively (Sorimachi, Hata & Ono, 2011; Ono, Saido & Sorimachi, 2016)

Calpains are neutral proteases that have optimal activity at neutral pH (7.0 to 7.5), at temperatures between 10 and 25°C and are dependent on calcium. They also degrade myofibrillar proteins (proteins present in muscle fibers) and act in the degradation of the Z line (delimiter of the functional unit of myofibrils – sarcomere) (Koochmaraie, 1992).

Proteolysis is carried out by enzymes that make changes in the structure of muscle tissue, such as the gradual reduction of the Z line, with the dissipation of the troponin T and the deterioration of the proteins desmin, nebulin and titin (Koochmaraie, 1994). Changes in myofibril structures cause a reduction in muscle stiffness. As a consequence, there is a gradual increase in the tenderness of the meat (Gaya & Ferraz, 2006).

When ATP reserves in the muscle run out, after death, Ca^{++} can no longer be transported into the sarcoplasmic reticulum, increasing its concentration intracellularly. There is also an acidification of the cell. These two factors (increase in Ca^{++} and fall in pH) activate calpains (Palma, 2017).

During the meat tenderization process, the weakening and disappearance of the Z disk of calcium-treated (Ca^{2+}) muscle sarcomeres were related, leading to the discovery of the calpain system. It identified and isolated a protease activated by Ca^{2+} , removing the Z discs and promoting a loss of periodicity between the contractile filaments of the muscle, moreover, point out the endogenous enzymatic activity with respect to actomyosin dissociation activated by heat supply. Therefore, dissociation of individual protein types depends on different modes of treatments (Wang *et al.*, 2013).

In addition to the different need for calcium levels to be activated, calpains 1 and 2 need to be in an optimal pH range to carry out proteolysis. Some authors confirmed that μ -

calpains are activated with a pH between 6.8 and 5.7; while m-calpains are activated at an average pH of 5.7 (Lonergan, Zhang & Lonergan, 2010).

There are evidences that at pH between 5.5 and 5.8 μ -calpain is inactivated, thus it is necessary to simultaneously evaluate the activities of calpains 1 and 2 to obtain specific results for each of them (Kanawa, Ji & Takahashi, 2002).

In sheep of the Polish Merino breed, kept on pasture, the CAPN1 gene had highly significant effects on the loss of natural drip, lightness and intramuscular fat content, respectively. The results confirmed that the CAPN1 gene can be considered a candidate gene for meat quality traits in sheep and can affect lamb quality parameters, as it is associated with important production traits (Grochowska, Borysb, Grzeńkowiak & Mroczkowski, 2017).

Calpastatin

The Calpastatin gene (CAST) plays a significant role in growth traits and carcass characteristics. *CAST* works by inhibiting protease enzymes that degrade muscle protein, and influences meat production, tenderness, and quality (Zareian-Jahromi *et al.*, 2015). Calpastatin, the well characterized member of the calpain system, is a protein that specifically inhibits the proteolytic activity of μ -calpain and m-calpain but of no other proteases tested thus (Huang, Hoffmann, Norton, Hashimoto & Hoffmann, 2011).

Low pH can cause inhibition of enzyme activity and excessive fiber shortening, which makes meat harder, with less water retention capacity. This is because the helical sequences of calpastatin prevent calpains from binding to membranes, negatively affecting softness in living muscle, and the heightened action of calpastatin results in reduced degradation of muscle proteins (Morgan, Wheeler, Koohmaraie, Savell & Crouse, 1993).

Calcium (Ca^{++}) is required by calpastatin to bind and inhibit calpains (Otsuka & Goll, 1987). The binding between calpastatin and calpain is reversible and the calcium requirement depends on the calpain molecule being bound. The amount of calcium needed for calpastatin/calpain binding is significantly less than that needed to initiate the proteolytic activity of all forms of cathepsins, taking this into account, nutrition is very important for the action of calpastatin (Kapprell & Goll, 1989).

There was expression of the CAST gene in muscle samples from Santa Inês lambs when compared with the meat from White Dorper x Santa Inês and Dorper x Santa Inês crossbred lambs. The authors suggests that the expression of this gene in the Santa Inês breed leads to greater production of the enzyme calpastatin and consequent inhibition of calpains, resulting in less tender meat for this breed. In the same study, a higher SF was found in the meat of animals of the Santa Inês breed, indicating that the meat of this breed was less tender compared to the other genetic groups studied (Bagatoli *et al.*, 2013).

Actuation and activation of caspase-3

Postmortem proteolysis plays important role in muscle structure fragmentation affecting tenderness and/or water-holding capacity. Proteolysis, however, can only explain limited portion of quality variations in muscle (Kim *et al.*, 2018; Carlson *et al.*, 2017). Chen *et al.* (2011) and Huang, Hoffmann, Norton, Hashimoto and Hoffmann (2011) indicated that the active caspase-3 was associated with degradation of myofibrillar proteins, then are the main enzymes involved in the initiation and execution of apoptosis, which is an important process that occurs in multicellular organisms, both during development and for the maintenance of tissue homeostasis.

Many of the changes that occur in cells undergoing apoptosis are mediated by an enzymatic cascade involving cysteine proteases, called caspases (CASP), they are endoproteases that hydrolyze peptide bonds in a reaction that depends on catalytic cysteine residues in the caspase active site and occurs only after certain aspartic acid residues in the substrate. Although caspase-mediated processing can result in substrate inactivation, it may also generate active signaling molecules that participate in ordered processes such as apoptosis. Accordingly, caspases have been broadly classified by their known roles in apoptosis (McIlwain, Berger & Mak, 2013).

It has been suggested that there may be an interaction between the calpain and caspase systems (Kemp, Bardsley & Parr, 2006). Cells express their genes responding to environmental changes, in particular in response to specific extracellular signaling molecules. In turn, the cell changes the microenvironment by synthesis and release of cytokines, soluble receptors, enzymes, etc. The way a cell will respond to a stimulus depends very much on the context, namely the repertoire and sequence of incoming signals. The multiple extracellular signals converge within the cell and may have differential impact on gene expression. Since gene expression is initiated at the level of transcription it is widely accepted that cellular fates are derivative of gene transcription. Cell activation by cytokines, as well as expression of cytokines, bases upon a molecular machinery including transcription as the major regulatory pathway. Therefore the following paragraphs will show that communication between caspases and cytokines occurs also at transcriptional level (Loppnow, Guzik & Pryjma, 2013).

In addition to cleaving the same substrates as calpains, there is also evidence that there are interactions between the calpain system and the caspase system, acting together (Chua, Guo & Li, 2000). It is important to note that calpastatin is a substrate of caspases, mainly caspases 3 and 7 (Nakagawa & Yuan, 2000). Thus, if caspases are active in the postmortem muscle, they may influence meat quality in response to calpastatin proteolysis, resulting in a greater amount of active calpains that can act during the proteolytic process (Wang *et al.*, 1998).

Although CASP3 is not a calcium-dependent cysteine protease, the use of Ca²⁺ leads to increased caspase 3 activity, but it is still necessary more studies to understand the true

relationship between the calpain proteolytic system - calpastatin and caspase3 (Chen *et al.*, 2011). In relation to 3/7 caspases, Fuente-García *et al.* (2021) indicate its preferable use as an indicator capable of detecting race and transport differences influencing the characteristics of animal meat.

In this line, some authors found a higher expression of the caspase 3 large subunit in DFD beef samples at 24 h *post mortem* times (Díaz-Luis *et al.*, 2021). However, the tenderness of the meat can be considered a complex system and an intrinsic network of proteins may be related to tenderizing meat (Guillemín *et al.*, 2011; Lana & Zolla, 2016; Picard & Gagaoua, 2017)

RT-qPCR - Endogenous genes

To be considered a normalizer, a gene must show unregulated and stable expression in the type of sample analyzed, and normalizer genes meet these criterias (Romanowski, Markiewicz, Bednarz & Bielawski, 2007).

In unpublished data by Guartieri *et al.* (2021), the most stable endogenous genes for the analysis of CASP3, CAPN1, CAPN2 and CAST gene expression in sheep muscle fed with three different nutritional plans was the combination of endogenous hydroxymethylbilanosynthase (HMBS) and β -2-microglobulin (B2M) as reaction normalizers. There was also the possibility of using the HMBS gene and the TATA box binding protein (TBT) gene alone as normalizers.

HMBS is a molecule involved in the metabolism of porphyrin (purple pigment of natural origin). It becomes a metabolic intermediate in heme biosynthesis (Salway, 2017). One of the best known hemeproteins of the heme group is hemoglobin, which is responsible for carrying O₂ in the blood and for the red color of the blood. Another example of hemeprotein is myoglobin, which is a sarcoplasmic protein that makes up muscle fibers. Hemeproteins have several functions such as: oxygen binding and transport, electron transfer, catalysis and signaling (Lin & Wang, 2013).

An additional function of B2M is its association with the HFE protein, jointly regulating the expression of hepcidin in the liver which targets the iron transporter ferroportin in the basolateral membrane of enterocytes and macrophage cell membrane for degradation, resulting in decreased uptake of iron from food and decreased iron release from recycled red blood cells in the mononuclear phagocyte system, respectively. Loss of this function causes excess iron and hemochromatosis (Hundall, 2011).

Some researchers have studied a total of 12 genes belonging to various functional classes, which are often used as reference genes in RT-qPCR studies, including B2M (García-Crespo, Juste & Hurtado, 2005).

The TATA box binding protein (TBP) is a transcription factor (TF) that specifically binds to a DNA sequence called TATA box and can also be used as a normalizer for the genes in question. TF are proteins that bind to the DNA of eukaryotic cells to allow a link between the RNA polymerase enzyme and the DNA, thus allowing for transcription and future translation (Dylacht, Hoey & Tijan, 1991). TBP and TF play crucial roles in the transcription of class II genes (DYA, DYB and DI), specific ruminant genes, whose functions are unknown (Tizard, 2014).

The transcription of genes in eukaryotes requires the actions of an RNA polymerase to bind to a sequence upstream of a gene to initiate transcription. However, unlike prokaryotic cells, the eukaryotic RNA polymerase requires other proteins, or transcription factors, to facilitate transcription initiation. Transcription factors are proteins that bind to the promoter sequence and other regulatory sequences to control the transcription of the target gene. RNA polymerase by itself cannot initiate transcription in eukaryotic cells. Transcription factors must bind to the promoter region first and recruit RNA polymerase to the site for transcription to be established (Rye *et al.*, 2021).

Final considerations

Research has shown that for years the action of the calpain-calpastatin complex acts directly on muscle proteolysis, actively acting in the transformation of muscle into meat and being directly responsible for its quality. However, the expression of the genes responsible for these enzymes still differs from the results found by several authors, for example some of them associate the shear force considerably higher in the meat of animals that express the CAST gene, while meats that do not express this gene are tender.

Likewise, there are authors who have not found a relationship between tenderness and the expression of any gene responsible for muscle proteolysis. It is known that animal nutrition interferes with the action of enzymes, but it is not certain that the same nutrition affects the gene expression of CAPN1, CAPN2 or CAST, which may depend on the animal species, time of study or breed.

Further research is suggested on the level of RNA abundance for the CAPN1, CAPN2 and CAST genes, especially in sheep.

Bibliographic references

- Anderson, M. J., Lonergan, S. M., Fedler, C. A., Prusa, K. J., Binning, J. M., & Huff-Lonergan, E. (2012). Profile of biochemical traits influencing tenderness of muscles from the beef round. *Meat Science*, 91(3), 247-254. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.01.022.

- Bagatoli, A., Gasparino, E., Soares, M. A. M., Amaral, R. M., Macedo, F. A. F., Voltolini, D. M., & Del Vesco, A. P. (2013). Expression of calpastatin and myostatin genes associated with lamb meat quality. *Genetics and Molecular Research*, 12 (4), 6168–6175. doi: 10.4238/2013.
- Becker, P. L., Bohatý, L., Liebertz, J., Kleebe, H. J., Mueller, M., Eichler, H. J., Kaminskii, A. A. (2010). Non-centrosymmetric tetragonal Sr₂ ZnGe₂ O₇ – a novel melilite-type interactions. *Laser Physics Letter*, 7, 367. doi: 10.1002 / lapl.200910160.
- Carlson, K., Prusa, K. J, Fedler, C. A., Steadham, E. M., Outhouse, A. C., King, D. A., . . . Lonergan, S. M. (2017). *Post mortem* protein degradation is a key contributor to fresh pork loin tenderness. *Journal Animal Science*, 95, 1574–1586. doi: 10.2527/jas.2016.1032.
- Chang, Y. S., Stromer, M. H., Chou, R. G. (2013). μ -Calpain is involved in the *post mortem* proteolysis of gizzard smooth muscle. *Food Chemistry*, 139, 384–388. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.075.
- Chen, L., Feng, X. C., Lu, F., Xu, X. L., Zhou, G. H., Li, Q. Y., & Guo, X. Y. (2011). Effects of camptothecin, etoposide and Ca²⁺ on caspase-3 activity and myofibrillar disruption of chicken during *post mortem* ageing. *Meat Science*, 87, 165–174. doi: 10.1016 / j.meatsci.2010.10.002.
- Chua, B. T., Guo, K., & Li, P. (2000). Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *Journal Biology Chemistry*, 275, 5131–5135. doi: 10.1074 / jbc.275.7.5131.
- Costa, R. G., Santos, N. M., Sousa, W. H., Queiroga, R. C. R. E., Azevedo, P. S., & Cartaxo, F. Q. (2011). Qualidade física e sensorial da carne de cordeiros de três genótipos alimentados com rações formuladas com duas relações volumoso:concentrado. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, 40(8), 1781-1787. doi: 10.1590/S1516-35982011000800023.
- Deliza, R., Andrade, J. C., Sobral, L. A., Barcellos, M. D., Ares, G., & Nalerio, E. S. (2019). Avaliação dos Hábitos de Compra do Consumidor Brasileiro e Consumo de Carne Ovina. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento – EMBRAPA*, 2019. ISSN 0101-630X. Recuperado de <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1110438/avaliacao-dos-habitos-de-compra-do-consumidor-brasileiro-e-consumo-de-carne-ovina>.
- Díaz-Luis, A., Díaz, F., Diñeiro, Y., González-Blanco, L., Arias, E., & Coto-Montes, A. (2021). Nuevos indicadores de carnes (DFD): estrés oxidativo, autofagia y apoptosis. *Información Técnica Económica Agraria.*, 117, 3–18. doi: 10.12706/itea.2020.006.
- Dylacht, B. D., Hoey, T. & Tjian, R. (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell*, 66(3), 563–576. doi: 10.1016 / 0092-8674.
- Fuente-García, C., Aldai, N., Sentandreu, E., Oliván, M., Franco, D., García-Torres, S., Sentandreu, M. A. (2021). Caspase activity in post mortem muscle and its relation to cattle handling practices. *Journal Science Food Agriculture.*, 5. doi: 10.1002/jsfa.11293.
- Giusti, J., Castan, E., Dal Pai, M., Arrigoni, M. D. B., Baldin, S. R., & Oliveira, H. N. (2013). Expression of genes related to quality of *Longissimus dorsi* muscle meat in Nellore (*Bos indicus*) and Canchim (5/8 *Bos taurus* × 3/8 *Bos indicus*) cattle. *Meat Science*, 94, 247–252. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.02.006.
- Gois, G. C., Santos, E. M., Sousa, W. H., Ramos, J. P. F., Azevedo, P. S., Oliveira, J. S., Perazzo, A. F. (2017). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 69, 1653-1659. doi: 10.1590/1678-4162-9231.

- García-Crespo, D., Juste, R. A., & Hurtado, A. (2005). Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR. *BMC Veterinary Research*, 1, 3. doi: 10.1186 / 1746-6148-2-26.
- Gaya, L. G., & Ferraz, J. B. S. (2006). Aspectos genético-quantitativos da qualidade da carne em frangos. *Ciência Rural*, 36, 349-356. doi: 10.1590/S0103-84782006000100058.
- González-Calvo, L.; Ripoll, G.; Molino, F.; Calvo, J. H. & Joy, M. (2015). The relationship between muscle α -tocopherol concentration and meat oxidation in light lambs fed vitamin E supplements prior to slaughter. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 103-110. doi: 10.1002/jsfa.6688
- Grochowska, E., Borys, B., Grzeškowiak, E., & Mroczkowski, S. (2017). Effect of the calpain small subunit 1 gene (CAPNS1) polymorphism on meat quality traits in sheep. *Small Ruminant Research*, 150, 15–21. doi: 10.1016/j.smallrumres.2017.02.022.
- Guartieri, I. S. (2021). *Diferentes sistemas nutricionais influenciam na maciez da carne de borregas sem alterar a expressão gênica*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.
- Guerrero, A. B., & Sañudo, C. (2019). Los desafíos actuales en el consumo de carnes frescas. Papel de las marcas de calidad. *Revista Eurocarne*, 279, 71-82.
- Guerrero, A. B., Valero, M. V., Campo, M. M., & Sañudo, C. (2013). Some factors that affect ruminant meat quality: from the farm to the fork. Review. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 35(4), 335-347. ISSN: 1806-2636. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=303128707001>.
- Guillemin, N., Jurie, C., Cassar-Malek, I., Hocquette, J. F., Renand, G., & Picard, B. (2011). Variations in the abundance of 24 protein biomarkers of beef tenderness according to muscle and animal type. *Animal*, 5(6), 885–894. doi: 10.1017 / S1751731110002612.
- Huang, J. C., Huang, M., Wang, P., Zhao, L., Xu, X. L., Zhou, G. H., & Sun, J. X. (2014). Effects of physical restraint and electrical stunning on plasma corticosterone, *post mortem* metabolism, and quality of broiler breast muscle. *Journal of Animal Science*, 92, 5749–5756. doi: 10.2527 / jas.2014-8195.
- Huang, J. C., Yang, J., Huang, F., Huang, M., Chen, K. J., Xu, X. L., & Zhou, G. H. (2016). Effect of fast pH decline during the early *post mortem* period on calpain activity and cytoskeletal protein degradation of broiler M. pectoralis major. *Poultry Science*, 95, 2455–2463. doi: 10.3382/ps/pew206.
- Huang, Z., Hoffmann, F. W., Norton, R. L., Hashimoto, A. C., Hoffmann, P. R. (2011). Selenoprotein K is a novel target of m-calpain, and cleavage is regulated by Toll-like receptor-induced calpastatin in macrophages. 286 (40): 34830-8. doi: 10.1074/jbc.M111.265520.
- Hundall, S. D. (2011). Iron, Heme, and Hemoglobin. In: *Hematology: A Pathophysiologic Approach* (Chap 3, 17-25). Elsevier.
- Kanawa, R., Ji, J. R., & Takahashi, K. (2002). Inactivity of μ -calpain throughout *post mortem* aging of meat. *Journal of Food Science*, 67(2), 635-638. doi: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb10651.x.

- Kapprell, H. P. & Goll, D. E. (1989). Effect of Ca⁺⁺ on binding of the calpains to calpastatin. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 17888–17896.
- Kemp, C., Bardsley, R., & T. Parr. (2006). Changes in caspase activity during the *post mortem* conditioning period and its relationship to shear force in porcine *longissimus* muscle. *Journal Animal Science*, 84, 2841–2846. doi: 10.2527 / jas.2006-163.
- Kim, Y. H. B., Ma, D., Setyabrata, D., Farouk, M. M., Lonergan, S. M., Huff-Lonergan, E., & Hunt, M. C. (2018). Understanding postmortem biochemical processes and post-harvest aging factors to develop novel smart-aging strategies. *Meat Science*, 144, 74–90. doi: 10.1016 / j.meatsci.2018.04.031.
- Koohmaraie, M. (1994). Muscle proteinases and meat aging. *Meat science*, 36(1), 93-104. doi: 10.1016 / 0309-1740 (94) 90036-1.
- Koohmaraie M. (1992). The role of Ca⁺⁺- dependent proteinases (calpains) in *post mortem* proteolysis and meat tenderness. *Biochimie*, 74, 239-245. doi: 10.1016 / 0300-9084 (92) 90122-u.
- Lana, A. & Zolla, L. (2016). Proteolysis in meat tenderization from the point of view of each single protein: A proteomic perspective. *Journal of Proteomics*, 147, 85–97. doi: 10.1016 / j.jprot.2016.02.011.
- Liao, C. C., Chang, Y. S., Yang, S. Y., & Chou, R. G. (2016). *Post mortem* proteolysis and tenderisation are more rapid and extensive in female duck breast muscle. *British Poultry Science*, 57, 734–739. doi: 10.1080 / 00071668.2016.1209736.
- Lima, D. M., Rangel, A., Urbano, S., Mitzi, G., & Moreno, G. M. (2013). Oxidação lipídica da carne ovina. *Acta Veterinaria Brasílica*, 7(1), 14-28. doi: 10.21708/avb.2013.7.1.3119.
- Lin, Y. W., & Wang, J. (2013). Structure and function of heme proteins in non-native states: A mini-review. *Journal of Inorganic Biochemistry*; 129, 162–171. doi: 10.1016 / j.jinorgbio.2013.07.023.
- Lonergan, E. H., Zhang, W., & Lonergan, S. M. (2010). Biochemistry of *post mortem* muscle - Lessons on mechanisms of meat tenderization. *Meat Science*, 86(1), 184-195. doi: 10.1016 / j.meatsci.2010.05.004.
- Lopes, J. E. L., Sales, R. O., Azevedo, A. R., & Oliveira, A. L. T. (2012). Composição centesimal, perfil de ácidos graxos e colesterol da carne de cordeiros submetidos aos sistemas de produção com dieta experimental e convencional. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 6, 31-50. Recuperado de <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/13>.
- Loppnow, H., Guzik, K., & Pryjma, J. (2013). *The Role of Caspases in Modulation of Cytokines and Other Molecules in Apoptosis and Inflammation*. Landes Bioscience. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6184/>.
- Mellwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). A caspase atua na morte celular e na doença. In: *Perspectives of Cold Spring Harbor in biology*, (Chap.5, 4). doi: 10.1101/cshperspect.a008656.
- Moreno, G. M. B., Borba, H., Araújo, G. G. L., Sañudo, C., Silva Sobrinho, A. G., Buzanskas, M. E., Boaventura Neto, O. (2015). Meat Quality of Lambs Fed Different Saltbush Hay (*Atriplex*

- nummularia*) Levels. *Italian Journal of Animal Science*, 14(2), 3302. doi: 10.4081/ijas.2015.3302.
- Morgan, J. B., Wheeler, T. L., Koohmaraie, T. M., Savell, J. W., & Crouse, J. D. (1993). Meat tenderness and calpain proteolytic system in *Longissimus* muscle of Young bulls and steers. *Journal of Animal Science*, 71, 408. doi: 10.2527/1993.7161471x.
- Nakagawa, T., & Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *Journal Cell Biology*, 150, 887–894. doi: 10.1083/jcb.150.4.887.
- Ono, Y., Saido, T. C., & Sorimachi, H. (2016) Calpain research for drug discovery: challenges and potential. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15, 854–876. doi:10.1038/nrd.2016.212.
- Otsuka, Y., & Goll, D. E. (1987). Purification of the Ca⁺⁺ dependent proteinase inhibitor from bovine cardiac muscle and its interaction with the millimolar Ca⁺⁺ dependent proteinase. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 5839-5851.
- Palma, S. F. (2017). *Transformação do músculo em carne: influência na qualidade da carne*. Recuperado de https://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:8LpagICYdmUJ:scholar.google.com/+transforma%C3%A7%C3%A3o+de+muscuro+em+carne&hl=pt-BR&as_sdt=0,5&as_ylo=2017.
- Picard, B., & Gagaoua, M. (2017). Proteomic Investigations of Beef Tenderness. In: *Proteomics in food science: From farm to fork*. Academic Publisher, 177- 197. doi: 10.1016/B978-0-12-804007-2.00011-4.
- Pitombo, R. S., Souza, D. D. N., Ramalho, R. O. S., Figueiredo, A. B. A., Rodrigues, V. C., Freitas, D. D. G. C., & Ferreira, J. C. S. (2013). Qualidade da carne de bovinos superprecoces terminados em confinamento. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65, 1203-1207. doi: 10.1590/S0102-09352013000400036.
- Pomponio, L., & Ertbjerg, P. (2012). The effect of temperature on the activity of μ - and m-calpain and calpastatin during *post mortem* storage of porcine *Longissimus* muscle. *Meat Science*, 91, 50–55. doi: 10.1016/j.meatsci.2011.12.005.
- Rexroad, C., Vallet, J., Matukumalli, L. K., Reecy, J., Bickhart, D., Blackburn, H., . . . Wells, K. (2019). Genome to Phenome: Improving Animal Health, Production, and Well-Being – A New USDA *Blueprint for Animal Genome Research 2018–2027*, 10, 327.
- Romanowski, T, Markiewicz, A, Bednarz, N., & Bielawski, KP. (2007). Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR. *Postepy Hig Med Dosw*, 61, 500:510.
- Rubio-Lozano, M. S., Alfaro-Zavala, S., Sifuentes-Rincón, A. M., Parra-Bracamonte, G. M., Braña Varela, D., Medina, R. D. M., . . . Figueroa S. F. (2016). Meat tenderness genetic and genomic variation sources in commercial beef cattle. *Journal of Food Quality*, 39, 150–156. doi: 10.1111/jfq.12185.
- Rye, C., Wise, R., Jurukovski, V., DeSaix, J., Choi, J., & Avissar, Y. (2021). *Eukaryotic Transcription Gene Regulation*. (2021, August 27). Retrieved from <https://bio.libretexts.org/@go/page/1905>
- Salway JG. (2017). Porphyrin metabolism, haem and the bile pigments. In: *Metabolism at a Glance*. John Wiley & Sons, (4th ed, 114).

- Sorimachi, H., Hata, S., & Ono, Y. (2011). Impact of genetic insights into calpain biology. *Journal of Biochemistry*, 150, 23–37. doi:10.1093/jb/mvr070 pmid:21610046
- Tizard, I. (2014). Complexo de histocompatibilidade. In: *Imunologia Veterinária*. (Ed. 9, 108). Elsevier.
- Valadez-Garcia, K. M., Avendaño-Reyes, L., Díaz-Molina, R., Mellado, M., Meza-Herrera, C. A., Correa-Calderón, A. & Macías-Cruz, U. (2021). Free ferulic acid supplementation of heat-stressed hair ewe lambs: Oxidative status, feedlot performance, carcass traits and meat quality. *Meat Science*, 173, 108395. doi: 10.1016 / j.meatsci.2020.108395.
- Wang, D., Dong, H., Zhang, M., Liu, F., Bian, H., Zhu, Y., & Xu, W. (2013). Changes in actomyosin dissociation and endogenous enzyme activities during heating and their relationship with duck meat tenderness. *Food Chemistry*, 141(2), 675-679. doi: 10.1016 / j.foodchem.2013.04.034.
- Wang, K. K. R., Posmantur, K., Nadimpalli, R., Nath, R., Mohan, P., Nixon, R. A., . . . Allen, H. (1998). Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Archive Biochemistry Biophysics*, 356, 187–196. doi: 10.1006 / abbi.1998.0748.
- Zareian-Jaromi, E., Ranjbari, M., Khaleghizadeh, S., Ahrari, S., Ahrari, I., & Ghavipisheh, M. A. (2015). Polymorphism of Calpastatin Gene (CAST) in Khalkhali Goats: A Possible Marker for Meat Tenderness. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5 (4), 605–909.

Diferentes sistemas nutricionais influenciam na maciez da carne de borregas sem alterar a expressão gênica

Isabella Guartieri Da Silva^a; Ines Cristina Giometti^a; Calie Castilho^a; Gabriela Azenha Milani Soriano^a; Aline De Oliveira Santos^a; Leticia Jalloul Guimarães Souza^a; Gabriella Capitane Sena^b; Fabiola Cristine De Almeida Rêgo^c; Marilice Zundt^{a*}

a Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

b Faculdade de Ciências Agrárias, Curso de Zootecnia, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil.

c Universidade Pitágoras – UNOPAR, Arapongas, Paraná, Brasil.

Resumo

Contexto: O conceito de carne de qualidade é complexo e com muitas variáveis, sendo influenciada principalmente pela genética e nutrição. Dessa forma a estratégia de associação de genes com características de interesse econômico é bastante abordada na produção animal. Esse estudo teve o objetivo de avaliar o efeito da suplementação de borregas terminadas em diferentes planos nutricionais, sobre a expressão gênica da caspase-3, μ -calpaína, m-calpaína e calpastatina e sua possível associação com a força de cisalhamento da carne. Foram utilizadas amostras do músculo *Longissimus lumborum* de 24 borregas, distribuídas em 3 grupos: P (pasto, 70 a 80% da exigência nutricional), PS (pasto e suplemento, 100 a 110% da exigência nutricional) e C (confinamento, fornecido 140% da exigência). Foram realizadas análises centesimal, pH, marmoreio, oxidação lipídica e força de cisalhamento e também a RT-qPCR para a análise de expressão gênica relativa dos seguintes genes: caspase 3 (CASP3), calpastatina (CAST), μ -calpaína (CAPN1) e m-calpaína (CAPN2).

Resultados: Houve diferença estatística para o extrato etéreo, força de cisalhamento e oxidação lipídica entre os tratamentos, em contrapartida, na análise centesimal, pH, marmoreio e expressão dos genes não houve diferença estatística.

Conclusões: Há aumento do extrato etéreo na carne dos animais confinados, pois o maior aporte energético na nutrição aumenta esta variável. Os animais mantidos somente a pasto têm menor oxidação na carne que os outros tratamentos por conta da maior ingestão de vitamina E oriunda das pastagens. A força de cisalhamento é consideravelmente maior na carne dos animais mantidos somente a pasto, porém ainda é considerada macia. A nutrição das borregas não interfere na expressão gênica de CASP3, CAPN1, CAPN2 e CAST. Sugere-se mais pesquisas entre raças distintas de ovinos e tempos mais longos de experimento.

Palavras-chave: μ -Calpaína. Calpastatina. Caspase-3. Ovis aries. RT-qPCR.

*Autora de correspondência:

Marilice Zundt

Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Rod Raposo Tavares, km572

Presidente Prudente - SP Cep 19067-175

(18) 3229 3213, E-mail: marilicezundt@gmail.com

1 **Introdução**

2 A composição centesimal da carne sofre variações em função do tipo de
3 músculo, da idade, da espécie animal, da nutrição, da raça, da condição sexual, do
4 manejo pré-abate e pós-abate dos animais¹. O pH final da carne em torno de 5,5,
5 próximo ao ponto isoelétrico das proteínas e com ausência da força de atração existente
6 entre as fibras musculares, favorece o distanciamento entre os miofilamentos que
7 constituem o tecido muscular, aumentando o comprimento dos sarcômeros e
8 conduzindo a maciez da carne ².

9 Outro fator de grande relevância é a oxidação lipídica dos ácidos graxos
10 poliinsaturados, a concentração de malonaldeído, produto secundário desta oxidação,
11 pode ser determinada através do T'bars, sendo a dieta fator determinante nessa
12 variável³.

13 A caspase 3 (CASP3) é responsável pela clivagem proteolítica de várias
14 proteínas e evidências sugerem que as principais enzimas envolvidas neste processo são
15 as calpaínas (CAPNs) e seu inibidor, calpastatina (CAST) ⁴. Além de clivarem os
16 mesmos substratos das CAPNs, há também evidências que existam interações entre o
17 sistema CAPNs e o sistema de CASPs, atuando de forma conjunta⁵. É importante
18 salientar que a CAST é um substrato das CASPs, principalmente as CASP 3 e 7 ⁶.

19 Dessa forma, se as CASPs estão ativas no músculo *post mortem*, poderão
20 influenciar na qualidade da carne em resposta à proteólise da CAST, resultando em
21 maior quantidade de CAPNs ativas que podem atuar durante o processo proteolítico⁷. A
22 CAST atua como inibidor endógeno das calpaínas e, portanto, diminui a taxa e extensão
23 da proteólise no músculo esquelético. Fica localizado no quinto cromossomo de
24 ovelhas, codifica um inibidor específico das CAPNs que desempenham papéis
25 importantes na formação do músculo, degradação e maciez da carne pós abate⁸.

26 Os objetivos específicos dessa pesquisa foram analisar através da qPCR a
27 expressão gênica relativa dos genes alvos caspase-3, μ -calpaína, m-calpaína,
28 calpastatina e sua possível relação com a maciez da carne, que foi mensurada através da
29 força de cisalhamento juntamente com as análises do teste do ácido tiobarbitúrico
30 (T'bars), pH e análise centesimal para um resultado mais completo.

31 A hipótese deste trabalho é que os diferentes planos nutricionais influenciem
32 na qualidade e na expressão dos genes CASP3, CAPN1, CAPN2 e CAST na carne das
33 borregas.

34

35 **Material e métodos**

36 **Local de desenvolvimento**

37 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da
38 instituição de origem, sob protocolo número 4610, realizado na Universidade do Oeste
39 Paulista – UNOESTE, Campus II, na cidade de Presidente Prudente-SP, latitude de 22°
40 07'21,06" norte e longitude 51° 23'17,71", clima tropical, iniciado em Abril de 2018 e
41 finalizado em Janeiro de 2021.

42

43 **Manejo nutricional**

44 Foram utilizadas 24 borregas (7/8 Dorper), com peso médio inicial de 21,64 \pm
45 1,31 kg e idade inicial entre 6 e 7 meses provenientes do mesmo rebanho de matrizes e
46 nascidas de partos sincronizados após IATF com sêmen do mesmo reprodutor. Ao
47 início do experimento todas as fêmeas foram pesadas e as fezes coletadas para
48 realização de OPG, cujo exame foi repetido mensalmente até o final do experimento de
49 campo. As fêmeas foram aleatoriamente distribuídas em três grupos sendo, Pasto (P),
50 onde as borregas receberam entre 70 a 80% da exigência nutricional; Pasto e

51 suplemento (PS), grupo que as fêmeas receberam de 100 a 110% da exigência
52 nutricional, e o grupo Confinamento (C), em que as fêmeas foram alimentadas em
53 cocho individual, sendo fornecido 140% da exigência nutricional⁹.

54 Foram feitas 3 análises bromatológicas do pasto, contemplando o início, meio e final do
55 experimento. Foram avaliados matéria seca (MS), proteína bruta (PB), nutrientes
56 digestíveis totais (NDT), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido
57 (FDA), no terço inicial 26,22%, 7,53%, 53,24%, 75,81% e 45,78%, no terço médio
58 45,12%, 7,55%, 48,58%, 79,33% e 51,76% e no terço final do experimento 25,11%,
59 10,39%, 49,51%, 80,45% e 30,92% respectivamente. As análises foram realizadas
60 conforme metodologia proposta por Silva e Queiroz ¹⁰, valores de nutrientes digestíveis
61 totais (NDT), segundo Capelle ¹¹. Os teores de fibra em detergente ácido (FDA) de
62 acordo com metodologia obtida pelo método de Van Soest ¹².

63 Desta forma o nível de exigência nutricional dos grupos experimentais, foi
64 elaborado de acordo com a realidade do ovinocultor brasileiro, bem como o
65 estabelecimento dos diferentes sistemas nutricionais adotados.

66 Os animais do grupo P (n=7) foram mantidos exclusivamente a pasto
67 (*Panicum maximum* cv. Tanzânia), com acesso a água e sal mineral *ad libitum*. O grupo
68 PS (n=8) também permaneceu a pasto (*Panicum maximum* cv. Tanzânia), porém
69 recebendo 1,5% do peso vivo de ração comercial® (FORT OVINOS 16, FORTSAL®)
70 para ovinos, contendo 16% de proteína bruta e 72% de NDT.

71 As borregas do P e PS foram mantidas a pasto em módulo de rotacionado,
72 totalizando área 0,8 hectares, subdivididos em 4 piquetes de aproximadamente 200 m²,
73 onde permaneceram por 9 dias em cada piquete com período de descanso do capim de
74 27 dias¹³.

75 As borregas do C (n=9) ficaram confinadas durante todo o período
 76 experimental, recebendo dieta total, na proporção volumoso/concentrado de 20:80, em
 77 cocho individual, com acesso a água e sal mineral (quelatado) *ad libitum*. O volumoso
 78 utilizado foi feno de Tifton e o concentrado a ração comercial citada acima, contendo
 79 16% de PB e 72% de NDT, visando ganho de peso diário de 200g/dia⁹.

80 Inicialmente as borregas receberam 1,5% do peso vivo da dieta total (feno +
 81 ração), sendo esta porcentagem aumentada até atingir em média de 4,5 a 5% do peso
 82 vivo, conforme leitura de cocho^{14,15}. As borregas dos grupos PS e C foram alimentadas,
 83 duas vezes ao dia, às oito horas da manhã e 4 horas da tarde, durante o experimento e
 84 foram pesadas a cada quinze dias para ajuste da dieta em função do peso vivo.

85

86 **Metodologia de abate**

87 Ao atingirem o peso médio de 37,26±3,25 kg/PV, as borregas permaneceram
 88 18 horas em jejum alimentar com dieta hídrica. O abate ocorreu em frigorífico
 89 comercial. A tabela 1 mostra a ordem de abate das borregas de acordo com a sequencia
 90 em que foram atingindo o peso pré-estipulado.

91 **Tabela 1.** Ordem, data, quantidade e grupo pertencente das borregas abatidas e peso
 92 médio por abate dos grupos.

Ordem dos abates	Dias de abates	P (pasto)	PS (pasto + suplemento)	C (confinamento)	Peso médio por abate
1º abate	27/09/2018	01	01	04	42,18±2,01
2º abate	11/10/2018	-	02	04	38,81±2,5
3º abate	29/10/2018	01	03	01	35,4±1,0
4º abate	06/12/2018	03	01	-	34,02±1,4
5º abate	10/12/2018	02	01	-	35,9±0,5

93

94 Todas as borregas foram sincronizadas e os abates ocorreram durante a
 95 primavera brasileira.

96 Imediatamente após o abate, foram colhidas amostras do músculo *Longissimus*
97 *lumborum* para que ocorresse a devida preservação do Rna.

98 As carcaças foram resfriadas por 24 horas em câmara frigorífica com
99 temperatura de 0 – 1 °C. O músculo *Longissimus lumborum*, entre a 12^a e a 13^a vértebra
100 torácica foi removido e separado em pequenas porções e congelados para análise
101 posterior.¹⁶

102 **Análises físico-químicas da carne**

103 Foram realizadas análises centesimais do músculo (umidade, proteína bruta,
104 extrato etéreo e matéria mineral)¹⁷.

105 Já o pH da carne foi determinado por um peagâmetro portátil com eletrodo de
106 penetração (Hanna Instruments, Brasil), a 1 cm de profundidade no músculo da fatia¹⁸.
107 O índice de oxidação lipídica foi feito pelo teste do T'bars, com a leitura em
108 espectrofotômetro a 538 nm¹⁹. A taxa de marmoreio foi avaliada subjetivamente
109 utilizando padrões fotográficos, onde foram classificadas com notas de 1 a 10 (1 =
110 traços de marmoreio e 10 = marmoreio abundante)²⁰.

111 O preparo das amostras para a avaliação da força de cisalhamento foi realizado
112 em forno elétrico pré-aquecido a 180 °C. Os bifes foram assados até atingirem 71 °C
113 internamente¹⁹. Para a obtenção das amostras foi utilizado um amostrador cilíndrico.

114 Foram utilizadas três amostras por animal e de cada amostra foram retiradas
115 duas sub-amostras de aproximadamente 1,25 cm de espessura e cada sub-amostra foi
116 cisalhada uma única vez, totalizando seis leituras por animal²¹. A força de cisalhamento
117 foi objetivamente medida por meio da utilização de um texturômetro CT3 texture
118 Analyser Brookfield® (Brookfield engineering, Middleboro, MA) com lamina Warner-
119 Bratzler de 3mm de espessura²².

120

121 **Expressão gênica**

122 Durante o abate foram colhidas amostras do músculo *Longissimus lumborum*
123 para a extração de RNA para a análise da expressão gênica. As amostras de músculo
124 foram colhidas e depositadas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenados em freezer
125 -80°C até a realização da RT-qPCR. Esses fragmentos (~40 mg) foram triturados em
126 homogeneizador de tecidos e submetidos ao protocolo de extração do TRIzol[®] (Thermo
127 Fisher Scientific[®]) de extração total.

128 A concentração do RNA total recuperado e a razão 260/280 foram mensuradas
129 por NanoDrop[®] Thermo Fisher Scientific, Brasil. Todas as amostras de RNA total
130 foram tratadas com DNase antes de serem submetidas ao RT-qPCR, conforme as
131 instruções do protocolo DNase I – Amplification Grade (Invitrogen[®]).

132 A transcrição reversa foi realizada utilizando o protocolo da High Capacity
133 (Applied Biosystems[™], Thermo Fisher Scientific, Brasil), seguindo protocolo do
134 fabricante. A qPCR foi realizada para a análise quantitativa da expressão gênica
135 relativa. Os ensaios com os “primers” e as sondas para os genes-alvo que são
136 correlacionados com qualidade da carne foram: CASP3 (Oa0481763_m1), CAPN1
137 (Oa04658113_g1), CAPN2 (Oa04659692_m1) e CAST (Oa0456608_m1). Como
138 controle interno das reações de qPCR em tempo real foram utilizados 3 genes
139 endógenos: B2M (Oa04818291_m1), HMBS (Oa04838105_g1) e TBP
140 (Oa04666642_m1).

141 Para a normalização dos dados se utilizou a combinação de HMBS e B2M, que
142 se mostrou mais estável pelo programa NormFinder software[®] (MOMA, Dinamarca),
143 com a finalidade de normalizar os resultados obtidos para o gene-alvo. Os “primers”
144 para os genes endógenos e alvos e suas respectivas sondas foram obtidos a partir de
145 ensaios TaqMan[®] (AppliedBiosystems[®], Foster, USA), já padronizados.

146

147 **Análises estatísticas**

148 O experimento inicial foi composto de 3 tratamentos, inteiramente casualizado,
149 com 8 repetições. Para o peso inicial, ganho médio diário, peso de abate, análise
150 centesimal (umidade, PB, MM e EE), pH, marmoreio, força de cisalhamento e oxidação
151 lipídica, a homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de Bartlett ($p > 0,05$) e a
152 normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados foram
153 submetidos à análise de variância e quando significativos submetidos ao teste de Tukey,
154 á nível de 5%. Todas as avaliações estatísticas foram executadas com auxílio do
155 Software Rstudio.

156 As qPCRs foram conduzidas em duplicatas para cada amostra e a expressão foi
157 determinada pela quantificação em relação ao gene endógeno. Para quantificação
158 relativa das amplificações foi empregado o método de Pfaffl²³. Os dados de expressão
159 gênica foram analisados quanto ao suposto de normalidade Shapiro-Wilk e então foram
160 submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA). Diferenças significativas foram
161 consideradas com $p < 0,05$.

162 **Resultados**

163 O GMD foi maior no grupo C ($p < 0,05$) e menor nos animais do grupo PS e
164 grupo P sucessivamente. O menor ganho de peso dos grupos PS e P se deu em
165 consequência desses grupos terem grande infestação parasitária durante o experimento e
166 o grupo C ter 140% das suas exigências nutricionais atendidas.

167 Consequentemente, houve diferença no ganho de peso total ($p < 0,05$) com o
168 aumento do concentrado, de acordo com os planos nutricionais (Tabela 2).

169 Os valores encontrados na análise centesimal da carne de borregas criadas em
170 diferentes planos alimentares, não apresentaram diferença estatística entre os

171 tratamentos para a maioria das variáveis com exceção EE, que apresentou um aumento
172 linear ao ser adicionado concentrado na dieta dos animais (Tabela 2).

173 **Tabela 2.** Peso vivo inicial, ganho de médio diário, valores médios (%) para umidade,
174 PB, MM e EE da carne de borregas, em três grupos com diferentes sistemas de
175 alimentação.

Variáveis (%)	TRATAMENTOS			Média	Erro padrão	Valor de P
	P	PS	C			
PVI	22,24	22,56	20,14	21,64	1,264	0,4611
GMD	0,0539c	0,178b	0,222a	0,151	0,0083	2,1231
Umidade	71,76	71,57	68,93	70,91	0,71	0,2328
PB	23,74	23,20	23,52	23,50	0,58	0,9345
MM	1,25	1,03	1,18	1,16	0,04	0,1309
EE	1,77a	3,56b	5,10c	3,29	0,39	<0,001

176 P = pasto / PS = pasto e suplemento / C = confinamento / PVI = peso vivo inicial / GMD =
177 ganho médio diário / PB = proteína bruta / MM = matéria mineral / EE = extrato etéreo.

178 Na avaliação qualitativa não houve diferença significativa para as variáveis pH
179 e marmoreio ($p > 0,05$) (Tabela 3).

180 **Tabela 3.** Avaliação de pH e marmoreio da carne de borregas, em três grupos com
181 diferentes sistemas de alimentação.

Variáveis	TRATAMENTOS			Média	Erro Padrão	Valor de P
	P	OS	C			
pH	5,62	5,47	5,54	5,54	0,03	> 0,05
Marmoreio	1	1	1	1	0	> 0,05

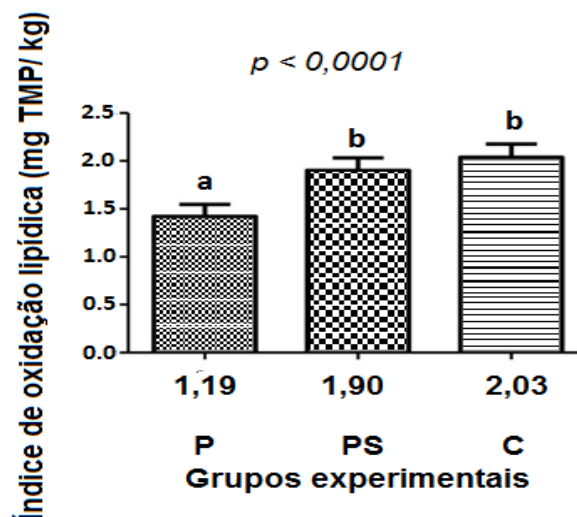
182 Marmoreio – 1 (traços de marmoreio) a 10 (marmoreio abundante)

183 P = pasto / PS = pasto e suplemento / C = confinamento

184 O pH manteve-se dentro do padrão esperado para a carne de ovinos sendo que
185 não houve diferença significativa entre os tratamentos, obtendo valor médio de 5,54.

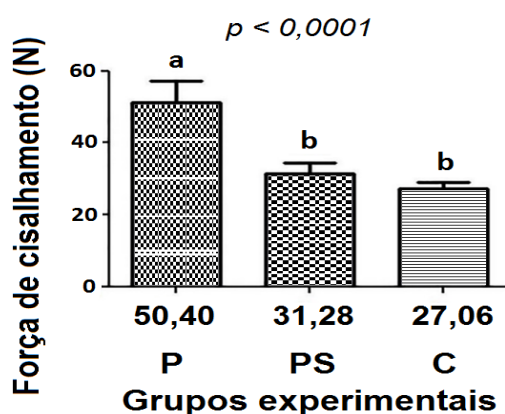
186 O marmoreio não apresentou diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$), estando
187 todos com traços de marmoreio.

188 Houve diferença estatística entre os tratamentos para a variável oxidação
189 lipídica onde o grupo P diferiu dos demais tratamentos tendo média de 1,1998 mg TMP/
190 kg de carne (Figura 1).



192 **Figura 1.** Oxidação lipídica na carne de borregas alimentadas com diferentes sistemas
 193 nutricionais: P (pasto, no qual as borregas receberam entre 70 a 80% da exigência
 194 nutricional⁹, n=7); PS (pasto e suplementação, no qual as fêmeas receberam de 100 a
 195 110% da exigência nutricional⁹, n=8); e C (confinamento, em que as borregas foram
 196 alimentadas em cocho individual, fornecido 140% da exigência nutricional⁹, n=9).

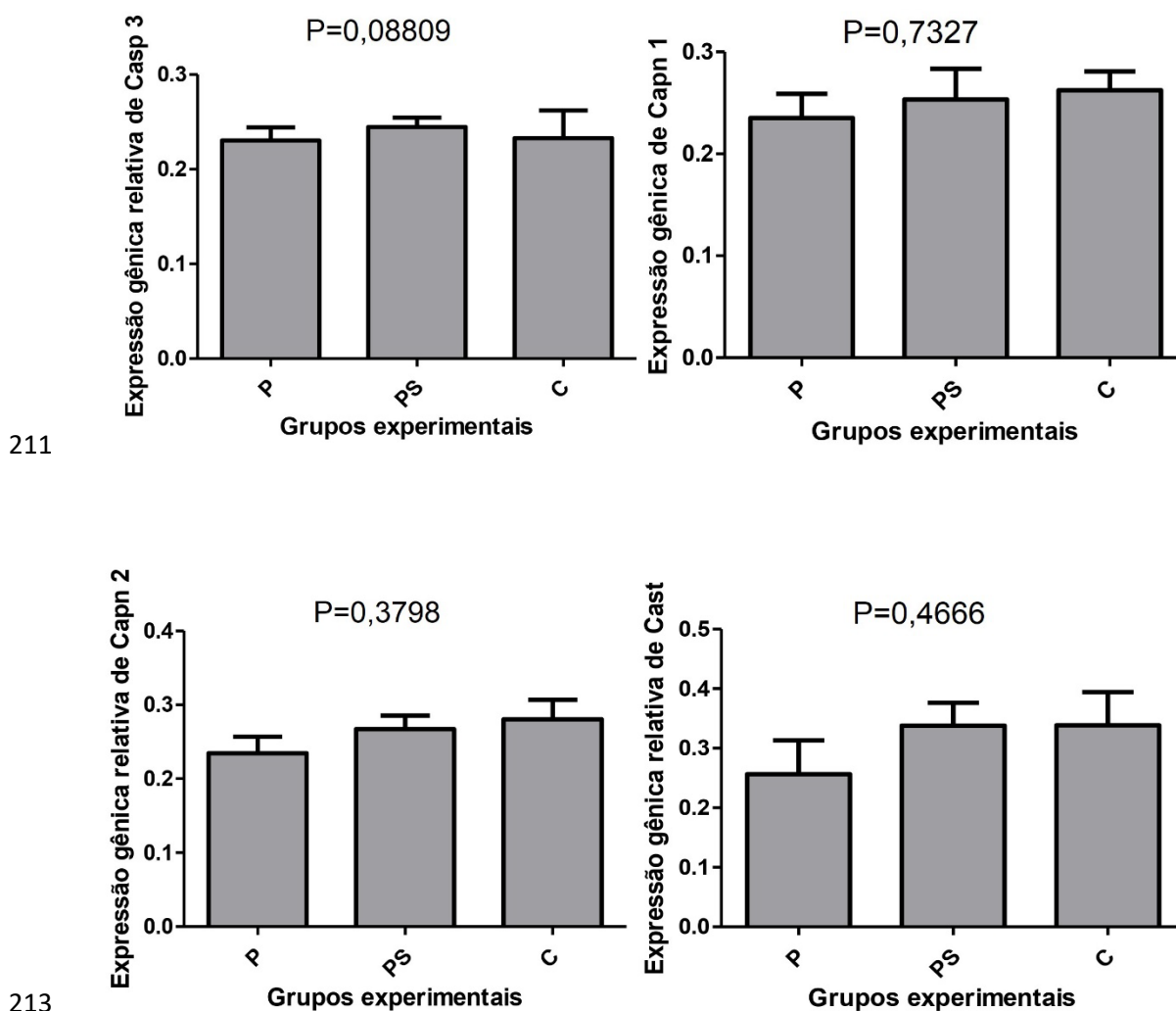
197 Para a força de cisalhamento houve diferença significativa entre os três
 198 tratamentos, sendo que o grupo C apresentou valor de 27,06 N, seguido do grupo o PS
 199 (31,28 N) mostraram menor N do que o tratamento P (50,40 N) (Figura 2).



201 **Figura 2.** Força de cisalhamento na carne de borregas alimentadas com diferentes
 202 sistemas nutricionais: P (pasto, no qual as borregas receberam entre 70 a 80% da
 203 exigência nutricional⁹, n=7); PS (pasto e suplementação, no qual as fêmeas receberam

204 de 100 a 110% da exigência nutricional⁹, n=8); e C (confinamento, em que as borregas
 205 foram alimentadas em cocho individual, fornecido 140% da exigência nutricional⁹,
 206 n=9).

207 Com os resultados devidamente corrigidos para eficiência, não houve diferença
 208 estatística para nenhum dos genes avaliados na análise de expressão gênica relativa
 209 ($P>0,05$) (Figura 3 – A, B, C e D).



211
 212
 213
 214 **Figura 3.** Expressão gênica relativa dos genes CASP3 (A), CAPN1 (B), CAPN2 (C) e
 215 CAST (D) avaliada no músculo *Longissimus lumborum* de borregas, utilizando a média
 216 dos endógenos HMBS e B2M como normalizadores da reação, em três grupos
 217 terminados com diferentes sistemas de alimentação: P (pasto, no qual as borregas

218 receberam entre 70 a 80% da exigência nutricional⁹); PS (pasto e suplementação, no
219 qual as fêmeas receberam de 100 a 110% da exigência nutricional⁹); e C (confinamento,
220 em que as borregas foram alimentadas em cocho individual, sendo fornecido 140% da
221 exigência nutricional⁹).

222

223 **Discussão**

224 É importante destacar que criar animais exclusivamente com alimentação
225 oriunda de pastejo não é suficiente para o atendimento das demandas de produção,
226 principalmente de animais geneticamente mais produtivos, havendo necessidade de
227 buscar alternativas que contornem o problema, tais como suplementação dos animais ²⁴.

228 As ovelhas terminadas em confinamento atingiram em menor tempo a
229 condição de abate, devido ao aporte nutricional que esse sistema proporciona e
230 provavelmente também está relacionado aos ganhos médios diários ²⁵.

231 Em um estudo sobre o crescimento e a taxa de infestação parasitológica na
232 terminação de cordeiros com e sem suplementação na fase de cria, confinados ou
233 semiconfinados em *Brachiaria brizantha*, mostrou que como esperado, os animais
234 confinados permaneceram com níveis de OPG baixos até o final, e os semiconfinados
235 mostraram aumento na infecção, mas sem necessidade de tratamentos anti-helmínticos e
236 sem prejuízos no seu desempenho ²⁶.

237 O que não aconteceu neste experimento, que, mesmo o pastejo sendo
238 rotacionado, a baixa qualidade das pastagens, fez com que a contaminação helmíntica
239 provocasse maior sensibilidade aos animais, o que aliado ao aporte nutricional baixo,
240 provocou menores ganhos, chegando a levar uma borrega a óbito durante ao final do
241 experimento.

242 Ovinos alimentados com dietas mais energéticas tem aumento nos valores de
243 extrato etéreo na carne, pois cordeiros alimentados com diferentes volumosos obtiveram
244 aumento linear no extrato etéreo da carne de acordo se elevava a gordura do volumoso
245 utilizado na dieta²⁷. Comparando animais confinados e a pasto observaram maiores
246 valores de lipídios na carne dos animais confinados, corroborando com o presente
247 estudo²⁸.

248 A composição centesimal média da carne ovina é de 75% de umidade, 19% de
249 proteína, 4% de gordura e 1,1% de matéria mineral, sendo influenciada em grande parte
250 pela alimentação e terminação dos animais²⁹.

251 Para a carne ovina espera-se pH final entre 5,5 e 5,8, sendo esta medida
252 importante para a qualidade da carne, principalmente a maciez, pois está relacionado
253 com a transformação do músculo em carne, pela degradação enzimática que ocorre na
254 estrutura miofibrilar do músculo³⁰. Os valores de pH encontrados corroboram com
255 dados recentes para a carne de cordeiras e borregas e demonstra que o abate foi
256 realizado dentro das normas de bem-estar animal, permitindo o correto rigor-mortis³¹.

257 O resultado para o marmoreio pode estar relacionado com a idade de abate,
258 pois o tecido adiposo, responsável pelo marmoreio, é o último dos tecidos a ser
259 depositado³². Sabe-se também que a gordura se deposita primeiro ao redor do rim e
260 intestinos, depois subcutaneamente e, finalmente, como gordura inter e intramuscular,
261 portanto, é difícil produzir carcaças contendo grande quantidade de gordura
262 intramuscular e pequenas quantidades de outras gorduras. Deve ser lembrado que o grau
263 de marmoreio está fortemente correlacionado com o conteúdo geral de gordura na
264 carcaça³³.

265 As médias de oxidação lipídica observadas na carne dos animais do tratamento
266 P (1,19mg de malonaldeído kg-1) apresentaram medias dentro do desejado, pois valores

267 abaixo de 1,59mg de malonaldeído kg-1 são considerados aceitáveis e sem prejuízos ao
268 consumidor³⁴. Já os tratamentos PS e C apresentaram médias acima do desejado isso
269 pode estar relacionado com a dieta dos animais.

270 O pasto possui antioxidantes naturais, sendo que animais que tem dieta
271 exclusiva em pastagem apresentam mais vitamina E na carne³⁵. Em carne de bovinos
272 em sistema a pasto, pasto com suplementação e confinamento, outros autores também
273 encontraram menores valores de oxidação lipídica para aos animais terminados a pasto
274 (a pasto 0,09 mg TMP/ kg e confinados 0,28 mg TMP/ kg), pois animais que tem dieta
275 exclusiva em pastagem apresentam mais vitamina E na carne^{36,37}.

276 A diferença significativa na FC pode ser explicada fisiologicamente pelo fato
277 dos animais a pasto se movimentarem mais em busca do alimento, conseqüentemente se
278 exercitando mais, produzem mais colágeno. E o aumento do colágeno e de sua
279 resistência é responsável pelo aumento da dureza da carne³⁸. Mesmo com valores mais
280 altos a carne do tratamento P é considerada macia³⁹, enquanto as carnes dos tratamentos
281 PS e C são consideradas muito macias. Valores próximos foram encontrados na
282 literatura para cordeiras e borregas variando de 34,9N a 57,8N^{31,40}.

283 Mesmo que a FC na carne do grupo PS não tenha sido menor que o grupo C,
284 sua carne é considerada muito macia, pleiteando a criação a pasto com suplemento a
285 melhor alternativa, como em pesquisa utilizando pasto com suplemento e confinamento
286 em cordeiros que obtiveram diferença no ganho de peso e resultados semelhantes nas
287 características de carcaça, por exemplo a textura, respectivamente, foi 3,0 e 3,73 (pela
288 granulometria das fibras musculares, onde 1 – muito grosseira e 5 – muito fina)⁴¹.

289 Embora a CASP3 não seja uma cisteína-protease dependente de cálcio, o uso
290 de Ca⁺⁺ leva a maior atividade da caspase 3, mas ainda é necessário para entender a

291 verdadeira relação entre o sistema proteolítico calpaína - calpastatina e caspase 3, e no
292 presente estudo não foi utilizado nenhum tipo de suplemento mineral especial⁴².

293 Porém é responsável pela fase de execução da apoptose celular, as principais
294 enzimas ativadas neste processo são as calpaínas, o que justifica a pesquisa dessa
295 variável⁴³. Na avaliação da maciez da carne de vacas descarte, não houve associação da
296 força de cisalhamento com a atividade da caspase 3 e apesar de estar relacionada ao
297 fenótipo, não está envolvida no processo de amaciamento *postmortem*⁴⁴.

298 Em bovinos de corte, houve diferença estatística em relação à expressão gênica
299 relativa das calpaínas entre raças distintas que são alimentadas com duas fontes
300 nutricionais, sendo elas Nelores e Angus que tem maior abundância de RNA do que o
301 Nelore. Também não foram relatadas diferenças na expressão desse gene na mesma
302 raça⁴⁵.

303 Na comparação de raças distintas, 54% das variações na maciez da carne se
304 deve às variações ambientais, enquanto os outros 46% estão associados à genética.
305 Dependendo da raça bovina, há mais genes que se relacionam com as calpaínas,
306 potencializando sua ação, o que é uma sugestão de que ocorra em outras espécies de
307 animais de produção, principalmente nos ruminantes⁴³.

308 Em outra pesquisa utilizando cabras de diferentes idades, houve a expressão do
309 gene CAPN2 na carne de cabras pós-púberes quando comparadas com a carne de cabras
310 mais jovens. Já o gene CAPN1, a expressão foi semelhante entre os grupos
311 experimentais de cabras recém-desmamadas e cabras pós-púberes. Os autores sugerem
312 que animais jovens têm uma menor taxa de proteólise, de acordo com sua maior taxa de
313 crescimento⁴⁶.

314 Em bovinos Braford terminados com diferentes planos nutricionais, pasto e
315 pasto com silagem de milho a 1% PV/dia, houve diferença significativa para a

316 abundancia de RNA do gene CAPN1 em diferentes músculos analisados de acordo com
317 a alimentação fornecida aos animais, havendo expressão no *Longissimus dorsi* dos
318 animais suplementados. Não houve diferença para o gene CAPN2 no mesmo estudo⁴⁷.

319 Cordeiras com 5 meses de idade, alimentadas por dois dias a pasto e
320 posteriormente divididas em 4 protocolos de jejum antes do abate, controle (zero dias),
321 1, 3 e 7 dias, observou-se correlação significativa entre a maciez de diferentes músculos
322 e abundância de RNA apenas no músculo *Longissimos dorsi*, que também apresentou
323 atividade significativa de μ -calpaína e de m-calpaína nas miofibrilas. A suposição geral
324 foi que aumentou a ação da calpaína e diminuiu da calpastatina, resultando em uma
325 maior maciez na carne dos animais dos grupos de jejum de 1 e 3 dias⁴⁸.

326 Com a expressão das calpaínas em todas as amostras, pode-se afirmar que a
327 criação PS é a mais indicada ao produtor, de acordo com um estudo onde os cordeiros
328 terminados em pasto com suplemento, não gerou prejuízo, o que indica necessidade de
329 elevada eficiência no uso dos recursos na criação de ovinos. O sistema de confinamento
330 para terminação dos cordeiros apresentou alto custo de produção, por isso, é
331 economicamente inviável⁴⁹.

332 A maior proporção de genes zebuínos em novilhos afetou significativamente a
333 atividade de calpastatina no 1º dia *post mortem* no músculo *Longissimus dorsi*, sendo
334 superior ($p < 0,05$) à de bovinos europeus. Não se detectou diferença na atividade de
335 calpastatina entre três grupos genéticos após 10 dias de maturação, mas pode-se notar
336 uma tendência de aumento com a maior participação do genótipo *Bos indicus*⁵⁰.

337 Houve maior expressão do gene CAST nas amostras de músculo de cordeiros
338 Santa Inês quando comparados com a carne de cordeiros mestiços White Dorper x Santa
339 Inês e Dorper x Santa Inês. Os autores sugerem que a expressão desse gene na raça
340 Santa Inês leva a uma maior produção da enzima calpastatina e consequente inibição da

341 calpaína, resultando em uma carne menos macia para esta raça. No mesmo estudo, foi
342 encontrado FC maior na carne dos animais da raça Santa Inês indicando que a carne
343 desta raça era menos macia em relação aos demais grupos genéticos estudados⁵¹.

344 Também não foi encontrado efeito da expressão sobre a FC, tanto em bovinos
345 Angus quanto em ovinos Dorset Down, em que não houve diferença estatística na
346 expressão do gene CAST, porém houve diferença da atuação da enzima calpastatina em
347 fases distintas da maturação da carne, que são ocorrências diferentes, justificando o
348 resultado comparativo desta variável com a FC⁵².

349

350 **Conclusões**

351 Os animais confinados têm maior ganho peso médio diário e menor tempo de
352 abate, quando comparados com animais criados exclusivamente a pasto e pasto com
353 suplemento.

354 Há aumento do extrato etéreo na carne dos animais confinados, pois o maior
355 aporte energético na nutrição aumenta esta variável.

356 Os animais mantidos somente a pasto têm menor oxidação lipídica na carne
357 que os outros tratamentos por conta da maior ingestão da vitamina E proveniente das
358 pastagens.

359 A força de cisalhamento é consideravelmente maior na carne dos animais
360 mantidos somente a pasto, porém ainda é considerada macia.

361 A nutrição das borregas não interfere na expressão gênica de CASP3, CAPN1,
362 CAPN2 e CAST.

363 Sugere-se mais pesquisas entre raças distintas de ovinos e tempos mais longos
364 de experimento.

365

366 **Agradecimentos**

367 Os autores agradecem a Universidade do Oeste Paulista, a qual financiou a
368 presente pesquisa, onde também todo o projeto se desenvolveu e realizou as análises de
369 qPCR em tempo real. Os autores também gostariam de agradecer à Laís Belan pela
370 grande colaboração nas análises de qualidade da carne.

371

372 **Conflito de interesse**

373 Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Referências bibliográficas

1. Forrest JC, Aberle ED, Hedrick HB, Judge MD, Merkel RA. Fundamentos de ciencia de la carne. 1 ed. 363p. **Zaragoza: Acribia**, 1979.
2. Watanabe A, Daly CC, Devine CE. The effect of the ultimate pH of meat on tenderness changes during ageing. **Meat Sci.**, v.42, p.67-78, 1996.
3. Insani EM et al. Oxidative stability and its relationship with natural antioxidants during refrigerated retail display of beef produced in Argentina. **Meat Sci.**, v. 79, n. 3, p. 444–452, 2008.
4. Koohmaraie M, Geesink GH. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. **Meat Sci.**, v. 74, n. 1, p. 34-43, 2006.
5. Chua BT, Guo K, Li P. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. **Journal Biology Chemistry**.v.275, p.5131–5135, 2000.
6. Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis, **Journal Cell Biology**. 150:887–894, 2000.
7. Wang KKW, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, Talanian VR, Keegan M, Herzog L, Allen H. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. **Archive Biochemistry Biophysics**. v. 356:p.187–196, 1998.
8. Palmer BR, Su HY, Roberts N, Hickford JG, Bickerstaffe R. Single Nucleotide Polymorphisms in the Intron of the Ovine Calpastatin Gene. **Anim.Biotechnol.**,2000. 11: 63-67.
9. National Research Council - NRC. Nutrient requirements of small ruminants. 2007, 362p.
10. Silva DJ, Queiroz AC. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). **UFV/Imprensa Universitária**, 2.ed. Viçosa, MG: 2002. 235p.
11. Capelle ER, Valadares Filho SC, Silva JFC et al. Estimativas do valor energético a partir de características químicas e bromatológicas dos alimentos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30, 6, p.1837-1856, 2001.
12. Souza GB, Nogueira ARA, Sumi LN, Batista LAR. Método alternativo para a determinação de fibra em detergente neutro e detergente ácido. São Carlos: **Embrapa Pecuária Sudoeste**, 1999. 21p.
13. Hegarty RS, Goopy JP, Herd RM, Mc Corkell B. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. **Journal of Animal Science**. 2006. v.85, p. 1479-1486.

14. Rogério MCP, Borges I, Neiva JNM. Valor nutritivo do resíduo da indústria processadora de abacaxi (*Ananas comosus* L.) em dietas para ovinos. Consumo, digestibilidade aparente e balanços energético e nitrogenado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, p.773-781, 2007.
15. Parente HM, Machado TM, Garcia R, Rogério MCP. Desempenho produtivo de ovinos em confinamento alimentados com diferentes dietas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 2009. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/237787703_Desempenho_produtivo_de_ovinos_em_confinamento_alimentados_com_diferentes_dietas>. Acesso em: 12 jun de 2019.
16. Osório JCS, Osório MTM. Produção de carne ovina: Técnicas de avaliação “in vivo” e na carcaça. **Embrapa Caprinos e Ovinos**.2.ed. Pelotas, p.82, 2005.
17. AOAC- Association of official analytical chemists. HORWITZ, W. Official methods of analysis of the association analytical chemists. 18th ed. Washington: **AOAC**. 1115 p. 2005.
18. Gomide LAM, Ramos EM. Ciência da qualidade da carne: fundamentos. Editora UFV. Viçosa, 197p. 2013.
19. Pikul J, Leszczynski DE, Kummerow FA. Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. **J. Agric. Food Chem.** 1989, 37,1309-1313.
20. American Meat Science Association (AMSA). 2001. Meat Evaluation Handbook. **American Meat Science Association**, Savoy, IL.
21. Wheeler TL, et al. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Sci.**, v. 62, n. 3, p. 345-352, 2002.
22. Ramos EM, Gomide LAM. Avaliação da qualidade da carnes: fundamentos e metodologias. Viçosa: UFG, 2007.
23. Pfaffl MW. Um novo modelo matemático para quantificação relativa em tempo real RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** 1 de maio de 2001; 29 (9): e45.
24. Borton RJ, et al. Comparison of characteristics of lambs fed concentrate or grazed on ryegrass to traditional or heavy slaughter weights. I. Production, carcass, and organoleptic characteristics. **Journal of Animal Science**, v. 83, n. 3, p. 679, 2005.
25. Pelegrini LFM et al. Características de carcaça de ovelhas de descarte das raças Ideal e Texel terminadas em dois sistemas de alimentação. **R. Bras. Zootec.**, v.37, n.11, p.2024-2030, 2008.
26. Catto JB, et al. Terminação de cordeiros, com e sem suplementação na fase de cria, confinados ou semiconfinados em *Brachiaria brizantha* diferida: parasitismo gastrointestinal e eficiência bioeconômica. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.20, 1-13, e-41626, 2019

27. Madruga MS. et al. Qualidade da Carne de Cordeiros Santa Inês Terminados com Diferentes Dietas. **R. Bras. Zootec.**, v.34, n.1, p.309-315, 2005.
28. Macedo FAF. et al. Qualidade de Carcaças de Cordeiros Corriedale, Bergamácia x Corriedale e Hampshire Down x Corriedale, Terminados em Pastagem e Confinamento. **R. Bras. Zootec.**, v. 29, n. 5, p. 1520-1527, 2000.
29. Lopes JEL, Sales RO, Azevedo AR, Oliveira ALT. Composição centesimal, perfil de ácidos graxos e colesterol da carne de cordeiros submetidos aos sistemas de produção com dieta experimental e convencional. **R. Bras. Higiene e Sanidade Animal.** 6: 31-50, 2012.
30. Silva Sobrinho AG et al. Características de qualidade da carne de ovinos de diferentes genótipos e idade ao abate. **R. Bras. Zootec.**, v.34, n.3, p.1070-1078, 2005.
31. Valadez-Garcia KM. et al. Free ferulic acid supplementation of heat-stressed hair ewe lambs: Oxidative status, feedlot performance, carcass traits and meat quality. **Meat Sci.**, v. 173, 108395, 2021.
32. Rosa GT et al. Crescimento de osso, músculo e gordura dos cortes da carcaça de cordeiros e cordeiras em diferentes métodos de alimentação. **R. Bras. Zootec.**, v. 36, n. 6, p. 2283-2289, 2002.
33. Pannier L, Gardner GE, Pearce KL, McDonagh M, Ball AJ, Jacob RH, Pethick DW. (2014). Associations of sire estimated breeding values and objective meat quality measurements with sensory scores in Australian lamb. **Meat Sci.**, 96: 1076–1087.
34. Torres EAFS, Okani ET. Teste de TBA: ranço em alimentos. **R. Nac. Carne**, v. 243, p. 68-76, 1997.
35. Yang A. et al. Lipid stability and meat colour of beef from pasture- and grain-fed cattle with or without vitamin E supplement. **Meat Sci.**v.60, n. 1, 41–50, 2002.
36. Descalzo AM. et al. Influence of pasture or grain-based diets supplemented with vitamin E on antioxidant/oxidative balance of Argentine beef. **Meat Sci.**, v. 70, n. 1,p. 0–44, 2005.
37. Daley CA. et al. A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. **Nutrition Journal**, v. 9, n. 10, 2010.
38. Field R. et al. Growth, carcass, and tenderness characteristics of virgin, spayed, and single-calf heifers. **J. Anim. Sci.**, v. 74, n. 9, p. 2178-86, 1996
39. Boleman SJ. et al. Consumer Evaluation of Beef of Known Categories of Tenderness. **J. Anim. Sci.**, v. 75, n. 1521–1524, 1997.
40. Zhao J. et al. Effect of dietary Tartary buckwheat extract supplementation on growth performance, meat quality and antioxidant activity in ewe lambs. **Meat Sci.**, v. 134,p. 79–85, 2017.

41. Antônio SDD. *Meta-análise do desempenho e características da carcaça e carne de cordeiros*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, 2017.
42. Chen L et al. Effects of camptothecin, etoposide and Ca²⁺ on caspase-3 activity and myofibrillar disruption of chicken during *postmortem* ageing. **Meat Sci.** v.87, p.165–174, 2011.
43. Koohmaraie M, Kent MP, Shackelford SD et al. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship? **Meat Sci.**v.62, p.345-352, 2002
44. Underwood KR, Means WJ, Du M. Caspase 3 is not likely involved in the 564 *postmortem* tenderization of beef muscle. **Journal of Animal Science**, v.86, p.960–965, 2008
45. Ferraz ALJ. Análise da expressão gênica no músculo esquelético de bovinos das raças Nelore e Aberdeen Angus e sua relação com o desenvolvimento muscular e a maciez da carne. 2009. xv, 93 f. **Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/104894>>. Acesso em 02 de fevereiro de 2021.
46. Saccà E, Corazzin M, Bovolenta S, Piasentier E. Meat quality traits and the expression of tenderness-related genes in the loins of young goats at different ages. **Animal** (2019), 13:10 p p 2419 –2428
47. Coria MS, Reineri PS, Pighin D, Barrionuevo MG, Carranza PG, Grigioni G, Palma GA. Feeding strategies alter gene expression of the calpain system and meat quality in the *longissimus* muscle of Braford steers. **Asian-Australas J. Anim. Sci.**, v. 33, n. 5:753-762, 2020.
48. Ilian MA, Morton JD, Bekhit AED, Roberts N, Palmer B, Sorimachi H, Bickerstaffe R. Effect of preslaughter feed with drawal period on longissimus tenderness and the expression of calpains in the ovine. **J. Agric. Food Chem.**2001,49, 1990-1998 [1]
49. Carina Simionato de Barros CS, Monteiro ALG, Poli CHEC, Dittrich JR, Canziani JRF, Fernandes MAM. Rentabilidade da produção de ovinos de corte em pastagem e em confinamento. **R. Bras. Zootec.**, v.38, n.11, p.2270-2279, 2009.
50. Whipple G, Koohmaraie M, Dikeman ME, Crouse J, Hunt MC, Klemm. Evaluation of attributes that affect longissimus muscle tenderness in Bos Taurus and Bos Indicus cattle. **Journal of animal science**. 1990.
51. Bagatoli A, Gasparino E, Soares MAM, et al. Expression of calpastatin and myostatin genes associated with lamb meat quality. **Genetics and Molecular Research**. v.12, n.4, p.6168-6175, 2013.
52. Ilian MA, Morton JD, Kent MP, LeCouteur CE, Hickford J, Cowley R, Bickerstaffe R. Intermuscular variation in tenderness: association with the ubiquitous and muscle-specific calpains. **Journal of Animal Science**, Albany, v.79, p.122-132, 2001.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO CEUA

18/08/2021

Certificado

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EXPRESSÃO DO GENE DA CALPAÍNA 1 NA CARNE DE BORREGAS SUBMETIDAS A DIFERENTES PLANOS NUTRICIONAIS NA PRÉ-PUBERDADE", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 6167 e tendo como participante(s) ISABELLA GUARTIERI DA SILVA (discente), ANANDA SILVA COIMBRA (discente), INES CRISTINA GIOMETTI CEDA (docente), MARILICE ZUNDT ASTOLPHI (orientador responsável), foi avaliado e APR. COM RECOMENDAÇÃO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.


Este Projeto de Pesquisa, 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), tendo sido APR. COM RECOMENDAÇÃO em reunião realizada em 17/06/2020.

MATERIAL ARMazenado/DOADO

Protocolo(s)	Data Aprovação	Armazenado (local)	É doação	Detalhes armazenamento
5667	11/05/2018	UNOESTE	NÃO	Bloco Q, Laboratório de Citogenética e Genética Molecular

Presidente Prudente, 18 de Agosto de 2021.


Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Coordenador Científico da CPDI


Prof. Dra. Adriana Falco de Brito
Coordenadora da CEUA - UNOESTE

Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação – CPDI – 18 3229-2079 – cpdi@unoeste.br
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP – 18 3229-2079 – cep@unoeste.br
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – 183229-2079 – ceua@unoeste.br
valide este documento em www.unoeste.br/sgp informando o código de segurança a8321cb2f6b958531928dd5a0d2f39a9

ANEXO B – NORMAS DA REVISTA SEMINA (QUALIS CAPES B1, FATOR DE IMPACTO 0,564)

Normas editoriais para publicação na Semina: Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Os artigos podem ser submetidos em português ou inglês, mas somente serão publicados em inglês. Os artigos submetidos em português, caso sejam aceitos para publicação, deverão ser traduzidos para o inglês.

Todos os artigos, após serem aceitos para publicação, devem ser acompanhados de um certificado comprovativo de tradução ou correção (como arquivo suplementar) de um dos seguintes serviços de tradução:

[American Journal Experts](#)

<https://www.researchsquare.com/researchers/editing>

[Editage](#)

[Elsevier](#)

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

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

<https://www.traduzoo.com/>

O autor principal deve anexar o **documento que comprova** esta tradução ou correção no sistema eletrônico na página de submissão em " **Docs. Sup.** . "

COMENTÁRIOS:

1) Os manuscritos originais submetidos para revisão são inicialmente avaliados pelo Comitê Editorial da *Semina: Ciências Agrárias*. Nessa avaliação, serão avaliados os requisitos de qualidade para publicação na revista, como escopo do artigo, adequação aos padrões da revista, qualidade da redação e embasamento teórico. Adicionalmente, considera-se também atualização da revisão bibliográfica, consistência e acurácia da metodologia, contribuição dos resultados, discussão dos dados observados no estudo, representação em tabela e figura, originalidade e consistência das conclusões.

Caso o número de manuscritos submetidos ultrapasse a capacidade de avaliação e publicação da *Semina: Ciências Agrárias*, será feita uma comparação entre as submissões e os trabalhos considerados de maior potencial de contribuição para o conhecimento científico serão encaminhados para assessores ad hoc. Os manuscritos que não forem aprovados por esses critérios são arquivados, enquanto os demais manuscritos são submetidos à avaliação de pelo menos dois assessores científicos especialistas na área temática do manuscrito, sem identificação dos autores. A taxa de inscrição não será devolvida aos autores que tenham seus manuscritos arquivados.

2) Quando apropriado, se o projeto de pesquisa que originou o artigo foi realizado de acordo com as normas técnicas de biossegurança e ética sob aprovação de um comitê de ética envolvendo seres humanos e / ou um comitê de ética envolvendo animais, o nome da comissão,

MANUSCRITOS NÃO SERÃO ACEITOS QUANDO:

- a) O arquivo principal do artigo em anexo contém os nomes dos autores e suas respectivas afiliações.
- b) O registro completo de todos os autores não foi adicionado aos metadados durante a submissão; por exemplo Nome completo; Instituição / Afiliação; País; Resumo da biografia / título / função.
- c) Texto explicativo da relevância do trabalho (importância e distinção de trabalhos já publicados), com extensão máxima de 10 linhas, não está incluído no campo COMENTÁRIOS AO EDITOR.
- d) A submissão não é acompanhada de documento que comprove o pagamento da taxa de submissão em arquivo complementar no " **Docs. Sup.** . " seção.
- e) O artigo principal não vem acompanhado de arquivos suplementares, incluindo gráficos, figuras, fotos e outros documentos, NA VERSÃO ORIGINAL (formatos JPEG, TIFF ou EXCEL).
- f) Não constam do manuscrito original as seguintes informações: título, resumo, palavras-chave em português e inglês, tabelas e figuras.
- g) A indicação de três possíveis revisores médicos para o manuscrito com NOME, INSTITUIÇÃO e E-MAIL deve constar no campo COMENTÁRIOS PARA O EDITOR.

RESTRICÇÕES POR ÁREA DE ASSUNTO:

PARA O CAMPO DA AGRONOMIA, NÃO SERÃO ACEITOS MANUSCRITOS, CASO:

- a) Os experimentos realizados com cultura *in vitro* limitam-se ao aprimoramento de protocolos já padronizados ou não fornecem novas informações sobre a área temática;
- b) Os experimentos de campo não incluem dados correspondentes a pelo menos dois anos ou locais diversos dentro do mesmo ano;
- c) Os experimentos referem-se apenas a testes de eficácia de produtos comerciais frente a agentes bióticos e abióticos de estresse fisiológico;
- d) Os experimentos envolvem apenas bioensaios (triagem) sobre a eficácia de métodos de controle de insetos, ácaros ou doenças em plantas, a menos que contenham uma contribuição importante sobre os mecanismos de ação sob a perspectiva de uma fronteira do conhecimento; ou
- e) O objetivo limita-se a registrar a ocorrência de uma espécie de praga ou patógeno ou associações com hospedeiros em novos locais dentro de regiões geográficas onde a espécie já seja conhecida. A documentação de espécies ou associações já conhecidas só será considerada se forem descritas em novas áreas ecológicas. Os registros de distribuição devem ser baseados em ecossistemas e não em fronteiras políticas.

PARA A CIÊNCIA ANIMAL, OS MANUSCRITOS NÃO SERÃO ACEITOS NOS SEGUINTE CASOS:

Referências bibliográficas muito antigas . 70% das referências devem ser dos últimos dez anos. Referências mais antigas (menos de 30%) serão aceitas somente na seção Material e Métodos. Não incluir como referência bibliográfica resumos simples ou expandidos e estudos apresentados em anais de eventos como referência. Teses, dissertações e monografias realizadas nos últimos três anos serão aceitas somente se não tiverem sido publicadas como artigos científicos em periódico.

Manuscrtos que não realizaram análises estatísticas adequadas,

Contém mais de dez autores.

Manuscrtos baseados em dados derivados do período completo de produção em experimentos avícolas (frangos e poedeiras).

Manuscrtos baseados em levantamentos locais (municipal, regional, matadouro específico, fazenda, etc.) contendo dados de manejo, alimentação, saúde, entre outros, de baixo impacto científico.

Categorias de Trabalho

a) Artigos científicos: máximo de 20 páginas, incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas

b) Comunicações científicas: máximo de 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e máximo de duas tabelas, duas figuras, ou a combinação de uma tabela e uma figura

c) Artigos de revisão: máximo de 25 páginas, incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas

Apresentação do Trabalho

Artigos originais completos, comunicações e resenhas devem ser redigidos em português ou inglês no Microsoft Word for Windows, em papel tamanho A4, com linhas numeradas por página, espaçamento 1,5 entre linhas, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, margens de 2 cm em todas as faces, com as páginas numeradas no canto superior direito e seguindo as orientações para o número máximo de páginas de acordo com a categoria do trabalho.

As figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e tabelas devem ser numeradas com algarismos arábicos, devem ser incluídas ao final do trabalho imediatamente após as referências bibliográficas, e devem ser citadas no próprio texto. Além disso, as figuras devem ser de boa qualidade e devem ser anexadas em seu formato original (JPEG, TIFF, etc.) no Docs Sup na página de submissão. Não serão aceitas figuras e tabelas que não atendam às seguintes especificações: largura de 8 cm ou 16 cm com altura máxima de 22 cm. Se a figura tiver dimensões maiores, ela será reduzida durante o processo editorial às dimensões acima mencionadas.

Nota : Figuras (Ex. **Figura 1**. Título) e tabelas (**Tabela 1**. Título) devem ter largura de 8 cm ou 16 cm com altura máxima de 22 cm. Aqueles com dimensões maiores serão reduzidos durante o processo editorial às dimensões acima mencionadas. Para quaisquer tabelas e figuras que não sejam da obra original do autor, é obrigatória a citação da fonte consultada. Coloque esta citação abaixo da tabela ou figura e indique usando uma fonte menor (Times New Roman 10).

Ex: " **Fonte**": IBGE (2017), ou **Fonte** : IBGE (2017).

Preparação do manuscrito

Artigo científico:

Os artigos científicos devem relatar resultados de pesquisas originais nas áreas afins, com as seções organizadas da seguinte forma: Título em inglês; Título em português; Três a cinco destaques; Resumo em inglês com palavras-chave (máximo de seis palavras, em ordem alfabética); Resumo em português com palavras-chave (máximo de seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Materiais e métodos; Resultados e discussão; Conclusões; Reconhecimentos; Fornecedores, se aplicável; e referências bibliográficas. Os títulos devem estar em negrito sem numeração. Se houver necessidade de incluir um subtítulo em uma seção, ele deve ser colocado em itálico e, se houver outros subtópicos a serem incluídos em um subtítulo, estes devem ser numerados com algarismos arábicos. (Exemplo: **Materiais e Métodos** , *As áreas de estudo* , 1. *área rural* , 2. *Urban uma rea* .)

O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outro local com o mesmo conteúdo, exceto na forma de Resumo em Eventos Científicos, Notas Introdutórias ou Formato Reduzido.

O trabalho deve ser apresentado na seguinte ordem:

1. **Título do trabalho** , acompanhado de sua tradução para o português, se for o caso.

2. **Três ou cinco destaques**, consiste em pontos orientados para resultados que fornecem aos leitores uma visão geral das principais descobertas de seu artigo. Cada destaque deve ter 85 caracteres ou menos.

3. **Resumo e Palavras-chave**: Deve ser incluído um resumo informativo com no mínimo 200 palavras e no máximo 400 palavras, no mesmo idioma do texto do artigo, acompanhado de uma tradução para o inglês (*Resumo e Palavras-chave*) do texto não foi escrito em inglês.

4. **Introdução**: A introdução deve ser concisa e conter apenas a revisão estritamente necessária para apresentar o tema e subsidiar a metodologia e a discussão.

5. **Materiais e Métodos**: Esta seção pode ser apresentada de forma contínua, descritiva ou com subtítulos para permitir ao leitor compreender e poder repetir a metodologia citada com ou sem o apoio de citações bibliográficas.

6. Resultados e Discussão : Esta seção deve ser apresentada de forma clara, com o auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de forma que não suscite dúvidas ao leitor quanto à autenticidade dos resultados e pontos de vista discutidos.

7. Conclusões: Estas devem ser claras e apresentadas de acordo com os objetivos propostos no trabalho.

8. Agradecimentos : Pessoas, instituições e empresas que contribuíram com o trabalho devem ser citadas ao final do texto, antes da seção de Referências Bibliográficas.

Observação:

Notas: Cada nota referente ao corpo do texto deve ser indicada com um símbolo sobrescrito imediatamente após a frase a que se refere e deve ser incluída como nota de rodapé no final da página.

Figuras: Devem ser inseridas ao final do artigo, uma em cada página, após as referências. As figuras que forem consideradas essenciais serão aceitas e deverão ser citadas no texto por ordem numérica, em algarismos arábicos. Se alguma das ilustrações submetidas já tiver sido publicada, a fonte e a permissão para publicação devem ser informadas.

Tabelas:

Devem ser inseridas ao final do artigo, uma em cada página, após as referências. As tabelas devem vir acompanhadas de um cabeçalho que permita a compreensão dos dados coletados sem a necessidade de utilizar o corpo do texto como referência.

Quantidades, unidades e símbolos:

a) Os manuscritos devem estar de acordo com os critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais de cada área temática.

b) Use o Sistema Internacional de Unidades em todo o texto.

c) Use o formato de potência negativa para observar e apresentar unidades relacionadas: por exemplo, kg ha⁻¹. Não use o símbolo de barra para relacionar unidades: por exemplo, kg / ha.

d) Use um espaço simples entre as unidades: g L⁻¹, não gL⁻¹ ou gL⁻¹.

e) Use a representação horária de 24 horas com quatro dígitos para as horas e minutos: 09h00, 18h30.

8. Citações de autores no texto

As Regras da APA utilizam o sistema autor-data para citações indiretas, ou seja, sobrenome do autor, vírgula e ano de publicação. O número da página só é inserido quando há uma citação direta. Nesse caso, o sobrenome do autor citado, vírgula, ano, vírgula seguida de "p". E o número da página

Quando nas citações os autores estiverem fora dos parênteses, use sempre "e" (português); "And" (inglês) e "y" (espanhol); para separar o penúltimo do último autor citado. O "&" é sempre inserido entre o penúltimo e último autor quando citado entre parênteses e referências.

Citação:

Um Trabalho de Dois Autores: Nomeie ambos os autores na frase de sinalização ou entre parênteses cada vez que você citar o trabalho. Use a palavra "e" entre os nomes dos autores no texto e use o e comercial entre parênteses.

Ex:

Os resultados de Wegener e Petty (1994) confirmaram que ...
(Wegener & Petty, 1994)

Uma obra de três a cinco autores : Liste todos os autores na frase de sinalização ou entre parênteses na primeira vez que citar a fonte. Use a palavra "e" entre os nomes dos autores no texto e use o e comercial entre parênteses.

Ex:

Almeida, Parisi e Pereira (1999, p. 379)
ou Almeida, Parisi e Pereira (1999, pp. 372-373)
ou (Almeida, Parisi, & Pereira, 1999, p. 73)

Kernis, Cornell, Sun, Berry e Harlow (1993)
(Kernis, Cornell, Sun, Berry, & Harlow, 1993)

Nas citações subsequentes, use apenas o sobrenome do primeiro autor seguido de "et al." na frase de sinalização ou entre parênteses.

(Kernis et al., 1993)

Exemplo : modelo de citação com um, seis ou mais autores

Figura 1

Estilos básicos de citação no texto

Tipo de citação	Frase Sinal		Referência Parentética	
	1 st Uso de Fonte	Uso subsequente da Fonte	1 st Uso de Fonte	Uso subsequente da Fonte
1-2 autores	Minosso e Toso (2019)	Minosso e Toso (2019)	(Minosso & Toso, 2019)	(Minosso & Toso, 2019)
3-5 autores	Lopes, Meier e Rodrigues (2019)	Lopes et al. (2019)	(Lopes, Meier e Rodrigues, 2019)	(Lopes et al., 2019)
6 ou mais autores	Werner et al. (2017)	Werner et al. (2017)	(Werner et al., 2017)	(Werner et al., 2017)
Organização com abreviatura identificável	Instituto Brasileiro de Ciência e Tecnologia (IBICT) (2018)	IBICT (2018)	(Instituto Brasileiro de Ciência e Tecnologia [IBICT], 2018)	(IBICT, 2018)
Organização sem abreviatura	Simply Cats (2019)	Simply Cats (2019)	(Simply Cats, 2019)	(Simply Cats, 2019)

Duas ou mais obras do mesmo autor no mesmo ano - use letras minúsculas (a, b, c) com o ano para ordenar as entradas na lista de referência. Use as letras minúsculas com o ano na citação no texto.

Ex: (Porter, 1999a, 1999b, 1999c)

Autores com o mesmo sobrenome: Para evitar confusão, use as primeiras iniciais com os sobrenomes.

(E. Johnson, 2001; L. Johnson, 1998)

Duas ou mais obras do mesmo autor com datas de publicação diferentes. (Ordem cronológica)

Ex: Segundo Porter (1986, 1991, 1999, 2000),

Exemplo de referência:

Todos os autores participantes de um estudo referenciado devem ser mencionados, independentemente do número de participantes .

Artigo:

Berndt, TJ (2002). Qualidade de amizade e desenvolvimento social. *Current Directions in Psychological Science*, 11 , 7-10.

Mais de um autor - Listar por seus sobrenomes e iniciais. Use o e comercial em vez de "&."

Adair, JG, & Vohra, N. (2003). A explosão de conhecimento, referências e citações: a resposta única da psicologia a uma crise. *American Psychologist*, 58 (1), 15-23. doi: 10.1037 / 0003-066X.58.1.15

Pereira, GP, Sequinatto, L., Caten, A., & Mota, M. (2019). Refletância espectral VIS-NIR para discretização de solos com alto teor de areia. *Semina: Ciências Agrárias*, 40 (1), 99-112. doi: 10.5433 / 1679-0359.2019v40n1p99

Wegener, DT e Petty, RE (1994). Gestão do humor em estados afetivos : a hipótese de contingência hedônica. *Journal of Personality and Social Psychology*, 66 , 1034-1048. doi: 10.1037 / 0022-3514.66.6.1034

Artigo eletrônico:

Santos, CP, & Fernandes, DH von der (2007). A recuperação de serviços e seu efeito na confiança e lealdade do cliente. *RAC-letrônica*, 1 (3), 35-51. Obtido em http://anpad.org.br/periodicos/content/frame_base.php?revista=3

Livro

Kashdan, T., & Biswas-Diener, R. (2014). *O lado bom do seu lado negro*. New York, NY: Hudson Street Press.

Capítulo de livro

Serviss, GP (1911). Uma viagem de terror. Em *A Columbus of space* (pp. 17-32). New York, NY: Appleton.

Capítulo de livro eletrônico

Shuhua, L. (2007). Festival da Noite do Meio-Outono. Em JSM Lau & H. Goldblatt (Eds.), *The Columbia Anthology of Modern Chinese Literature* (pp. 95-102). New York, NY: Columbia University Press. Obtido em <https://www.worldcat.org/title/columbia-anthology-of-modern-chinese-literature/oclc/608153696>

Anais / Anais

Costa, ER e Boruchovitch, E. (2001). Entendendo as relações entre a aprendizagem e a ansiedade. Anais da XXXI Reunião Anual de Psicologia (p.203). Ribeirão Preto, SP: Sociedade Brasileira de Psicologia.

Uma tese e / ou dissertação impressa

Leon, ME (1998). *Uma análise de redes de cooperação das pequenas e médias empresas do setor das telecomunicações*. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Tese ou dissertação eletrônica

Hirata, CA (2016). *Microbiologia agrícola, Microorganismos do solo, Fungos micorrízicos, Microorganismos fixadores de nitrogênio, Ecologia microbiana*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil. Obtido em <http://www.bibliotecadigital.uel.br>

Organização como Autor

American Psychiatric Association. (1988). *DSM-III-R, Manual de diagnóstico e estatística de transtorno mental* (3ª ed. Rev.). Washington, DC: Autor.

Lei

Lei n. 11.638, de 28 de setembro de 2007. Altera e revoga dispositivos da Lei n. 6.404, de 15 de dezembro de 1976, e da Lei n. 6.385, de 7 de dezembro de 1976, e estende às sociedades de grande porte relativo à elaboração e divulgação da contabilidade. Obtido em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/lei/l11638.htm

A exatidão e a adequação das referências bibliográficas das obras consultadas e citadas no texto do artigo, bem como das opiniões, conceitos e afirmações, são de inteira responsabilidade dos autores.

Nota : Consulte os números recentemente publicados da **Semina: Ciências Agrárias** para mais detalhes sobre como formatar as referências no artigo.

As demais categorias de trabalhos (Comunicação e Revisão Científica) devem seguir as normas acima mencionadas, mas com as seguintes orientações adicionais para cada categoria:

Comunicação científica

As comunicações científicas devem ser apresentadas de forma concisa, mas com uma descrição completa do termo pesquisa ou pesquisa em andamento (nota introdutória), com documentação bibliográfica completa e metodologias, semelhantes a um artigo científico regular. As comunicações científicas devem conter as seguintes seções: Título (em português e inglês); Resumo com palavras-chave em português; Resumo com palavras-chave em inglês; e corpo do texto. O corpo do texto não deve ser dividido em seções, mas deve seguir a seguinte sequência: introdução, metodologia, resultados e discussão (podem incluir tabelas e figuras), conclusão e referências bibliográficas.

Artigos de revisão bibliográfica

Artigos de revisão devem envolver tópicos relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por número é limitado, e os autores só podem escrever artigos de revisão de interesse da revista, a convite dos membros do conselho editorial da revista. Se um artigo de revisão é submetido por um autor, é necessária a inclusão de resultados relevantes do autor ou do grupo envolvido no estudo, juntamente com referências bibliográficas que demonstrem experiência e conhecimento sobre o tema.

Um artigo de revisão deve conter as seguintes seções: Título (português e inglês); Resumo com palavras-chave em português; Resumo com palavras-chave em inglês; Desenvolvimento do tema proposto (o texto pode ser dividido em seções, mas não é obrigatório); Conclusões ou Considerações Finais; Agradecimentos (se aplicável); e referências bibliográficas.

Outras informações importantes

1. A publicação dos artigos depende do parecer favorável de assessores ad hoc e da aprovação do Conselho Editorial da *Semina: Ciências Agrárias* UEL.

2. As reimpressões não serão entregues aos autores, uma vez que os números estarão disponíveis online no site da revista (<http://www.uel.br/revistas/uel>).

3. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do manuscrito para a revista. A reprodução dos artigos só é permitida quando a fonte é citada. O uso comercial das informações é proibido.

4. Dúvidas ou problemas imprevistos nas presentes normas serão tratados pelo Conselho Editorial da área temática em que o artigo foi submetido para publicação.

5. *O número de autores:* Não há limite para o número de autores, mas as pessoas incluídas como co-autores devem ter participado efetivamente do estudo. Pessoas com participação limitada no estudo ou na elaboração do artigo devem ser citadas na seção Agradecimentos, assim como instituições que concederam bolsas e outros recursos financeiros.

6. Incluir o ORCID de todos os autores aprovados para publicação. O identificador ORCID pode ser obtido no registro ORCID. Você deve aceitar os padrões para apresentação de ID ORCID e incluir o URL completo (por exemplo <http://orcid.org/0000-0002-1825-0097>).

Condições de submissão

Como parte de nosso processo de submissão, os autores devem verificar se a submissão está de acordo com todos os itens listados abaixo. Submissões que não estiverem de acordo com as normas serão rejeitadas e os autores informados sobre a decisão.

1. Os autores devem declarar que a contribuição é original e nova e que não está sendo avaliada para publicação em outro lugar; qualquer exceção (ões) deve ser justificada nos "Comentários ao Editor".
2. Os autores também devem informar que o material está formatado corretamente e que os Documentos Complementares estão anexados, CONSCIENTE que o **formato incorreto resultará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DE MÉRITO**.
3. **Os dados de autoria de todos os autores devem ser inseridos no campo Metadados durante o processo de submissão.**

Use o botão "incluir autor".

1. **Na etapa seguinte, preencha os metadados em inglês.**

Para incluir os dados, após salvar os dados do envio em português, clique em "editar metadados" no topo da página. Altere o idioma para inglês e insira o título em inglês, o resumo e as palavras-chave. Salve e prossiga para a próxima etapa.

1. A **identificação da autoria** da obra deve ser retirada do arquivo e do Word utilizando a opção "Propriedades" para garantir o critério de anonimato da revista, caso o artigo seja submetido à revisão por pares, de acordo com as orientações disponíveis em [Garantir uma revisão por pares cega](#).
2. Os arquivos a serem submetidos devem estar em formato Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2 MB).

O texto deve ser digitado em folha de papel A4, com linhas numeradas, espaçamento 1,5, e fonte Times New Roman tamanho 11.

1. Confirme que todos os padrões éticos foram seguidos caso a pesquisa tenha sido realizada com seres vivos. Incluir documentos de prova de aprovação por um comitê de ética institucional envolvendo seres humanos e / ou um comitê de ética envolvendo animais, se esses documentos forem solicitados.
2. **Incluir o pagamento da Taxa de Submissão e anexar o comprovante de pagamento como documento complementar em "Data Sub"**

Declaração de direitos autorais

A **Declaração de Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista é de direito do autor. Como os artigos publicados nesta revista são de acesso aberto, os artigos podem ser utilizados livremente, com suas atribuições, para fins educacionais e não comerciais.

A revista tem o direito de fazer alterações em nível normativo, ortográfico e gramatical nos artigos originais, para manter o uso adequado do idioma e a credibilidade da revista. No entanto, o estilo de redação dos autores será respeitado.

Alterações, correções ou sugestões em nível conceitual, quando necessárias, serão encaminhadas aos autores.

As opiniões expressas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Política de Privacidade

Os nomes e afiliações relatados neste periódico são utilizados exclusivamente para os serviços prestados e não são disponibilizados para nenhuma outra finalidade ou a terceiros.

Semina: Ciências Agrárias

Londrina - PR
ISSN 1676-546X
E-ISSN 1679-0359
semina.agrarias@uel.br

Condições de submissão

Como parte de nosso processo de submissão, os autores são obrigados a garantir que a submissão esteja de acordo com todos os itens listados abaixo. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. Os autores afirmam que a contribuição é original e nova e que não está sendo avaliada para publicação em outro periódico; qualquer exceção (ões) deve ser justificada nos "Comentários ao Editor".
2. Os autores afirmam que o material está formatado corretamente e que os Arquivos Suplementares foram carregados, CONSCIENTE que o **formato incorreto resultará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DE MÉRITO**.
3. **Na próxima etapa, preencha os metadados em inglês.**

Para incluir metadados, após salvar os dados de submissão em português, clique em "editar metadados" no topo da página. Altere o idioma para inglês e insira o título em inglês, o resumo e as palavras-chave. Salve e vá para a próxima etapa.

1. **Os dados de autoria de todos os autores devem ser preenchidos durante o processo de submissão.**

Use o botão "incluir autor."

1. Verifique se a **identificação de autoria** do trabalho foi removida do arquivo e do Word usando a opção Propriedades para garantir o critério de anonimato da revista se o artigo for submetido à revisão por pares de acordo com as orientações disponíveis em [Garantir uma revisão por pares cega](#).
2. Os arquivos para envio estão nos formatos Word, OpenOffice ou RTF (desde que não excedam 2 MB).

O texto está escrito em espaçamento 1,5 e em fonte Times New Roman tamanho 11. Use itálico em vez de sublinhado (exceto para endereços de URL).

O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos nas [Diretrizes para Autores](#) sob o título "Sobre a Revista".

1. Confirme que todos os padrões éticos foram seguidos caso a pesquisa tenha sido realizada com seres vivos. Forneça a documentação da aprovação de um comitê de ética institucional e a prova de consentimento informado, se esses documentos forem solicitados. O cumprimento dos preceitos éticos aplicáveis deve ser citado no corpo do texto.
2. No campo **COMENTÁRIOS AO EDITOR** deve constar um texto indicando a relevância do trabalho (importância e distinção em relação a outros trabalhos já publicados), com extensão máxima de 10 linhas.

Declaração de direitos autorais

A **Declaração de Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista é de direito do autor. Como os artigos publicados nesta revista são de acesso aberto, os artigos podem ser utilizados livremente, com suas atribuições, para fins educacionais e não comerciais.

A revista tem o direito de fazer alterações em nível normativo, ortográfico e gramatical nos artigos originais, para manter o uso adequado do idioma e a credibilidade da revista. No entanto, o estilo de redação dos autores será respeitado.

Alterações, correções ou sugestões em nível conceitual, quando necessário, serão encaminhadas aos autores. Nestes casos, após a cobrança, os artigos serão submetidos a nova avaliação.

As opiniões expressas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Política de Privacidade

Os nomes e afiliações relatados neste periódico são utilizados exclusivamente para os serviços prestados e não são disponibilizados para nenhuma outra finalidade ou a terceiros.

Lista de verificação de preparação de envio

Como parte do processo de submissão, os autores são solicitados a verificar a conformidade de sua submissão com todos os itens a seguir, e as submissões podem ser devolvidas aos autores que não cumpram essas diretrizes.

1. Este trabalho é original e inédito e não está sendo considerado para publicação em outro periódico; caso contrário, uma justificativa deve ser fornecida nos "Comentários ao Editor".
2. O texto está formatado corretamente e o Material Complementar será submetido, **LEVANDO EM CONTA** que a formatação incorreta resultará na **SUSPENSÃO** do processo de avaliação **SEM AVALIAÇÃO DE SEU MÉRITO**
3. Os arquivos de envio estão nos formatos Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não excedam 2 MB);
 - O espaçamento entre linhas deve ser definido como 1,5, a fonte é Times New Roman, tamanho 11, e itálico deve ser usado em vez de sublinhado (exceto para endereços URL);
 - O texto segue o estilo e os requisitos de referência descritos nas "Diretrizes para autores", que estão incluídas na seção "Sobre a revista"
4. As informações de autoria de todos os autores devem ser fornecidas no momento da submissão.
 - Use a opção "**incluir autor**".
5. De acordo com as instruções descritas em "Garantir cegueira, revisão por pares," a identidade do autor foi removida do arquivo e a opção "Propriedades" no Word, garantindo assim que os critérios de confidencialidade da revista sejam atendidos se o documento for enviado para revisão por pares (por exemplo, manuscritos)
6. Declaro que todas as normas éticas foram seguidas no caso de pesquisas com organismos vivos, e, se solicitado, possuo os documentos que comprovam a aprovação pelo Comitê de Ética, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O cumprimento dos princípios éticos aplicáveis deve ser mencionado no texto.
7. Nos Comentários do Editor, os autores precisam adicionar três possíveis revisores médicos. Nome, instituição e e-mail precisam ser adicionados.
8. [Taxa de submissão de artigos](#)

Aviso de direitos autorais

O Copyright dos manuscritos publicada ao periódico. Como são publicados em um periódico de acesso aberto, eles estão disponíveis gratuitamente, para uso privado ou para fins educacionais e não comerciais.

A revista tem o direito de fazer, no documento original, mudanças relativas às normas linguísticas, ortografia e gramática, com o objetivo de garantir as normas padrão do idioma e a credibilidade da revista. No entanto, respeitar o estilo de escrita dos autores.

Quando necessário, mudanças conceituais, correções ou sugestões serão encaminhadas aos autores. Casos de casos, o manuscrito deve ser submetido a uma nova avaliação após revisão.

A responsabilidade pelas opiniões expressas nos manuscritos é inteiramente dos autores.

Declaração de privacidade

Os nomes e endereços de e-mail inseridos neste site da revista serão usados exclusivamente para os propósitos declarados desta revista e não serão disponibilizados para qualquer outro propósito ou a qualquer outra parte.

ANEXO C – NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURA (QUALIS CAPES A2, FATOR DE IMPACTO 2.240)

Journal of the
**Science of Food and
Agriculture**



HOME

ABOUT ▾

CONTRIBUTE ▾

BROWSE ▾

Contents

- [1. Submission](#)
- [2. Aims and Scope](#)
- [3. Manuscript Categories and Requirements](#)
- [4. Preparing Your Submission](#)
- [5. Editorial Policies and Ethical Considerations](#)
- [6. Author Licensing](#)
- [7. Publication Process After Acceptance](#)
- [8. Post Publication](#)
- [9. Editorial Office Contact Details](#)

1. SUBMISSION

Thank you for your interest in *Journal of the Science of Food and Agriculture*. All papers submitted to JSFA will also be considered for our sister journal, *JSFA Reports*.

Note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

Once you have prepared your submission in accordance with the Guidelines, manuscripts should be submitted online [here](#).

The submission system will prompt you to use an ORCID iD (a unique author identifier) to help distinguish your work from that of other researchers. Click [here](#) to find out more.

Click [here](#) for more details on how to use ScholarOne.

Authors will receive an immediate acknowledgement of receipt of their paper.

For help with submissions, please contact the Editorial Office at jsfa@wiley.com

Please note that the editorial office cannot accept submissions via email.

We look forward to your submission.

2. AIMS AND SCOPE

With particular emphasis on interdisciplinary studies at the agriculture/food interface, the journal covers fundamental and applied research in these areas:

- Food – Health and Nutrition
- Food Qualities
- Food Safety
- Food Materials and Food Engineering
- Food Science and Technology, Sustainable Production
- Sensory and Consumer Sciences
- Agriculture – Production
- Agriculture – Utilization
- Agriculture – Environment

To view our detailed Aims and Scope click [here](#)

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

Front Matter

Front Matter is usually commissioned.

Please note that all manuscript types require an abstract.

-
- **Review:** A summary and discussion of the relevant literature.
 - **Mini-Review:** A sharply focused, selectively referenced summary and assessment of the relevant literature. Particularly effective when discussing cutting-edge advancements in the discipline.
 - **Perspective:** A lightly referenced scholarly opinion piece, focusing on current or future directions in a field. A Perspective can serve to assess the science directly concerned with a particular topic or report on relevant issues that may arise from the discipline (for example, policy, effects on society, regulatory issues and controversies).
 - **Spotlight:** A brief, lightly referenced article about an outstanding area, newsworthy advance or other event. These articles should be written in a lively and accessible style; contain a one-sentence abstract; and include an eye-catching, captioned image.

Research

Please note that all research manuscript types require a compound abstract.

- **Research Paper**
- **Short Communication:** A shorter paper aiming to provide readers with useful and novel results or information that does not warrant publication as a full research paper. The manuscript should contain the same headings found in a Research Paper (see Preparing Your Submission)

Manuscript Length

Paper Type	Maximum Length (including tables and figures)
Research Article	6000 words
Short Communication	4000 words
Review	6000 words
Mini-Review	4000 words
Perspective	6000 words
Spotlight	3000 words

4. PREPARING YOUR SUBMISSION

Cover Letters

The journal requires a cover letter be included in submissions.

A cover letter should explain: why this topic is important; why these results are significant; why you are submitting to this journal; and why this journal's readers will read it.

It should also include any other information the editor needs to know, for example if the paper is for a Special Issue, or has been invited.

Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: main text file; tables; figures.

Text File

The text file should be presented in the following order:

- i. **Title**
- ii. A short **running title** of less than 80 characters
- iii. The **full names of all authors**
- iv. The **authors' institutional affiliations at which the work was carried out**. (footnote for author's present address if different to where the work was carried out)
- v. **Abstract** and **keywords**
- vi. **Main text**
- vii. **Acknowledgments**
- viii. **References**
- ix. **Figure Legends**
- x. **Appendices**

Figures and supporting information should be supplied as separate files.

Title

The title should be short, informative and contain the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's [best practice SEO tips](#))

Authorship

Please refer to the journal's authorship policy in the [Editorial Policies and Ethical Considerations](#) section for details on eligibility for author listing.

Acknowledgements

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

You will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. See the section 'Conflict of Interest' in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on what to include in this section. Please ensure you liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Abstract

For all manuscripts please provide an abstract of no more than 250 words, containing the major keywords. Abstracts for Research Papers and Short Communications **must** be divided into the following sections 'Background', 'Results' and 'Conclusion'

Keywords

Please provide 4-6 keywords. These will improve the discoverability of your paper.

Main text

The main text of Research Papers and Short Communications should contain the following sections:

1. **Introduction** including a clear description of the aims of the investigation.
2. **Materials and Methods** section stating clearly, in sufficient detail to permit the work to be repeated, the methods and materials used. Give the statistical design (including replication) of each experiment where appropriate, and include the details of the supplier or manufacturer of any chemical or apparatus not in common use.
3. **Results** presented concisely, using tables or illustrations for clarity.
4. **Discussion** and interpretation of the results.
5. **Conclusion(s)**. To avoid repetition this can sometimes be combined with the Discussion section.

*Note: These criteria do not apply to **Front Matter** papers, which should be given headings appropriate to the structure and format of the individual manuscript.*

Conflict of Interest Statement

You will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. See the section 'Conflict of Interest' in the Editorial Policies and Ethical Considerations section for details on what to include in this section. Please ensure you liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Abstract

For all manuscripts please provide an abstract of no more than 250 words, containing the major keywords. Abstracts for Research Papers and Short Communications **must** be divided into the following sections 'Background', 'Results' and 'Conclusion'

Keywords

Please provide 4-6 keywords. These will improve the discoverability of your paper.

Main text

The main text of Research Papers and Short Communications should contain the following sections:

1. **Introduction** including a clear description of the aims of the investigation.
2. **Materials and Methods** section stating clearly, in sufficient detail to permit the work to be repeated, the methods and materials used. Give the statistical design (including replication) of each experiment where appropriate, and include the details of the supplier or manufacturer of any chemical or apparatus not in common use.
3. **Results** presented concisely, using tables or illustrations for clarity.
4. **Discussion** and interpretation of the results.
5. **Conclusion(s)**. To avoid repetition this can sometimes be combined with the Discussion section.

Note: These criteria do not apply to **Front Matter** papers, which should be given headings appropriate to the structure and format of the individual manuscript.

References

References follow the Vancouver style, i.e. numbered sequentially as they occur in the text and ordered numerically in the reference list.

- All citations mentioned in the text, tables or figures must be listed in the reference list.
- If cited in tables or figure legends, number according to the first identification of the table or figure in the text.
- Reference to unpublished data and personal communications should not appear in the list but should be cited in the text only (e.g. Smith A, 2000, unpublished data).
- Avoid listing more references than necessary.
- Authors are responsible for the accuracy of the references.

Submissions are not required to reflect the precise reference formatting of the journal (use of italics, bold etc.), however it is important that all key elements of each reference are included. Please see below for examples of reference content requirements.

Journal Article

Journal Article

1. Patel TD and Bott TR, Oxygen diffusion through a developing biofilm of *Pseudomonas fluorescens*. *J Chem Technol Biotechnol* **52**:187-199 (1991).

Online Article Not Yet Published in an Issue

An online article that has not yet been published in an issue (therefore has no volume, issue or page numbers) can be cited by its Digital Object Identifier (DOI). The DOI will remain valid and allow an article to be tracked even after its allocation to an issue.

2. Williams K, Galerneau F. Maternal transcranial Doppler in pre-eclampsia and eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003. <https://doi.org/10.1002/uog.83>

Book

3. Kaufmann HE, Baron BA, McDonald MB, Wlatman SR (eds). *The Cornea*, 2nd edn. Churchill Livingstone, New York (1998).

Chapter in a Book

4. Barros MRA, Oliveira AC and Cabral JMS, Integration of enzyme catalysis in an extractive fermentation process, in *Biocatalysis in Organic Media*, ed. by Laane C, Tramper J and Lilly MD. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 185–196 (1987).

Electronic Material

5. Strunk W, Jr, *The Elements of Style*. [Online]. Columbia University, Academic Information Services (1995). Available: <http://www.columbia.edu/acis/bartleby/strunk/> [17 November 1998]

Footnotes

Footnotes should be kept to a minimum and, if used, should be placed as a list at the end of the paper only, not at the foot of each page. They should be numbered in the list and referred to in the text with consecutive, superscript Arabic numerals. Keep footnotes brief: they should contain only short comments tangential to the main argument of the paper and should not include references.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Tables

Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Preparing Figures

- Supply each figure in a separate file.
- Number figures consecutively, in order of appearance in the text, using Arabic numerals.
- Figures must be of **high resolution** (300 dpi minimum for photos, 800 dpi minimum for graphs, drawings, etc., at the actual size the figure will be printed). Numbers and symbols incorporated in the figure must be large enough to be legible after reduction in figure size.

Figure File Types

Suitable file types include **JPEG**, **TIFF** and **Microsoft Word (doc)** files. *If figures are uploaded as Microsoft Word (doc) files then authors **must** include figure numbers and captions in the document.*

Please note we **cannot** publish scans or photocopied figures or accept PowerPoint, Excel, Encapsulated PostScript (EPS), LaTeX, Roshal Archive (RAR) or PDF files.

Colour figures: Figures submitted in colour may be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white. If you wish to have figures printed in colour in hard copies of the journal, a fee will be charged by the Publisher.

Guidelines for Cover Submissions

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please [follow these general guidelines](#).

For inspiration, check out our [Cover Gallery](#) of the images featured so far.

Additional Guidelines for Cover Pictures, Visual Abstracts, Frontispieces and Table of Contents Graphics

- Concepts illustrated in graphical material must clearly fit with the research discussed in the accompanying text.
- Images featuring depictions or representations of people must not contain any form of objectification, sexualization, stereotyping, or discrimination. We also ask authors to consider community diversity in images containing depictions or representations of people.
- Use, representation, or depiction of religious figures or imagery, and iconography should be avoided.
- Use of elements of mythology, legends, and folklore might be acceptable and will be decided on a case-by-case basis. However, these images must comply with the guidelines on human participants when they are present.
- Generally, authors should consider any sensitivities when using images of objects that might have cultural significance or may be inappropriate in the context (for example, religious texts, historical events, and depictions of people).
- Legal requirements:
 - All necessary copyright permission for the reproduction of the graphical elements used in visuals must be obtained prior to publication.
 - Clearance must be obtained from identifiable people before using their image on the cover or the like and such clearance must specify that it will be used on the cover. Use within text does not require such clearance unless it discloses sensitive personal information such as medical information. In all situations involving disclosure of such personal info, specific permission must be obtained. And images of individuals should not be used in a false manner.

Graphics that do not adhere to these guidelines will be recommended for revision or will not be accepted for publication.

Appendices

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article but that provides greater depth and background. It is hosted online, and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc. [Click here](#) for Wiley's FAQs on supporting information.

Note, if data, scripts or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

General Style Points

- **Abbreviations:** In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only.
- **Units of measurement:** Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website
- **Formatting:** Double-spaced text, continuous line numbering and page numbers are required for all manuscript types.

Wiley Author Resources

Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available. In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on [Writing for Search Engine Optimization](#).

Article Preparation Support : [Wiley Editing Services](#) offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence. Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

Editorial Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to our readership. Manuscripts are single-blind peer reviewed. Papers will only be sent to review if the Editorial Board determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Wiley's policy on confidentiality of the review process is [available here](#).

Data Storage and Documentation

Journal of the Science of Food and Agriculture encourages data sharing wherever possible, unless this is prevented by ethical, privacy or confidentiality matters. Authors publishing in the journal are therefore encouraged to make their data, scripts and other artefacts used to generate the analyses presented in the paper available via a publicly available data repository, however this is not mandatory. If the study includes original data, at least one author must confirm that he or she had full access to all the data in the study, and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Human Studies and Subjects

For manuscripts reporting medical studies involving human participants, we require a statement identifying the ethics committee that approved the study, and that the study conforms to recognized standards, for example: [Declaration of Helsinki](#); [US Federal Policy for the Protection of Human Subjects](#); or [European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice](#).

Images and information from individual participants will only be published where the authors have obtained the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher, however in signing the author license to publish authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a [standard patient consent form available](#)

Animal Studies

A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, and the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. We encourage authors to adhere to animal research reporting standards, for example the [ARRIVE reporting guidelines](#) for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines and regulations for the care and use of laboratory animals:

- US authors should cite compliance with the US National Research Council's *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, the US Public Health Service's *Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals*, and *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*.
- UK authors should conform to UK legislation under the *Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations (SI 2012/3039)*.
- European authors outside the UK should conform to *Directive 2010/63/EU*.

Clinical Trial Registration

We require that clinical trials are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Please include the name of the trial register and your clinical trial registration number at the end of your abstract. If your trial is not registered, or was registered retrospectively, please explain the reasons for this.

Research Reporting Guidelines

Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. We encourage authors to adhere to the following research reporting standards, as relevant to their study.

- CONSORT
- SPIRIT
- PRISMA
- PRISMA-P
- STROBE
- CARE
- COREQ
- STARD and TRIPOD
- CHEERS
- The EQUATOR Network
- Future of Research Communications and e-Scholarship (FORCE11)
- ARRIVE guidelines
- National Research Council's Institute for Laboratory Animal Research guidelines: the Gold Standard Publication Checklist from Hooijmans and colleagues
- Minimum Information Guidelines from Diverse Bioscience Communities (MIBBI) website; Biosharing website
- REFLECT statement

Species Names

Upon its first use in the title, abstract and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, the scientific name should be used only.

Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines (see [here](#)), where examples of acceptable nomenclature are provided.

Nucleotide Sequence Data

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'. Addresses are as follows:

- [DNA Data Bank of Japan \(DDBJ\)](#)
- [EMBL Nucleotide Sequence Submissions](#)
- [GenBank](#)

Conflict of Interest

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to, patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

Funding

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the [Open Funder Registry](#) for the correct nomenclature.

Authorship

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data.
2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content.
3. Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content.
4. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Additional Authorship Options

Joint first authorship: In the case of joint first authorship a footnote should be added to the author listing, e.g. 'X and Y should be considered joint first author'.

Requesting Changes to Article Author List

In accordance with [Wiley's Best Practice Guidelines on Research Integrity and Publishing Ethics](#) and the [Committee on Publication Ethics' guidance](#), *Journal of the Science of Food and Agriculture* will allow authors to correct authorship on a submitted, accepted, or published article if a valid reason exists to do so. All authors – including those to be added or removed – must agree to any proposed change. To request a change to the author list, please complete the [Request for Changes to a Journal Article Author List Form](#) and contact either the journal's editorial or production office, depending on the status of the article. Authorship changes will not be considered without a fully completed Author Change form. [Correcting the authorship is different from changing an author's name; the relevant policy for that can be found in [Wiley's Best Practice Guidelines](#) under "Author name changes after publication."]

Editors as Authors

Editors and editorial team members are excluded from publication decisions when they are authors or have contributed to a manuscript.

Author Name Change Policy

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

ORCID

As part of our commitment to supporting authors at every step of the publishing process, *Journal of the Science of Food and Agriculture* requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. Find more information [here](#).

Publication Ethics

This journal is a member of the [Committee on Publication Ethics \(COPE\)](#). Note this journal uses iThenticate's CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read our Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors [here](#). Wiley's Publication Ethics Guidelines can be found [here](#).

6. AUTHOR LICENSING

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author will receive an email prompting them to log in to Author Services, where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be required to complete a copyright license agreement on behalf of all authors of the paper.

You may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or Open Access under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available [here](#). To review the Creative Commons License options offered under open access, please [click here](#). (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please click [here](#).)

Self-Archiving definitions and policies. Note that the journal's standard copyright agreement allows for [self-archiving](#) of different versions of the article under specific conditions.

Open Access fees: Subscription journal that offers an open access option. You'll have the option to choose to make your article open access after acceptance, which will be subject to an APC. [You can read more about APCs](#) and whether you may be eligible for waivers or discounts, through your institution, funder, or a country waiver.

Funder Open Access: Please click [here](#) for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted article received in production

When your accepted article is received by Wiley's production team, you (corresponding authors) will receive an email asking you to login or register with [Author Services](#). You will be asked to sign a publication license at this point.

Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online very soon after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance, appear in PDF format only, are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked, and are indexed by PubMed. After publication of the final version article (the article of record), the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is correct for indexing. Subsequently the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will automatically be updated.

Proofs

Once your paper is typeset you will receive email notification of the URL from where to download a PDF typeset page proof, associated forms and full instructions on how to correct and return the file.

Please note that you are responsible for all statements made in your work, including changes made during the editorial process and thus you must check your proofs carefully. Note that proofs should be returned 48 hours from receipt of first proof.

Colour figures. Colour figures may be published online free of charge, however the journal charges for publishing figures in colour in print.

Early View

The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. [Early View](#) (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before your article appears online, as Editors also need to review proofs. Once your article is published on Early View no further changes to your article are possible. Your Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

8. POST PUBLICATION

Access and sharing

When your article is published online:

- You receive an email alert (if requested).
- You can share your published article through social media.
- As the author, you retain free access (after accepting the Terms & Conditions of use, you can view your article).
- The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to your article.

You can now order print copies of your article (instructions are sent at proofing stage or can be found on this website: www.sheridan.com/wil)

Now is the time to start promoting your article. Find out how to do that here.

Article Promotion Support: [Wiley Editing Services](#) offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

Measuring the impact of your work

Wiley also helps you measure the impact of your research through our specialist partnerships with [Kudos](#) and [Altmetric](#).

9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

For queries about submissions, please email the Editorial Office at jsfa@wiley.com

Author Guidelines Updated February 2018