

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

Magda Aita Monego

**EFEITO DO CAROÇO DE ALGODÃO NA MODULAÇÃO DE FIBRAS
MUSCULARES ESQUELÉTICAS E QUALIDADE DE PRODUTOS DE
CARNE OVINA**

TESE DE DOUTORADO

Santa Maria, RS
2018

Magda Aita Monego

**EFEITO DO CAROÇO DE ALGODÃO NA MODULAÇÃO DE FIBRAS
MUSCULARES ESQUELÉTICAS E QUALIDADE DE PRODUTOS DE CARNE
OVINA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,
RS), como requisito parcial para a obtenção do
grau de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos
Alimentos.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Renius de Oliveira Mello

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Giovani de Pellegrini

Santa Maria, RS
2018

Monego, Magda Aita
EFEITO DO CAROÇO DE ALGODÃO NA MODULAÇÃO DE FIBRAS
MUSCULARES ESQUELÉTICAS E QUALIDADE DE PRODUTOS DE CARNE
OVINA / Magda Aita Monego.- 2018.
61 f.; 30 cm

Orientador: Renius de Oliveira Mello
Coorientador: Luiz Giovani de Pellegrini
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2018

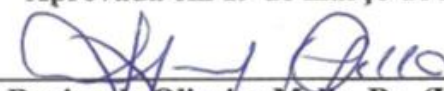
1. Caroço de algodão 2. Carne ovina 3. Fibra muscular
4. Hambúrguer 5. Almôndega I. Mello, Renius de Oliveira
II. Pellegrini, Luiz Giovani de III. Título.

Magda Aita Monego

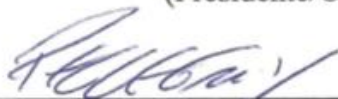
**EFEITO DO CAROÇO DE ALGODÃO NA MODULAÇÃO DE FIBRAS
MUSCULARES ESQUELÉTICAS E QUALIDADE DE PRODUTOS DE CARNE
OVINA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

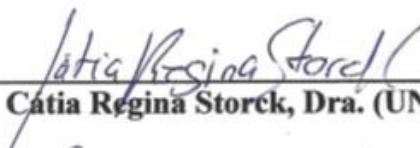
Aprovada em 19 de março de 2018:



Renius de Oliveira Mello, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Luiz Giovanni de Pellegrini, Dr. (IFFar)
(Co-orientador)



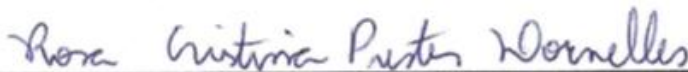
Cátia Regina Storck, Dra. (UNIFRA)



Paula Rossini Augusti, Dra. (UFRGS)



Paulo Cezar Bastianello Campagnol, Dr. (UFSM)



Rosa Cristina Prestes Dornelles, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

*Dedico este trabalho à minha mãe,
Aguida Leocrécia Aita Monego,
meu exemplo de vida, bondade e determinação.
Quem sempre acreditou e investiu na minha formação.*

AGRADECIMENTOS

Após quatro anos de estudos e trabalhos intensos, tenho muito a agradecer àqueles que me proporcionaram suporte emocional, financeiro, acadêmico e técnico.

A Deus, simplesmente por tudo.

Aos meus pais, Mauro Luís Monego (*in memoriam*) e Aguida Leocrécia Aita Monego, pela educação, pelo amor e dedicação. Vocês foram e sempre serão meu primeiro referencial. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Estela Aita Monego e Maurício Aita Monego, pelo carinho e motivação. Estaremos sempre unidos, nem que seja em pensamentos e orações.

Ao meu companheiro de vida, Fillipi Garcia Madrid, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo apoio, carinho e paciência em momentos decisivos. Amo-te!

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de formação e qualificação.

À Direção e aos colegas do Colégio Agrícola de Frederico Westphalen (CAFW/UFSM), pelo apoio no processo seletivo e posterior liberação integral para qualificação. Em especial, agradeço aos meus queridos amigos Adriana Soares, Ana Eucares von Laer, Renato Trevisan e Valéria Limberger Bayer, pelas conversas motivadoras e parceria.

Ao orientador, Prof. Dr. Renius de Oliveira Mello, pela oportunidade e confiança, pelos ensinamentos e por ser incansável na ajuda em todas as etapas deste trabalho. Deixo registrado meu respeito, admiração e gratidão! Muito obrigada!!!

Ao co-orientador, Prof. Dr. Luiz Giovani de Pellegrini e ao colega Dr. Luiz Gustavo de Pellegrini, por ceder as amostras objeto deste estudo e por todo auxílio. Muito obrigada!

Aos docentes e TAEs do PPGCTA, em especial aos professores Dr^a Luisa Helena Rychecki Hecktheuer, Dr. Ernesto Hashime Kubota e Dr^a. Rosa Cristina Prestes Dornelles, pelas constantes contribuições e apoio.

À prof^a. Dr^a. Tatiana Emanuelli, que através do projeto Casadinho, possibilitou a realização das análises de fibra muscular na UNICAMP.

Aos professores das bancas de Exame de Qualificação e Defesa de Tese, pela disponibilidade em avaliar este trabalho e por todas contribuições. Muito obrigada!

Às equipes: Laboratório de Morfofisiologia Experimental – Labitex (UFSM), em especial à técnica Marina Vencato; Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia –

LAMEB (UFSC), em especial à Emily Daiana dos Santos; Departamento de Biologia Estrutural e Funcional (UNICAMP), em especial à prof^a. Dr^a. Helena Coutinho Franco de Oliveira e à pós-doutoranda Amarylis Bonito Wanschel; Laboratório de Análises de Alimentos II (UNICAMP), em especial à prof^a. Dr^a. Juliana Azevedo Lima Pallone e ao Técnico Eduardo Orlando. Todos foram imprescindíveis para o desenvolvimento das análises de fibras musculares. Muito obrigada!!!

Aos colegas e amigos da pós-graduação, em especial, aos ‘Nidalenses’, pela parceria e trocas de experiências na rotina das análises laboratoriais. Gratidão aos estagiários Ana Clara Trindade, André Fogaça Nigelskii, Gabriela Ocaña, Juliana Cremonese e Rosângela Dias.

À colega e amiga, Djenifer Kipper, pelo companheirismo nas análises laboratoriais e nas longas jornadas de estudos e trabalho analisando os dados, sempre regado a muito chimarrão e lanchinhos diversos. Muito obrigada!

À colega e amiga, Fernanda Lüdtke, gratidão pela parceria e convivência no período de estágio em Campinas, o que certamente amenizou nossa saudade de casa. Criamos laços de amizade e cumplicidade que serão cultivados para sempre.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!

RESUMO

EFEITO DO CAROÇO DE ALGODÃO NA MODULAÇÃO DE FIBRAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS E QUALIDADE DE PRODUTOS DE CARNE OVINA

AUTORA: Magda Aita Monego

ORIENTADOR: Prof. Dr. Renius de Oliveira Mello

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Giovani de Pellegrini

Objetivou-se avaliar a modulação das fibras musculares esqueléticas da carne de cordeiros Ile de France alimentados com níveis de caroço de algodão (CA), bem como desenvolver produtos de carne ovina e caracterizá-los. Este trabalho foi composto de três ensaios experimentais. O primeiro avaliou os níveis séricos e a modulação das fibras musculares esqueléticas do *Longissimus thoracis* de cordeiros Ile de France alimentados com caroço de algodão e sua relação com a qualidade da carne. As fibras musculares esqueléticas foram identificadas por análise histoquímica e classificadas de acordo com a velocidade de contração, coloração e metabolismo. Foram utilizados 50 cordeiros Ile de France, cinco referências e cinco tratamentos (0, 10, 20, 30 e 40% CA na dieta), com nove repetições, em delineamento experimental inteiramente casualizado. Foram avaliadas as tendências linear e quadrática e correlação parcial de *Spearman* entre características de fibras e qualidade da carne (58 variáveis), sendo os níveis de caroço de algodão usados como covariáveis. Os níveis séricos de colesterol, proteínas totais e gama glutamil transpeptidase aumentaram ($P < 0,05$) de acordo com a inclusão de caroço de algodão. Observou-se efeito do tempo (referência \times CA) na modulação das fibras musculares, com aumento ($P < 0,05$) das fibras vermelhas, redução ($P < 0,05$) das fibras glicolíticas, e transição ($P < 0,05$) das fibras Tipo IIB em Tipo IIA. O efeito da dieta foi observado apenas para a variável área relativa das fibras Tipo IIC, com tendência linear crescente de acordo com a inclusão de caroço de algodão. Concluiu-se que o efeito do tempo (referência \times CA) foi mais pronunciado que o efeito da dieta nas características das fibras musculares, as quais estavam correlacionadas à qualidade da carne. No segundo e no terceiro experimentos, foram avaliadas as propriedades físico-químicas, tecnológicas e sensoriais de hambúrguer e almôndega, respectivamente, elaborados com carne de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão. Cada experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos (0; 10; 20; 30; 40% CA) e 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), a 5% de significância e os resultados significativos foram submetidos à análise de regressão. Nos hambúrgueres, a adição de caroço de algodão às dietas de cordeiro diminuiu ($P < 0,05$) o TBARS da carne e alterou ($P < 0,05$) as características físico-químicas do produto, caracterizados por baixos teores de lipídeos ($\hat{y} = 4,27$), colesterol ($\hat{y} = 75,15$) e teor calórico ($\hat{y} = 122,04$). Os resultados relativos às características de cocção foram diretamente relacionados às observações microscópicas relativas aos hambúrgueres; as estruturas mais coesas apresentaram melhor desempenho ($P < 0,05$) após o cozimento, com maior ($P < 0,05$) rendimento e retenção de umidade e menor ($P < 0,05$) perda por cocção. Os níveis de caroço de algodão não afetaram ($P > 0,05$) o perfil de textura, mas afetaram negativamente a aceitabilidade dos hambúrgueres ($P < 0,05$), uma vez que, à medida que os níveis de caroço de algodão aumentaram, as pontuações dos atributos sensoriais diminuíram ($P < 0,05$). Assim, para as formulações de hambúrguer recomenda-se uma inclusão máxima de 16,7% CA na matéria seca da dieta de cordeiros. As almôndegas preparadas com carne de cordeiros alimentados com caroço de algodão apresentaram maior ($P < 0,05$) teor de cinzas. Todas as formulações de almôndegas apresentaram baixos níveis de lipídios ($\hat{y} = 2,90$) e colesterol ($\hat{y} = 74,15$ mg / 100 g), bem como alto teor de proteína ($\hat{y} = 18,92$). A diferença ($P < 0,05$) observada nas variáveis de características de cocção não teve efeito no perfil de textura, que foi relacionado às observações microscópicas do produto. No teste triangular para a diferença, os provadores não perceberam a diferença entre as almôndegas controle (0% CA) e aquelas com até 30% CA. No entanto, no teste de aceitação, os provadores detectaram alteração sensorial a partir de um nível de 12,5% CA. Assim, é possível produzir almôndegas com carne de cordeiros alimentados com até 12,5% de caroço de algodão na matéria seca de sua dieta sem alterar as características sensoriais do produto.

Palavras-chave: *Gossypium hirsutum*, histoquímica, características de cocção, análise de perfil de textura, microscopia, teste triangular.

ABSTRACT

EFFECT OF WHOLE COTTONSEED IN THE MODULATION OF SKELETAL MUSCLE FIBRES AND QUALITY OF LAMB MEAT PRODUCTS

AUTHOR: Magda Aita Monego

SUPERVISOR: Prof. Dr. Renius de Oliveira Mello

COSUPERVISOR: Prof. Dr. Luiz Giovani de Pellegrini

The aim of this study was to evaluate the modulation of skeletal muscle fibres from Ile de France lambs fed with levels of whole cottonseed (WCS), as well as to develop sheep meat products and characterise them. This study was composed of three experimental tests. The first evaluated the serum levels, modulation, and performance of skeletal muscle fibres of *Longissimus thoracis* of Ile de France lambs fed with whole cottonseed and its relation to meat quality. The skeletal muscle fibres were identified by histochemical analysis and classified according to contraction velocity, staining and metabolism. Fifty Ile de France lambs, five references and five treatments (0, 10, 20, 30 and 40% WCS in the diet) were used, with nine replicates and a completely randomised design. The linear and quadratic trends, as well as the Spearman partial correlation between fibre characteristics and meat quality (58 variables) were evaluated, with whole cottonseed levels being used as covariates. Serum cholesterol, total protein and gamma glutamyl transpeptidase levels increased ($P < 0.05$) according to the level of inclusion of whole cottonseed. The effect of time (reference \times WCS) on the modulation of muscle fibres, with an increase ($P < 0.05$) of red fibres, reduction ($P < 0.05$) of glycolytic fibres, and transition ($P < 0.05$) of Type IIB to Type IIA fibres was observed. The effect of the diet was observed only for the variable relative area of Type IIC fibres, with a linear tendency that increased according to the inclusion of whole cottonseed. It was concluded that the effect of time (reference \times CA) was more pronounced than the effect of diet on the characteristics of muscle fibres, which was correlated with meat quality. In the second and third experiments, the physicochemical, technological and sensorial properties of hamburger and meatballs that were prepared with meat from lambs fed on different levels of whole cottonseed were evaluated. Each experiment was conducted in a completely randomised design, with five treatments (0; 10; 20; 30; 40% WCS) and four replicates. The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) at 5% significance and the significant results were submitted to regression analysis. In the hamburger, the addition of whole cottonseed to the lambs' diets decreased ($P < 0.05$) the thiobarbituric acid reactive substances in the lamb meat and altered ($P < 0.05$) the physicochemical characteristics of the hamburgers, which were characterised by low lipid ($\hat{y} = 4.27$), cholesterol ($\hat{y} = 75.15$) and caloric content ($\hat{y} = 122.04$). The results regarding cooking characteristics were directly related to the microscopic observations regarding the hamburgers; the more cohesive structures exhibited better ($P < 0.05$) performance after cooking, with increased ($P < 0.05$) cooking yield and moisture retention and decreased ($P < 0.05$) cooking loss. The levels of whole cottonseed did not influence ($P > 0.05$) the texture profile, but they negatively affected the acceptability of the hamburgers ($P < 0.05$); as the levels of whole cottonseed increased the scores for the sensorial attributes decreased ($P < 0.05$). Thus, for hamburger formulations, a maximum inclusion of 16.7% WCS in the dry matter of the diet of lambs is recommended. The meatballs prepared with lamb from animals fed on whole cottonseed presented higher ($P < 0.05$) ash content. All the meatball formulations presented low levels of lipids ($\hat{y} = 2.90$) and cholesterol ($\hat{y} = 74.15$ mg/100g), as well as high protein content ($\hat{y} = 18.92$). The difference ($P < 0.05$) observed in the variables of the cooking characteristics did not influence the texture profile, which was related to the microscopic observations of the product. In the triangle test for difference, the testers did not perceive difference between the control meatballs (0% WCS) and those with up to 30% WCS. However, in the acceptance test the testers detected sensory alteration starting at a level of 12.5% WCS. Thus, it is possible to produce meatballs with meat from lambs fed on up to 12.5% WCS in the dry matter of their diet without altering the sensory characteristics of the product.

Keywords: *Gossypium hirsutum*; histochemical; cooking characteristics; texture profile analysis; microscopy; triangle test.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Algodão e seus subprodutos..... 19

ARTIGO 1

Figura 1 – Seções transversais do músculo *Longissimus thoracis* reagidas pelo método m-ATPase e incubadas em pH 4,3 e 4,6..... 26

Figura 2 – Velocidade de contração (A), cor (B) e metabolismo (C) do *Longissimus thoracis* de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão, em função do tempo (referência × CA)..... 44

Figura 3 – Diâmetro, μm (A), área, μm^2 (B), frequência, % (C) e área relativa, % (D) das fibras musculares esqueléticas de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão, em função do tempo (referência × CA)..... 45

Figura 4 – Área relativa (%) das fibras musculares esqueléticas de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão, em função do nível de caroço de algodão..... 46

ARTIGO 2

Figure 1 – Photomicrographs of lamb burger from animals fed on different levels of whole cottonseed..... 78

ARTIGO 3

Figure 1 – Photomicrographs of lamb meatballs from animals fed on different levels of whole cottonseed..... 107

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1 – Terminologias utilizadas para classificação dos tipos de fibras musculares.....	14
Tabela 2 – Características das fibras musculares esqueléticas.....	15

ARTIGO 1

Tabela 1 – Proporção dos ingredientes das dietas experimentais, expressas em g.Kg ⁻¹ , em relação à matéria seca.....	47
Tabela 2 – Níveis séricos de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão.....	48
Tabela 3 – Correlação parcial de <i>Spearman</i> entre as características das fibras musculares esqueléticas do músculo <i>Longissimus thoracis</i> versus qualidade da carne de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão.....	49
Tabela 4 – Características das fibras musculares esqueléticas do <i>Longissimus thoracis</i> de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão.....	50

ARTIGO 2

Table 1 – Physicochemical characterisation of meat from lambs fed on different levels of whole cottonseed.....	73
Table 2 – Proximate composition of hamburgers made with meat from lambs fed on different levels of whole cottonseed.....	74
Table 3 – Cooking characteristics and texture profile analyses of hamburgers made with meat from lambs fed on different levels of whole cottonseed.....	75
Table 4 – Mean scores of the sensory analysis of hamburgers made with meat from lambs fed on different levels of whole cottonseed, after 15 and 60 days of storage at -18 °C.....	76
Table 5 – Number of correct judgments in the triangle test of hamburgers made with meat from lambs fed on different levels of whole cottonseed, after 15 and 60 days of storage at -18 °C.....	77

ARTIGO 3

Table 1 – Physicochemical characterisation of meat from lambs fed on different levels of whole cottonseed.....	103
Table 2 – Chemical composition of lamb meatballs from animals fed on different levels of whole cottonseed.....	104
Table 3 – Cooking characteristics and texture profile analyses of lamb meatballs made with meat from animals fed on different levels of whole cottonseed..	105
Table 4 – Mean scores for the sensory analysis of lamb meatballs from animals fed on different levels of whole cottonseed.....	106

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1	CARNE OVINA	13
2.2	FIBRAS MUSCULARES	14
2.2.1	Miogênese e crescimento muscular	15
2.2.2	Modulação da fibra muscular	16
2.2.3	Fibra muscular <i>versus</i> qualidade da carne	17
2.2.4	Efeito da dieta animal na fibra muscular esquelética	18
2.3	PRODUTOS CÁRNEOS	18
2.4	CAROÇO DE ALGODÃO	19
3	ARTIGO 1 – Níveis séricos, modulação das fibras musculares esqueléticas e sua relação com a qualidade da carne de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão	21
4	ARTIGO 2 – Physicochemical, technological and sensory properties of hamburger made with meat from lambs fed on whole cottonseed.	53
5	ARTIGO 3 – Is it possible to produce meatballs made with lamb from animals fed on whole cottonseed without altering the sensory characteristics?	79
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
	ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	117

1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de carne ovina aumentou no período de 2007 a 2016, passando de 8,7 para 9,3 milhões de toneladas (FAO, 2018). No mesmo período, o Brasil registrou aumento de 16,7%, passando de 78 mil toneladas para 91 mil toneladas (FAO, 2018). Entretanto, o consumo nacional ainda é considerado baixo, cerca de 204 g *per capita* anual (IBGE, 2010). Quando consideradas as grandes regiões, a região Sul é a que mais consome carne ovina, com 592 g *per capita* anual, seguido das regiões nordeste (339 g), centro-oeste (143 g), norte (95 g) e sudeste (10 g). Na região Sul, destaca-se o estado do Rio Grande do Sul, onde o consumo é de 1380 g *per capita* anual (IBGE, 2010).

O panorama nacional demonstra crescente interesse por carne ovina, principalmente na região Sul do Brasil, o que demanda maior oferta por produtos de qualidade. Considerada um dos fatores preponderantes para a expansão e consolidação do mercado da carne ovina (BRASIL, 2016; LIMA JÚNIOR, 2016), a qualidade tem sido definida como desempenho do produto que resulte na satisfação do consumidor, tendo como principais atributos: cor, sabor, textura, conservação (vida de prateleira), composição química, confiabilidade e conveniência (JOO et al., 2013; PONNAMPALAM et al., 2016). Tais atributos podem ser influenciados pela dieta dos animais.

As dietas animais, por sua vez, compreendem altos custos de produção, sendo oportuno o estudo de ingredientes alternativos, que forneçam os nutrientes adequados, aliado ao baixo custo. Neste sentido, a suplementação de caroço de algodão na dieta de ruminantes vem se destacando principalmente em virtude de seus altos teores de lipídios e proteína (MADRUGA et al., 2008; PAIM et al., 2010; VIEIRA et al., 2010; PIONA et al., 2012; VIANA et al., 2014). No entanto, o uso deste ingrediente em dietas animais está relacionado à possível associação do caroço de algodão com características indesejáveis nos aspectos qualitativos da carne e derivados. Tal fato torna importante verificar se o uso de caroço de algodão na dieta para pequenos ruminantes promove alterações quali e/ou quantitativas nas propriedades da carne e seus derivados.

Em relação à qualidade da carne, tem-se destacado o estudo das propriedades metabólicas e fisiológicas dos músculos (PICARD, 2012; HOCQUETTE et al., 2012; CHRIKI et al., 2013a, b; DU et al. 2014; ITHURRALDE et al., 2015). O tipo de fibra, sua distribuição e frequência nos músculos podem ser influenciados por fatores genéticos e ambientais. Existem diferenças nessas características considerando-se as diferentes espécies animais, a localização dos músculos e as diferentes regiões de um mesmo músculo (CHRIKI

et al. 2012; CHRKI et al., 2013a, b; SANTELLO et al., 2010, ITHURRALDE et al., 2015). A modulação, ou seja, a transformação de um tipo de fibra em outro pode ser obtida através de manejo alimentar e sistema de terminação. Desta maneira, o conhecimento dos atributos das fibras musculares e dos fatores que influenciam sua modulação permite prever a dinâmica da qualidade da carne ao longo do desenvolvimento do animal e pós abate, o que pode contribuir para sugerir usos comerciais ideais de cada músculo para a indústria ou comércio (PICARD et al., 2002; ITHURRALDE et al., 2015).

Estudo realizado por Viana et al. (2013) aponta a diferenciação de apresentação da carne ovina como alternativa para estruturar a cadeia de valor da ovinocultura no Rio Grande do Sul. O consumo desta carne pode ser ampliado através da oferta de produtos que satisfaçam o gosto e as necessidades do consumidor, tais como hambúrguer e almôndega, uma vez que são produtos muito apreciados, de fácil e rápido preparo.

Apesar de hambúrguer e almôndega reunirem diversas características comuns, cada produto apresenta uma forma de consumo própria, sendo o primeiro mais consumido na forma de lanches e *fast foods*; enquanto a almôndega geralmente é consumida durante as refeições principais, acompanhada de molhos diversos. Assim, torna-se importante avaliar o emprego da carne de cordeiro alimentados com níveis de caroço de algodão em ambos os produtos, visto que o modo de preparo e forma de consumo podem influenciar na aceitabilidade das diferentes formulações.

Neste contexto, o presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de avaliar a modulação das fibras musculares esqueléticas e a qualidade de produtos de carne de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão, tendo como objetivos específicos:

- Mensurar os níveis séricos dos cordeiros;
- Verificar o efeito do tempo e da dieta na modulação das fibras musculares esqueléticas do músculo *Longissimus thoracis*;
- Relacionar as características das fibras musculares esqueléticas do *Longissimus thoracis* com a qualidade da carne;
- Caracterizar os produtos desenvolvidos, através da composição físico-química e propriedades tecnológicas;
- Averiguar, através de análise sensorial, se a presença de caroço de algodão na dieta dos cordeiros afetou a qualidade dos produtos elaborados e, em caso positivo, a partir de que nível de caroço de algodão ocorreu tal alteração.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARNE OVINA

A carne ovina origina-se de distintos tipos de animais: cordeiro, animal entre 4 meses e 1 ano de idade; capão, animal adulto e castrado; ovelha, fêmea adulta. Destes, a carne mais apreciada é a de cordeiro, devido às características favoráveis, pois possui textura macia, coloração rosa-avermelhada, de consistência firme e pouca gordura (BRASIL, 2016; LIMA JÚNIOR et al., 2016).

A qualidade da carne ovina pode ser influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Os primeiros estão relacionados ao animal e consideram raça, sexo, idade, peso ao nascimento e ao abate, genes e composição do músculo, através do tipo e proporção das fibras musculares esqueléticas (LIMA JÚNIOR et al., 2016). Os segundos consideram fatores relacionados a instalações, nutrição, gestão da produção e manejo.

No âmbito da nutrição, diversos estudos investigam o emprego de coprodutos agroindustriais como alimentos/suplementos para ovinos, como uma estratégia para reduzir os custos de alimentação, aliado à necessidade de reciclar os resíduos o que é dispendioso de eliminar (OLIVEIRA et al., 2013). Dentre os coprodutos, podem-se citar: fava e tremoço (LESTINGI et al., 2015), resíduos de vinificação (GUERRA-RIVAS et al., 2016), torta de amendoim (BEZERRA et al., 2016) e coprodutos do algodão, empregados nas dietas na forma de caroço integral, torta, farelo ou óleo de algodão (PAIM et al. 2010; PAIM et al., 2014; VIEIRA et al., 2010; PIONA et al., 2012; VIANA et al., 2014; PEREIRA et al., 2016, PELLEGRINI, 2017).

A dieta dos cordeiros pode influenciar a composição e qualidade da carcaça, da carne e seus derivados. Em geral, a carne de cordeiro apresenta baixos teores de lipídios totais (2% a 4%), elevados teores de proteínas (19% e 22,74%), umidade entre 73,66 a 74,53% e cinzas entre 0,9 e 1,09% (MONTE et al., 2012; HAJJI et al., 2016). Os valores de colesterol geralmente são menores que 90 mg em 100 g de carne, sendo considerados baixos em relação a carnes de bovinos e suínos (MADRUGA et al., 2008).

Além da composição química, a dieta pode influenciar outros fatores determinantes para a qualidade final da carne. Pode-se citar as características físicas, as quais englobam pH, cor, perda de peso por cocção, capacidade de retenção de água; e as características sensoriais, que englobam odor, sabor, textura, suculência entre outros (MONTE et al., 2012).

2.2 FIBRAS MUSCULARES

O tecido muscular divide-se em liso, estriado cardíaco e estriado esquelético. O tecido muscular estriado esquelético, responsável pelos movimentos voluntários do corpo, é composto por células altamente especializadas, multinucleadas, alongadas e denominadas miócitos ou fibras musculares (LEFAUCHEUR, 2010).

As fibras musculares podem ser classificadas de acordo com as propriedades metabólica, fisiológica e contrátil. Comparações diretas entre essas propriedades permitem classificar as fibras musculares em três tipos Tipo I, Tipo IIA, Tipo IIB (Tabela 1), sendo que cada tipo apresenta características diferenciadas quanto à composição e ao comportamento (Tabela 2).

Tabela 1– Terminologias utilizadas para classificação dos tipos de fibras musculares.

Método	Tipos de fibras			Referência
Histoquímico	Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIB	Brooke & Kaiser (1970)
Coloração	vermelha	intermediária	pálida	Ashmore & Doerr (1971)
Bioquímico	SO	FOG	FG	Peter <i>et al.</i> (1972)
Fisiológico	S	FR	FF	Burke <i>et al.</i> (1973)

Nota. SO= *Slow oxidative* (lenta, oxidativa), FOG= *Fast oxidative and glycolytic* (rápida, oxidativa-glicolítica), FG= *fast glycolytic* (rápida, glicolítica), S= resistente à fadiga, contração lenta (*very fatigue resistant units with relatively slow twitch contraction*), FR= contração rápida, resistente à fadiga (*fatigue resistant units with fast twitch contraction*), FF= contração rápida, fadigável (*fatigue sensitive, relatively fast twitch contraction*).

A identificação das fibras musculares pode ser feita através de técnicas histoquímicas, dentre as quais destaca-se m-ATPase (ATPase miosínica) (BROOKE, KAISER, 1970). O princípio desta técnica baseia-se no comportamento diferenciado das fibras musculares frente a diferentes valores de pH, devido à concentração muscular de fosfatase alcalina ou ácida (LOUGHLIN, 1993).

Este método permite distinguir um outro tipo de fibra, denominada Tipo IIC (PEINADO et al., 2004), a qual tem sido considerada fibra não diferenciada ou precursora dos tipos IIA e IIB (BROOKE, KAISER, 1970), fibra que sofreu mudanças devido a doenças ou injúrias (RAMOS, GOMIDE, 2009) ou fibra imatura (DUBOWITZ, SEWRY, OLDFORS, 2013). As fibras Tipo IIC são consideradas fibras híbridas devido à coexistência das miosinas de cadeia pesada I e II (principalmente MHCIIa) (HORI et al., 1998), apresentam velocidade de contração rápida e alta resistência à fadiga (NAKATANI et al., 2003).

Tabela 2 – Características das fibras musculares esqueléticas.

Características	Tipo I	Tipo IIA	Tipo IIB	Tipo IIC
Metabolismo	Oxidativo	Glicolítico-oxidativo	Glicolítico	
Diâmetro	Menor	Intermediário	Maior	
Resistência à fadiga	Alta	Média	Baixa	Alta
Suprimento sanguíneo	Rico	Intermediário	Pobre	
Glicogênio	Baixo	Alto/intermediário	Alto	
Lipídeos	Alto	Alto/intermediário	baixo	
Tamanho mitocôndrias	Grande	Médio	Pequeno	
Mioglobina	Alta	Intermediária	Baixa	
Contração				
Potência	Baixa	Intermediária	Alta	
Velocidade	Lenta	Média	Rápida	Alta
Tempo	Longo	Médio	Curto	
Tipo de exercício				
Duração	Longa	Média	Curta	
Intensidade	Baixa/moderada	Intermediária	Alta	
Modalidade	Corridas, caminhadas, ciclismo, ginástica	Musculação, natação	Levantamento de peso, corridas curtas, saltos.	

Fonte: Adaptado de PICARD et al., 2002; NAKATANI et al., 2003; CHOE, KIM, 2009; RAMOS, GOMIDE, 2009 e CHRICKI et al. 2012.

Cada músculo é formado por uma combinação de fibras musculares. A frequência e a área de cada tipo de fibra no músculo permitem avaliar o desenvolvimento do tecido muscular, o qual pode variar de acordo com a raça, idade, sexo, genética, nutrição e sistema de terminação dos animais.

2.2.1 Miogênese e crescimento muscular

Miogênese consiste no processo de desenvolvimento do tecido muscular que ocorre ainda na fase embrionária. Em mamíferos, a multiplicação das fibras musculares (hiperplasia) incide na gestação e o número de fibras é determinado até o momento do parto. Após o nascimento, pode ser observado um pequeno aumento no número de células devido à maturação de miotubos pré-existentes ou de grupos de fibras não identificadas (ASHMORE et al., 1972; PICARD et al., 2002; LEFAUCHEUR, 2010).

A miogênese, fusão dos mioblastos para formação das fibras musculares, ocorre em fases distintas. Na primeira, originam-se fibras primárias, as quais formam estrutura para o

desenvolvimento de células secundárias, formadas durante o segundo momento de diferenciação dos mioblastos fetais (ASHMORE et al., 1972; DU et al., 2014). Uma terceira população de mioblastos, que não sofre diferenciação, localiza-se próximo às miofibras e são chamadas de células satélites.

As células satélites, mononucleadas e mitoticamente ativas, promovem crescimento muscular pós-natal (hipertrofia). Estas células são incorporadas pelas fibras musculares, como fonte extra de núcleo, aumentando a quantidade de DNA (ácido desoxirribonucléico) para a produção de proteína (FU et al., 2015). Este evento é marcado pelo aumento considerável no número de núcleos das fibras musculares (DU et al. 2014).

A frequência de células satélites pode ser decisiva na hipertrofia muscular. O número de células satélites presentes no músculo varia com a idade, o tipo de músculo, a nutrição e a demanda de esforço. Em geral, os músculos oxidativos possuem uma maior densidade de células satélites que os músculos glicolíticos (DU et al., 2014).

2.2.2 Modulação da fibra muscular

A modulação de fibras musculares consiste na transformação de um tipo de fibra em outro, no período pós-natal. Este processo pode ser ocasionado por diferenças entre as raças (BÜNGER et al., 2009), idade (PEINADO et al., 2004), manejo alimentar e sistema de terminação (GALLO et al. 2009; SANTELLO et al., 2010) e tipo de músculo (ITHURRALDE et al., 2015), dentre outros fatores.

O tecido muscular esquelético apresenta grande plasticidade resultantes da transição da expressão de cadeias de miosina pesadas na sequência de uma via obrigatória I ↔ IIA ↔ IIX ↔ IIB (PICARD et al., 2002). Em geral, durante o crescimento pós-natal de músculos mistos de mamíferos, observa-se um aumento de fibras Tipo IIB e Tipo IIX, bem como uma diminuição de fibras Tipo IIA (PICARD et al., 2002). Em cordeiros, entre o nascimento e 15 dias de idade, foi observado aumento da frequência das fibras Tipo IIB associado à redução das fibras Tipo IIA (PEINADO et al., 2004), enquanto que a frequência das fibras Tipo I manteve-se constante no período de desenvolvimento pós-natal e as fibras Tipo IIC foram observadas apenas em animais adultos. Não foram encontrados relatos sobre a transição envolvendo a fibra Tipo IIC.

2.2.3 Fibra muscular *versus* qualidade da carne

O tipo de fibra muscular predominante na musculatura do animal tem influência sobre as características de qualidade da carne. Músculos com predominância de fibras vermelhas são mais suscetíveis ao encurtamento pelo frio (LEFAUCHEUR, 2010), o que afeta a maciez da carne, reduzindo sua maciez.

A maturação da carne e, conseqüentemente, o seu amaciamento, ocorrem mais lentamente em músculos que apresentam maior frequência de fibras oxidativas, ou seja, a proteólise ocorre com menor intensidade, com diminuição da maciez final da carne. Esta redução no amaciamento da carne pode estar associada à presença de maior quantidade de calpastatinas nos músculos vermelhos, que são inibidores naturais das calpaínas, principal complexo enzimático proteolítico (SANTELLO et al., 2010).

Ainda o tipo de fibra influencia no sabor, uma vez que estas diferem no seu teor de gordura e metabólitos. Estas diferenças afetam tanto as propriedades sensoriais e nutricionais da carne, quanto às características de conservação (lipólise, oxidação) (HOCQUETTE et al., 2012). O teor de lipídeos é maior nas fibras do tipo I, intermediário no tipo IIA e menor no tipo IIB.

A suculência e o rendimento da carne podem ser influenciados pelo tipo de fibra. Músculos com predominância de fibras brancas (Tipo IIB) são mais propensos a desenvolver a condição PSE (pálida, sem firmeza, exsudativa), por serem ricas em glicose e glicogênio, possibilitando queda mais acentuada do pH (HOCQUETTE et al., 2012; CHRKI et al., 2013a).

Em estudo realizado em cordeiros ½ Dorper-Santa Inês, foi observado que o músculo *Semitendinosus* apresentou 5% mais fibras glicolíticas do que o *Longissimus lumborum*. Carnes com proporção de fibras glicolíticas maior que fibras oxidativas, tendem a ser mais duras, em consequência do menor teor de lipídios e maior quantidade de tecido conjuntivo (SANTELLO et al., 2010).

Uma vez que a variação no tipo de fibra apresenta impacto sobre as características dos músculos e conseqüentemente sobre a qualidade da carne, o conhecimento do tipo de fibra e suas características pode contribuir para a indicação de usos comerciais para cada músculo (ITHURRALDE et al., 2015).

2.2.4 Efeito da dieta animal na fibra muscular esquelética

Na literatura são relatadas evidências de que a natureza da dieta, sua composição e nível de energia influenciam diretamente as características das fibras musculares e conseqüentemente a qualidade da carne. A restrição alimentar em cordeiros reduziu a síntese de proteína no músculo, o que atrasou a hipertrofia ou causou atrofia muscular (ZHAO et al., 2016). Ainda, a desnutrição (dieta composta exclusivamente de feno) influenciou negativamente a morfologia muscular dos cordeiros, evidenciado pelo menor diâmetro e área das fibras musculares, podendo resultar em prejuízos à qualidade da carne (GALLO et al., 2009).

Adicionalmente, a inclusão de suplemento às dietas dos animais pode alterar a composição de fibras nos músculos. Estudo comparando sistemas de alimentação (*indoor* vs. *pastagem*) e suplementação (controle vs. torta de oliva (280 g/animal/dia)), mostrou que o músculo de cordeiros Barbarine alimentados com *pastagem* apresentou maior proporção de fibras tipo I (11,5 vs. 7%) e a suplementação não afetou a proporção de fibras; contudo aumentou metabolismo glicolítico e reduziu o metabolismo oxidativo (HAMDI et al., 2016). Já, a suplementação com grãos de girassol (9,10%) em cordeiros ½ Dorper-Santa Inês promoveu alterações nas fibras musculares em diferentes músculos analisados, representadas pelo maior diâmetro das fibras brancas no *Semitendinosus* e pelo maior diâmetro de fibras vermelhas no *Longissimus lumborum* (SANTELLO et al., 2010).

2.3 PRODUTOS CÁRNEOS

Segundo a Associação Brasileira da Indústria Alimentícia (ABIA, 2018), o faturamento nacional de derivados da carne dobrou no período de 2010 a 2016, passando de 66 para 133,1 bilhões de Reais, indicando aumento na comercialização e consumo. Do ponto de vista mercadológico, o desenvolvimento de produtos cárneos precisa acompanhar as constantes evoluções da sociedade, satisfazendo as diferentes necessidades dos consumidores e seus diversos hábitos de consumo. Produtos cárneos tais como hambúrguer e almôndega tornaram-se alimentos populares e convenientes, pela economia, praticidade de preparo e por possuir nutrientes que alimentam e saciam a fome rapidamente, o que combina com o modo de vida atual (BORBA et al., 2013).

O hambúrguer é definido como um produto cárneo industrializado obtido da carne moída dos animais, adicionado ou não de tecido adiposo e ingredientes, moldado e submetido

a processo tecnológico adequado, devendo a textura, cor, sabor e odor serem característicos (BRASIL, 2000a). A composição química do hambúrguer deve apresentar no máximo 23% de gordura, no mínimo 15 % de proteína e 3% de carboidratos totais e teor de cálcio de 0,1% (máximo em base seca) (BRASIL, 2000a).

Entende-se por almôndega o produto cárneo industrializado, obtido a partir da carne moída de uma ou mais espécies de animais de açougue, moldada na forma arredondada, adicionada de ingredientes e submetido ao processo tecnológico adequado. Quanto ao processamento o produto pode ser cru, semi-frito, frito, cozido ou esterilizado, designado almôndega, seguido do nome da espécie animal, acrescido ou não do termo "carne" (BRASIL, 2000b). A composição química das almôndegas deve atender os seguintes requisitos: máximo de 18 % de gordura, mínimo de 12 % de proteína, máximo de 10 % de açúcares totais (carboidratos) e teor de cálcio máximo de 0,1 % em almôndega crua e 0,45 % em almôndega cozida (BRASIL, 2000b).

Apesar de hambúrguer e almôndega reunirem diversas características comuns, cada produto apresenta identidade própria. Além da definição regulamentar e composição química, uma das principais diferenças está na forma de consumo, visto que o hambúrguer geralmente é consumido na forma de lanches e *fast foods*. Por outro lado, a almôndega comumente é consumida durante as refeições principais, almoço e janta, normalmente servida com molhos diversos. Dessa forma, o modo de preparo pode influenciar na aceitabilidade do produto.

2.4 CAROÇO DE ALGODÃO

A semente ou caroço de algodão é o subproduto do beneficiamento e/ou descaroçamento, visando à separação da fibra (Figura 1). Constitui uma das principais matérias-primas para a indústria de óleo comestível, originando a torta e o farelo, os quais são utilizados no preparo de rações, como fontes de proteína de boa qualidade (EMBRAPA, 2003).

Figura 1 – Algodão e seus subprodutos.



Algodão



Caroço de algodão



Torta de algodão



Farelo de algodão

Fonte: Embrapa, 2003.

O caroço de algodão possui 23,0% de proteína bruta, 17,8% de extrato etéreo, 47,0% de fibra em detergente neutro (FDN), 39% de fibra em detergente ácido (FDA) e 95% de nutrientes digestíveis totais (NRC, 2007). Tal composição caracteriza-o como um bom suplemento energético e proteico para adição na ração animal, permitindo incrementar a dieta, com custos reduzidos (PAIM et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2013).

Entretanto, apesar de ser um produto de elevado valor nutricional, o caroço de algodão possui limitações nutricionais, sendo a principal delas a presença do gossipol, pigmento amarelo, classificado como aldeído polifenólico e presente no algodão e seus coprodutos, principalmente na semente ou caroço (PAIM et al., 2010; GADELHA et al., 2014). Embora considerado em baixas proporções (0,4 a 1,2%), o gossipol presente na forma livre no caroço de algodão, pode combinar-se com proteínas formando complexos não assimiláveis pelos animais (CARVALHO et al., 2013; GADELHA et al., 2014), sendo que sua toxicidade está associada aos efeitos negativos provocados nos animais, tais como redução da fertilidade, interferência na função imune, reduzindo a resistência do animal a infecções e prejudicando a eficiência das vacinas (GADELHA et al., 2014). Estudos apontam que animais monogástricos apresentam elevado grau de sensibilidade ao gossipol, enquanto que os ruminantes se mostram mais tolerantes a esta substância, provavelmente devido à detoxificação ruminal (PAIM et al. 2010; VIEIRA et al., 2010).

A presença de gossipol na carne poderia causar alterações indesejáveis nas suas características sensoriais (PAIM et al., 2010). Por outro lado, Senegalhe et al. (2014) sugerem que tais alterações podem ser causadas pelo excesso de ácidos graxos insaturados presentes no caroço de algodão que escapam da biohidrogenação ruminal.

Estudos relacionam o gossipol com a qualidade da carne de animais alimentados com caroço de algodão, especialmente para ruminantes. A qualidade da carne de ovinos em diferentes estados fisiológicos alimentados com dietas suplementadas com caroço de algodão foi considerada de boa aceitação pelos apreciadores de carne ovina (PINHEIRO et al., 2012). Em outros trabalhos, não foi detectado resíduo de gossipol na carne de ovinos suplementados com caroço de algodão (VIEIRA et al., 2010; VIANA et al., 2014).

3 ARTIGO 1 – Níveis séricos, modulação das fibras musculares esqueléticas e sua relação com a qualidade da carne de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão

Artigo em fase de revisão pelos autores para ser submetido ao periódico Meat Science. [Versão em Português]. Configurado conforme as normas da Revista (<https://www.elsevier.com/journals/meat-science/0309-1740/guide-for-authors>).

Resumo

Objetivou-se avaliar os níveis séricos, a modulação das fibras musculares do *Longissimus thoracis* de cordeiros alimentados com caroço de algodão (CA) e sua relação com a qualidade da carne. Foram utilizados 50 cordeiros Ile de France, sendo cinco referências, cinco tratamentos (0, 10, 20, 30 e 40% CA) e nove repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Avaliou-se a correlação entre as fibras musculares e as características qualitativas da carne. Os níveis de colesterol, proteínas totais e gama glutamil transpeptidase aumentaram ($P<0,05$) com os níveis de caroço de algodão na dieta. Verificou-se modulação ($P<0,05$) das fibras musculares, com aumento das vermelhas, redução das glicolíticas e modulação das Tipo IIB para Tipo IIA. A dieta influenciou ($P<0,05$) apenas a área relativa das fibras Tipo IIC. Concluiu-se que o efeito do tempo foi mais pronunciado que o efeito da dieta na modulação das fibras musculares, as quais estavam intimamente associadas à qualidade da carne.

Palavras-chave: Histoquímica, ATPase miosínica, qualidade da carne, *Longissimus thoracis*.

1 Introdução

A dieta animal envolve altos custos de produção, sendo oportuno o estudo de ingredientes alternativos, que forneçam os nutrientes adequados, aliado ao baixo custo. Neste sentido, o emprego de caroço de algodão (CA) na dieta de ruminantes vem se destacando principalmente em virtude de seus altos teores de proteínas (23%) e lipídeos (17,8%) (NRC, 2007). No entanto, o caroço de algodão pode conter quantidade variável de gossipol,

pigmento amarelo contido nas glândulas do algodão (Gadelha et al., 2014), que na sua forma livre pode ser tóxico aos ruminantes jovens, quando a capacidade de desintoxicação for excedida (Solaiman, Gurung, McCrary, Goyal, & McElhenney, 2009). A fragilidade dos eritrócitos tem sido usada como indicador de toxicidade do gossipol (Dayani, Dadvar, & Afsharmanesh, 2011, Câmara, Vale, Mattoso, Melo, & Soto-Blanco, 2016, Ismartoyo, 2016), enquanto que a avaliação dos níveis séricos reflete a condição nutricional dos animais (González, Barcellos, & Patiño, 2000).

O uso de subprodutos do algodão (caroço, torta e farelo) na nutrição de pequenos ruminantes foi amplamente pesquisado, abordando seu efeito sobre os custos de produção, comportamento ingestivo, níveis séricos e desempenho da carcaça (Dayani, Dadvar, & Afsharmanesh, 2011, Lima Júnior et al., 2012, Piona et al., 2012; Rufino Júnior et al. 2015, Pilleco 2016); bem como seu efeito na qualidade da carne, tendo como principais temas pesquisados a composição físico-química, o perfil de ácidos graxos e aminoácidos, a identificação de compostos orgânicos voláteis e a aceitação sensorial da carne de cordeiros alimentados com subprodutos de algodão (Madruga et al., 2008, Paim et al., 2010, Vieira et al., 2010, Paim, Louvandini, McManus, & Abdalla, 2010, Paim et al., 2014, Viana et al., 2014, Pellegrini, 2017). Contudo, não foram encontrados estudos do efeito da inclusão de subprodutos de algodão na dieta de cordeiros sobre a expressão de suas fibras musculares esqueléticas, sendo um tema relevante a ser investigado.

Cada músculo é formado por uma combinação de fibras musculares, sendo que a frequência de cada tipo de fibra, o diâmetro e a área, bem como suas propriedades contráteis e metabólicas são considerados fatores importantes, uma vez que podem influenciar tanto diretamente na qualidade da carne, quanto promover alterações na elaboração de produtos cárneos (Ithurrealde et al., 2015). As fibras musculares podem ser classificadas de acordo com as propriedades metabólicas, fisiológica e contrátil. Comparações diretas entre essas

propriedades permitem classificar as fibras musculares em três categorias: Tipo I (vermelha, aeróbica, oxidativas de contração lenta, SO – *Slow oxidative*), Tipo IIA (intermediárias, oxidativas glicolíticas contração rápida, FOG – *Fast oxidative and glycolytic*) e as fibras Tipo IIB (brancas, anaeróbicas, glicolíticas de contração rápida, FG – *fast glycolytic*) (Ryu, & Kim, 2005, Choe, & Kim, 2009, Chriki et al. 2012). A identificação das fibras musculares (I, IIA e IIB) pode ser feita através de técnicas histoquímicas, dentre as quais destaca-se m-ATPase (ATPase miosínica) (Brooke, & Kaiser, 1970). O princípio desta técnica baseia-se no comportamento diferenciado das fibras musculares frente a diferentes valores de pH, devido à concentração muscular de fosfatase alcalina ou ácida (Loughlin, 1993).

O método histoquímico permite distinguir outro tipo de fibra, denominada Tipo IIC (Peinado et al., 2004), a qual tem sido considerada fibra não diferenciada ou precursora das fibras Tipo IIA e Tipo IIB (Brooke, & Kaiser, 1970), fibra que sofreu mudanças devido a doenças ou injúrias (Ramos, & Gomide, 2009) ou fibra imatura (Dubowitz, Sewry, & Oldfors, 2013). As fibras Tipo IIC são consideradas fibras híbridas devido à coexistência das miosinas de cadeia pesada I e II (principalmente MHCIIa) (Hori, Ishihara, Kobayashi, & Ibata, 1998), apresentam velocidade de contração rápida e alta resistência à fadiga (Nakatani, Nakashima, Kita, & Ishihara, 2003).

A qualidade da carne é resultado das características das fibras musculares, as quais podem ser influenciadas por diferenças entre as raças (Bünger et al., 2009), idade (Peinado et al., 2004), tipo de músculo (Ithurralde et al., 2015), bem como manejo alimentar e sistema de terminação (Gallo, Siqueira, Delgado, Silva, & Rosa, 2009, Santello et al., 2009, Santello et al., 2010, Joo, Kim, Hwang, & Ryu, 2013, Hamdi et al., 2016). Assim, objetivou-se avaliar os níveis sérios, a modulação das fibras musculares esqueléticas de cordeiros Ile de France alimentados com níveis de caroço de algodão (0; 10; 20; 30 e 40%), bem como a relação das fibras musculares esqueléticas do *Longissimus thoracis* com a qualidade da carne.

2 Material e métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) do Instituto Federal Farroupilha, Protocolo 01.0378.2015 / 001.2015.

2.1 Local e época

O experimento com os cordeiros foi realizado no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha, localizado na cidade de Júlio de Castilhos, RS, Brasil. O município está situado a 513 metros de altitude, latitude de 29°18'35" Sul e sua longitude é 53°71'23" Oeste.

2.2 Tratamentos

Foram utilizados 50 cordeiros Ile de France, machos inteiros, sendo 5 animais referência (abatidos no início do experimento, 60 dias, peso médio 20 Kg) e 45 cordeiros confinados, divididos em cinco tratamentos com nove repetições cada. Os tratamentos foram constituídos por níveis de inclusão de caroço de algodão integral (*Gossypium hirsutum* L.) na dieta (0, 10, 20, 30 e 40% de CA na matéria seca), sendo que cada grama de caroço de algodão continha 3,65 mg de gossipol. As dietas foram calculadas de modo a atender as exigências nutricionais de cordeiros em crescimento (NRC, 2007), conforme Tabela 1. Após o desmame (60 dias) e adaptação às condições experimentais (7 dias), os cordeiros foram terminados em confinamento, em baias individuais, totalmente cobertas, com piso ripado, com aproximadamente 2m² de área, providas de bebedouros e comedouros. O arraçoamento foi *ad libitum* e o consumo foi monitorado duas vezes ao dia, em horários pré-estabelecidos às 7:00 e 16:00 horas. Após a adaptação (peso médio inicial 19,26 Kg, idade 67 dias), o ensaio de alimentação estendeu-se até o momento em que cada cordeiro atingiu o peso de abate pré-estabelecido, correspondente a 60% do peso vivo a maturidade, ou seja, 36 kg de peso vivo, quando então foram abatidos (tempo médio de confinamento 64 dias, peso médio final 36.64 Kg, idade 127 dias). Os cordeiros foram submetidos a jejum de sólidos por 12 horas, em

seguida pesados, insensibilizados com pistola pneumática, seguido de sangria, esfolação, evisceração, pesagem, lavagem e resfriamento das carcaças em câmara fria a 2°C por 24 horas (Brasil, 1952).

2.3 Amostragem e análise dos níveis séricos

Antes da insensibilização, as amostras de sangue foram coletadas por punção na veia jugular, centrifugadas a 3000 rpm para obtenção do soro, o qual foi armazenado a -12 °C até o momento das análises. As concentrações plasmáticas de albumina, colesterol, fosfatase alcalina, gama glutamiltransferase (GGT), glicose, proteínas totais, aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT) e triglicerídeos foram determinadas por meio dos kits colorimétricos comerciais (ref. 19, 76, 40, 105, 133, 99, 52, 53, 87, respectivamente), de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica S. A., Lagoa Santa, MG, Brasil).

2.4 Amostragem do músculo

Após o período de resfriamento das carcaças (24h), foram coletadas amostras (1 cm x 1 cm x 0,5 cm) do músculo *Longissimus thoracis* da carcaça (lado direito, porção medial), armazenadas em microtubo Eppendorf, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até o momento das análises.

2.5 Histoquímica, tipos de fibras e análises morfométricas

As amostras do tecido muscular congeladas foram fixadas em suportes metálicos específicos utilizando resina Optimal Critical Temperature compound – OCT Tissue-Tek® e mantidas (-20°C) no criostato Leica® CM1850™ (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), até o momento do corte. Para a montagem da lâmina histológica, foram realizados cortes transversais seriados, 10 µm de espessura, os quais foram aderidos à lâmina por aproximação.

Inicialmente os cortes histológicos foram estabilizados a temperatura ambiente. Em seguida, os mesmos foram corados de acordo com o protocolo descrito por Loughlin (1993),

baseando-se nas variações de sensibilidade para atividade de adenosina trifosfatase miofibrilar (mATPase ou ATPase miosínica) em exposição a diferentes valores de pH. Sendo assim, foram preparadas duas lâminas por unidade experimental (animal), as quais foram incubadas em solução pH 4,3 e pH 4,6, a fim de distinguir os diferentes tipos de fibras.

As imagens foram capturadas através do Microscópio óptico Olympus® (modelo BX51, Olympus, Tokyo-Japan), com objetiva de 20X. Em cada lâmina, foram capturadas imagens de 20 campos microscópicos, dentre as quais foram escolhidas dez melhores para realizar a análise das fibras.

Com base na intensidade do seu tingimento histoquímico quando incubado a um determinado pH, as fibras apresentaram coloração pálida, intermediária e escura (Figura 1). Assim, a identificação e classificação das fibras musculares foi realizada pela seguinte relação: Tipo I (escura, pH 4,3), Tipo IIA (pálida, pH 4,6), Tipo IIB (intermediária, pH 4,6) e Tipo IIC (intermediária, pH 4,3) (Loughlin, 1993).

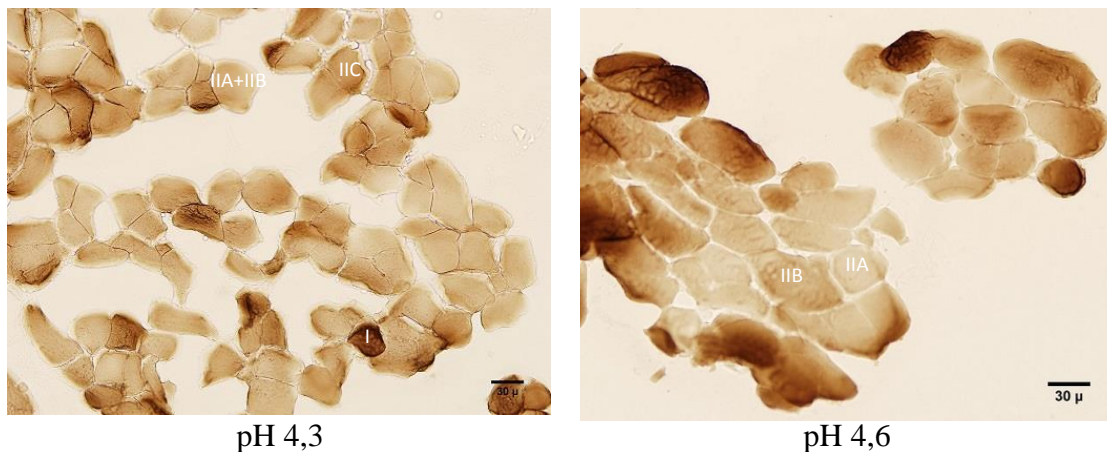


Fig. 1. Seções transversais do músculo *Longissimus thoracis* reagidas pelo método m-ATPase e incubadas em pH 4,3 e 4,6.

Para cada tipo de fibra foi mensurada a área da secção transversal (μm^2) e menor diâmetro (μm) para evitar efeito de bisel, com auxílio de uma máscara de grade, no *software* livre Image J (National Institutes of Health, NIH, Maryland-USA). A frequência (%) das

fibras foi calculada pela razão do número absoluto de cada tipo de fibra na máscara de grade, pelo número total de fibras contadas, multiplicando-se o quociente por 100 (Ramos, & Gomide, 2009). A área relativa (%) foi determinada pela razão do produto de cada fibra com sua respectiva frequência, pelo somatório dos produtos de todas as fibras pelas suas frequências, e o resultado foi multiplicado por 100.

Velocidade de contração, cor e metabolismo das fibras foram expressos em % de área relativa, sendo os tipos de fibras classificados da seguinte maneira: lentas (Tipo I), rápidas (Tipo IIA + Tipo IIB + Tipo IIC), vermelhas (Tipo I + Tipo IIA), brancas (Tipo IIB + Tipo IIC), oxidativas (Tipo I), oxidativo-glicolíticas (Tipo IIA), glicolíticas (Tipo IIB + Tipo IIC).

2.6 Dados de qualidade da carne

Para análise de correlção entre as características das fibras musculares esqueléticas e sua relação com a qualidade da carne de cordeiro, foram utilizados os dados obtidos por Pellegrini (2017), referentes às análises: cor (10 variáveis), perfil de textura e sensorial (17 variáveis), físico-químicas (13 variáveis) e perfil de ácidos graxos (18 variáveis) (dados não mostrados).

2.7 Delineamento experimental e análise estatística

Os dados foram sujeitos a investigação de *outliers* a partir do resíduo estudentizado. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA).

Para verificar se houve modulação de fibras musculares esqueléticas durante a fase de terminação em confinamento, os dados dos cordeiros abatidos no início do experimento (referência) foram analisados conjuntamente com os dos cordeiros abatidos ao final do experimento (confinados) em delineamento inteiramente casualizado, com seis (6) tratamentos (referência, 0, 10, 20, 30 e 40% CA) e número diferente de repetições (5 referências, 9 confinados) utilizando o procedimento GLM. As médias foram ajustadas pelo

método dos quadrados mínimos ordinários com o comando LSMEANS e comparadas por contraste.

Para avaliar o efeito da inclusão de caroço de algodão na dieta sobre as variáveis de níveis séricos e as características das fibras musculares esqueléticas, os dados dos cordeiros abatidos no final do experimento foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, com cinco (5) tratamentos (0, 10, 20, 30 e 40% CA) e nove (9) repetições cada, sendo o peso inicial dos animais usado como covariável, utilizando o procedimento GLM. As médias foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ordinários com o comando LSMEANS e comparadas pelo teste t. Além disso, testaram-se as tendências linear e quadrática via contrastes a partir dos coeficientes para interpolação dos polinômios ortogonais. Adicionalmente foi ajustada regressão polinomial com o procedimento RSREG e os valores de r^2 expressos em relação a fonte tratamentos (regressão + falta de ajuste). Em seguida, efetuou-se análise de correlação parcial de *Spearman* entre as características das fibras musculares esqueléticas do *Longissimus thoracis* e 58 variáveis da qualidade da carne, sendo os níveis de caroço de algodão utilizados como covariável.

As análises estatísticas foram realizadas no aplicativo SAS® - *Statistical Analysis System* versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA) ao nível de 5% de significância.

3 Resultados e discussão

3.1 Níveis séricos

À medida que aumentou o nível de caroço de algodão na dieta foi observado aumento do grau de hemólise em 0; 11; 22; 33 e 44% para os tratamentos com dietas 0; 10; 20; 30 e 40% CA, respectivamente ($\hat{y}_{hemólise} = 1,1CA$; $r^2 = 0,99$). O aumento da hemólise está associado a alterações bioquímicas induzidas pelo gossipol livre que escapou da desintoxicação do rúmen e / ou gossipol ligado que foi hidrolisado no rúmen e absorvido

através do intestino delgado, causando fragilidade dos eritrócitos (Rogers, Poore, & Paschal, 2002, Ismartoyo, 2016).

Não foi verificado efeito ($P > 0,05$) do caroço do algodão na glicose, triglicérides e albumina séricas (Tabela 2). Entretanto, verificou-se efeito ($P < 0,05$) do caroço de algodão nos níveis de colesterol e proteínas totais. Tais alterações devem-se ao fato do caroço de algodão ser rico em proteínas (23,3%) e lipídeos (22,7%) (Pilecco, 2016), sendo que o metabolismo destes constituintes influencia diretamente suas concentrações plasmáticas. A inclusão de caroço de algodão aumenta a exportação de colesterol lipoproteico pelo intestino, principal local da síntese de novo colesterol em ruminantes (Noble, 1981). Estudos anteriores relataram que o óleo do caroço de algodão tem a capacidade de aumentar os níveis sanguíneos de colesterol e triglicérides (Hernandez, Dryden, Marchello, & Shell, 1978, Garcia, Amstalden, Morrison, Keisler, & Williams, 2003). Além disso, o aumento dos níveis séricos de colesterol pode ser justificado pelo aumento de ácido oleico (18:1 *cis*-9), principal ácido graxo precursor do colesterol em mamíferos (Faria et al., 2012); uma vez que com o aumento dos níveis de caroço de algodão, aumentou a concentração de ácido oleico na dieta (Pellegrini, 2017). Os valores encontrados para os constituintes sanguíneos estavam de acordo com os valores referência para ovinos (Feldman, Zinkl, Jain, 2000) e foram corroborados com os encontrados na literatura (Dayani, Dadvar, & Afsharmanesh, 2011, Câmara, Vale, Mattoso, Melo, & Soto-Blanco, 2016, Lestingi, Facciolongo, Marzo, Nicastro, & Toteda 2016).

Dentre as enzimas indicativas de extravasamento hepatocelular, a aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALF) estavam de acordo com os valores referência (Feldman, Zinkl, Jain, 2000). O conteúdo de alanina aminotransferase (ALT) foi levemente maior (31,37 UI/L) que o valor referência (30 UI/L). A enzima gama glutamil transpeptidase (GGT) aumentou ($P < 0,05$) com os níveis de caroço de algodão, sendo que a partir da inclusão de 13,48% CA ($\hat{y}_{GGT} = 30,17 + 1,62CA; r^2 = 0,92$), os resultados de

GGT extrapolam os valores referência, acima da normalidade, indicando possível lesão hepática aguda (González, Barcellos, Patiño, 2000). Câmara et al. (2016), ao avaliarem a inclusão de 40% de torta de algodão ($3,28 \text{ mg.g}^{-1}$ de gossipol livre e $0,11 \text{ mg.g}^{-1}$ de gossipol ligado) na dieta de fêmeas Santa Inês confinadas por 63 dias, encontraram $29,7 (\pm 8,8)$; $144 (\pm 40,8)$ e $48,3 (\pm 5,82)$ U/L, para as enzimas ALT, AST e GGT, respectivamente; e não foram observados sinais de toxicidade provocada pelo gossipol no período estudado.

Os constituintes bioquímicos avaliados no soro dos cordeiros indicam a condição nutricional e função hepática dos animais (Feldman, Zinkl, & Jain, 2000). Assim, pode-se inferir que os níveis de caroço de algodão não afetaram a condição nutricional dos animais; entretanto, promoveram alterações importantes nos níveis de enzimas indicadoras da função hepática, sugerindo que a adição deste ingrediente na dieta pode causar danos às células hepáticas, podendo causar prejuízos à saúde dos animais quando alimentados por longos períodos.

3.2 Fibras musculares esqueléticas

Os resultados do efeito do tempo (referência \times CA) e do efeito da dieta (0; 10; 20; 30; 40% CA) em todas as variáveis estudadas foram compilados na tabela 4 (Material complementar). As variáveis que diferiram ($P < 0,05$) de acordo com o tempo foram apresentadas nas figuras 2 e 3; e a que diferiu ($P < 0,05$) de acordo com os níveis de caroço de algodão foi apresentada na figura 4.

3.2.1 Modulação das fibras musculares esqueléticas

A modulação das fibras musculares esqueléticas consiste na transição de um tipo de fibra em outro, no período pós-natal. O tempo (referência \times CA) de confinamento não afetou ($P > 0,05$) a velocidade de contração (Figura 2, A); mas promoveu modulação ($P < 0,05$) na cor (Figura 2, B), no metabolismo (Figura 2, C) e nas características morfométricas das fibras musculares esqueléticas (Figura 3).

O tempo (referência × CA) de confinamento influenciou ($P < 0,05$) a cor do músculo, com aumento da expressão das fibras vermelhas e redução das fibras brancas. Em geral, com o aumento da idade dos animais aumenta o metabolismo glicolítico, devido ao aumento do diâmetro das fibras que reduz a difusão de oxigênio, reduzindo assim o metabolismo oxidativo (Picard, Lefaucheur, Berri, & Duclos, 2002, Peinado et al., 2004). No entanto, no presente trabalho o tempo (referência × CA) de alimentação promoveu relação inversa entre metabolismo e idade, visto que houve redução ($P < 0,05$) das fibras glicolíticas (Tipo IIB + Tipo IIC) e aumento ($P = 0,0888$) das fibras oxidativo-glicolíticas (Tipo IIA) (Figura 2, C). Esta transição foi ocasionada pela natureza dos nutrientes fornecidos aos cordeiros no confinamento, uma vez que o metabolismo das fibras é influenciado pelo aporte nutricional da dieta. As fibras glicolíticas utilizam reservas glicídicas (glicose e glicogênio), enquanto que as fibras oxidativas utilizam reservas lipídicas (triglicerídeos, ácidos graxos livres e voláteis, corpos cetônicos) (Picard, Lefaucheur, Berri, & Duclos, 2002).

As propriedades metabólicas das fibras musculares influenciam tanto a qualidade da carne, quanto seu beneficiamento e qualidade de seus derivados. No processamento da carne, músculos oxidativos lentos estão associados à carne mais vermelha, ao sarcômero altamente encurtado e à menor intensidade de proteólise, reduzindo a maciez final da carne (Santello et al., 2010). Assim, músculos com predominância do metabolismo oxidativo poderiam se beneficiar mais por estimulação elétrica (Ithurrealde et al., 2015). Por outro lado, músculos glicolíticos rápidos estão associados com menor pH final da carne e redução da capacidade de retenção de água, o que poderia resultar em menor capacidade de emulsificação (Ithurrealde et al., 2015).

Conforme esperado, os animais confinados apresentaram maiores ($P < 0,05$) diâmetro (Figura 3, A) e área (Figura 3, B) em todos os tipos de fibras do *Longissimus thoracis*, com aumento médio de 27 e 63%, respectivamente. O aumento do tamanho das fibras (hipertrofia)

no desenvolvimento pós-natal do animal está associado à idade de abate (Peinado et al., 2004), ao tipo de músculo e sua taxa de exercício (Ithurralde et al., 2015), ao sistema de terminação (Santello et al., 2010) e à qualidade nutricional da dieta (Gallo, Siqueira, Delgado, Silva, & Rosa, 2009). A hipertrofia indica maior deposição de proteína muscular, comprova a eficiência nutricional da dieta e resulta em maior rendimento de carcaça (Chriki et al., 2013).

O confinamento alterou ($P < 0,05$) a proporção dos tipos de fibras, evidenciado pelo aumento da frequência de Tipo IIA e redução de Tipo IIB (Figura 3, C). Entretanto, a proporção de área relativa no músculo foi alterada ($P < 0,05$) apenas para as fibras Tipo IIB. A proporção das fibras nos músculos é constantemente alterada no desenvolvimento pós-natal do animal e pode exibir comportamentos diferentes de acordo com o período analisado. A avaliação do *Longissimus thoracis* no desenvolvimento pós-natal (1 a 90 dias e adultos) de cordeiros Segureña mostrou que a modulação na proporção de fibras varia de acordo com o tempo considerado; comparando-se o período de um a 30 dias pós-natal houve redução das fibras Tipo IIA e aumento das Tipo IIB (Peinado et al., 2004). No período de 30 dias de idade aos animais adultos, foi observada relação inversa, ou seja, aumentou Tipo IIA e reduziu Tipo IIB.

3.2.2 Efeito da dieta na performance das fibras musculares esqueléticas

A velocidade de contração, cor e metabolismo das fibras não foram alteradas ($P > 0,05$) de acordo com os níveis de caroço de algodão na dieta dos cordeiros. O *Longissimus thoracis* de cordeiros alimentados com caroço de algodão caracterizou-se como músculo de contração rápida (83,43% rápida vs. 16,59% lenta), coloração vermelha (63,44% vermelha vs. 36,58% branca) e metabolismo oxidativo-glicolítico (16,59% oxidativo; 46,30% oxidativo-glicolítico; 36,58% glicolítico). Estes resultados concordam com os anteriormente relatados para *Longissimus thoracis* de ovinos, que tem sido classificado como rápido, vermelho (Briand, Talmant, Briand, Monin, & Durand, 1981); porém divergem quanto ao metabolismo, definido

como glicolítico por Ithurralde et al. (2015). Esta diferença pode ser atribuída ao grau de maturidade fisiológica do animal, à porção do músculo onde foi feita a amostragem, bem como ao sistema de terminação.

Considerando-se as características morfométricas (diâmetro, área, frequência e área relativa) das fibras musculares do *Longissimus thoracis*, apenas a área relativa das fibras Tipo IIC foi alterada ($P < 0,05$) com a inclusão de caroço de algodão ($\hat{y}_{IIC} = 15,90 + 0,08CA$; $r^2 = 0,60$) (Figura 4). O aumento das fibras glicolíticas está associado ao aumento do declínio do pH *post mortem* (Joo, Kim, Hwang, & Ryu, 2013). De fato, a área das fibras Tipo IIC estava negativamente correlacionada ($r = -0,31$; $P < 0,05$) com o pH inicial (Tabela 3) do músculo *Longissimus thoracis* e não teve correlação significativa com o pH final (5,57) (Pellegrini, 2017). Apesar de pH inicial considerado normal estar entre 6,9 e 7,2 (Pardi, Santos, Souza, & Pardi, 2006), a média do pH inicial do *Longissimus thoracis* dos cordeiros foi considerada ligeiramente baixa (6,72) (Pellegrini, 2017) e não teve influência na qualidade da carne.

Na literatura são relatadas diferenças no tamanho entre os tipos de fibras, de acordo com a alimentação, tipo de músculo analisado e idade de abate. O *Longissimus thoracis* de cordeiros adultos apresentou diferença no diâmetro entre os tipos de fibras, sendo as fibras Tipo IIA (20,54 μm) menores que as fibras Tipo I (26,33 μm) e Tipo IIB (24,27 μm) (Peinado et al., 2004). O músculo *Semitendinosus* de cordeiros ½ Dorper-Santa Inês terminados em diferentes sistemas de alimentação (confinamento e pastagem mais suplementação com óleo) apresentaram maior diâmetro para as fibras oxidativo-glicolíticas (43,71 μm), seguido das fibras glicolíticas (35,96 μm) e oxidativas (20,34 μm) (Santello et al., 2009). Cordeiros ½ Dorper-Santa Inês terminados com grão de girassol (9,10%) apresentaram diâmetros semelhantes entre os tipos de fibras vermelhas (35,38 μm), intermediárias (36,02 μm) e brancas (35,31 μm) para o músculo *Semitendinosus*; já para o músculo *Longissimus lumborum* os diâmetros entre os tipos de fibras apresentaram certa diferenciação, com valores

de 28,71; 29,81 e 32,22 μm para as fibras vermelhas, brancas e intermediárias, respectivamente (Santello et al., 2010). De forma contrária aos resultados supracitados, no presente trabalho o diâmetro e a área das fibras não variaram entre os tipos (I, IIA, IIB e IIC) de fibras, com valores médios de 19,37 μm e 451,70 μm^2 , respectivamente (material complementar). A falta de diferenciação entre os tipos de fibras no diâmetro e o menor valor observado, em relação aos relatados na literatura, podem indicar a maturidade fisiológica incompleta dos animais, ou seja, o crescimento muscular dos cordeiros ainda é bastante ativo (Macedo, Pai-Silva, Pai, Macedo, & Martins, 2000).

A frequência dos tipos de fibras não variou ($P > 0,05$) de acordo com os níveis de caroço de algodão; e o músculo *Longissimus thoracis* apresentou maior proporção de fibras intermediárias (*Tipo IIA* = 48,32%), seguida das glicolíticas (*Tipo IIB* + *Tipo IIC* = 36,12%) e oxidativas (*Tipo I* = 15,82%). A proporção da área relativa dos tipos de fibras seguiu o mesmo padrão da frequência, com valores médios de 46,27; 35,98 e 16,59% para as fibras intermediárias, glicolíticas e oxidativas, respectivamente. Estes resultados são consistentes com trabalhos anteriores que demonstraram que o sistema alimentar por curtos períodos não influenciou a proporção de fibras no músculo de ovinos (Gallo, Siqueira, Delgado, Silva, & Rosa, 2009, Santello et al., 2009; Santello et al., 2010b).

3.3 Relação entre fibra muscular e qualidade da carne

A carne é formada por inúmeros tecidos, com predominância do tecido muscular, composto de fibras musculares; logo, alterações nos tipos de fibras musculares refletem diretamente na qualidade da carne. Qualidade tem sido definida como desempenho do produto que resulte em satisfação do consumidor, sendo os principais atributos intrínsecos associados à qualidade da carne: cor, sabor, textura, conservação (vida de prateleira), composição química, confiabilidade e conveniência (Chriki et al., 2013, Joo, Kim, Hwang, & Ryu, 2013, Ponnampalam, Holman, & Scollan, 2016).

As características das fibras musculares do *Longissimus thoracis* foram correlacionadas com as características qualitativas da carne de cordeiro. As correlações mostraram baixo ou médio grau de associação (baixo $< 0,40$ \geq médio $\leq 0,70$ $>$ alto), sendo que foram apresentadas apenas as variáveis e os coeficientes de correlações significativos ($P < 0,05$) e com significado prático para este estudo (Tabela 3).

A cor da carne é o primeiro fator de qualidade avaliado pelo consumidor para sua aquisição (Ponnampalam, Holman, & Scollan, 2016). Conforme esperado, as características das fibras vermelhas estavam positivamente correlacionadas com desoximioglobina (Tipo I, $r = 0,51^*$) e intensidade de vermelho (Tipo IIA, $r = 0,47^*$), enquanto que as fibras brancas (Tipo IIB e Tipo IIC) estavam negativamente correlacionadas com a intensidade de vermelho e saturação da cor. A mioglobina adota estrutura de desoximioglobina quando a carne é armazenada em ambiente anaeróbico, e promove cor vermelho cereja à carne (Ponnampalam, Holman, & Scollan, 2016). Assim, estes resultados estão de acordo com as características de cor das fibras, visto que as fibras Tipo I e Tipo IIA possuem maior teor de mioglobina que as fibras Tipo IIB e Tipo IIC (Choe, & Kim, 2009). Embora as fibras Tipo I possuam maior teor de lipídeos, o diâmetro e área destas fibras estava inversamente correlacionado com a intensidade de amarelo.

A capacidade de retenção de água estava positivamente correlacionada ($r = 0,37^*$) com o diâmetro das fibras oxidativas (Tipo I). Da mesma forma, Ryu, & Kim (2005) associaram o aumento da capacidade de retenção de água ao número de fibras Tipo I e Tipo IIA, devido à correlação inversa dessas fibras com perda de gotejamento no *Longissimus dorsi* de porco. A capacidade de retenção de água influencia a qualidade da carne tanto *in natura* quanto após cozimento, pois está intimamente relacionada à cor da carne fresca e à maciez da carne cozida, respectivamente (Ryu, & Kim, 2005, Ponnampalam, Holman, & Scollan, 2016).

Em relação à textura, a fibra Tipo IIA (diâmetro e área) estava negativamente correlacionada ($r = -0,37^*$; $P < 0,05$) com o valor de Warner-Bratzler Shear (WBS), isto é, quanto maior o diâmetro e área das fibras Tipo IIA, menor a dureza (mais macio). Da mesma forma, a fibra Tipo IIA apresentou correlação negativa ($r = -0,38^*$; $P < 0,05$) com a coesividade, demonstrando que o aumento da frequência desta fibra, diminui a coesividade (mais macio). Tal comportamento indica que considerando uma mesma área de tecido muscular, quanto maior foi o diâmetro das fibras, menor número de fibras estavam dispostas nesse intervalo; e, portanto, menos tecido conjuntivo que permeava as fibras (endomísio) ou feixe de fibras (perimísio) precisou ser rompido para os testes de textura (*shear force* e coesividade), o que influenciou diretamente a maciez da carne. Assim, pode-se inferir que a fibra Tipo IIA estava relacionada com características desejáveis da textura da carne de cordeiro.

A carne de ovinos pode apresentar características sensoriais indesejáveis, como sabor e aroma mais intensos que o característico, o que tem sido associado a alimentação, condição fisiológica, castração e estresse pré-abate (Monte et al., 2012). As correlações entre atributos sensoriais e características das fibras, mostraram que aspectos indesejáveis (*off flavour*, sabor metálico e sabor fígado) estavam associadas à presença das fibras Tipo I. Já o aumento das fibras Tipo IIA estava associado à redução do *off flavour* ($r = -0,39^*$) e sabor fígado ($r = -0,41^*$).

Na literatura, é consenso que o conteúdo de lipídeos é elevado nas fibras Tipo I, alto ou intermediário em nas Tipo IIA e baixo nas Tipo IIB (Picard et al., 2002, Choe, & kim, 2009, Chriki et al. 2012). Entretanto, no presente trabalho, o teor de lipídeos no *Longissimus thoracis* apresentou correlação positiva ($r = 0,40^*$; $P < 0,05$) apenas com a área relativa das fibras Tipo IIB. Em relação ao perfil de ácidos graxos, observou-se que as fibras Tipo I (lentas, oxidativas) estavam associadas com aspectos indesejáveis (aumento de ácidos graxos

saturados, redução de ácidos graxos insaturados, menor relação monoinsaturados:saturados, menor $n3$, maior $n6n3$, maior índice de trombogenicidade); enquanto que as fibras Tipo IIA (intermediárias) estavam associadas às características desejáveis do perfil de ácidos graxos (aumento de ácidos graxos insaturados e $n3$; redução de ácidos graxos saturados, relação $n6n3$ e índice de trombogenicidade).

4 Conclusão

O caroço de algodão na dieta dos cordeiros promoveu alterações nos níveis de enzimas indicadoras da função hepática, sugerindo que a adição deste ingrediente na dieta pode causar danos às células hepáticas.

O tempo (referência \times CA) influenciou positivamente a modulação das fibras musculares esqueléticas, promovendo o aumento do diâmetro e área de todas as fibras; e foi mais pronunciado que o efeito dos níveis de caroço de algodão.

A qualidade da carne foi influenciada pelas características dos diferentes tipos de fibras do *Longissimus thoracis*, sendo que as fibras intermediárias presentes em maior quantidade no músculo foram positivamente correlacionadas com as características desejáveis de qualidade da carne.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Departamento de Biologia Estrutural e Funcional e ao Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Laboratório de Morfofisiologia Experimental (LABITEX) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), pelo suporte técnico e ao Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro através do Projeto Casadinho/Procad CNPq (Processo 552440/2011-6).

Referências

- Brasil. (1952). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Brasília: MAPA, 154 p.
- Briand, M., Talmant, A., Briand, Y., Monin, G., & Durand, R. (1981). Metabolic types of muscle in the sheep: I. Myosin ATPase, glycolytic, and mitochondrial enzyme activities. *European Journal of Applied Physiology*, *46*, 347-358.
- Brooke, M.H., & Kaiser, K.K. (1970). Three ‘myosin adenosine triphosphatase’ systems: the nature of their pH lability and sulphhydryl dependence. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *18*, 670-672.
- Bünger, L., Navajas, E.A., Stevenson, L., Lambe, N.R., Maltin, C.A., Simm, G., Fisher, A.V., & Chang, K.C. (2009). Muscle fibre characteristics of two contrasting sheep breeds: Scottish Blackface and Texel. *Meat Science*, *81*, 372–381.
- Câmara, A. C. L., Vale, A. M., Mattoso, C. R. S., Melo, M. M., & Soto-Blanco, B. (2016). Effects of gossypol from cottonseed cake on the blood profile in sheep. *Tropical Animal Health and Production*, *48*, 1037–1042.
- Choe, J. H., & Kim, B. C. (2014). Association of blood glucose, blood lactate, serum cortisol levels, muscle metabolites, muscle fiber type composition, and pork quality traits. *Meat Science*, *97*, 137–142.
- Chriki, S., Picard, B., Jurie, C., Reichstadt, M., Micol, D., Brun, J.-P., Journaux, L., & Hocquette, J.-F. (2012). Meta-analysis of the comparison of the metabolic and

- contractile characteristics of two bovine muscles: *Longissimus thoracis* and *Semitendinosus*. *Meat Science*, *91*, 423–429.
- Dayani, O., Dadvar, P., & Afsharmanesh, M. (2011) Effect of dietary whole cottonseed and crude protein level on blood parameters and performance of fattening lambs. *Small Ruminant Research*, *97*, 48–54.
- Dubowitz, V., Sewry, C. A., & Oldfors, A. (2013). Muscle biopsy: A practical approach. *Saunders Elsevier*. Fourth edition.
- Faria, P. B., Bressan, M. C., Vieira, J. O., Vicente-Neto, J., Ferrão, S. P. B., Rosa, F. C., Monteiro, M., Cardoso, M.G., & Gama, L.T. (2012). Meat quality and lipid profiles in crossbred lambs finished on clover-rich pastures. *Meat Science*, *90*, 733–738.
- Feldman, B. F., Zinkl, J. G., Jain, & C. N. (2000) Schalm's veterinary hematology. 5th ed. *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*, 1344 p.
- Gadelha, I. C. N., Fonseca, N. B. S., Oloris, S. C. S., Melo, M. M., & Soto-Blanco, B. (2014). Gossypol Toxicity from Cottonseed Products. *The Scientific World Journal*. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/231635>
- Gallo, S. B., Siqueira, E. R., Delgado, E. F., Silva, M. D. P., & Rosa, G. T. (2009). Influence of feeding regime and finishing system on lamb muscle fiber and meat quality. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *38*(11), 2204-2210.
- Garcia, M. R., Amstalden, M., Morrison, C. D., Keisler, D. H., & Williams, G. L., (2003). Age at puberty, total fat and conjugated linoleic acid content of carcass, and circulating metabolic hormones in beef heifers fed a diet high in linoleic acid beginning at four months of age. *Journal of Animal Science*, *81*, 261–268.
- González, F. H. D., Barcellos, J., & Patiño, H. O. (2000). Perfil metabólico em ruminantes – seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: *Editores da UFRGS*. 106p.

- Hamdi, H., Majdoub-Mathlouthi, L., Picard, B., Listrat, A., Durand, D., Znaïdi, I.A., & Kraiem, K. (2016). Carcass traits, contractile muscle properties and meat quality of grazing and feedlot Barbarine lamb receiving or not olive cake. *Small Ruminant Research*, *145*, 85–93.
- Hernandez, A. M., Dryden, F. D., Marchello, J. A., & Shell, L. A. (1978). Protein protected fat for ruminants. iv. Plasma lipid, insulin and depot fat composition of lambs. *Journal of Animal Science*, *46*, 1338–1345.
- Hori, A., Ishihara, A., Kobayashi, S., & Ibata, Y. (1998). Immunohistochemical classification of skeletal muscle fibers. *Acta Histochemica et Cytochemica*, *31*, 375-384.
- Ismartoyo (2016). The effect of feeding whole cottonseed as a feed supplement for a basal diet grass hay on the red blood fragility of sheep. Seminar Nasional Peternakan 2, Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin Makassar.
- Ithurralde, J., Bianchi, G., Feed, O., Nana, F., Garibotto, G., & Bielli, A. (2015). Histochemical fiber types in 16 heavy-lamb skeletal muscles. *Small Ruminant Research*. Short Communication.
- Joo, S. T., Kim, G. D., Hwang, Y. H., & Ryu, Y. C. (2013). Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics. *Meat Science*, *95*, 828–836.
- Lestingi, A., Facciolongo, A.M., Marzo, D., Nicastrò, F., & Toteda, F. (2015). The use of faba bean and sweet lupin seeds in fattening lamb feed. 2.Effects on meat quality and fatty acid composition. *Small Ruminant Research*.
- Lima Júnior, D. M., Carvalho, F. F. R., Silva, F. J. S., RangeL, A. N., Novaes, L. P., & Difante, G. S. (2016). Intrinsic factors affecting sheep meat quality: a review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *29*, 3-15.
- Loughlin, M. (1993). Muscle biopsy. A laboratory investigation. *Butterworth-Heinenann*. 78-79.

- Macedo, R. M. G., Pai-Silva, M. D., Pai, V. D., Macedo, F. A. F., & Martins, E. N. (2000). Morphology and histochemistry of muscle fiber types of skeletal muscle tissue of lambs during growth. *Acta Scientiarum*, 22 (2), 581-585.
- Madruga, M. S., Vieira, T. R. L., Cunha, M. G. G., Pereira Filho, J. M., Queiroga, R. C. R. E., & Sousa, W. H. (2008). Effect of diets with increasing levels of whole cotton seed on chemical composition and fatty acid profile of Santa Inez (Santa Inês) lamb meat. *Brazilian Journal of Animal Science*, 37, 1496-1502.
- Monte, A. L. S., Gonsalves, H. R. O., Villarroel, A. B. S., Damaceno, M. N. and Cavalcante, A. B. D. (2012). Quality of goats and lambs meat: a review. *Agropecuária Científica no Semiárido*, 8(3): 11-17.
- Nakatani, T., Nakashima, T., Kita, T., & Ishihara, A. (2003). Cell size and oxidative enzyme activity of Type-identified fibers in rat hindlimb muscles: A Review. *Acta Histochemica et Cytochemica*, 36, 2, 105-114.
- Noble, R. C. (1981). Digestion, absorption, and transport of lipids in ruminant animals. In: Christie, W.W. (Ed.), *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*, 57–93.
- NRC-National Research Council. (2007). Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids and new world camelids. Washington, D.C.: *National Academy Press*.
- Paim, T. P., Louvandini, H., McManus, C. M., & Abdalla, A. L. (2010). Use of cotton byproducts in ruminant nutrition. *Veterinary Science in the Tropics*, 13, 24 – 37.
- Paim, T. P., Viana, P., Brandão, E., Amador, S., Barbosa, T., Cardoso, C., Dantas, A. M. M., Souza, J. R., McManus, C., Abdalla, A. L., & Louvandini, H. (2014). Carcass traits and fatty acid profile of meat from lambs fed different cottonseed by-products. *Small Ruminant Research* 116: 71-77.
- Pardi, M.C., Santos, I.F., Souza, E.R., & Pardi, H.S. (2006). Ciência, higiene e tecnologia da carne. Goiana:Ed. da UFG, v.1, 624p.

- Peinado, B., Latorre, R., Vázquez-Autón, J. M., Poto, A., Ramírez, G., López-Albors, O., Moreno, F., & Gil, F. (2004). Histochemical skeletal muscle fibre types in the sheep. *Anatomia Histologia, Embryologia*, 33, 236–243.
- Pellegrini, L. G. (2017). Quality of lambs meat in the finishing stage with cottonseed. Santa Maria, RS, Brazil: Federal University of Santa Maria. Doctoral thesis.
- Picard, B.; Lefaucheur, L.; Berri, C.; Duclos, M. J. (2002). Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reproduction Nutrition Development*, 42, 415–431.
- Picard, B. (2012) Relationship between muscle fibers, growth efficiency and beef quality. In: *8th Symposium of beef cattle production*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.
- Pilecco, V. M. (2016). Cottonseed use on finishing of feedlot lambs. Santa Maria, RS, Brazil: Federal University of Santa Maria. MA dissertation.
- Piona, M. N. M., Cabral, L. S., Zervoudakis, J. T., Abreu, J. G., Galati, R. L., Caetano, G. G. G. P., & Silva, A. R. (2012). Whole cottonseed levels in feedlot lambs diets. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 13(1), 110-122.
- Ponnampalam, E. N., Holman, B. W. B., & Scollan, N. D. (2016). Sheep: Meat. *Encyclopedia of Food and Health*, 750-757.
- Ramos, E. M., & Gomide L. A. M. (2009) Avaliação da qualidade de Carne: Fundamentos e Metodologias. 1ª ed. Viçosa: UFV, 599 p.
- Rogers, G. M., Poore, M. H., & Paschal, J. C. (2002). Feeding cotton products to cattle. *Veterinary Clinics Food Animal*, 18, 267–294.
- Ryu, Y. C., & Kim, B. C. (2005). The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolic rate, and meat quality of pig *Longissimus dorsi* muscle. *Meat Science*, 71, 351–357.

- Rufino Junior, J., Carvalho, D. M. G., Souza, J. G., Cabral, L. S., Silva, J. J., Ribeiro, M. D., Arnoldo, T.L. Q., Oliveira, A. S., & Soares, J. Q. (2015). Whole cottonseed in diets without roughage for feedlot lambs. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(4), 2727-2738.
- Santello, G. A., Macedo, F. A. F., Dias, F. J., Mexia, A. A., Macedo, R. M. G., & Lourenço, F. J. (2009) Performance and histochemical characteristics of the skeletal muscle tissue of lambs finished under different systems. *Acta Scientiarum*, 31(4), 425-431.
- Santello, G. A., Macedo, F. A. F., Lourenço, F. J., Macedo, R. M. G., Jacobs Dias, F., Alcalde, C. R. (2010). Morfologia muscular e características qualitativas da carne de cordeiros ½ Dorper-Santa Inês. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, Salvador*, 11(3), 876-887.
- SAS Institute. (2002). Statistical Analysis System: user guide. Version 9. Cary (NC): SAS Institute Inc.
- Viana, P. G., Lima, P. M. T., Paim, T. P., Souza, J. R., Dantas, A. M. M., Pereira, E. F., Gonçalves, V., McManus, C., Abdalla, A. L., & Louvandini, H. (2014). Gossypol was not detected in the longissimus muscle of lambs fed several forms of cottonseed. *Animal Production Science*, <http://dx.doi.org/10.1071/AN14035> .

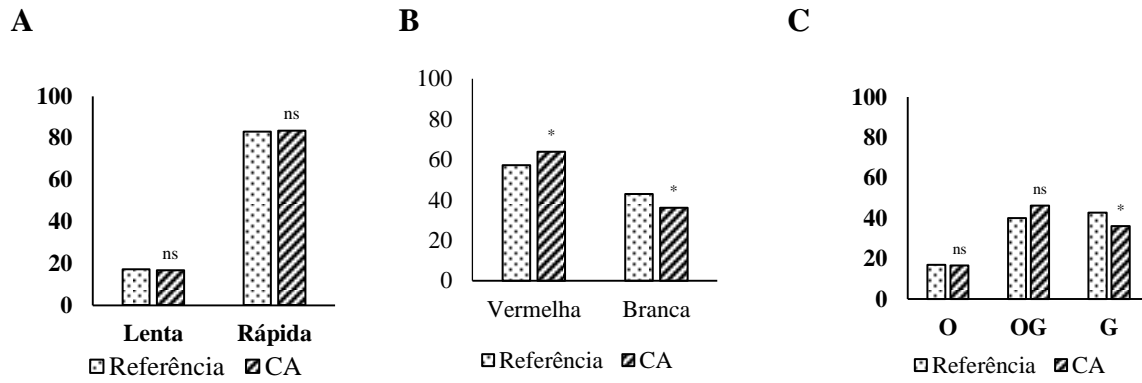


Fig. 2. Velocidade de contração (A), cor (B) e metabolismo (C) do *Longissimus thoracis* de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão, em função do tempo (referência × CA).

O= Oxidativo, OG= Oxidativo-glicolítico, G= glicolítico. Dados expressos em % de área relativa. CA seguido de * difere ($P < 0,05$) da referência pelo teste t. ns= não significativo.

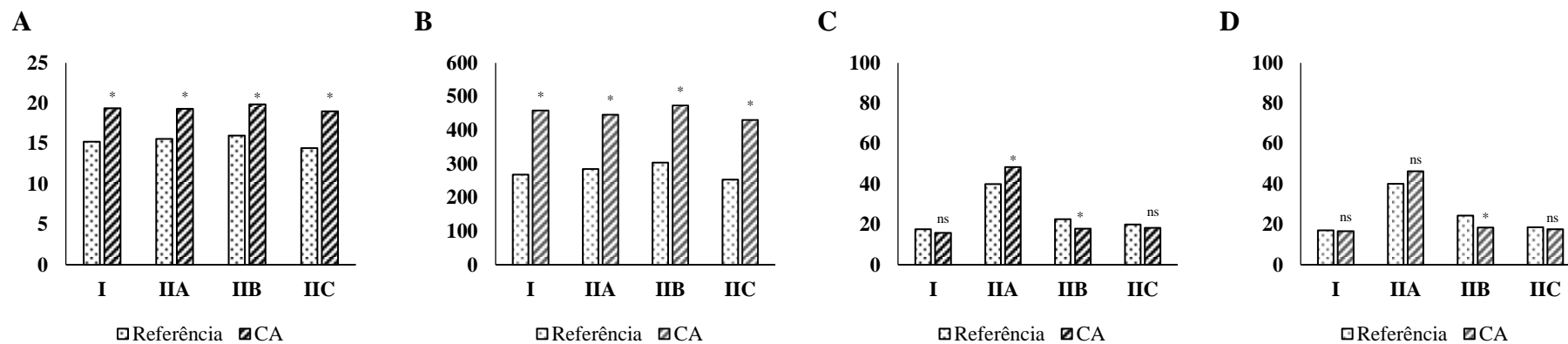


Fig. 3. Diâmetro, μm (A), área, μm^2 (B), frequência, % (C) e área relativa, % (D) das fibras musculares esqueléticas de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão, em função do tempo (referência \times CA).

CA seguido de * difere ($P < 0,05$) do referência pelo teste t. ns= não significativo.

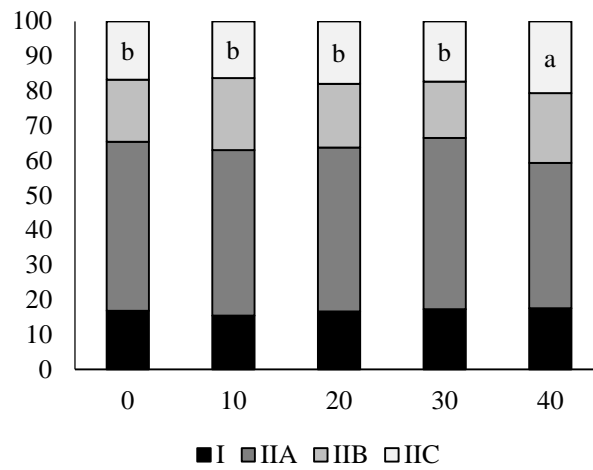


Fig. 4. Área relativa (%) das fibras musculares esqueléticas de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão, em função do nível de caroço de algodão.

Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem ($P < 0,05$) pelo teste t, de acordo com o nível de caroço de algodão. $\hat{y}_{IIC} = 15,90 + 0,08CA$; $r^2 = 0,60$.

Tabela 1. Proporção dos ingredientes das dietas experimentais, expressas em g.Kg⁻¹, em relação à matéria seca.

Ingredientes	Dietas (Níveis de caroço de algodão, %)				
	0	10	20	30	40
Silagem de milho	400	400	400	400	400
Caroço de algodão	0	100	200	300	400
Milho triturado	325,4	260,2	195,2	129,2	65,5
Farelo de soja	250	215	180	146	110
Calcário calcítico	19,6	19,2	19,2	19,2	19,5
Mistura mineral ¹	5,0	5,6	5,6	5,6	5,0

¹Composição por kg: 152g de Ca, 85g de P, 135g de Na, 10g de Mg, 18g de S, 80mg de I, 1400mg de Mn, 150mg de Mo, 25mg de Se, 60mg de Co, 4000mg de Zn, 850mg de F.

Tabela 2. Níveis séricos de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão.

Variáveis ¹	Caroço de algodão, %					Média ou Equação ²	Valor probabilístico ³			EPM ⁴	CV ⁵
	0	10	20	30	40		CA	L	Q		
Glicose	79,38	72,80	71,60	72,65	69,15	$\bar{y} = 73,44$	0,5916	0,1716	0,6306	1,97	17,17
Triglicerídeos	90,26	96,30	96,37	103,97	128,06	$\bar{y} = 100,6$	0,2401	0,0301	0,3165	5,12	30,10
Colesterol	38,26 ^c	48,95 ^{bc}	54,81 ^b	59,23 ^{ab}	71,51 ^a	(1)	0,0019	0,0001	0,9302	2,83	32,01
Proteínas totais	6,36 ^{abc}	5,19 ^c	6,09 ^{bc}	8,28 ^a	7,75 ^{ab}	(2)	0,0360	0,0171	0,3546	0,35	31,71
Albumina	3,09	3,02	3,13	3,81	2,99	$\bar{y} = 3,19$	0,0646	0,3782	0,2422	0,10	18,22
ALT	31,31	28,62	34,40	36,92	24,97	$\bar{y} = 31,37$	0,1231	0,6643	0,0725	1,44	27,14
AST	94,49	89,59	95,06	106,18	98,11	$\bar{y} = 96,00$	0,1825	0,1263	0,9688	2,15	13,23
FA	51,32 ^a	30,57 ^b	37,17 ^b	54,63 ^a	28,55 ^b	(3)	0,0006	0,1604	0,9906	2,62	37,76
GGT	27,29 ^c	46,27 ^c	65,41 ^b	90,04 ^a	83,04 ^{ab}	(4)	0,0001	0,0001	0,1275	5,17	52,72

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem (P<0,05) pelo teste t. (n=9).

¹Glicose, triglicerídeos e colesterol (mg/dL); albumina e proteínas totais (g/dL); ALT, AST, ALF, e GGT (U/L), ALT- Alanina aminotransferase, AST= Aspartato aminotransferase, FA= fosfatase alcalina, GGT= gama glutamil transpeptidase. Valores referência para cordeiros: glicose (50-80 mg/dL), triglicerídeos (indefinido), colesterol (52-76 mg/dL), proteínas totais (6,0-7,9 g/dL), albumina (2,4-3,0 g/dL), ALT (30 U/L), AST (307 U/L), FA (387 U/L), GGT (20-52 U/L) (Feldman, Zinkl, & Jain, 2000).

²Média das variáveis que não diferem (P>0,05) ou equação de regressão das variáveis que diferem (P<0,05) pelo teste t, de acordo com os níveis de caroço de algodão.

³CA= caroço de algodão; L= tendência linear; Q= tendência quadrática.

⁴EPM= Erro padrão da média.

⁵CV (%)= coeficiente de variação.

(¹) $\hat{y}_{\text{colesterol}} = 39,24 + 0,77CA$ ($r^2 = 0,97$); (²) $\hat{y}_{\text{proteínas totais}} = 5,63 + 0,05CA$ ($r^2 = 0,49$); (³) $\hat{y}_{FA} = 44,75 - 0,21CA$ ($r^2 = 0,081$); (⁴) $\hat{y}_{GGT} = 30,17 + 1,62CA$ ($r^2 = 0,92$).

Tabela 3. Correlação parcial de Spearman entre as características das fibras musculares esqueléticas do músculo *Longissimus thoracis* versus qualidade da carne de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão.

Variables ¹	Tipo I				Tipo IIA				Tipo IIB				Tipo IIC			
	d	Área	F	AR	d	Área	F	AR	d	Área	F	AR	d	Área	F	AR
a	-0,55***	-0,49***						0,47*	-0,17*	-0,12*			-0,44*	-0,41**		
b	-0,51**	-0,44*														
c	-0,55***	-0,49**						0,48*	-0,19*	-0,13*			-0,41*	-0,37**		
DMb	0,57*	0,51*														
pH 0h			-0,34*				0,30*	0,31*						-0,31*		
Aa							0,41*									-0,47*
CRA	0,37*															
WBS					-0,37*	-0,37*										
Maciez			-0,38*	-0,41*												
coe								-0,38*								
OF				0,37*												
SM			0,37*													
SD	-0,39*	-0,40*												-0,38*		
SF			0,42*	0,39*				-0,41*	-0,41*							0,37*
SG	-0,51**	-0,45												-0,40*		
Lipídeos																
AGCML							0,38*				-0,41*	-0,38*				
AGCI																-0,38*
AGS			0,42*	0,43*												
AGM											-0,37*					
AGI			-0,42*	-0,43*				0,45*	0,44*							
RMS			-0,37*					0,38*								
n3			-0,48**					0,58**	0,50**						-0,37*	
n6n3			0,43*					-0,48**	-0,40*							
IT			0,43*	0,43*				-0,48**	-0,48**							
TN			0,39*													

¹ a= intensidade de vermelho, b= intensidade de amarelo, c= croma, DMb= desoximioglobina, Aa= atividade de água, CRA= capacidade de retenção de água, WBS= Warner-Bratzler Shear, coe= coesividade, OF= *Off-flavor*, SM= sabor metálico, SD= sabor doce, SF= sabor fígado, SG= sabor gordura, AGCML= ácidos graxos de cadeia muito longa, AGCI= Ácidos graxos de cadeia ímpar, AGS= ácidos graxos saturados, AGM= ácidos graxos monoinsaturados, AGI= ácidos graxos insaturados, RMS= razão monoinsaturado:saturado, n3= ômega 3, n6 n3= razão ômega 6/ ômega 3, IT= Índice de trombogenicidade, TN= taxa nutricional.

*Significância (P<0,05); **Significância (P<0,01); ***Significância (P<0,001)

Material complementar

Tabela 4. Características das fibras musculares esqueléticas do *Longissimus thoracis* de cordeiros alimentados com níveis de caroço de algodão.

Variável	Referência	Caroço de algodão, %					Média ou Equação ¹	Valor probabilístico ²				CV ³
		0	10	20	30	40		Ref × CA	CA	L	Q	
Velocidade de contração (%)												
Lenta	17,02	16,86	15,47	15,91	17,07	17,63	$\bar{y} = 16,59$	0,8306	0,8142	0,4836	0,3866	24,77
Rápida	83,00	83,17	84,53	84,09	82,96	82,40	$\bar{y} = 83,43$	0,8325	0,8240	0,4904	0,3964	4,94
Cor (%)												
Vermelha	57,16	65,40*	62,99	63,81	67,60*	59,37	$\bar{y} = 63,44$	0,0123	0,2020	0,1439	0,3761	9,64
Branca	42,86	34,62*	37,01	36,19	32,43*	40,67	$\bar{y} = 36,58$	0,0123	0,2006	0,1421	0,3699	16,47
Metabolismo (%)												
Oxidativo	17,02	16,86	15,47	15,91	17,07	17,63	$\bar{y} = 16,59$	0,8306	0,8142	0,4836	0,3866	24,77
Oxidativo-glicolítico	40,14	48,54	47,52	44,99	48,54	41,73	$\bar{y} = 46,30$	0,0888	0,2990	0,1299	0,5650	16,92
Glicolítico	42,86	34,62*	37,01	36,19	32,43*	40,67	$\bar{y} = 36,58$	0,0123	0,2006	0,1421	0,3699	16,47
Diâmetro (µm)												
Tipo I	15,22	19,26*	18,70*	19,53*	19,80*	19,46*	$\bar{y} = 19,35$	0,0001	0,6915	0,3605	0,8737	10,66
Tipo IIA	15,58	20,16*	18,66*	19,33*	19,57*	18,78*	$\bar{y} = 19,30$	0,0003	0,5226	0,3952	0,7002	12,06
Tipo IIB	15,98	20,62*	19,39*	19,99*	20,39*	18,91*	$\bar{y} = 19,86$	0,0001	0,1132	0,3030	0,8104	11,34
Tipo IIC	14,44	19,63*	18,44*	18,90*	19,78*	18,11*	$\bar{y} = 19,00$	0,0001	0,3143	0,2362	0,7732	11,08
Área (µm²)												
Tipo I	267,7	457,0*	434,1*	467,6*	478,5*	451,7*	$\bar{y} = 457,8$	0,0001	0,8087	0,6469	0,7138	21,42
Tipo IIA	284,6	486,3*	423,4*	446,9*	450,9*	420,0*	$\bar{y} = 445,5$	0,0008	0,6044	0,3079	0,7126	24,28
Tipo IIB	303,2	516,6*	456,6*	475,6*	487,8*	430,1	$\bar{y} = 473,3$	0,0004	0,1598	0,3773	0,7429	23,38
Tipo IIC	252,7	458,1*	403,8*	431,0*	466,2*	391,8*	$\bar{y} = 431,1$	0,0001	0,4082	0,1709	0,9843	21,65
Frequência (%)												
Tipo I	17,52	16,34	15,14	14,34	16,62	16,66	$\bar{y} = 15,85$	0,3248	0,5765	0,5774	0,2207	22,25
Tipo IIA	39,92	49,12	48,22	49,30	52,41*	42,52	$\bar{y} = 48,22$	0,0148	0,1005	0,2452	0,0895	16,32
Tipo IIB	22,54	17,08*	19,41	16,84*	16,42*	19,80	$\bar{y} = 17,91$	0,0077	0,0651	0,0438	0,1111	20,99
Tipo IIC	19,98	17,51	17,24	18,18	17,10	21,00	$\bar{y} = 18,21$	0,2295	0,1432	0,5023	0,3322	17,85

Continuação

Variável	Referência	Caroço de algodão, %					Média ou Equação ¹	Valor probabilístico ²				CV ³
		0	10	20	30	40		Ref × CA	CA	L	Q	
Área relativa (%)												
Tipo I	17,02	16,86	15,47	15,91	17,07	17,63	$\bar{y} = 16,59$	0,8306	0,8142	0,4836	0,3866	24,77
Tipo IIA	40,14	48,54	47,52	44,99	48,54	41,73	$\bar{y} = 46,30$	0,0888	0,2990	0,1299	0,5650	16,92
Tipo IIB	24,36	17,84*	20,69	17,48*	15,91*	20,00	$\bar{y} = 18,44$	0,0008	0,0609	0,0194	0,1026	21,71
Tipo IIC	18,50	16,76 ^b	16,30 ^b	17,20 ^b	17,08 ^b	20,67 ^a	(1)	0,5648	0,0429	0,9048	0,3436	19,67
Proporção área de fibra (μm^2)												
IIA/I	1,05	0,90	0,99	0,98	0,95	0,95	$\bar{y} = 0,95$	0,3078	0,8642	0,7909	0,6659	19,50
IIB/I	1,12	0,97	1,05	1,03	1,03	0,97	$\bar{y} = 1,01$	0,1454	0,8995	0,7426	0,4300	15,42
IIC/I	0,95	0,94	0,93	0,95	0,97	0,93	$\bar{y} = 0,95$	0,8863	0,6608	0,8978	0,1547	9,29
Diferença área de fibra (μm^2)												
IIA-I	16,94	-56,51	-10,69	-20,71	-27,59	-31,74	$\bar{y} = -28,83$	0,2733	0,8735	0,7353	0,4013	-356,6
IIB-I	35,48	-21,25	22,54	7,92	9,27	-21,77	$\bar{y} = -0,19$	0,2994	0,6300	0,8759	0,1560	2082
IIC-I	-14,96	-16,36	-30,27	-25,50	-12,27	-28,16	$\bar{y} = -22,58$	0,6659	0,8233	0,9086	0,9303	-162,7

Médias seguidas de * na mesma linha diferem ($P < 0,05$) do referência pelo teste t. Médias seguidas por letras distintas na mesma linha diferem ($P < 0,05$) pelo teste t, de acordo com o nível de caroço de algodão.

¹Média das variáveis que não diferem ($P > 0,05$) ou equação de regressão das variáveis que diferem ($P < 0,05$) pelo teste t, de acordo com os níveis de caroço de algodão.

²Ref (referência) × CA (0, 10, 20, 30, 40% de caroço de algodão); CA= caroço de algodão; L= tendência linear; Q= tendência quadrática.

³CV (%)= coeficiente de variação.

⁽¹⁾ $\hat{y}_{IIC} = 15,90 + 0,08CA$ ($r^2 = 0,60$).

4 ARTIGO 2 – Physicochemical, technological and sensory properties of hamburger made with meat from lambs fed on whole cottonseed.

Magda Aita Monego, Djenifer Kirch Kipper, Luiz Gustavo de Pellegrini, Luiz Giovanni de Pellegrini, Silvane Souza Roman, Ernesto Hashime Kubota, Rosa Cristina Prestes, Renius de Oliveira Mello.

Artigo submetido ao periódico Journal of Food Science and Technology. Configurado conforme as normas da Revista (<http://www.springer.com/food+science/journal/13197>).

Research highlights

Meat of lambs fed with whole cottonseed was considered suitable for the production of hamburgers.

The inclusion of whole cottonseed reduced the caloric value and cholesterol content of the lamb meat product.

The structural properties of the hamburgers were unaffected by the inclusion of whole cottonseed.

The hamburgers prepared with lamb meat from animals fed on whole cottonseed had a soft texture.

Whole cottonseed in the diet negatively influenced the sensory characteristics of the hamburgers.

1 **Abstract**

2 The physicochemical composition and the technological and sensory properties of
3 hamburgers made with meat from Ile de France lambs fed on different levels (0, 10, 20, 30
4 and 40%) of whole cottonseed were studied. The addition of whole cottonseed to the lambs'
5 diets decreased ($P < 0.05$) the thiobarbituric acid reactive substances in the lamb meat and
6 altered ($P < 0.05$) the physicochemical characteristics of the hamburgers, which were
7 characterised by low lipid ($\hat{y} = 4.27$), cholesterol ($\hat{y} = 75.15$) and caloric content ($\hat{y} = 122.04$).
8 The results regarding cooking characteristics were directly related to the microscopic
9 observations regarding the hamburgers; the more cohesive structures exhibited better ($P <$
10 0.05) performance after cooking, with increased ($P < 0.05$) cooking yield and moisture
11 retention and decreased ($P < 0.05$) cooking loss. The levels of whole cottonseed did not
12 influence ($P > 0.05$) the texture profile, but they negatively affected the acceptability of the
13 hamburgers ($P < 0.05$), since as the levels of cotton seedlings increased, the scores for the
14 sensorial attributes decreased ($P < 0.05$). Thus, a maximum inclusion of 16.7% of whole
15 cottonseed in the dry matter of the diet of lambs is recommended.

16

17 **Keywords:** *Gossypium hirsutum*, lamb meat products, cooking characteristics, texture profile
18 analysis, microscopy, triangle test.

19

20 **Introduction**

21 There is a growing interest in the consumption of lamb in Brazil, especially in the
22 southern region, and this is provoking a demand for a greater supply of quality products. The
23 quality of carcass, which is highly influenced by the animals' diet, is one of the major factors
24 in relation to the the expansion and consolidation of the market for lamb meat (Lima Júnior et
25 al. 2016).

26 Animal diets involve high production costs and it is appropriate to study alternative
27 ingredients which can provide adequate nutrients at low cost. Brazil has a large level of cotton
28 production and, consequently, there is great availability of low-cost by-products from the
29 textile industry (CONAB 2016). The by-products of cotton production, like cottonseed cake,
30 cottonseed meal and whole cottonseed (WCS), have a high lipid content, which makes it
31 possible to increase the energy density of animal diets without the need to reduce fibre or
32 protein content. There is great potential to reduce the cost of animal diets, especially for
33 ruminants (Paim et al. 2010; Vieira et al. 2010; Costa et al. 2011).

34 However, one of the limitations of the use of this ingredient in animal diets is related
35 to the possible association of whole cottonseed with undesirable characteristics in the
36 qualitative aspects of the meat, in particular, the sensorial characteristics such as disagreeables
37 flavour and odour (Pellegrini 2017). This is due to the presence of gossypol, which can
38 produce a residual flavour in meats and their derivatives. A study by Viana et al. (2014)
39 showed that meat from lambs fed with high levels (39% WCS) of whole cottonseed showed
40 no detectable gossypol, demonstrating that whole cottonseed can be used in the diet of
41 ruminants without causing harmful effects to human health.

42 Other studies have evaluated the effect of whole cottonseed on the quality of lamb
43 meat (Madruga et al. 2008; Vieira et al. 2010; Paim et al. 2010), demonstrating that this
44 practice can be performed, for short periods (60 to 90 days), at levels up to 40% for finishing
45 lambs. However, no studies were found in the literature evaluating the quality of products
46 made with meat from lambs fed on whole cottonseed. Consequently, it is appropriate to
47 investigate the technological behaviour of such meat during processing.

48 A study by Viana et al. (2013) emphasised the possibility to promote lamb meat as an
49 alternative, in order to structure and add value to the process of sheep farming. One method of
50 expanding the consumption of lamb would be to develop convenience products that satisfy

51 the tastes and needs of consumers. The aim of this study was to evaluate the physicochemical
52 composition, as well as the technological and sensory properties, of hamburgers made with
53 meat from Ile de France lambs fed on different levels of whole cottonseed.

54

55 **Materials and methods**

56 **Obtaining the meat**

57 The lamb meat came from an experiment approved by the Ethics Committee on
58 Animal Use (CEUA) at the Federal Institute of Education, Science and Technology,
59 Farroupilha, Rio Grande do Sul, Brazil. The protocol number was 01.0378.2015/001.2015.
60 Twenty-five male, uncastrated, Ile de France lambs, which were weaned at 60 days, were
61 used. The lambs were distributed into five experimental treatments, with five replicates. Each
62 treatment consisted of the experimental base diet, to which was added whole cottonseed
63 (*Gossypium hirsutum* L.) in proportions of 0, 10, 20, 30 and 40% WCS. The experimental
64 base diet was composed of corn silage (*Zea mays* L.), ground corn (*Zea mays* L.) and soybean
65 meal (*Glycinemax* L.), in a voluminous ratio:concentrate (40:60) and mineral mixture. The
66 prepared diets were isoproteic in order to meet the nutritional requirements of growing lambs
67 (NRC 2007). Feeding was ad libitum and the amount consumed was monitored, at the pre-set
68 times of 7:00 a.m. and 4:00 p.m. The feeding trial of the lambs started after the adaptation
69 period (7 days, initial mean weight 19.26 Kg, 67 days old) and was extended until the time of
70 slaughter. The slaughter criterion was a final live weight of 36 kg (mean confinement time of
71 64 days, final mean weight 36.64 Kg, 127 days old) (Pellegrini 2017; Pilecco 2016). The
72 animals were slaughtered using a pneumatic gun for desensitisation, which was followed by
73 bleeding, skinning, evisceration, weighing, washing and cooling. The carcasses were cooled
74 to 2 °C for 24 hours. The shanks were subsequently collected, packed and frozen in a

75 conventional freezer at -18 °C, where they were stored for a month, until the moment of
76 production of the hamburgers.

77 **Preparation of hamburgers**

78 The hamburgers were developed according to the of Hamburger Identity and Quality
79 Technical Regulation (Brasil 2000) and Regulation No. 1004 (Brasil 1998). The base
80 formulation was composed of the following: water (3%); textured soy protein (4%) (Solae,
81 Esteio, RS, Brasil); sodium chloride (1.2%) (Diana, São Paulo, SP, Brasil); garlic paste (1%)
82 (Temperalho ind. LTDA, Iacanga, SP, Brasil); monosodium glutamate (0.3%) (Ajinomoto,
83 São Paulo, SP, Brasil); maltodextrin (0.3%) (Nutract, Chapecó, SC, Brasil); sodium
84 tripolyphosphate (0.3%) (Kerry, São Paulo, SP, Brasil); parsley (0.2%) (Kitano, São Bernardo
85 do Campo, SP, Brasil); seasoning (0.2%) (Bremil, Arroio do Meio, RS, Brasil); sodium
86 erythorbate (0.2%) (Nutract, Chapecó, SC, Brasil); sodium lactate (0.01%) (Nutract, Chapecó,
87 SC, Brasil), powdered smoke (0.04%) (ICL, São Paulo, SP, Brasil); sodium nitrite (0.01%)
88 (Nutract, Chapecó, SC, Brasil); cochineal carmine colouring (0.007%) (CHR Hansen, São
89 Paulo, SP, Brasil); and red pepper (0.038%) (Kitano General Mills, São Bernardo do Campo,
90 SP, Brasil). Five hamburger formulations were developed, each of which contained lamb meat
91 (89.195%) from the respective animals' diets (0, 10, 20, 30 and 40% WCS).

92 For the preparation of the hamburgers, the lamb shank was thawed under refrigeration
93 (4 °C) and the excess fat was removed. The meat was then ground (Jamar PJ22, Jamar Ltda,
94 São Paulo, SP, Brasil) using 5 mm hole discs and taken to a mixer (Jamar MJI 35, Jamar Ltda,
95 São Paulo, SP, Brasil) for the addition of the other ingredients. The temperature of the
96 preparation process did not exceed 2 °C.

97 After a homogeneous mixture was obtained it was packed in plastic wrappers (10 cm
98 diameter, Spel, Atibaia, SP, Brasil) and immediately frozen in a conventional freezer
99 (Metalfrio, São Paulo, SP, Brasil) at -18 °C. The following day, the product was sliced

100 (Malpa, São Paulo, SP, Brasil), with an average thickness of 1 cm and average weight of 100
101 g, the plastic wrapping was removed and the hamburgers were individually wrapped in low-
102 density polyethylene bags and kept at -18 °C, until the moment of analysis. The analyses of
103 physicochemical characterisation, cooking characteristics, texture profile and histological
104 evaluation were performed in the first seven days of storage. The sensorial analysis was
105 conducted at 15 and 60 days of storage, after obtaining the results of the microbiological
106 analysis.

107

108 **Physicochemical characterisation**

109 The lamb meat and the hamburgers were characterised raw, in triplicate, by
110 determining moisture, protein and ashes (AOAC 2005), as well as lipids (Hara and Hadin
111 1978). In the hamburger, carbohydrates were determined by difference (AOAC 2005). The
112 caloric value was calculated by the sum of the calories provided by carbohydrates, proteins
113 and lipids, multiplying their values in grams by the Atwater factors of 4 kcal, 4 kcal and 9
114 kcal, respectively. Cholesterol was determined in duplicate in the crude samples by the
115 enzymatic method (Saldanha et al. 2004). To assess the extent of lipid oxidation that occurred
116 in the hamburgers, the thiobarbituric acid (TBA) index was used, following the methodology
117 of Raharjo et al. (1992). The analyses were performed in duplicate and the results were
118 expressed as mg of malonaldehyde per kg of sample (MDA mg/kg). The evaluation of pH
119 was performed using a pH meter (pH metro, model DM-23DC São Paulo, Brasil) in
120 accordance with the IAL (2008), with readings performed in triplicate. The water activity
121 values were determined using Aqualab[®] (Decagon Devices, Inc., Pullman, Wa, USA) at 25
122 °C, in triplicate.

123

124

125 **Technological properties**

126 For the analysis of cooking characteristics, texture profile and sensory analysis, the
127 hamburgers were cooked in an electric oven (Fischer Grill 44 L, Fischer, Brusque, SC, Brasil)
128 at 180 °C until they reached an internal temperature of 72 °C. The cooking characteristics
129 were determined in quadruplicate. Cooking yield, moisture retention and fat retention (Gök et
130 al. 2011) were all determined. Cooking loss was calculated as the difference in weight
131 between the uncooked and cooked burger divided by the weight of the uncooked burger.
132 Shrinkage was calculated as the difference between the uncooked and cooked burger divided
133 by the uncooked burger, considering thickness and diameter.

134 The texture profile analysis (TPA) was performed using a TA-Xt.plus texture
135 analyser which was equipped with Texture Expert Exponent software (Stable Microsystems
136 Ltd., Surrey, England). After being cooked according to the procedure described above and
137 cooled to room temperature, the hamburger samples were cubed (1 cm³). Four hamburgers
138 from each formulation were analysed and 10 cubes were removed from each hamburger. Each
139 cube was tested under the following conditions: test velocity (5 mm/s), pre-test velocity (1
140 mm/s), return velocity (5 mm/s), return distance (20 mm), contact force (1 g), 50%
141 compression height, and interval between compressions (5 s). The TPA was evaluated based
142 on the characteristics of hardness, cohesiveness, flexibility and chewiness (Bourne 1978).

143

144 **Histological evaluation**

145 For the histological evaluation, three fragments from the centre of raw samples of each
146 hamburger formulation were extracted and processed according to the conventional
147 histological technique (Junqueira and Carneiro 2008). The samples were cut into sections with
148 a thickness of 4 µm and stained with hematoxylin and eosin; three slides of each sample were
149 prepared. The images observed under a microscope (Leica Microscopy Systems, Heerbrugg,

150 Switzerland) were obtained using Motic Images Plus 2.0 software (Motic instruments, INC,
151 Richmond, Canada). Microscopy was performed in the Histology Laboratory of the
152 Department of Pharmacy at the Integrated Regional University of Alto Uruguay and Missions
153 (URI), Erechim, RS, Brazil.

154

155 **Microbiological evaluation**

156 The microbiological analyses were performed according to Normative Instruction No.
157 62 (Brasil 2003) following the standards established by ANVISA (Brasil 2001) - (*Salmonella*
158 spp., *Clostridium* sulfite reducing, coagulase positive *Staphylococcus* and total coliforms and
159 coliforms at 45 °C) on the 1st and 45th days of storage to ensure the microbiological quality
160 of the products for sensory analysis, which was performed subsequently.

161

162 **Sensory analysis**

163 This study was previously approved by the Research Ethics Committee of the Federal
164 University of Santa Maria (UFSM) under protocol No. 936.005 and Certificate of
165 Presentation for Ethical Assessment No. 40264114.4.0000.5346. The sensorial analysis were
166 performed in the Sensory Analysis Laboratory, of the UFSM, in a standardised room, with
167 individualised booths and normal white lighting, at 25°C.

168 The sensory analysis tests were performed by untrained testers (who confirmed that
169 they liked lamb meat). They were female and male, aged from 18 to 50, and were recruited
170 from staff, students and general public at the UFSM. The number of testers for each test was
171 chosen as recommended by the Adolfo Lutz Institute (IAL 2008). A total of 187 different
172 testers participated in the sensory analysis, of which 107 participated in the acceptance test
173 (day 15 = 55 testers; day 60 = 52 testers); 55% of these testers were female and 45% were

174 male. Eighty testers participated in the triangular test, (day 15 = 40; day 60 = 40), of which
175 60% were female and 45% were male.

176 After confirming the microbiological safety of the products, sensorial analysis was
177 performed on days 15 and 60 of storage at -18 °C: testing on day 15 was to verify the
178 acceptance of the hamburgers and testing on day 60 was to verify the effects of storage. The
179 samples were prepared according to the cooking procedure previously described. After
180 cooking, the burgers were cut into uniform pieces (1 cm³ cubes), wrapped individually in
181 aluminium foil and kept at 60 °C until ready to serve.

182 The hedonic test was applied through an acceptance test that evaluated odour, colour,
183 flavour, texture and appearance, using an hedonic seven-point scale (1 = dislike intensely, 7 =
184 like intensely) and purchase intent by using a five-point scale (1 = would definitely not
185 purchase, 5 = would definitely purchase). The samples were offered to the testers in a
186 monodic and random manner, together with the sensory score sheet (IAL 2008); each taster
187 evaluated the five hamburger formulations. From the scores assigned in the acceptance test,
188 the acceptability index (AI) of the product was calculated according to the following equation:
189 $AI (\%) = A \times 100/B$, where A = average score obtained for the product and B = maximum
190 score given to the product (Dutcosky 2011).

191 The triangular test was applied to detect if the whole cottonseed used in the animals'
192 diets provided a flavour in the developed products and at what level the tester perceived this
193 flavour when compared to the control (0% WCS); each tester tasted the treatments: 0% WCS
194 versus 10% WCS; 0% WCS versus 20% WCS; 0% WCS versus 30% WCS and 0% WCS
195 versus 40% WCS. The interpretation of the results was based on the relationship between the
196 total number of judgements versus the number of correct judgements compared to the result
197 of the chi-square table (IAL 2008). The results of the number of correct judgements that were
198 equal to or greater than the table value made it possible to conclude that there was a

199 significant difference between the samples at the corresponding probability level. Three coded
 200 samples were presented simultaneously, two identical and one different, together with the
 201 sensory score sheet of the triangular test; the tester was asked to identify the sample that
 202 seemed different to them.

203 During each evaluation, was provided along with samples water for mouth rinsing and
 204 cracker as palate moderator.

205

206 **Experimental design and statistical analysis**

207 Five replicates for each lamb meat experiment and four replicates for each hamburger
 208 experiment were performed. For each sample, the analyses were carried out in duplicate
 209 (cholesterol and TBARS determination); triplicate (physicochemical, pH, water activity,
 210 histological evaluation); quadruplicate (cooking characteristics) and in ten replicates (texture
 211 profile analysis).

212 For the physicochemical analyses of the raw lamb meat and hamburgers, the statistical
 213 analyses were carried out in a completely randomised, experimental design with five
 214 treatments (0, 10, 20, 30 and 40% WCS in the diet) and a different number of repetitions (five
 215 for the lamb meat and four for the hamburgers) according to the following statistical model:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

216 Where, Y_{ij} = the value observed at the i -th level of whole cottonseed and the j -th repetition; μ
 217 = the average mean of the response variable; α_i = the fixed effect of the i th level of whole
 218 cottonseed; ε_{ij} = the random effect associated with the Y_{ij} observation, assuming
 219 $\varepsilon_{ij} \sim^{iid} N(0, \sigma^2)$.

220 The sensory analysis data were analysed using a randomised block design for each
 221 storage time (15 and 60 days).

222 The data were subjected to outlier investigation from the studentised residuals. They

223 were subsequently submitted to univariate analysis of variance (ANOVA) by the GLM
224 procedure: their averages were adjusted by the ordinary least squares method using the
225 LSMEANS command and compared by the least significant difference (t-test).

226 The linear and quadratic trends were tested by means of the contrasts from the
227 coefficients for interpolation of the orthogonal polynomials. In addition, the polynomial and
228 multiple regression were adjusted using the RSREG procedure, and the r^2 values were
229 expressed in relation to the source treatments (regression + lack of fit). Furthermore, Pearson
230 and Spearman correlation analyses were performed between the studied variables.

231 The statistical analyses were performed using SAS[®] System for Windows[™] software,
232 version 9.4 (SAS Institute 2002).

233

234 **Results and discussion**

235 **Physicochemical characterisation of lamb meat**

236 The addition of whole cottonseed to the lambs' diets altered ($P < 0.05$) the ash content
237 and the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in the meat (Table 1). The ash
238 content reduced ($P < 0.05$) with the addition of whole cottonseed, although there were no
239 scientific findings that justified this behaviour. In contrast, data from the literature emphasise
240 an increase in ash content in line with increased whole cottonseed in the diet (Paim et al.
241 2014; Pellegrini 2017).

242 The TBARS had quadratic behavior ($P < 0.05$) with minimum point at 31% WCS. The
243 decrease of TBARS up to 31% WCS can be explained by reduction of the lipid oxidation
244 (Wang et al. 2008) induced by the possible deposition of whole cottonseed constituents in the
245 lamb meat (Kim et al. 1996) such as phenolic compounds, tocopherol (Oliveira et al. 2016)
246 and gossypol (Wang et al. 2008; Wang et al. 2009). However, the increase in TBARS values
247 from 31% WCS can be explained by the increase in the level of whole cottonseed in the diet

248 of the lambs; there was an increase in the deposition of unsaturated fatty acids (Pellegrini
249 2017), which are more susceptible to lipid oxidation. Brazilian legislation does not establish a
250 maximum limit of malonaldehyde/kg in meat products; however, data from the literature
251 indicate that values up to 2.00 mg of MDA/kg of sample are not perceived by consumers
252 (Wood et al. 2004).

253 Madruga et al. (2008) evaluated the effect of including whole cottonseed (0, 20, 30
254 and 40%) in the diet of Santa Inês lambs on the chemical composition of the meat. They
255 found similar results to those obtained in the present study and found no significant difference
256 ($P > 0.05$) for all the analysed variables (moisture, ash, proteins, lipids and cholesterol),
257 which was attributed to the short confinement period (70 days). Thus, the results of the
258 physicochemical analyses in the present study demonstrated that the meat of lambs fed with
259 different levels of whole cottonseed presented satisfactory characteristics and was considered
260 suitable for the production of hamburgers.

261

262 **Chemical composition of the hamburgers**

263 The moisture levels in the hamburgers increased ($P < 0.05$) in line with increased
264 levels of whole cottonseed (Table 2), which was reflected in lower protein content ($r = -0.89$,
265 $P < 0.001$), ash content ($r = -0.95$, $P < 0.001$) and caloric value ($r = -0.88$, $P < 0.0001$). The
266 lipids (minimum point = 18.8% WCS) and carbohydrates (maximum point = 20.1% WCS)
267 demonstrated quadratic behaviour. It is believed that these results may have been associated
268 with the heterogeneity of the products because only the ash content was reduced in the meat
269 (Table 1).

270 All the formulations of the hamburgers made with lamb from animals fed with whole
271 cottonseed were low in fat ($\hat{y} = 4.27$) and low in caloric value ($\hat{y} = 122.04$) when compared to
272 other commercial meat products. It should be noted that the hamburgers prepared in this study

273 did not contain added fat. Furthermore, the cut of meat that was used (lamb shank) contained
 274 low levels of fat (3.76g /100g, Table 1). Similar results were found by Santos Júnior et al.
 275 (2009) when they evaluated oatmeal-enriched lamb meat hamburger, in which the lipid values
 276 were 4.3 - 8.4 g/100g and the caloric values were 122.55 - 153.68 Kcal/100g. Likewise,
 277 Linares et al. (2012) studied the effect of the type of meat (shank compared with shank + neck
 278 + breast) on the nutritional composition of hamburgers made with meat from Spanish
 279 Manchego lamb and found that the hamburgers only made with shank had lower fat content
 280 and lower caloric value than those made with shank + neck + breast (5.16 g/100g and 201
 281 Kcal/100g; 10.71g/100g and 246.51 Kcal/100g, respectively).

282 In the present study, the cholesterol levels decreased ($\hat{y}_{cholesterol} = 83.99 -$
 283 $0.44WCS, r^2 = 0.90$) in line with the addition of whole cottonseed and can be considered
 284 low (<90 mg/100 g). The cholesterol values were in accordance with those reported by
 285 Madruga et al. (2008) in lamb meat fed with levels of whole cottonseed (80 mg/100g).

286

287 **Technological properties**

288 The yield and levels of moisture retention in the hamburgers increased ($P < 0.05$)
 289 according to the level of whole cottonseed in the animals' diet (Table 3), which was due to the
 290 reduction in cooking loss. No significant difference was observed regarding fat retention and
 291 shrinkage.

292 Cooking loss, which is associated with moisture and fat retention, is important for
 293 evaluating the juiciness and mouthfeel of cooked products. The hamburgers made with meat
 294 from lamb fed with whole cottonseed levels showed lower values for cooking loss
 295 ($\bar{y} = 12.9\%$), as well as high moisture ($\bar{y} = 55.7\%$) and fat ($\bar{y} = 108.5\%$) retention rates. These
 296 results can be explained by the ability of the protein matrix to retain lipids, especially in
 297 formulations with low lipid content [$r(\text{lipids} \times \text{fat retention}) = -0.93, P < 0.001$], which

298 optimises the cooking characteristics of products and guarantees greater succulence for
299 cooked hamburgers. Furthermore, the addition of sodium tripolyphosphate to the formulation
300 may have aided the fixation of water in the product, reducing the cooking loss.

301 The texture profile results of the hamburgers were not affected ($P > 0.05$) by the levels
302 of whole cottonseed in the lambs' diet (Table 3) and were in agreement with those found in
303 the literature for cooked beefburgers (hardness = 50.8 N; cohesiveness = 0.82; flexibility =
304 0.71; chewiness = 30.06) (Gutt et al. 2014). Of all the TPA characteristics, hardness is the
305 most important because it best represents the texture characteristic of a product. The
306 hamburgers prepared with lamb meat from animals fed on different levels of whole
307 cottonseed had a soft texture.

308

309 **Histological evaluation**

310 Microscopy was used to evaluate the relationship between the cooking and textural
311 characteristics of the hamburgers and their microscopic structures. Using photomicrographs it
312 was possible to evaluate the disposition of the muscle fibres, the compact connective tissue,
313 adipose tissue, extracellular matrix and air bubbles in the products. The presence of adipose
314 cells was most noticeable in the hamburger made with meat from lambs fed with 0% WCS
315 (Fig. 1 A-B), which was related to the fat content found in this formulation (Table 2). The
316 lamb meat hamburger formulations (Fig. 1 C-D-E-F-G-H-I-J) were more homogeneous in
317 relation to the distribution of muscle cells, connective tissue and adipose tissue, exhibiting
318 better structural conditions. These characteristics promote adequate tissue bonding, which
319 provides better technological properties because a more compact and cohesive structure
320 makes it possible to retain more moisture during cooking (Abdel-Naeem and Mohamad
321 2016). The results for moisture retention and texture profile analysis (Table 3) corroborated

322 with the aforementioned structural conditions in the hamburgers prepared with meat from
323 animals fed with 10, 20, 30 and 40% WCS.

324 Comparing the results for chemical composition, texture and cooking characteristics
325 with the microscopy results, it was concluded that there was a relationship between the
326 properties and their respective microscopic structures. Although the values for protein (Table
327 2), total loss (Table 3) and moisture retention (Table 3) of the hamburgers presented a
328 significant difference ($P < 0.05$), the attributes evaluated in the TPA of the product were not
329 affected ($P > 0.05$) and were closely related to the microscopic characteristics observed in the
330 histological evaluation (Fig. 1).

331

332 **Microbiological evaluation**

333 The hamburgers that were analysed on days 1 and 45 were within the norms of quality
334 control set out in Brazilian legislation (Brasil 2001), which establishes the absence of
335 *Salmonella* in 25 g of sample and a maximum limit of of 3.48 log CFU/g for *Clostridium*
336 sulfite reducer, 3.7 log CFU/g for coagulase positive *Staphylococcus*, and 3.7 log CFU/ g for
337 coliforms at 45°C (results not shown). All the formulations were considered safe and suitable
338 for human consumption.

339

340 **Sensory analysis**

341 At 15 days of storage (Table 4), a difference ($P < 0.05$) was observed only for the
342 attribute of odour. Considering a minimum score of 5 (like moderately) for acceptable odour,
343 the regression equation revealed a maximum limit of the addition of 16.7% WCS ($\hat{y}_{odour} =$
344 $5.24 - 0.01WCS, r^2 = 0.94$).

345 At 60 days of storage there was no difference ($P > 0.05$) between the hamburger
346 formulations regarding odour; however, even without the inclusion of whole cottonseed in the

347 animals' diet (0% WCS) odour received an 'indifferent' score (4.5). The scores for all the
 348 other attributes (colour, taste, texture, overall impression and purchase intention) decreased (P
 349 < 0.05) with increased levels of whole cottonseed in the diet, i.e. they worsened. According to
 350 the regression equation, these attributes would be acceptable (5 = like moderately) up to the
 351 maximum addition limits of 22.3, 29.0, 2.9 and 16.7% WCS for colour, flavour, texture and
 352 appearance, respectively. The purchase intention was rated as 'indifferent' for all the
 353 hamburger formulations.

354 All the values found for the acceptance test on both days (15 and 60) of the sensory
 355 analysis of hamburgers made with lamb meat from animals fed with different levels of whole
 356 cottonseed were higher than those reported by Villalobos-Delgado et al. (2015), who
 357 evaluated lamb hamburgers with added hops, which resulted in judgements of 'dislike slightly'
 358 or 'indifferent'.

359 Odour and flavour are considered to be the most important attributes in terms of the
 360 sensory evaluation of lamb meat and its derivatives (Linares et al. 2012). Therefore, it was
 361 interesting to evaluate if the use of whole cottonseed in the diet of the lambs would affect the
 362 sensory quality of the hamburgers prepared from this meat. Thus, the acceptability index (AI)
 363 was calculated only for odour and flavour because the other attributes had a lesser influence
 364 on the acceptability of the product in question. Considering that an acceptability level equal to
 365 or greater than 70% is considered acceptable (Dutcosky 2011), at 15 days of storage it was
 366 found that the minimum acceptance limit was reached with a maximum inclusion of 29.3%
 367 WCS for odour ($\hat{y}_{odour} = 75.79 - 0.20WCS, r^2 = 0.94$) and 27.8% WCS for flavour
 368 ($\hat{y}_{flavour} = 73.61 - 0.13WCS, r^2 = 0.62$). However, at 60 days of storage all the
 369 formulations were rejected for acceptance in terms of odour ($\bar{y}_{odour} = 66.1$), while a
 370 minimum favourable acceptability was obtained with a maximum inclusion of up to 37.6%
 371 WCS in terms of flavour ($\hat{y}_{flavour} = 80.55 - 0.28WCS, r^2 = 0.53$). This demonstrates that

372 the storage time may have influenced the testers in their perception of odour but it did not
373 affect their perception of flavour.

374 In addition to the affective tests, a discriminatory test was carried out which compared
375 each hamburger formulation prepared with lamb meat from animals fed with whole
376 cottonseed (10, 20, 30 and 40% WCS) and the formulation prepared with lamb from animals
377 with no whole cottonseed in their diet (0% WCS). At 15 days of storage it was found that the
378 testers were able to detect the hamburgers that had been prepared with meat from animals fed
379 on whole cottonseed (Table 5). However, at 60 days of storage, the testers were only able to
380 detect hamburgers made meat from animals fed on whole cottonseed with more than 20%
381 WCS in their diet. Perhaps the natural oxidation of the product during storage may have
382 influenced the sensory perception of the testers.

383

384 **Conclusion**

385 The use of lamb meat from animals fed with whole cottonseed in their diet to prepare
386 hamburgers positively influenced the chemical composition, cooking characteristics
387 (decreased cooking loss, and increased cooking yield and moisture retention) and structural
388 properties (increased homogeneity and cohesion), as well as negatively influencing the
389 sensory characteristics of the product, reducing its acceptability with increasing levels of
390 whole cottonseed.

391 In order to guarantee the sensory acceptability of such a product (based on this
392 appearance) it is recommended that a maximum level of 16.7% of whole cottonseed is
393 included in the dry matter diet of lambs.

394

395 **References**

396 Abdel-Naeem HHS, Mohamed HMH (2016). Improving the physico-chemical and sensory
397 characteristics of camel meat burger patties using ginger extract and papain. *Meat Sci* 118:52–
398 60

- 399 AOAC (2005) Official methods of analysis of the AOAC, 18th ed. Association of Official
400 Analytical Chemists, Gaithersburgh
401
- 402 Bourne MC (1978) Texture profile analysis. *Food Technol* 32:62–72
403
- 404 Brasil (1998) Portaria nº 1004. Aditivos e seus limites máximos de uso para carne e produtos
405 cárneos. Brasília:Diário Oficial da União
406
- 407 Brasil (2000) Instrução Normativa nº 20/2000. Regulamento Técnico de Identidade e
408 Qualidade do Hambúrguer. Brasília:Diário Oficial da União
409
- 410 Brasil (2001) Resolução nº 12. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos.
411 Brasília:Diário Oficial da União
412
- 413 Brasil (2003) Instrução Normativa nº 62. Métodos Analíticos Oficiais para Análises
414 Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Brasília:Diário Oficial
415 da União
416
- 417 CONAB Companhia Nacional de Abastecimento (2016) Acompanhamento da safra brasileira
418 agrícola, v. 3 - Safra 2015/16, n. 10 - Décimo levantamento julho 2016
419
- 420 Costa QPB, Wechsler FS, Costa DPB, Polizel Neto A, Roça RO, Brito TP (2011)
421 Performance and carcass traits of steers fed diets containing whole cottonseed. *Arq Bras Med*
422 *Vet Zootec* 63:729-735
423
- 424 Dutcosky SD (2011) *Análise Sensorial de Alimentos*. 3th ed. Curitiba: Champagnat
425
- 426 Gök V, Akkaya L, Obuz E, Bulut S (2011) Effect of ground poppy seed as a fat replacer on
427 meat burgers. *Meat Sci* 89:400–404
428
- 429 Gutt G, Paduret S, Amariei S, Chelaru M (2014) Chopped meat freshness assessment by
430 texture profile analysis. *Lucrări Științifice - Seria Zootehnie* 61:87-91
431
- 432 Hara A, Radin NS (1978) Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal*
433 *Biochem* 90:420-426
434
- 435 IAL Instituto Adolfo Lutz (2008) *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São
436 Paulo: IAL
437
- 438 Junqueira LC, Carneiro J (2008) *Histologia Básica*. São Paulo:Guanabara Koogan ed.11, 524
439
- 440 Kim HL, Calhoun MC, Stipanovic RD (1996) Accumulation of gossypol enantiomers in
441 ovine tissues. *Comp Biochem Physiol* 113(2):417-420
442
- 443 Lima Júnior DM, Carvalho FFR, Silva FJS, Rangel AHN, Novaes LP, Difante GS (2016)
444 Intrinsic factors affecting sheep meat quality: a review. *Rev Colomb Cienc Pec* 29:3-15
445
- 446 Linares MB, Cózar A, Garrido MD, Vergara H (2012) Chemical and sensory quality of lamb
447 meat burgers from Manchego Spanish breed. *Inte J Food Sci Nutr* 63(7):843–852
448

- 449 Madruga MS, Vieira TRL, Cunha MGG, Pereira Filho JM, Queiroga RCRE, Sousa WH
450 (2008) Effect of diets with increasing levels of whole cotton seed on chemical composition
451 and fatty acid profile of Santa Inez (Santa Inês) lamb meat. *Braz J Anim Sci* 37:1496-1502
452
- 453 NRC National Research Council (2007) Nutrient requirements of small ruminants: Sheep,
454 goats, cervids and new world camelids. Washington, D.C.: National Academy Press
455
- 456 Oliveira AS, Carvalho, MLM, Bárbara, CNV, Guimarães RM, Oliveira JA, Pereira DS (2016)
457 Biochemical changes in fiber naturally colored cottonseeds during storage. *J Seed Sci*
458 38(2):101-109
459
- 460 Paim TP, Louvandini H, McManus CM, Abdalla AL (2010) Use of cotton byproducts in
461 ruminant nutrition. *Vet Sci Trop* 13:24 – 37
462
- 463 Paim TP, Viana P, Brandão E, Amador S, Barbosa T, Cardoso C, Dantas AMM, Souza JR,
464 McManus C, Abdalla AL, Louvandini H (2014) Carcass traits and fatty acid profile of meat
465 from lambs fed different cottonseed by-products. *Small Rumin Res* 116:71-77
466
- 467 Pellegrini LG (2017) Quality of lambs meat in the finishing stage with cottonseed. Santa
468 Maria, RS, Brazil: Federal University of Santa Maria. Doctoral thesis
469
- 470 Pilecco VM (2016) Cottonseed use on finishing of feedlot lambs. Santa Maria, RS, Brazil:
471 Federal University of Santa Maria. MA dissertation
472
- 473 Raharjo S, Sofos JN, Schmidt GR (1992) Improved speed, specificity, and limit of
474 determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid–C18 method for measuring
475 lipid peroxidation in beef. *J Agric Food Chem* 40(11):2182– 2185
476
- 477 Saldanha T, Mazalli MR, Bragagnolo N (2004) Comparative evaluation of two methods for the
478 determination of cholesterol in meat and milk. *Food Sci Technol* 24(1):109-113
479
- 480 Santos Júnior LCO, Rizzatti R, Brungera A, Schiavini TJ, Campos EFM, Neto JFS,
481 Rodriguez LB, Dickel EL, Santos LR (2009) Development of hamburger using adult sheep
482 meat and oat flour. *Braz Anim Sci* 10(4):1128-1134
483
- 484 SAS Institute (2002) Statistical Analysis System: user guide. Version 9. Cary (NC):SAS
485 Institute Inc.
486
- 487 Viana JGA, Revillion JPP, Silveira VCP (2013) Alternative of Structuring of the Chain of
488 Sheep Production Value in Rio Grande do Sul. *J Management Regional Development* 9:187-
489 210
490
- 491 Viana PG, Lima PMT, Paim TP, Souza JR, Dantas AMM, Pereira, EF, Gonçalves V,
492 McManus C, Abdalla AL and Louvandini H. (2014) Gossypol was not detected in the
493 longissimus muscle of lambs fed several forms of cottonseed. *Animal Production Science*
494 55(6):812-817
495
- 496 Vieira TRL, Cunha MGG, Garrutti DS, Duarte TF, Félex SSS, Pereira Filho JM, Madruga
497 MS (2010) Physical and sensorial properties of Santa Ines lamb meat terminated in diets with
498 increasing levels of whole cotton seed (*Gossypium hirsutum*). *Food Sci Technol* 30:372-377

- 499 Villalobos-Delgado LH, Carob I, Blanco C, Bodas R, Andrés S, Giráldez FJ, Mateo J (2015)
500 Effect of the addition of hop (infusion or powder) on the oxidative stability of lean lamb
501 patties during storage. *Small Rumin Res* 125:73–80
502
- 503 Wang X, Thomas HB, James CM, Feng C, Gangemi JD (2008) Bioactivities of Gossypol, 6-
504 Methoxygossypol, and 6,6'-Dimethoxygossypol. *J Agric Food Chem* 56:4393-4398
505
- 506 Wang X, Howell CP, Chen F, Yin J, Jiang Y (2009) Gossypol – a polyphenolic compound
507 from cotton plant. *Adv Food Nutri Res* 58:215-251
508
- 509 Wood JD, Richardson RI, Nute GR, Fisher AV, Campo MM, Kasapidou E, Enser M (2004)
510 Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Sci* 66(1):21–32
511

512 **Table 1** Physicochemical characterisation of meat from lambs fed on different levels of whole cottonseed

Variable	Whole cottonseed (%)					Mean or Equation	Probability value ¹			SEM ²	CV ³
	0	10	20	30	40		WCS	L	Q		
Moisture (%)	75.3	74.4	74.6	75.2	73.6	$\bar{y} = 74.51$	0.3863	0.2912	0.7092	0.29	1.82
Ashes (%)	1.38 ^a	1.14 ^{ab}	1.03 ^b	1.08 ^b	1.00 ^b	(1)	0.0448	0.0043	0.0992	0.04	15.2
Protein (%)	20.5	20.4	20.5	20.1	21.6	$\bar{y} = 20.5$	0.0928	0.1429	0.0735	0.17	3.80
Lipids (%)	2.79	4.13	3.90	3.60	3.78	$\bar{y} = 3.76$	0.4330	0.3452	0.1716	0.18	22.3
Cholesterol (mg/100g)	98.9	88.2	79.7	81.6	85.9	$\bar{y} = 85.2$	0.0921	0.0406	0.0242	1.96	10.8
TBARS* (mg MDA/Kg)	1.23 ^a	0.73 ^b	0.60 ^{bc}	0.46 ^c	0.52 ^{bc}	(2)	0.0006	0.0001	0.0052	0.06	41.9
pH	5.68	5.78	5.80	5.77	5.83	$\bar{y} = 5.78$	0.1611	0.0292	0.3762	0.02	1.31
Water activity	0.9934	0.9918	0.9918	0.9910	0.9910	$\bar{y} = 0.9916$	0.1001	0.0091	0.2625	0.0002	0.12

513 Means in the same row, followed by different letters, differ ($P < 0.05$) by t-test.

514 *TBARS= thiobarbituric acid reactive substances.

515 ¹WCS= whole cottonseed levels; L= linear tendency; Q= quadratic tendency.516 ²SEM= Standard error mean.517 ³CV (%)= coefficient of variation.518 ⁽¹⁾ $\hat{y}_{ashes} = 1.24 - 0.01WCS$ ($r^2 = 0.64$); ⁽²⁾ $\hat{y}_{TBARS} = 1.18 - 0.05WCS + 0.007WCS^2$ ($r^2 = 0.96$).

519

520

521 **Table 2** Proximate composition of hamburgers made with meat from lambs fed on different levels of whole cottonseed

Variables	Whole cottonseed (%)					Equation	Probability value ¹			SEM ²	CV ³
	0	10	20	30	40		WCS	L	Q		
Moisture (%)	68.63 ^b	68.88 ^b	74.55 ^a	68.33 ^b	75.80 ^a	(1)	0.0001	0.0001	0.3051	0.78	4.81
Ashes (%)	3.59 ^a	3.47 ^a	2.86 ^b	3.65 ^a	2.89 ^b	(2)	0.0004	0.0068	0.8316	0.09	12.64
Protein (%)	19.68 ^a	19.53 ^a	16.70 ^b	18.58 ^{ab}	14.43 ^c	(3)	0.0003	0.0001	0.2008	0.51	12.35
Lipids (%)	5.06 ^a	3.73 ^a	3.18 ^b	3.20 ^b	6.18 ^a	(4)	0.0015	0.2577	0.0001	0.32	33.14
Carbohydrates (%)	3.07 ^{bc}	4.42 ^{ab}	2.71 ^{bc}	6.25 ^a	2.19 ^c	(5)	0.0030	0.9757	0.0341	0.42	50.40
Caloric value (Kcal/100g)	136.50 ^a	129.32 ^a	106.27 ^b	128.08 ^a	110.01 ^b	(6)	0.0002	0.0007	0.1335	3.14	11.17
Cholesterol (mg/100g)	85.02 ^a	80.84 ^a	71.69 ^b	69.71 ^b	68.48 ^b	(7)	0.0030	0.0002	0.2342	1.92	11.10

522 Means in the same row, followed by different letters, differ ($P < 0.05$) by t-test.523 ¹WCS= whole cottonseed levels; L= linear tendency; Q= quadratic tendency.524 ²SEM= Standard error mean.525 ³CV (%)= coefficient of variation.

526 ⁽¹⁾ $\hat{y}_{moisture} = 68.58 + 0.13WCS (r^2 = 0.28)$; ⁽²⁾ $\hat{y}_{ashes} = 3.53 - 0.01WCS (r^2 = 0.25)$; ⁽³⁾ $\hat{y}_{protein} = 20.01 - 0.11WCS (r^2 = 0.63)$; ⁽⁴⁾ $\hat{y}_{lipids} = 5.23 - 0.24WCS +$
527 $0.01WCS^2 (r^2 = 0.91)$; ⁽⁵⁾ $\hat{y}_{carbohydrates} = 2.92 + 0.16WCS - 0.004WCS^2 (r^2 = 0.21)$; ⁽⁶⁾ $\hat{y}_{caloric\ value} = 133.81 - 0.54WCS (r^2 = 0.39)$; ⁽⁷⁾ $\hat{y}_{cholesterol} = 83.99 -$
528 $0.44WCS (r^2 = 0.90)$.

529

530

531 **Table 3** Cooking characteristics and texture profile analyses of hamburgers made with meat from lambs fed on different levels of whole
 532 cottonseed

Variables	Whole cottonseed (%)					Mean or Equation	Probability value ¹			SEM ²	CV ³
	0	10	20	30	40		WCS	L	Q		
Cooking yield (%)	85.28 ^{bc}	83.85 ^c	88.33 ^{ab}	89.80 ^a	88.40 ^{ab}	(1)	0.0089	0.0031	0.4840	0.67	3.43
Cooking loss (%)	14.74 ^{ab}	16.13 ^a	11.68 ^b	10.20 ^b	11.60 ^b	(2)	0.0096	0.0033	0.4816	0.67	23.3
Moisture retention (%)	53.05 ^b	54.93 ^{ab}	55.93 ^a	57.38 ^a	57.25 ^a	(3)	0.0109	0.0008	0.2653	0.49	3.95
Fat retention (%)	75.10	104.05	131.38	145.10	86.83	$\bar{y} = 108.5$	0.0518	0.2475	0.0096	9.05	37.3
Shrinkage (%)	1.34	5.80	3.60	4.34	4.12	$\bar{y} = 3.84$	0.1524	0.2808	0.1585	0.57	66.1
Hardness (N)	51.33	60.05	55.65	60.98	53.40	$\bar{y} = 56.3$	0.2314	0.6357	0.0853	1.57	12.5
Cohesiveness	0.68	0.68	0.70	0.70	0.70	$\bar{y} = 0.69$	0.3719	0.0856	0.6539	0.00	2.15
Springiness	0.98	0.96	1.03	0.97	0.93	$\bar{y} = 0.97$	0.0557	0.2005	0.0494	0.01	5.21
Chewiness	34.05	39.20	39.80	41.03	34.45	$\bar{y} = 37.7$	0.1710	0.7308	0.0211	1.15	13.6

533 Means in the same row, followed by different letters, differ ($P < 0.05$) by t-test.

534 ¹WCS= whole cottonseed levels; L= linear tendency; Q= quadratic tendency.

535 ²SEM= Standard error mean.

536 ³CV (%)= coefficient of variation.

537 ⁽¹⁾ $\hat{y}_{\text{cooking yield}} = 84.69 + 0.12WCS (r^2 = 0.61)$; ⁽²⁾ $\hat{y}_{\text{cooking loss}} = 15.31 - 0.12WCS (r^2 = 0.61)$; ⁽³⁾ $\hat{y}_{\text{moisture retention}} = 53.54 + 0.11WCS (r^2 = 0.91)$.

538

539

540

541 **Table 4** Mean scores of the sensory analysis of hamburgers made with meat from lambs fed on different levels of whole cottonseed, after 15 and
 542 60 days of storage at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$

Attributes ¹	Whole cottonseed (%)					Mean or Equation	Probability value ²			SEM ³	CV ⁴
	0	10	20	30	40		WCS	L	Q		
Day 15											
Odour	5.2 ^a	5.1 ^a	5.0 ^{ab}	4.8 ^{bc}	4.6 ^c	(1)	0.0044	0.0002	0.4928	0.02	12.73
Colour	4.6	4.8	4.6	4.7	4.6	$\bar{y} = 4.7$	0.7838	0.6924	0.5338	0.02	13.37
Flavour	5.0	4.9	4.9	4.9	4.6	$\bar{y} = 4.9$	0.0956	0.0269	0.2661	0.02	15.22
Texture	4.8	4.9	4.5	4.9	4.8	$\bar{y} = 4.8$	0.1132	0.6666	0.4380	0.02	13.77
Appearance	4.8	4.8	4.7	4.7	4.9	$\bar{y} = 4.8$	0.8280	0.8234	0.5131	0.02	12.38
Purchase intent	3.4	3.5	3.4	3.2	3.2	$\bar{y} = 3.4$	0.1481	0.0338	0.2466	0.02	18.49
Day 60											
Odour	4.4	4.6	4.6	4.4	4.5	$\bar{y} = 4.5$	0.3753	0.7034	0.2730	0.02	15.60
Colour	5.5 ^a	5.3 ^a	5.2 ^a	4.4 ^c	4.8 ^b	(2)	0.0001	0.0001	0.2418	0.02	14.14
Flavour	5.7 ^a	5.3 ^{ab}	5.5 ^a	4.5 ^c	5.0 ^b	(3)	0.0001	0.0001	0.2226	0.02	13.12
Texture	4.8 ^{ab}	5.1 ^a	5.1 ^a	4.7 ^b	4.7 ^b	(4)	0.0067	0.0528	0.0195	0.02	14.58
Appearance	5.1 ^{ab}	5.1 ^{ab}	5.4 ^a	4.3 ^c	4.9 ^b	(5)	0.0001	0.0002	0.7001	0.02	12.75
Purchase intent	3.7 ^{ab}	3.8 ^{ab}	3.9 ^a	3.0 ^c	3.5 ^b	(6)	0.0001	0.0001	0.8902	0.02	16.17

543 Means in the same row, followed by different letters, differ significantly by t-test ($P < 0.05$). Day 15 (n= 55), day 60 (n=52).

544 ¹Scores for odour, colour, flavour, texture and appearance (1 = dislike intensely; 2 = dislike a lot; 3 = dislike moderately; 4 = indifferent; 5 = like moderately; 6 = like a lot; 7
 545 = like intensely); scores for purchase intent (1 = would definitely not purchase, 2 = would probably not purchase, 3 = indifferent, 4 = would probably purchase, 5 = would
 546 definitely purchase).

547 ²WCS= whole cottonseed levels; L= linear tendency; Q= quadratic tendency.

548 ³SEM= Standard error mean.

549 ⁴CV (%)= coefficient of variation.

550 ⁽¹⁾ $\hat{y}_{odour} = 5.24 - 0.01WCS (r^2 = 0.94)$; ⁽²⁾ $\hat{y}_{colour} = 5.51 - 0.02WCS (r^2 = 0.66)$; ⁽³⁾ $\hat{y}_{flavour} = 5.63 - 0.02WCS (r^2 = 0.54)$; ⁽⁴⁾ $\hat{y}_{texture} = 5.02 - 0.01WCS (r^2 =$

551 $0.25)$; ⁽⁵⁾ $\hat{y}_{appearance} = 5.22 - 0.01WCS (r^2 = 0.27)$; ⁽⁶⁾ $\hat{y}_{purchase\ intent} = 3.79 - 0.01WCS (r^2 = 0.29)$.

552

Table 5 Number of correct judgments in the triangle test of hamburgers made with meat from lambs fed on different levels of whole cottonseed, after 15 and 60 days of storage at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$

Triangle test	Whole cottonseed (%)			
	10	20	30	40
Day 15	23	19	17	23
Day 60	15	17	21	19

Minimum number of correct judgments to establish significance at various levels of probability: 19 (5%), for day 15 (n = 40) and day 60 (n = 40).

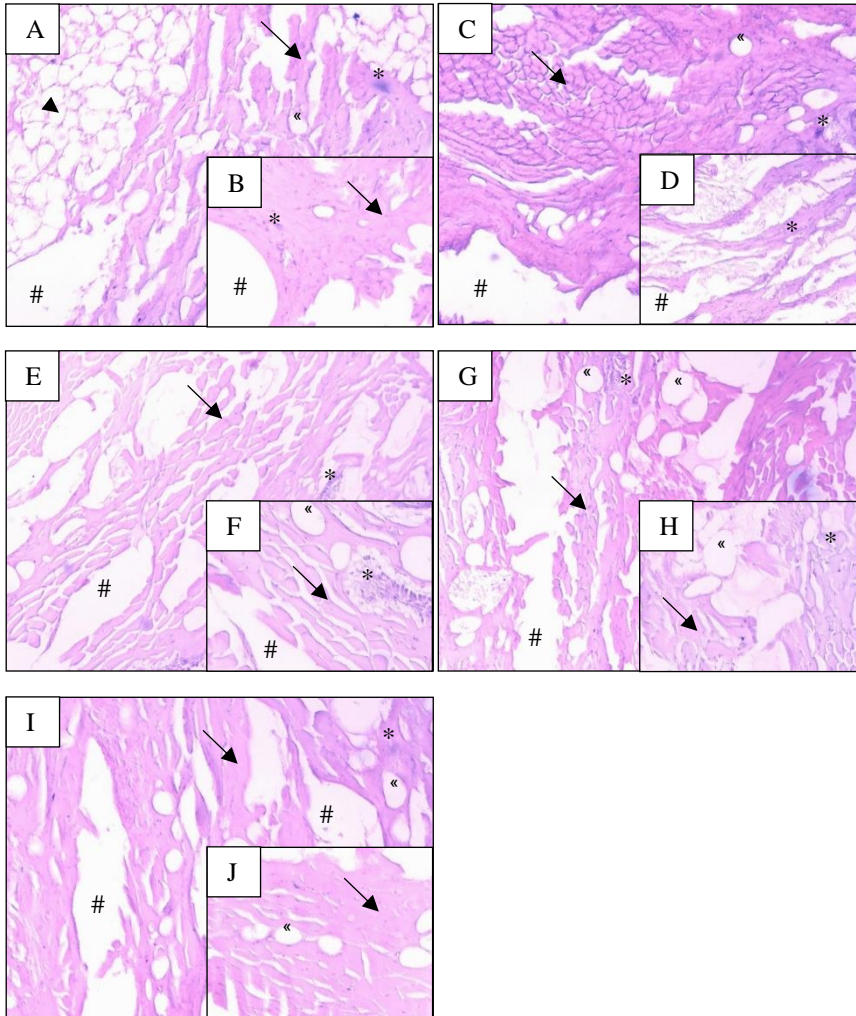


Fig. 1 Photomicrographs of lamb burger from animals fed on different levels of whole cottonseed

Details A,B) correspond to lamb burger 0% WCS. Note the disruption of muscle cells between the extracellular matrix, the presence of clusters of adipose cells, connective tissue fibres and large blisters of air bubbles. **Details C,D) correspond to lamb burger 10% WCS.** Note the presence of clusters of small muscle cells, large extracellular matrix in the compact connective tissue and air bubbles. **Details E, F) corresponds to lamb burger 20% WCS.** Note well-organised and better-defined muscle cells, abundant extracellular matrix, interstitial air bubbles of various sizes and clusters of cells in the connective tissue. **Details G, H) correspond to lamb burger 30% WCS.** Observe muscle tissue, connective tissue and air bubbles distributed heterogeneously in the tissue and ample extracellular matrix. **Details I, J) correspond to lamb burger 40% WCS.** Shows the presence of extracellular matrix, well organised muscle tissue and few air bubbles. Muscle tissue (arrows); adipose cells (arrowheads); connective tissue (*); extracellular matrix (#), air bubbles («). hematoxylin and eosin. 4x and 10x, respectively.

5 ARTIGO 3 – Is it possible to produce meatballs made with lamb from animals fed on whole cottonseed without altering the sensory characteristics?

Artigo aceito para publicação no periódico International Food Research Journal (IFRJ), em 21 de novembro de 2017. Apresentado conforme as normas da revista (<http://www.ifrj.upm.edu.my/doc/IFRJ%20Author%20Guidelines.pdf>).

1 **Is it possible to produce meatballs made with lamb from animals fed on whole**
2 **cottonseed without altering the sensory characteristics?**

3
4
5
6 ^{1*}Monego, M. A.; ¹Pellegrini, L. G.; ²Pellegrini, L. G., ³Roman, S. S.; ¹Kubota, E. H.;
7 ¹Prestes, R. C.; ¹Mello, R.

8
9
10
11
12 ¹Department of Science and Food Technology, Centre for Rural Sciences, Federal
13 University of Santa Maria – UFSM, Rio Grande do Sul, Brazil.

14 ²Federal Institute Farroupilha. CEP 98130-000. Júlio de Castilhos, Rio Grande do
15 Sul, Brazil.

16 ³Regional Integrated University of High Uruguay and Missions, Department of Health
17 Sciences, Avenue 7 de Setembro, 1621, 99700-000, Erechim RS, Brazil.

18
19
20
21 *Corresponding author.

22 Email: magdaamonego@gmail.com

23 Tel: +55-55-99724-3301

24

25 Abstract

26

27 The aim of this study was to evaluate the chemical composition and the technological and
28 sensory properties of lamb meatballs made with meat from animals fed with different levels
29 of whole cottonseed (0, 10, 20, 30 and 40%). The meatballs prepared with lamb from
30 animals fed on whole cottonseed presented higher ($P<0.05$) ash content. All the meatball
31 formulations presented low levels of lipids (2.90%) and cholesterol (74.15 mg/100g), as well
32 as high protein content (18.92%). The difference ($P<0.05$) observed in the variables of
33 cooking characteristics did not have an effect on the texture profile, which was related to the
34 microscopic observations of the product. In the triangle test for difference, the testers did not
35 perceive difference between the control meatballs (0%) and those with up to 30% of whole
36 cottonseed. However, in the acceptance test, the testers detected sensory alteration starting
37 at a level of 12.5% of whole cottonseed. Thus, it is possible to produce meatballs with meat
38 from lambs fed on up to 12.5% of whole cottonseed in the dry matter of their diet without
39 altering the sensory characteristics of the product.

40

41 **Keywords:** texture profile analysis; microscopy; triangle test; lamb meat products.

42

43 Introduction

44 Whole cottonseed is widely produced in Brazil and worldwide. In the period 2015-
45 2016, world production was 21 million tons and the largest producer was India (5.7 million
46 tons) (ICAC, 2016). Brazil occupied fifth place worldwide in terms of production (1.9 million
47 tons). The main producing states are Mato Grosso and Bahia, which are responsible for
48 about 57.4% and 28.8% of national production, respectively (Brasil, 2015).

49 Whole cottonseed, which is an oilseed, is a by-product of the processing and/or
50 ginning of cotton, both of which are intended to separate the fibres. Whole cottonseed is
51 characterised by high levels of protein, lipids and crude fibre (NRC, 2007); it is considered to
52 be a good protein and energy supplement and it can be used to prepare animal feed
53 because it is a good source of quality protein (EMBRAPA, 2003; Madruga *et al.*, 2008; Paim
54 *et al.*, 2010).

55 However, the use of whole cottonseed in animal diets is limited because of its
56 possible association with undesirable characteristics in meat. Several studies in the literature

57 have evaluated the effect of whole cottonseed on carcass performance and the quality of
58 lamb meat (Madruga *et al.*, 2008; Paim *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2010; Piona *et al.*, 2012;
59 Oliveira *et al.*, 2013; Viana *et al.*, 2014, Rufino Junior *et al.*, 2015; Pellegrini, 2017). These
60 studies have demonstrated the feasibility of using this ingredient in different concentrations
61 (10-40%) in the diet of lambs and for short periods (60 to 90 days) of confinement. However,
62 no studies were found that evaluated the performance of this meat during processing, or the
63 impact on the sensory quality of products. Consequently, this article investigates these
64 issues.

65 Meat products, such as meatballs, are popular and convenient foods because they
66 are economical, easy to prepare and also because they contain nutrients that satisfy hunger
67 rapidly, which is in line with current lifestyles (Borba *et al.*, 2013). Brazilian legislation defines
68 meatballs as a processed meat product obtained from the ground meat from one or more
69 species of slaughtered animals. Meatballs are moulded into a rounded form together with
70 additional ingredients and are then subjected to an appropriate technological process; they
71 are sold raw, semi-cooked, fried, cooked or sterilised (Brasil, 2000).

72 Considering the scarcity of data regarding the characteristics of meat products made
73 from meat from lambs fed with whole cottonseed, the present study was designed to
74 evaluate the chemical composition, as well as the technological and sensory properties, of
75 meatballs made with lamb from animals fed with different levels (0, 10, 20, 30 and 40%) of
76 whole cottonseed (WCS).

77

78 **Materials and Methods**

79 *Obtaining the meat*

80 The lamb meat that was used for the experiments was approved by the Ethics
81 Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal Institute of Education, Science and
82 Technology Farroupilha, in the city of Júlio de Castilhos, Rio Grande do Sul, Brazil under
83 Protocol No. 01.0378.2015/ 001.2015.

84 The animals that were used were twenty, male, uncastrated, lambs of the Ile de
85 France breed, which had been weaned at 60 days. The animals were finished in confinement
86 in individual, fully covered stalls, with a slatted floor and approximately 2 m² of area. The
87 animals were provided with drinking fountains and feeders.

88 The lambs were divided into five experimental treatments, with four replicates. Each
89 treatment consisted of the base experimental diet, to which whole cottonseed (*Gossypium*
90 *hirsutum* L.) was added in proportions of 0, 10, 20, 30 and 40% of WCS in dry matter,
91 respectively. The experimental diet (base) was composed of corn silage (*Zea mays* L.),
92 ground corn (*Zea mays* L.) and soybean meal (*Glycinemax* L.), in a concentrated voluminous
93 ratio (40:60) and mineral mix, as well as an isoproteic in order to meet the nutritional
94 requirements of growing lambs (NRC, 2007).

95 Feeding was ad libitum, twice a day, at the pre-set times of 7.00 a.m. and 4.00 p.m.,
96 with the quantity being adjusted to maintain leftovers at approximately 10% of the total that
97 was offered. The feeding trial of the lambs started after the adaptation period (14 days) and
98 continued until the moment of slaughter. A final live weight of 36 kg was established as the
99 slaughter criterion because the confinement times were different due to the difference in daily
100 weight gain (mean confinement time was 64 days). Prior to being slaughtered, the animals
101 were stunned using a pneumatic gun, followed by bleeding, skinning, evisceration, weighing,
102 washing and cooling. The carcasses were cooled at 2 °C for 24 hours. The legs were
103 subsequently collected, packed and frozen in a conventional freezer (Metalfrio, São Paulo,
104 SP, Brasil), at -18 °C, until the preparation of the meatballs.

105

106 *Preparation of meatballs*

107 The meatballs were prepared in accordance with the Technical Regulation of Identity
108 and Quality of Meatballs (Brasil, 2000) and Ordinance No. 1004 (Brasil, 1998). The base
109 formulation (common to all the formulations) was composed of the following: water (8%);
110 corn starch (4%), (Yoki General Mills, São Bernardo do Campo, SP, Brasil); textured soy
111 protein (2%), (Solae, Esteio, RS, Brasil); concentrated soy protein (2%), (Solae, Esteio, RS,

112 Brasil); sodium chloride (1.2%), (Diana, São Paulo, SP, Brasil); garlic paste (1%),
113 (Temperalho ind. LTDA, Iacanga, SP, Brasil); monosodium glutamate (0.3%), (Ajinomoto,
114 São Paulo, SP, Brasil); maltodextrin (0.3%), (Nutract, Chapecó, SC, Brasil); sodium
115 tripolyphosphate (0.3%), (São Paulo, SP, Brasil); parsley (0.2%), (Kitano, São Bernardo do
116 Campo, SP, Brasil); seasoning (0.2%), (Bremil, Arroio do Meio, RS, Brasil); sodium
117 erythorbate (0.2%), (Nutract, Chapecó, SC, Brasil); sodium lactate (0.01%), (Nutract,
118 Chapecó, SC, Brasil); smoke powder (0.04%) (ICL, São Paulo, SP, Brasil); and red pepper
119 (0.038%), (Kitano General Mills, São Bernardo do Campo, SP, Brasil). Five formulations of
120 meatballs were developed, in which lamb meat (80.21%) derived from animals fed on the
121 respective diets (0, 10, 20, 30 and 40% of WCS) was added to each formulation, giving rise
122 to five different meatball formulations.

123 For the preparation of the meatballs, leg of lamb was used, which had been
124 previously thawed under refrigeration (4 °C) (Electrolux, Curitiba, PR, Brasil), removing the
125 excess fat. The meat was subsequently ground (Jamar PJ22, Jamar Ltda, São Paulo, SP,
126 Brasil) using discs with a 5 mm hole and taken to a mixer (Jamar MJI 35, Jamar Ltda, São
127 Paulo, SP, Brasil) to add the other ingredients. The mixing process lasted approximately 15
128 minutes and the temperature of the mixture did not exceed 2 °C.

129 After a homogeneous mixture was obtained, the meatballs were manually moulded in
130 a spherical format with a \pm 3 cm diameter (approximately 30 g each), placed in aluminum
131 disposable trays, covered and immediately frozen in a conventional freezer (Metalfrio, São
132 Paulo, SP, Brasil), at -18 °C, where they were maintained until analysis.

133 *Physicochemical characterisation*

134 The lamb meat and meatballs were characterised as raw, in triplicate, by the
135 determination of humidity (indirect gravimetric method at 105 °C), protein (micro Kjeldahl
136 method), ash (method of incineration in muffle at 550 °C), according to the AOAC (2005),
137 and lipids (lipid separation method with hexane:isopropyl alcohol) according to Hara &
138 Hadin's (1978) methodology. For the meatballs, the carbohydrates were determined by the
139 difference between the other analysed fractions (AOAC, 2005).

140 The calorific value of the meatballs was calculated by summing the calories provided
141 by carbohydrates, proteins and lipids and by multiplying their values in grams by the Atwater
142 factors 4 kcal, and 4 kcal and 9 kcal, respectively.

143 Cholesterol was determined in the raw meat and meatballs by the enzymatic method
144 (Saldanha *et al.*, 2004) in duplicate.

145 To assess the extent of lipid oxidation that occurred in the meatballs, the
146 thiobarbituric acid (TBA) index was used, following the methodology of Raharjo, Sofos, and
147 Schmidt (1992). The analyses were performed in duplicate and the results were expressed
148 as mg of malonaldehyde per kg of sample (MDA mg/kg sample).

149 The evaluation of pH was performed using a pH meter (pH metro, model DM-23DC
150 São Paulo, Brazil) in accordance with the IAL (2008), with readings performed in triplicate.

151 The water activity values were determined using Aqualab[®] (Water Active Meter,
152 version 8, Decagon Devices, Inc., Pullman, Wa, USA) at 25 °C, in triplicate.

153

154 *Histological evaluation*

155 For the histological evaluation, three fragments of each meatball formulation were
156 collected from the centre of the raw samples and they were processed according to the
157 conventional histological technique (Junqueira and Carneiro, 2008). The raw samples were
158 cut into sections with a thickness of 4 µm and stained with hematoxylin and eosin; three
159 slides of each sample were prepared. The images observed under a microscope (Leica
160 Microscopy Systems, Heerbrugg, Switzerland) were captured with the aid of Motic Images
161 Plus 2.0 software (Motic instruments, INC, Richmond, Canada). The microscopy was
162 performed at the Histology Laboratory of the Pharmacy Department at the Integrated
163 Regional University of Alto Uruguay and the Missions (URI) in Erechim, RS, Brazil.

164

165 *Cooking characteristics*

166 The meatballs used in the analysis of cooking characteristics, texture profile and
167 sensory analysis were cooked in an electric oven (Fischer Grill 44 L, Fischer, Brusque, SC,

168 Brasil) at 180 °C until they reached an internal temperature of 72 °C. The analyses of the
 169 cooking characteristics were performed in four meatballs from each formulation and the yield
 170 was calculated by the ratio of the weight of cooked meatball to the raw meatball weight,
 171 which was expressed as a percentage. The data regarding moisture retention (Eq. 1), fat
 172 retention (Eq. 2), shrinkage (Eq. 3) and losses (total, exudate and evaporation) (Eq. 4, Eq. 5
 173 and Eq. 6, respectively) were obtained as described by Gök *et al.* (2011):

174

$$175 \text{ Moisture retention (\%)} = \frac{\text{weight}_{\text{cooked}} \times \% \text{ moisture}_{\text{cooked meatball}}}{\text{weight}_{\text{raw}} \times \% \text{ moisture}_{\text{raw meatball}}} \times 100 \quad (1)$$

176

$$177 \text{ Fat retention (\%)} = \frac{\text{weight}_{\text{cooked}} \times \% \text{ fat}_{\text{cooked meatball}}}{\text{weight}_{\text{raw}} \times \% \text{ fat}_{\text{raw meatball}}} \times 100 \quad (2)$$

178

$$179 \text{ Shrinkage (\%)} = \frac{\text{volume}_{\text{raw meatball}} - \text{volume}_{\text{cooked meatball}}}{\text{volume}_{\text{raw meatball}}} \times 100 \quad (3)$$

180

$$181 \text{ Cooking loss (\%)} = \frac{\text{weight}_{\text{raw}} - \text{weight}_{\text{cooked}}}{\text{weight}_{\text{raw}}} \times 100 \quad (4)$$

182

$$183 \text{ Exudate loss (\%)} = \frac{\text{weight}_{\text{tray exudate}} - \text{weight}_{\text{try}}}{\text{cooking loss}} \times 100 \quad (5)$$

184

$$185 \text{ Evaporative loss (\%)} = \frac{\text{cooking loss} - \text{exudate loss}}{\text{cooking loss}} \times 100 \quad (6)$$

186

187 *Texture profile analysis*

188 The texture profile analysis was performed using a TA-XT.plus Texture Analyzer,
 189 equipped with Texture Expert Exponent Software (Stable Microsystems Ltd., Surrey,
 190 England). To perform the analysis, after being cooked according to the cooking procedure
 191 described above and cooled to room temperature, the meatball samples were cubed (1 cm³).
 192 Four meatballs from each formulation were analysed and 10 cubes were removed from each
 193 unit. Each cube was tested under the following conditions: test speed of 5 mm/s; pre-test

194 speed of 1 mm/s; return speed of 5 mm/s; return distance of 20 mm; contact force of 1 g;
195 compression height of 50%; and interval between compressions of 5 s. The texture profile
196 was evaluated based on the characteristics of hardness, cohesiveness, springiness and
197 chewiness (Bourne, 1978).

198

199 *Microbiological evaluation*

200 In order to evaluate the microbiological quality of the meatballs, the following
201 analyses were performed: *Salmonella spp.*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*
202 and total coliforms and coliforms at 45 °C (*Escherichia coli*), in accordance with Normative
203 Instruction No. 62 (Brasil, 2003) and following the standards recommended by ANVISA
204 (Brasil, 2001). The analyses were performed on the raw meatballs on day one.

205

206 *Sensory analysis*

207 This study was previously approved by the Research Ethics Committee of the Federal
208 University of Santa Maria under protocol No. 934.222 and Certificate of Presentation for
209 Ethical Assessment, CAAE No. 40246214.3.0000.5346. Sensory evaluation was performed
210 on day 15, after confirmation of the microbiological safety of the products.

211 The samples offered to the testers were prepared according to the aforementioned
212 cooking procedures. After cooking, the meatballs were wrapped separately in foil and kept at
213 60 °C until serving. The meatballs were served in plastic cups in portions of 30 g with
214 approximately 20 g of traditional tomato sauce (Predilecta[®]; ingredients: tomato, tomato pulp,
215 salt, starch, sugar, soybean oil, onion, parsley flakes, garlic powder, monosodium glutamate
216 flavour enhancer and potassium sorbate conservative, with an energy value of 22 Kcal per
217 60 g portion). The meatballs were heated to 60 °C.

218 Based on the criterion that they liked lamb meat, untrained testers were recruited to
219 perform triangle (40 testers) and affective (50 testers) tests (IAL, 2008).

220 The triangle test was performed in order to detect if the whole cottonseed used in the
221 animals' diets had an effect on the flavour in the products and at what level the testers

222 perceived this differentiated flavor when compared to the control, which was developed with
223 meat from lambs fed on a diet without whole cottonseed. Thus, the triangular test was used
224 to compare each formulation of meatball made with meat from lambs fed with whole
225 cottonseed (10, 20, 30 and 40% of WCS) versus the formulation elaborated with the control
226 formulation (0% WCS).

227 The interpretation of the results was based on the relationship between the total
228 number of judgments versus the number of correct judgments compared to the result of the
229 chi-square table (IAL, 2008). The results of the number of correct judgments greater than or
230 equal to the table value made it possible to conclude that there was a significant difference
231 between the samples at the corresponding probability level (5%). Together with the sensory
232 scoresheet from the triangle test, three coded samples were simultaneously presented to the
233 testers, two identical and one different, and the testers were asked to discriminate the
234 sample(s) that seemed to be different.

235 The affective test was applied by using a hedonic scale acceptance test, in which the
236 attributes of odour, colour, flavour, texture and appearance were evaluated using a seven-
237 point scale (1 = dislike intensely, 7 = like intensely) and a five-point purchase intent test (1 =
238 would definitely purchase, 5 = would definitely not purchase). For this test, the samples were
239 offered to the testers in a monodic and random fashion, along with the sensory scoresheet of
240 the acceptance test and the purchase intent test (IAL, 2008). From the scores assigned in
241 the acceptance test, the acceptability index (AI) of the product was calculated according to
242 the equation: $AI (\%) = A \times 100/B$, where A = average score obtained for the product and B =
243 maximum score given to the product. In this context, $AI \geq 70\%$ was considered to be a good
244 score (Dutcosky, 2011).

245

246 *Statistical analysis*

247 For the physicochemical analysis of the fresh meat and the meatballs, the statistical
248 analyses were performed using a completely randomised experimental design with five

249 treatments (0, 10, 20, 30 and 40% of WCS) and four repetitions, according to the following
 250 statistical model:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

251 Where Y_{ij} = the value observed at the i -th level of WCS and j -th repetition; μ = the overall
 252 mean of the response variable; α_i = the fixed effect of the i -th level of WCS; ε_{ij} = the random
 253 effect associated with observation Y_{ij} , presupposing $\varepsilon_{ij} \sim^{iid} N(0, \sigma^2)$.

254 The sensory analysis data were analysed in a randomised block design for storage
 255 time (15 days).

256 The data were subjected to outlier investigation from the studied residues. They were
 257 subsequently submitted to univariate analysis of variance (ANOVA) by the GLM procedure.
 258 The means were adjusted by the ordinary least squares method with the LSMEANS
 259 command and compared by the least significant difference, by t-test.

260 The linear and quadratic trends were tested by means of the contrasts from the
 261 coefficients for interpolation of the orthogonal polynomials. In addition, the polynomial
 262 regression was adjusted using the RSREG procedure; the r^2 values were expressed in
 263 relation to the source treatments (regression + lack of fit). Furthermore, Spearman's partial
 264 correlation analysis was performed between the studied variables, with the levels of whole
 265 cottonseed being used as covariate.

266 The statistical analyses were performed using SAS[®] System for Windows[™] version
 267 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

268

269 **Results and Discussion**

270 *Physicochemical characterisation of lamb meat*

271 The addition of whole cottonseed to the diets of the lambs changed ($P < 0.05$) the
 272 moisture content and the TBARS of the meat (Table 1). The moisture levels in the meat were
 273 lowest ($P < 0.05$) with the inclusion of 19% of WCS in the diet of the lambs ($\hat{y}_{moisture} =$
 274 $76.47 - 0.15WCS + 0.004WCS^2$; ($r^2 = 0.85$)). The TBARS values displayed quadratic

275 behaviour ($P<0.05$), with a minimum point of 25% of WCS. The decrease in the TBARS
276 values up to 25% of WCS can be explained by the fact that phenolic compounds,
277 tocopherols (Oliveira et al., 2016) and gossypol (Wang et al., 2008; Wang et al., 2009), which
278 are present in whole cottonseed, when deposited in lamb meat (Kim et al., 1996) reduced
279 lipid oxidation (Wang et al., 2008). However, the increase in TBARS values from 25% of
280 WCS can be explained by the increase in the level of whole cottonseed in the diet of the
281 lambs; there was an increase in the deposition of unsaturated fatty acids (Pellegrini, 2017),
282 which are more susceptible to lipid oxidation. This explains the higher TBARS values found
283 for meatballs made with lamb from animals fed with 40% of WCS. Brazilian legislation does
284 not establish a maximum limit of malonaldehyde/kg in meat products. However, data from
285 the literature indicate that values of up to 2.00 mg of MDA /kg of sample are not perceived by
286 consumers (Wood *et al.*, 2004). Thus, the lamb meat used to prepare the meatballs in the
287 present study contained physicochemical conditions that were suitable for processing.

288

289 *Chemical composition of the meatballs*

290 The meatballs made with lamb from animals fed on diets containing whole cottonseed
291 presented higher ($P<0.05$) levels of ash content (Table 2). This was because the
292 consumption of whole cottonseed resulted in increased levels of minerals in the diets
293 (Pellegrini, 2017) and, consequently, an increased deposit of minerals in the meat of the
294 lambs (Paim *et al.*, 2014) and its derivatives. In the present study, the ash content in the
295 meat from lamb fed on whole cottonseed was higher, but not significantly (Table 1).

296 The results regarding the chemical composition of the meatballs showed that all the
297 formulations were in accordance with the Identity and Quality Standard for Products (Brasil,
298 2000), which establishes a minimum value of 12% for protein and maximum values of 18%
299 for fat and 10% for total carbohydrates.

300 The results regarding proteins were similar to those reported by Linares *et al.* (2012)
301 in hamburger made from lamb meat, when prepared with leg (19.56%) or leg + neck + breast

302 (17.23%), and higher than those found in reduced-fat lamb meat nuggets (14.32%) (Gadekar
303 *et al.*, 2016).

304 The meatballs made with lamb meat from animals fed with whole cottonseed had a
305 lipid content (2.90%) lower than those reported in the literature for lamb meatballs (10.5%),
306 lamb pâté (23.79%) and lamb nuggets (9.47 to 14.32%) (Kitano and Prestes, 2012, Amaral
307 *et al.*, 2015, Gadekar *et al.*, 2016). These differences were specifically attributed to the type
308 of cut used in the preparation of the product, as well as the addition (or not) of fat to the
309 formulation and the method of preparation (roasted or fried). Pre-fried and fried lamb nuggets
310 had a mean lipid content of 12.75% and 17%, respectively (Medina *et al.*, 2015).

311 The cholesterol content (74.15 mg/100 g) found in the meatball formulations was
312 similar to that found by Madruga *et al.* (2008) in meat from Santa Inês lambs fed with
313 different levels of whole cottonseed. The levels reported in the aforementioned study varied
314 from 80.60 mg/100 g in animals fed on the control diet (0% of WCS) to 77.96 mg/100 g in the
315 animals fed with 40% of WCS, which were considered as low (<90 mg/ 100 g). The
316 aforementioned results were similar to those found for ostrich meat (filet, 75.39 mg/100 g)
317 and chicken (thigh and leg, 75.94 mg/100 g), but were higher than those found for pork (leg,
318 56.97 mg/100 g) and beef (rump, 60.96 mg/100 g) (Hautrive *et al.*, 2012).

319 The formulations of meatballs made with lamb meat from animals fed with whole
320 cottonseed presented a nutritional quality that was compatible with the current trends for
321 meat products with reduced fat and cholesterol levels (Barbut *et al.*, 2016).

322

323 *Histological evaluation*

324 Histological evaluation using light microscopy has been widely used to evaluate the
325 microstructure of meat products (Vidal *et al.* 2014; Londero *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2015;
326 Abdel-Naem *et al.*, 2016; Barbut *et al.*, 2016), making it possible to relate structural
327 properties to results regarding cooking characteristics and texture profile of products.

328 By using microscopic images, it was possible to observe the distribution of the
329 muscular, adipose and connective tissue, as well as the presence of intracellular edema,

330 rupture of the cells, disorganisation and binding of the tissues. There was a histological
331 difference between the formulations. The control formulation (0% of WCS) presented a wide
332 disruption of the muscular and connective tissues, as well as the presence of clusters of
333 adipose cells and extracellular space (A and B, Fig. 1). Such characteristics reflected the
334 disorganisation of the microscopic structures of this formulation, evidencing the absence of
335 tissue binding.

336 The formulations containing 10% (C and D), 20% (E and F), 30% (G and H) and 40%
337 (I and J, Fig. 1) of WCS had structures that were similar to each other, showing well-defined
338 muscle cells, which were associated with well-organised connective tissue and well-
339 distributed adipose tissue cells. Such characteristics guarantee the organisation of muscular
340 tissues with connective and adipose tissues, demonstrating adequate tissue attachment and
341 providing better technological properties for products.

342

343 *Cooking characteristics and texture profile analysis*

344 The cooking yield of the meatballs was affected ($P<0.05$) by the levels of whole
345 cottonseed in the animals' diet (Table 3). The worst performance was in relation to the
346 formulation containing 17% of WCS, which was represented by a the lowest ($P<0.05$)
347 cooking yield, lowest ($P<0.05$) moisture retention and, consequently, the highest ($P<0.05$)
348 cooking loss and highest ($P<0.05$) shrinkage.

349 The cooking characteristics of a product make it possible to verify the influence of the
350 ingredients of a formulation, as well as the steps of the process. With the exception of the
351 lamb meat (from animals fed with 0, 10, 20, 30 and 40% of WCS), all the meatball
352 formulations received the same amount of ingredients. Furthermore, the order of the addition
353 of the ingredients, and the time and temperature of the mixtures, were standardised in order
354 to obtain the solubilisation of the myofibrillar proteins to provide a stable meat emulsion
355 (Gadekar *et al.*, 2016). Consequently, it was hard to understand the difference found in
356 relation to the variables of cooking characteristics. The retention of moisture and fat in the
357 food matrix have a direct influence on the texture and sensory properties of products

358 because moisture confers juiciness, and fat, in addition to conferring juiciness, promotes
359 flavour, texture, softness and shine (Costa *et al.*, 2009).

360 The cohesiveness of the meatballs differed ($P < 0.05$) depending on the level of
361 inclusion of whole cottonseed in the diet of the lambs. Cohesiveness provides the measure
362 of how much the structure of a product supports compression; it is proportional to the
363 strength of the internal bonds that make up the body of the product (the higher the cohesion
364 value the more resistant the product) (Bourne, 2002). The highest value ($P < 0.05$) was found
365 for the control formulation (0% of WCS).

366 The values for cohesiveness were high and correlated negatively ($r = -0.85$, $P < 0.01$)
367 with the lipid contents of the meatballs. Youssef and Barbut (2011) and Gadekar *et al.* (2016)
368 also reported a decrease in cohesiveness with increased lipid content. However, the lipid
369 content of meatballs did not differ ($P > 0.05$) in the present study (Table 2).

370 The texture profile of the meatballs showed low values for hardness, springiness and
371 chewiness (Table 3) when compared to those found by Gutt *et al.* (2014) in a study of the
372 freshness of chopped meat (hardness 50.8 N, cohesiveness 0.82, springiness 0.71,
373 chewiness 30.6), and were therefore considered to be soft and mouthwatering products. The
374 differences between these two studies can be attributed to the different species that were
375 used (lamb and cattle) and possibly the age of the animals.

376 The differences in relation to cooking characteristics (Table 3) did not reflect a
377 negative effect on the texture profile (Table 3) and the microscopic properties (Fig. 1),
378 between which a certain association was observed. Such behaviour can be attributed to the
379 main constituents of the meatballs (moisture, proteins and lipids), which did not differ
380 ($P > 0.05$) according to the level of whole cottonseed (Table 2).

381

382 *Microbiological evaluation*

383 Brazilian legislation (Brasil, 2001) recommends the absence of salmonella in 25 g of
384 sample and a maximum limit of 3.48 log CFU/g for *Clostridium* sulfite reducer, 3.7 log CFU/g
385 for *Staphylococcus* coagulase and 3.7 log CFU/g for total coliforms at 45 °C. All the

386 formulations of lamb meatballs made with meat from animals fed with whole cottonseed
387 (data not shown) were within these quality control standards established by current
388 legislation and were considered to be safe for consumption.

389

390 *Sensory analysis*

391 A total of 90 testers participated in the sensory analysis; 54% were female and 46%
392 were male. The testers were aged 18-30 (83%), 31-50 (12%) and over 50 (4%).

393 In the triangle test, 16, 14, 14 and 21 correct judgments were obtained for the
394 meatball formulations containing 10, 20, 30 and 40% of WCS, respectively, when compared
395 to the control (0% of WCS). Considering a significance level of 5%, it would be necessary to
396 have at least 19 correct judgments (IAL, 2008) to deduce that the testers detected a
397 difference between the formulations of meatballs made with meat from animals fed on whole
398 cottonseed (10, 20, 30 and 40% of WCS) compared to the control formulation (0% of WCS).
399 Thus, it can be concluded that the testers detected no difference between the control (0% of
400 WCS) and the formulations made with lamb from animals fed on levels of up to 30% of WCS.

401 In the affective test, the testers found no difference ($P>0.05$) between the
402 formulations regarding colour and texture, which received the ratings of 'indifferent' and 'like
403 moderately', respectively (Table 4). The attributes of odour, flavour and appearance of the
404 meatballs were influenced ($P<0.05$) by the levels of whole cottonseed, and these attributes
405 obtained a favorable rating (5 = like moderately) in the concentrations up to 34.4, 12.5 and
406 14.2% of WCS, respectively.

407 However, the acceptability index calculated for these attributes was higher than 70%
408 (70% odour, 74% flavour, 73% appearance) and the responses for all the attributes in the
409 acceptance test was 5 (like moderately) for all the formulations. In the purchase intent test,
410 the greater frequency was 4 (would probably purchase) up to 30% of WCS and 3 (indifferent)
411 for up to 40% of WCS (data not shown).

412 Similar results were reported by Pellegrini (2017), who evaluated the sensory quality
413 of lamb meat from animals fed on whole cottonseed (0, 100, 200, 300 and 400 g Kg⁻¹). In the

414 multiple comparison test the testers (8) could detect no difference ($P>0.05$) between the
415 flavor of meat from lambs fed with or without whole cottonseed. However, the testers
416 rejected ($P<0.05$) meat from animals fed with 23.5% of whole cottonseed in dry matter in the
417 diet, proving that the addition of whole cottonseed in the animals' diet increased the sensory
418 rejection of lamb meat.

419 In general, products made from lamb meat have shown good acceptability, and
420 consumer demand is increasing. Kitano *et al.* (2012) obtained good acceptance for lamb
421 meatballs, with 94% purchase intent. Amaral *et al.* (2015) reported good acceptance for lamb
422 pâté stored for up to 30 days. Furthermore, lamb nuggets made from different cuts (Medina
423 *et al.*, 2015) and reduced-fat lamb nuggets (control 10% fat, 7.5% fat and 2.5% inulin, 5% fat
424 and 5% inulin) also obtained good sensory acceptance (Gadekar *et al.*, 2016).

425 Thus, it can be stated that in the present study, the use of whole cottonseed in the
426 animals' diet compromised the sensory characteristics of the products. In addition, it was
427 inferred that the flavoring used in the formulation of the meatballs and the tomato sauce used
428 in the sensory evaluation inhibited the sensory detection of off-flavour compounds. However,
429 they were not sufficient to inhibit the aftertaste in the lamb meatballs made with meat from
430 animals fed with whole cottonseed. Therefore, it is evident that the inclusion of whole
431 cottonseed in the lambs' diet produced an undesirable taste in the meatballs, which was a
432 limiting factor in terms of flavour, but which was accepted up to 12.5% of WCS.

433 In lamb meat and lamb meat products, off-flavour has been referred to as a "strange"
434 or "strong" flavour (Khan, Jo and Tariq, 2015; Andrade *et al.*, 2016), which can lead to the
435 rejection of lamb products by testers. The development of off-flavour can be associated with
436 the following factors: the physiological condition, castration and stress of animals before
437 slaughter (Monte *et al.*, 2012); age at slaughter, body mass and animal feed (Brito *et al.*,
438 2016; Erasmus *et al.*, 2016; Jaworska *et al.*, 2016; Pellegrini, 2017); as well as the levels of
439 fat deposition, lipid oxidation and volatile compounds (Vasta and Luciano, 2011; Khan, Jo
440 and Tariq, 2015; Ma *et al.*, 2016; Brito *et al.*, 2017).

441

442 **Conclusion**

443 The formulations of meatballs made with meat from lambs fed with different levels of
444 whole cottonseed complied with Brazilian legislation in relation to physicochemical and
445 microbiological characteristics. The meatballs presented reduced levels of lipid, cholesterol
446 and calorific content, as well as high protein content. An association was observed between
447 the results of chemical composition, texture profile and the structural properties of the
448 meatballs. The whole cottonseed used in the diet of the lambs influenced the acceptability of
449 the meatballs, mainly affecting odour, flavour and appearance.

450 It is possible to produce meatballs with meat from lambs fed on levels of up to 12.5%
451 of whole cottonseed in the dry matter of the diet without altering the sensory characteristics
452 of the product.

453

454 **References**

- 455 Abdel-Naeem, H. H. S. and Mohamed, H. M. H. 2016. Improving the physico-chemical and
456 sensory characteristics of camel meat burger patties using ginger extract and papain. *Meat*
457 *Science* 118: 52-60.
- 458 Amaral, D. S., Silva, F.A.P., Bezerra, T.K.A., Arcanjo, N.M.O., Guerra, I.C.D., Dalmás, P.S.
459 and Madruga, M.S. 2015. Effect of storage time and packaging on the quality of lamb pâté
460 prepared with 'variety meat'. *Food Packaging and Shelf Life* 3: 39-46.
- 461 Andrade, J. C., Sobral, L. A., Ares, G. and Deliza, R. 2016. Understanding consumers'
462 perception of lamb meat using free word association. *Meat Science*, 117, 68–74.
- 463 AOAC. 2005. *Official methods of analysis*. 18nd ed. Washington: Association of Official
464 Analytical Chemists.
- 465 Barbut, S., Wood, J. and Marangoni, A. 2016. Potential use of organogels to replace animal
466 fat in comminuted meat products. *Meat Science* 122: 155-162.
- 467 Borba, C. M., Oliveira, V. R., Montenegro, K. R., Hertz, P. F. and Venzke, J. G. 2013.
468 Avaliação físico-química de hambúrguer de carne bovina e de frango submetidos a
469 diferentes processamentos térmicos 24(1): 21-27.

- 470 Bourne, M. C. 1978. Texture profile analysis. Food Technology 32: 62–72.
- 471 Bourne, M. C. 2002. Food Texture and Viscosity (Second Edition) Concept and
472 Measurement. A volume in Food Science and Technology pages xv–xvii.
- 473 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 1998. Portaria nº. 1004 de 11 de dezembro
474 de 1998. Atribuição da função dos aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria -
475 Carne e produtos à base de carne. Retrieved on December 13, 2014 from FSIS Website:
476 <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Portaria%2Bn%25C2%25BA%2B1004%252C%2Bde%2B11%2Bde%2Bdezembro%2Bde%2B1998.pdf/41e1bc8f-b276-4022-9afb-ff0bb3c12c0c>
478
- 479 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2000. Instrução Normativa nº 20,
480 de 31 de julho de 2000. Anexo I - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de
481 Almôndega. Retrieved on December 13, 2015 from FSIS Website:
482 <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1681> .
483
- 484 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2001. Resolução nº 12 de 2 de janeiro de
485 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentação. Retrieved on
486 December 14, 2015 from FSIS Website:
487 http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b .
488
- 489 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2003. Instrução Normativa nº 62,
490 de 26 de agosto de 2003. Anexo I - Métodos analíticos oficiais para análise microbiológica
491 para controle de produtos de origem animal e água. Retrieved on December 14, 2015 from
492 FSIS Website: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851> .
493
- 494 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Alimentos. 2015. Projeções
495 do agronegócio 2014/2015 a 2024/2025. Brasília, DF, 50p. Retrieved on January 14, 2017
496 from FSIS Website: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas->

- 497 [publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-brasil-](https://publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-brasil-2014-2015-a-2024-2025.pdf/view)
498 [2014-2015-a-2024-2025.pdf/view](https://publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio/projecoes-do-agronegocio-brasil-2014-2015-a-2024-2025.pdf/view) .
- 499 Brito, G. F., McGrath, S. R., Holman, B.W.B., Friend, M. A., Fowler, S. M., Vem, R. J.,
500 Hopkins, D. L. 2016. The effect of forage type on lamb carcass traits, meat quality and
501 sensory traits. *Meat Science*, 119, 95–101.
- 502 Brito, G. F., Holman, B. W.B., McGrath, S. R., Friend, M. A., Vem, R. and Hopkins, D. L.
503 2017. The effect of forage-types on the fatty acid profile, lipid and protein oxidation, and retail
504 colour stability of muscles from White Dorper lambs. *Meat Science*, 130, 81–90.
- 505 Costa, R. G., Silva, N. V., Medeiros, G. R. and Batista, A. S. M. 2009. Sensorial
506 Characteristics of Sheep Meat: Flavour and Aroma. *Revista Científica de Produção Animal*
507 11(2): 157-171.
- 508 Dutcosky, S. D. 2011. *Análise Sensorial de Alimentos*. 3th ed. Curitiba: Champagnat.
- 509 EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Algodão. 2003 *Cultura*
510 *do Algodão Herbáceo na Agricultura Familiar*. *Sistemas de Produção*, 1. Jan/2003.
- 511 Erasmus, S. W., Hoffman, L. C., Muller, M. and Rijst, M. V. D. 2016. Variation in the sensory
512 profile of South African Dorper lamb from extensive grazing systems. *Small Ruminant*
513 *Research*, 144, 62–74.
- 514 Gadekar, Y.P., Shinde, A.K. and Karim, S.A. 2016. Effect of inulin on physico-chemical,
515 textural and sensory characteristics of reduced fat lamb nuggets. *Veterinary and Animal*
516 *Science*. Retrieved on December 13, 2016 from FSIS Website:
517 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vas.2016.11.002> .
- 518 Gök, V., Akkaya, L., Obuz, E. and Bulut, S. 2011. Effect of ground poppy seed as a fat
519 replacer on meat burgers. *Meat Science* 89: 400–404.
- 520 Gutt, G., Paduret, S., Amariei, S. and Chelaru, M. 2014. Chopped meat freshness
521 assessment by texture profile analysis. *Lucrări Științifice - Seria Zootehnie* 61: 87-91.
- 522 Hara, A. and Radin, N. S. 1978. Lipid extraction of tissues of low toxicity solvent. *Analytical*
523 *Biochemistry* 90: 420-426.

- 524 Hautrive, T. P., Marques, A. C. and Kubota, E. H. 2012. Avaliação da composição
525 centesimal, colesterol e perfil de ácidos graxos de cortes cárneos comerciais de avestruz,
526 suíno, bovino e frango. *Alimentos e Nutrição* 23(2): 327-334.
- 527 IAL. Instituto Adolfo Lutz. 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São
528 Paulo: IAL.
- 529 ICAC. International Cotton Advisory Committee. 2016. *Cotton: review of the world situation*.
530 Washington, USA, December, 10p.
- 531 Jaworska, D., Czauderna, M., Przybylski, W., and Rozbicka-Wieczorek, A. J. 2016. Sensory
532 quality and chemical composition of meat from lambs fed diets enriched with fish and
533 rapeseed oils, carnosic acid and seleno-compounds. *Meat Science*, 119, 185–192.
- 534 Junqueira, L.C. and Carneiro, J. (2008) *Histologia Básica*. São Paulo:Guanabara Koogan
535 ed.11, 524.
- 536 Khan, M. I., J. C., Tariq, M. R. 2015. Meat flavor precursors and factors influencing flavor
537 precursors, a systematic review. *Meat Science*, 110, 278–284.
- 538 Kim, H. L., Calhoun, M. C., and Stipanovic R. D. 1996. Accumulation of gossypol
539 enantiomers in ovine tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113(2): 417-420.
- 540 Kitano, M. and Prestes, R. C. 2012. Avaliação sensorial de almôndega elaborada com carne
541 de ovelha. *Ingredientes, Aditivos, Corantes e Condimentos* 14-20.
- 542 Linares, M. B., Cózar, A., Garrido, M. D. and Vergara, H. 2012. Chemical and sensory quality
543 of lamb meat burgers from Manchego Spanish breed. *International Journal of Food Sciences*
544 *and Nutrition* 63(7): 843–852.
- 545 Londero, P.M.G., Prestes, R.C., Roman, S.S., Kubota, E.H., Hübscher, G.H., Silva, C.G.,
546 Fischer, L. and Alves, J.S. 2015. Development of functional beef meatball using landrace
547 common bean flour as a substitute for meat and textured soy protein. *International Food*
548 *Research Journal* 22(5): 2041-2049.
- 549 Ma, Q., Hamid, N., Oey, I., Kantono, K., Faridnia, F., Yoo, M. and Farouk, M. 2016. Effect of
550 chilled and freezing pre-treatments prior to pulsed electric field processing on volatile profile

- 551 and sensory attributes of cooked lamb meats. *Innovative Food Science and Emerging*
552 *Technologies*, 37, 359–374.
- 553 Madruga, M. S., Vieira, T. R. L., Cunha, M. G. G., Pereira Filho, J. M., Queiroga, R. C. R. E.
554 and Sousa, W. H. 2008. Effect of diets with increasing levels of whole cotton seed on
555 chemical composition and fatty acid profile of Santa Inez (Santa Inês) lamb meat. *Brazilian*
556 *Journal of Animal Science* 37: 1496-1502.
- 557 Medina, M., Antequera, T., Ruiz, J., Jiménez-Martín, E. and Pérez-Palacios, T. 2015. Quality
558 characteristics of fried lamb nuggets from low-value meat cuts: Effect of formulation and
559 freezing storage. *Food Science and Technology International* 21(7): 503-511.
- 560 Monte, A. L. S., Gonsalves, H. R. O., Villarroel, A. B. S., Damaceno, M. N. and Cavalcante,
561 A. B. D. 2012. Quality of goats and lambs meat: a review. *Agropecuária Científica no*
562 *Semiárido*, 8(3): 11-17.
- 563 NRC. National Research Council. 2007. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep,*
564 *Goats, Cervids, and New World Camelids.* (1th ed.) Washington, D.C.: National Academy
565 Press, 384p.
- 566 Oliveira, P.B., Lima, P.M.T., Campeche, A., Mendon, S., Laviolac, B.G., McManus, C. and
567 Louvandini, H. 2013. Growth and carcass characteristics of Santa Inês lambs fed diet
568 supplemented with physic nut meal free of phorbol ester. *Small Ruminant Research* 114: 20–
569 25.
- 570 Oliveira, M.R., Gubert, G., Roman, S.S., Kempka, A.P. and Prestes, R. C. 2015. Meat quality
571 of chicken breast subjected to different thawing methods. *Brazilian Journal of Poultry*
572 *Science* 17(2): 165-172.
- 573 Oliveira, A. S., Carvalho, M. L. M., Bárbara, C. N. V., Guimarães, R. M., Oliveira, J. A., and
574 Pereira, D. S. 2016. Biochemical changes in fiber naturally colored cottonseeds during
575 storage. *Journal of Seed Science* 38(2) 101-109.
- 576 Paim, T. P., Louvandini, H. McManus, C. M. and Abdalla, A. L. 2010. Use of cotton
577 byproducts in ruminant nutrition. *Veterinary Science in the Tropics* 13: 24 – 37.

- 578 Paim, T. P., Viana, P., Brandão, E., Amador, S., Barbosa, T., Cardoso, C., Dantas, A. M. M.,
579 Souza, J. R., McManus, C., Abdalla, A. L. and Louvandinia, H. 2014. Carcass traits and fatty
580 acid profile of meat from lambs fed different cottonseed by-products. *Small Ruminant*
581 *Research* 116: 71-77.
- 582 Pellegrini, L. G. 2017. Qualidade da carne de cordeiros alimentados na fase de terminação
583 com caroço de algodão. Santa Maria, RS, Brasil: Federal University of Santa Maria. Doctoral
584 thesis.
- 585 Piona, M. N. M., Cabral, L. S., Zervoudakis, J. T., Abreu, J. G., Galati, R. L., Caetano, G. G.
586 G. P. and Silva, A. R. 2012. Whole cottonseed levels in feedlot lambs diets. *Brazilian Journal*
587 *of Animal Health and Production* 13 (1): 110-122.
- 588 Raharjo, S., Sofos, J. N., and Schmidt, G. R. 1992. Improved speed, specificity, and limit of
589 determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid–C18 method for measuring
590 lipid peroxidation in beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(11): 2182– 2185.
- 591 Rufino Junior, J., Carvalho, D. M. G., Souza, J. G., Cabral, L. S., Silva, J. J., Ribeiro, M. D.,
592 Arnoldo, T. L. Q., Oliveira, A. S. and Soares, J. Q. 2015. Whole cottonseed in diets without
593 roughage for feedlot lambs. *Semina: Agrarian Sciences* 36(4) 2727-2738.
- 594 Saldanha, T., Mazalli, M. R., Bragagnolo, N. 2004. Comparative evaluation of two methods for
595 the determination of cholesterol in meat and milk. *Food Science and Technology* 24(1): 109-
596 113.
- 597 SAS Institute. 2002. *Statistical Analysis System: user guide*. Version 9. Cary (NC): SAS
598 Insitute Inc.
- 599 Vasta, V. and Luciano, G. 2011. The effects of dietary consumption of plants secondary
600 compounds on small ruminants' products quality. *Small Ruminant Research*, 101, 150– 159.
- 601 Viana, P. G., Lima, P. M. T., Paim, T. P., Souza, J. R., Dantas, A. M. M., Pereira, E. F.,
602 Gonçalves, V., McManus, C., Abdalla, A. L. and Louvandini, H. 2014. Gossypol was not
603 detected in the longissimus muscle of lambs fed several forms of cottonseed. *Animal*
604 *Production Science* 55(6) 812-817.

- 605 Vidal, A. R., Gubert, G., Roman, S. S. and Prestes, R. C. 2014. Structural Observations of
606 Beef Burger containing Wheat Fiber of Different Sizes. UNOPAR Científica Ciências
607 Biológicas e da Saúde 16(2): 93-98.
- 608 Vieira, T. R. L., Cunha, M. G. G., Garrutti, D. S., Duarte, T. F., Félex, S. S. S., Pereira Filho,
609 J. M. and Madruga, M. S. 2010. Physical and sensorial properties of Santa Ines lamb meat
610 terminated in diets with increasing levels of whole cotton seed (*Gossypium hirsutum*). Food
611 Science and Technology 30: 372-377.
- 612 Wang, X., Thomas, H. B., James, C. M., Feng, C. and Gangemi, J. D. 2008. Bioactivities of
613 Gossypol, 6-Methoxygossypol, and 6,6'-Dimethoxygossypol. Journal of Agricultural and Food
614 Chemistry 56: 4393-4398.
- 615 Wang, X., Howell, C. P., Chen, F., Yin, J. and Jiang, Y. 2009. Gossypol – a polyphenolic
616 compound from cotton plant. Advances in Food and Nutrition Research 58: 215-251.
- 617 Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E. and
618 Enser, M. 2004. Effects of fatty acids on meat quality: A review. Meat Science 66(1): 21–32.
- 619 Youssef, M. K. and Barbut, S. 2011. Fat reduction in comminuted meat products-effects of
620 beef fat, regular and pre-emulsified canola oil. Meat Science 87(4): 350-360.

621 Table 1. Physicochemical characterisation of meat from lambs fed on different levels of whole cottonseed.

Variable ¹	Whole cottonseed %					Mean or Equation	Probability value ¹			SEM ²	CV ³
	0	10	20	30	40		WCS	L	Q		
Moisture, %	76.65 ^{ab}	75.17 ^b	74.99 ^b	76.69 ^{ab}	77.42 ^a	(1)	0.0496	0.1308	0.0137	0.32	1.90
Ash, %	1.05	1.14	1.22	1.11	1.19	$\bar{y} = 1.15$	0.3543	0.2187	0.3161	0.03	10.15
Protein, %	18.76	19.90	20.69	18.91	18.35	$\bar{y} = 19.32$	0.1257	0.3953	0.0268	0.33	7.53
Lipids, %	3.32	3.79	3.10	3.29	3.06	$\bar{y} = 3.31$	0.4453	0.2845	0.6379	0.13	17.78
Cholesterol, mg/100g	93.73	85.58	100.02	100.81	92.52	$\bar{y} = 94.20$	0.0681	0.2863	0.3234	1.95	9.02
TBARS, *	0.67 ^a	0.43 ^{bc}	0.39 ^c	0.38 ^c	0.51 ^b	(2)	0.0002	0.0036	0.0001	0.03	26.73
pH	5.68	5.62	5.62	5.58	5.60	$\bar{y} = 5.62$	0.1787	0.0417	0.2765	0.01	1.03
Water activity	0.9875	0.9874	0.9876	0.9877	0.9873	$\bar{y} = 0.9875$	0.9344	0.9006	0.6585	0.01	0.06

622 Means in the same line, followed by different letters, differ significantly by t-test (P<0.05). (n=3).

623 *TBARS= thiobarbituric acid reactive substances (mg MDA/Kg).

624 ¹WCS= whole cottonseed levels; L= linear tendency; Q= quadratic tendency.625 ²SEM= standard error mean.626 ³CV (%)= coefficient of variation.627 ⁽¹⁾ $\hat{y}_{moisture} = 76.47 - 0.15WCS + 0.004WCS^2$ ($r^2 = 0.85$); ⁽²⁾ $\hat{y}_{TBARS} = 0.66 - 0.03WCS + 0.0006WCS^2$ ($r^2 = 0.97$).

628

629

630

631 Table 2. Chemical composition of lamb meatballs from animals fed on different levels of whole cottonseed.

Variable	Whole cottonseed, %					Mean or Equation	Probability value ¹			SEM ²	CV ³
	0	10	20	30	40		WCS	L	Q		
Moisture, %	70.50	70.00	70.19	70.05	70.30	$\bar{y} = 70.21$	0.1176	0.4319	0.0456	0.07	0.43
Ash, %	3.39 ^c	3.50 ^a	3.40 ^{bc}	3.48 ^a	3.47 ^{ab}	(1)	0.0210	0.0876	0.5566	0.01	1.79
Protein, %	18.60	19.28	19.12	19.10	18.55	$\bar{y} = 18.92$	0.0578	0.6735	0.0077	0.11	2.42
Lipids, %	3.15	3.00	2.64	2.85	2.88	$\bar{y} = 2.90$	0.5102	0.2981	0.2457	0.09	14.04
Carbohydrates, %	4.37	4.23	5.05	4.53	4.81	$\bar{y} = 4.60$	0.4148	0.2702	0.6775	0.15	14.19
Caloric value, Kcal/100g	120.22	121.04	118.49	120.17	119.32	$\bar{y} = 119.92$	0.7937	0.5562	0.8748	0.60	2.19
Cholesterol, mg/100g	70.71	76.77	74.08	72.42	76.77	$\bar{y} = 74.15$	0.8213	0.5804	0.8859	0.07	0.43

632 Means in the same line, followed by different letters differ significantly by t-test ($P < 0.05$). (n=3).633 ¹WCS= whole cottonseed levels; L= linear tendency; Q= quadratic tendency.634 ²SEM= standard error mean.635 ³CV (%)= coefficient of variation.636 ⁽¹⁾ $\hat{y}_{ashes} = 3.42 - 0.001WCS$ ($r^2 = 0.21$).

637

638

639

640 Table 3. Cooking characteristics and texture profile analyses of lamb meatballs made with meat from animals fed on different levels of whole
641 cottonseed.

Variable	Whole cottonseed, %					Mean or Equation	Probability value ¹			SEM ²	CV ³
	0	10	20	30	40		WCS	L	Q		
Cooking yield, %	88.87 ^a	85.28 ^b	86.65 ^b	88.51 ^a	88.64 ^a	(1)	0.0028	0.1698	0.0033	0.40	2.05
Cooking loss, %	11.14 ^b	14.72 ^a	13.35 ^a	11.50 ^b	11.37 ^b	(2)	0.0028	0.1698	0.0033	0.40	14.46
Exudation, %	1.69 ^a	1.64 ^{ab}	0.46 ^c	0.77 ^{bc}	1.77 ^a	(3)	0.0186	0.4617	0.0056	0.17	61.19
Evaporation, %	98.31 ^c	98.36 ^{bc}	99.54 ^a	99.24 ^{ab}	98.23 ^c	(4)	0.0186	0.4617	0.0056	0.17	0.77
Moisture retention, %	57.92 ^{ab}	53.86 ^c	56.02 ^b	58.90 ^a	58.21 ^a	(5)	0.0006	0.0195	0.0104	0.50	3.92
Fat retention, %	84.66	96.49	81.90	75.86	77.71	$\bar{y} = 83.32$	0.6599	0.3097	0.7732	4.45	23.89
Shrinkage, %	15.49 ^{ab}	17.65 ^a	21.61 ^a	16.87 ^a	7.89 ^b	(6)	0.0499	0.0987	0.0114	1.54	43.27
Hardness, N	28.91	27.97	34.33	35.68	34.30	$\bar{y} = 32.24$	0.3110	0.0772	0.6164	1.42	19.75
Cohesiveness	0.62 ^a	0.49 ^b	0.51 ^b	0.52 ^b	0.48 ^b	(7)	0.0001	0.0001	0.0084	0.01	10.52
Springiness	1.04	1.20	1.20	1.22	1.18	$\bar{y} = 1.17$	0.0996	0.0647	0.0503	0.02	9.13
Chewiness	18.46	16.86	21.31	22.50	20.64	$\bar{y} = 19.96$	0.5610	0.2401	0.7019	1.13	25.28

642 Means in the same line, followed by different letters, differ significantly by t-test (P<0.05). Cooking characteristics (n=4), texture profile analyses (n=10).

643 ¹WCS= whole cottonseed levels; L= linear tendency; Q= quadratic tendency.

644 ²SEM= standard error mean.

645 ³CV (%)= coefficient of variation.

646 ⁽¹⁾ $\hat{y}_{\text{cooking yield}} = 88.16 - 0.2WCS + 0.006WCS^2$ ($r^2 = 0.54$), ⁽²⁾ $\hat{y}_{\text{cooking loss}} = 11.84 + 0.2WCS - 0.006WCS^2$ ($r^2 = 0.53$), ⁽³⁾ $\hat{y}_{\text{exudation}} = 1.88 - 0.11WCS +$

647 $0.003WCS^2$ ($r^2 = 0.71$), ⁽⁴⁾ $\hat{y}_{\text{evaporation}} = 98.12 + 0.11WCS - 0.03WCS^2$ ($r^2 = 0.71$), ⁽⁵⁾ $\hat{y}_{\text{moisture retention}} = 56.91 - 0.16WCS + 0.005WCS^2$ ($r^2 = 0.42$),

648 ⁽⁶⁾ $\hat{y}_{\text{shrinkage}} = 14.67 + 0.72WCS - 0.02WCS^2$ ($r^2 = 0.93$), ⁽⁷⁾ $\hat{y}_{\text{cohesiveness}} = 0.59 - 0.07WCS + 0.0001WCS^2$ ($r^2 = 0.68$).

649

650 Table 4. Mean scores for the sensory analysis of lamb meatballs from animals fed on different levels of whole cottonseed.

Attributes ¹	Whole cottonseed, %					Mean or Equation	Probability value ²			SEM ³	CV ⁴
	0	10	20	30	40		WCS	L	Q		
Odour	5.26 ^a	5.18 ^{ab}	4.92 ^b	5.15 ^{ab}	4.94 ^b	(1)	0.0313	0.0224	0.5342	0.01	9.81
Colour	4.54	4.84	4.74	4.83	4.63	$\bar{y} = 4.71$	0.2236	0.6232	0.0465	0.02	12.97
Flavour	5.13 ^a	5.19 ^a	4.67 ^b	5.10 ^a	4.53 ^b	(2)	0.0005	0.0022	0.5288	0.02	12.61
Texture	5.16	4.94	5.05	5.22	5.05	$\bar{y} = 5.09$	0.4836	0.9050	0.7102	0.01	10.40
Appearance	5.00 ^a	5.20 ^a	4.93 ^a	5.09 ^a	4.61 ^b	(3)	0.0040	0.0128	0.0268	0.01	10.51
Purchase intent	3.60 ^{ab}	3.72 ^a	3.38 ^{bc}	3.60 ^{ab}	3.30 ^c	(4)	0.0253	0.0262	0.4936	0.02	14.75

651 Means in the same line, followed by different letters, differ significantly by t-test ($P < 0.05$). $n = 50$.

652 ¹Scores for odour, colour, flavour, texture and appearance (1 = dislike intensely; 2 = dislike a lot; 3 = dislike moderately; 4 = indifferent; 5 = like
653 moderately; 6 = like a lot; 7 = like intensely); scores for purchase intent (1 = would definitely not purchase, 2 = would probably not purchase, 3 =
654 indifferent, 4 = would probably purchase, 5 = would definitely purchase).

655 ²WCS= whole cottonseed levels; L= linear tendency; Q= quadratic tendency.

656 ³SEM= standard error mean.

657 ⁴CV (%)= coefficient of variation.

658 ⁽¹⁾ $\hat{y}_{odour} = 5.18 - 0.005WCS$ ($r^2 = 0.61$), ⁽²⁾ $\hat{y}_{flavour} = 5.15 - 0.01WCS$ ($r^2 = 0.45$), ⁽³⁾ $\hat{y}_{appearance} = 5.12 - 0.008WCS$ ($r^2 = 0.40$), ⁽⁴⁾ $\hat{y}_{purchase\ intent} = 3.66 -$
659 $0.007WCS$ ($r^2 = 0.45$).

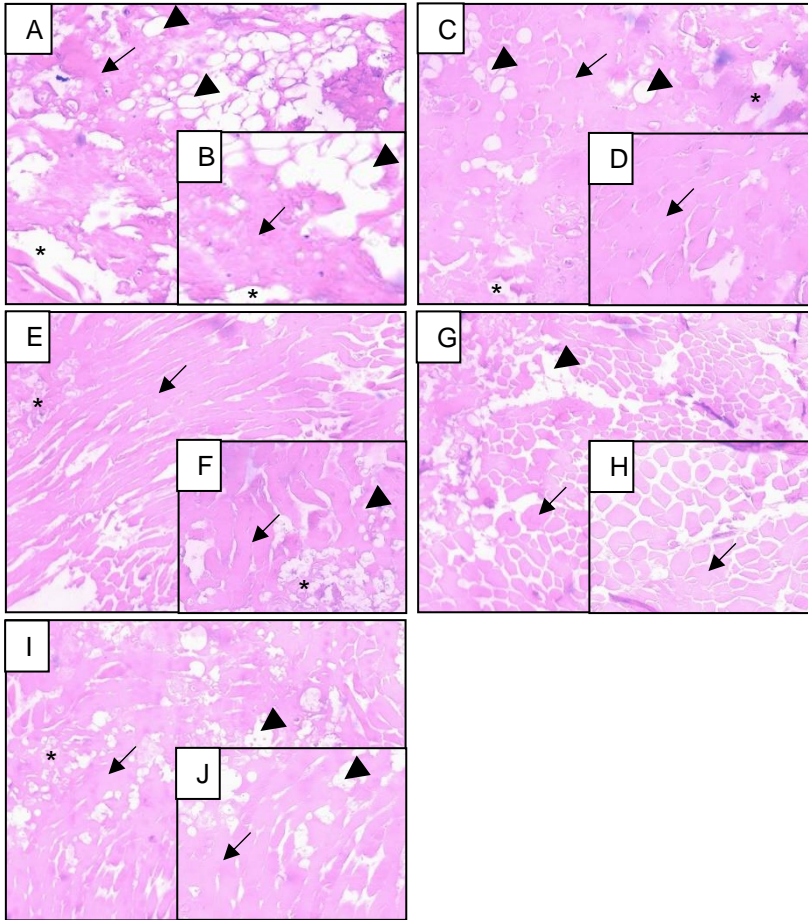


Fig. 1. Photomicrographs of lamb meatballs from animals fed on different levels of whole cottonseed.

Detail (A,B) corresponding to lamb meatball with 0% of whole cottonseed (WCS). Note the disruption of muscle cells and connective tissue, showing the absence of ligation between interstitial tissues. Also note a clump of fat cells in some areas. **Detail (C,D) corresponding to lamb meatball with 10% of WCS.** Note the organisation of muscular tissues with the connective and adipose tissues. Observe the distribution of adipocytes in different tissue areas. **Detail (E, F) corresponding to lamb meatball with 20% of WCS.** Note the well-defined muscle cells, alongside well-organised connective tissue and well-distributed adipose cells along the tissue. **Detail (G,H) corresponding to lamb meatball with 30% of WCS.** Observe the small muscle cells with extracellular space in the connective tissue. **Detail (I,J) corresponding to lamb meatball with 40% of WCS.** Note that the muscle cells and connective tissue are well-defined and grouped together. Observe the well-distributed adipose tissue along the tissue areas. Muscle tissue (arrows); connective tissue (*); adipose cells (arrowheads). Hematoxylin and eosin. 4x and 10x, respectively.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os níveis de caroço de algodão na dieta dos cordeiros promoveram alterações importantes nos níveis de enzimas indicadoras da função hepática, sugerindo que a adição deste ingrediente na dieta pode causar danos às células hepáticas, podendo causar prejuízos à saúde dos animais quando alimentados por longos períodos. O tempo (referência × CA) influenciou positivamente a modulação das fibras musculares esqueléticas, em especial, com aumento do diâmetro e área de todas as fibras; e foi mais pronunciado que o efeito dos níveis de caroço de algodão. A qualidade da carne foi influenciada pelas características dos diferentes tipos de fibras do *Longissimus thoracis*, sendo que as fibras intermediárias presentes em maior quantidade no músculo estavam positivamente correlacionadas com as características desejáveis de qualidade da carne.

O uso de carne de cordeiro de animais alimentados com níveis de caroço de algodão para preparar hambúrgueres influenciou positivamente a composição química, características de cozimento e propriedades estruturais; e negativamente suas características sensoriais, reduzindo sua aceitabilidade com níveis crescentes de caroço de algodão. A fim de garantir sua aceitabilidade sensorial, recomenda-se nível máximo de 16,7% de caroço de algodão na dieta dos cordeiros.

As formulações de almôndegas apresentaram reduzidos teores de gordura, colesterol e valor calórico e alto conteúdo de proteínas. Foi observada associação entre os resultados da composição química, o perfil de textura e propriedades estruturais das almôndegas. O caroço de algodão utilizado na dieta dos cordeiros influenciou a aceitabilidade das almôndegas, afetando principalmente o odor, sabor e impressão global. É possível produzir almôndega com carne de cordeiros alimentados com até 12,5% de caroço de algodão na matéria seca da dieta, sem alterar as características sensoriais do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIA - Associação Brasileira da Indústria Alimentícia. Disponível em: <http://www.abia.org.br/vsn/anexos/faturamento2016.pdf> , acessado em 02 de fevereiro de 2018.
- ANDERSEN, J.; SCHJERLING, P.; SALTIN, B. Dossier: sport et muscle-muscle, gènes et performances,” **Pour la Science**, 276, 2000.
- ASHMORE, C. R. et al. Biphasic development of muscle fibers in the fetal lamb. **Experimental Neurology**, 37, 241-255. 1972.
- BEZERRA, L. S.; BARBOSA, A. M.; CARVALHO, G. G. P.; SIMIONATO, J. I.; FREITAS JR., J. E.; ARAÚJO, M. L. G. M. L.; PEREIRA, L.; SILVA, R. R.; LACERDA, E. C. Q.; CARVALHO, B. M. A. Meat quality of lambs fed diets with peanut cake. **Meat Science**, 121, 88–95, 2016.
- BORBA, C. M.; OLIVEIRA, V. R.; MONTENEGRO, K. R.; HERTZ, P. F.; VENZKE, J.G. Avaliação físico-química de hambúrguer de carne bovina e de frango submetidos a diferentes processamentos térmicos. **Braz. J. Food Nutr.**, Araraquara. v. 24, n. 1, p. 21-27, jan./mar. 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Hambúrguer**. Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Almôndega**. Instrução Normativa nº 20, de 31 de julho de 2000b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Caprinos e ovinos**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>. Acessado em: 30 de julho de 2016.
- BROOKE, M.H.; KAISER, K.K. Three ‘myosin adenosine triphosphatase’ systems: the nature of their pH lability and sulphhydryl dependence. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.18, p.670-672, 1970.
- BÜNGER, L.; NAVAJAS, E.A.; STEVENSON, L.; LAMBE, N.R.; MALTIN, C.A.; SIMM, G.; FISHER, A.V.; CHANG, K.C. Muscle fibre characteristics of two contrasting sheep breeds: Scottish Blackface and Texel. **Meat Science**. V. 81. 372–381. 2009.
- BURKE, R. E.; LEVINE, D. N.; ZAJAC, F. E.; TSAIRIS, P.; ENGEL, W. K. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. **Journal Physiology**, v. 234, p. 749-765, 1973.
- CARVALHO, W. L.; MAIOLI, M. A.; MENDES, L. C. N.; ROZZA, D. B.; MINGATTO, F. E. Mecanismos da intoxicação do fígado de rato causada pelo gossipol. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 3, Mar. 2013.

CHOE, J. H.; KIM, B. C. Association of blood glucose, blood lactate, serum cortisol levels, muscle metabolites, muscle fiber type composition, and pork quality traits. **Meat Science**, 97, 137–142, 2014.

CHRIKI, S.; PICARD, B.; JURIE, C.; REICHSTADT, M.; MICOL, D.; BRUN, J.-P.; JOURNAUX, L.; HOCQUETTE, J.-F. Meta-analysis of the comparison of the metabolic and contractile characteristics of two bovine muscles: *Longissimus thoracis* and *Semitendinosus*. **Meat Science**, v. 91, p. 423–429, 2012.

CHRIKI, S.; PICARD, B.; FAULCONNIER, Y.; MICOL, D.; BRUN, J. P.; REICHSTADT, M.; JURIE, C.; DURAND, D.; RENAND, G.; JOURNAUX, L.; HOCQUETTE, J.-F. A data warehouse of muscle characteristics and beef quality in France and a demonstration of potential applications. **Italian Journal of Animal Science**, v. 12, 2013a.

CHRIKI, S.; RENAND, G.; PICARD, B.; MICOL, D.; JOURNAUX, L.; HOCQUETTE, J.-F. Meta-analysis of the relationships between beef tenderness and muscle characteristics. **Livestock Science**, v.155, p. 424–434, 2013b.

DU, M.; HUANG, Y.; DAS, A. K.; YANG, Q.; DUARTE, M. S.; DODSON, M. V.; ZHU, M.-J. MEAT SCIENCE AND MUSCLE BIOLOGY SYMPOSIUM: Manipulating mesenchymal progenitor cell differentiation to optimize performance and carcass value of beef cattle. **Journal Animal Science**, v. 2, 2014.

DUBOWITZ, V.; SEWRY, C. A.; OLDFORS, A. **Muscle biopsy: A practical approach**. Saunders Elsevier. Fourth edition, 2013.

EMBRAPA. **Embrapa Algodão**. Cultura do Algodão Herbáceo na Agricultura Familiar. Sistemas de Produção, 1. Jan/2003.

FAO – Food and Agriculture Organization. FAOSTAT – Data – Production – Livestock Primary. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL> , acessado em 02 de fevereiro de 2018.

FU, X.; ZHU, M.-J.; DODSON, M. V.; DU, M. AMP-activated protein kinase stimulates warburg-like glycolysis and activation of satellite cells during muscle regeneration. **Journal of Biological Chemistry**. September 2015.

GADELHA, I. C. N.; FONSECA, N. B. S.; OLORIS, S. C. S.; MELO, M. M., SOTO-BLANCO, B. Gossypol Toxicity from Cottonseed Products. **The Scientific World Journal**. 2014.

GALLO, S. B.; SIQUEIRA, E. R.; DELGADO, E. F.; SILVA, M. D. P.; ROSA, G. T. Influence of feeding regime and finishing system on lamb muscle fiber and meat quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.11, p.2204-2210, 2009.

GUERRA-RIVAS, C.; VIEIRA, C.; RUBIO, B.; MARTÍNEZ, B.; GALLARDO, B.; MANTECÓN, A.R.; LAVÍN, P.; MANSO, T. Effects of grape pomace in growing lamb diets compared with vitamin E and grape seed extract on meat shelf life. **Meat Science**, 116, 221–229, 2016.

HAJJI, H.; JOY, M.; RIPOLL, G.; SMETI, S.; MEKKI, I.; MOLINO GAHETE, F.; MAHOUACHI, M.; ATTI, N. Meat physicochemical properties, fatty acid profile, lipid oxidation and sensory characteristics from three North African lamb breeds, as influenced by concentrate or pasture finishing diets. **Journal of Food Composition and Analysis**, 48, 102–110, 2016.

HAMDI, H.; MAJDOUB-MATHLOUTHI, L.; PICARD, B.; LISTRAT, A.; DURAND, D.; ZNAÏDI, I.A.; KRAIEM, K. Carcass traits, contractile muscle properties and meat quality of grazing and feedlot Barbarine lamb receiving or not olive cake. **Small Ruminant Research**, 145, 85–93, 2016.

HOCQUETTE, J. F.; BOTREAU, R.; PICARD, B.; JACQUET, A.; PETHICK, D. W.; SCOLLAN, N. D. Opportunities for predicting and manipulating beef quality. **Meat Science**, V. 92, p. 197–209, 2012.

HORI, A.; ISHIHARA, A.; KOBAYASHI, S.; IBATA, Y. Immunohistochemical classification of skeletal muscle fibers. **Acta Histochemica et Cytochemica**, 31, 375–384, 1998.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008 – 2009. Aquisição alimentar domiciliar per capita: Brasil e Grandes Regiões. Rio de Janeiro – RJ. 2010.

ITHURRALDE, J.; BIANCHI, G.; FEED, O.; NANA, F.; GARIBOTTO, G.; BIELLI, A. Histochemical fiber types in 16 heavy-lamb skeletal muscles. **Small Ruminant Research**. Short Communication. 2015.

LEFAUCHEUR, L. A second look into fibre typing – Relation to meat quality. **Meat Science**. 84. 257–270. 2010.

LESTINGI, A.; FACCIOLONGO, A.M.; MARZO, D.; NICASTRO, F.; TOTEDA, F. The use of faba bean and sweet lupin seeds in fattening lamb feed. 2.Effects on meat quality and fatty acid composition. **Small Ruminant Research**, 2015.

LIMA JÚNIOR, D. M.; CARVALHO, F. F. R.; SILVA, F. J. S.; RANGEL, A. N.; NOVAES, L. P.; DIFANTE, G. S. Intrinsic factors affecting sheep meat quality: a review. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**. 29:3-15. 2016.

LOUGHLIN, M. **Muscle biopsy**. A laboratory investigation. Butterworth-Heinenann. p.78-79. 1993.

MADRUGA, M. S.; VIEIRA, T. R. L.; CUNHA, M. G. G.; PEREIRA FILHO, J. M.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUSA, W. H. Effect of diets with increasing levels of whole cotton seed on chemical composition and fatty acid profile of Santa Inez (Santa Inês) lamb meat. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.37, n.8, p.1496-1502, 2008.

MONTE, A. L. S.; GONSALVES, H. R. O.; VILLARROEL, A. B. S.; DAMACENO, M. N.; CAVALCANTE, A. B. D. Quality of goats and lambs meat: a review. **Agropecuária Científica no Semiárido**, 8(3): 11-17, 2012.

NAKATANI, T.; NAKASHIMA, T.; KITA, T.; ISHIHARA, A. Cell size and oxidative enzyme activity of Type-identified fibers in rat hindlimb muscles: A Review. **Acta Histochemica et Cytochemica**, 36, 2, 105-114, 2003.

NRC-National Research Council. **Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids and new world camelids**. Washington, D.C.: National Academy Press, 2007.

OLIVEIRA, R. L.; LEÃO, A. G.; ABREU, L. L.; TEIXEIRA, S.; SILVA, T. M. Alimentos alternativos na dieta de ruminantes. **Revista Científica de Produção Animal**, v.15, n.2, p.141-160, 2013.

PAIM, T. P.; LOUVANDINI, H.; McMANUS, C. M.; ABDALLA, A. L. Uso de subprodutos do algodão na nutrição de ruminantes. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife-PE, v. 13, nº 1/2/3, p. 24 - 37 - janeiro/dezembro, 2010.

PAIM, T. P.; VIANA, P.; BRANDÃO, E.; AMADOR, S.; BARBOSA, T.; CARDOSO, C.; DANTAS, A. M. M.; SOUZA, J. R.; MCMANUS, C.; ABDALLA, A. L.; LOUVANDINI, H. Carcass traits and fatty acid profile of meat from lambs fed different cottonseed by-products. **Small Ruminant Research**, 116, 71–77, 2014.

PEINADO, B.; LATORRE, R.; VÁQUEZ-AUTÓN, J. M.; POTO, A.; RAMÍREZ, G.; LÓPEZ-ALBORS, O.; MORENO, F.; GIL, F. Histochemical Skeletal Muscle Fibre Types in the Sheep. **Anat. Histol. Embryol.** 33, 236–243. 2004.

PELLEGRINI, L. G. **Qualidade da carne de cordeiros alimentados na fase de terminação com caroço de algodão**. 2017. 112 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2017.

PEREIRA, L.; PIRES, A. J.V.; CARVALHO, G. G.P.; SILVA, R. V.M.M.; SIMIONATO, J. I.; LACERDA, E. C.Q.; BEZERRA, L. S.; EIRAS, C. E.; CARVALHO, B. M.A. Nutritional characteristics of lambs meat fed diets with cotton cake. **Journal of Food Quality**, 39, 140–149, 2016.

PETER, J. B.; BARNARD, R. J.; EDGERTON, V. R.; GILLESPIE, C. A.; STEMPEL, K. E. Metabolic Profiles of Three Fiber Types of Skeletal Muscle in Guinea Pigs and Rabbits. **Biochemistry**, v. 11, n. 14, 1972.

PICARD, B.; LEFAUCHEUR, L.; BERRI, C.; DUCLOS, M. J. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. **Reproduction Nutrition Development**, EDP Sciences, V. 42, p. 415–431, 2002.

PICARD, B. Relationship between muscle fibers, growth efficiency and beef quality. In: **8th Symposium of beef cattle production**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil. 2012.

PINHEIRO, R.S.B.; JORGE, A.M.; SOUZA, H.B.A. Aceitação sensorial e composição centesimal da carne de ovelhas abatidas em diferentes estágios fisiológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.4, p.1053-1059, 2012.

PIONA, M. N. N.; CABRAL, L. S.; ZERVOUDAKIS, J. T.; ABREU, J. G.; GALATI, R. L.; CAETANO, G. G. G. P.; SILVA, A. R. Níveis de Caroço de algodão na dieta de cordeiros confinados. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.13, n.1, p.110-122 jan/mar, 2012.

RAMOS, E. M.; GOMIDE L. A. M. **Avaliação da Qualidade de Carne: Fundamentos e Metodologias**. 1ª ed. Viçosa: UFV, 599 p., 2009.

SANTELLO, G. A.; MACEDO, F. A. F.; LOURENÇO, F. J.; MACEDO, R. M. G.; JACOBS DIAS, F.; ALCALDE, C. R. Morfologia muscular e características qualitativas da carne de cordeiros ½ Dorper-Santa Inês. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.11, n.3, p.876-887, 2010.

SENEGALHE, F. B. D.; MACEDO, F. A. F.; MORA, N. H. A. P.; GUALDA, T. P.; RADIS, A. C.; QUEIROZ, E. O.; MACEDO, F. G. Composição química da carne de cordeiros abatidos com diferentes espessuras de gordura subcutânea. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 15, n.3, p.740-753 jul./set., 2014.

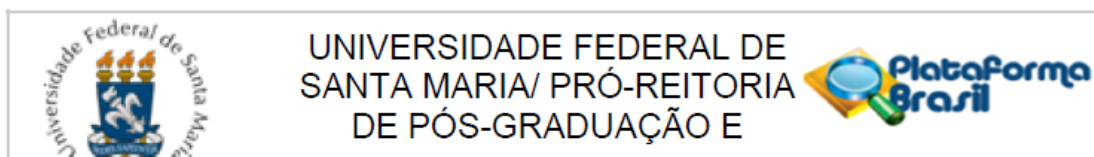
VIANA, J. G. A.; REVILLION, J. P. P.; SILVEIRA, V. C. P. Alternativa de Estruturação da Cadeia de Valor da Ovinocultura no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, Taubaté, SP, v. 9, n. 1, p. 187-210, jan-mar/2013.

VIANA, P. G.; LIMA, P. M. T.; PAIM, T. P.; SOUZA, J. R.; DANTAS, A. M. M.; PEREIRA, E. F.; GONÇALVES, V.; MCMANUS, C.; ABDALLA, A. L.; LOUVANDINI, H. Gossypol was not detected in the longissimus muscle of lambs fed several forms of cottonseed. **Animal Production Science**. 55(6) 812-817. 2014.

VIEIRA, T. R. L.; CUNHA, M. G. G.; GARRUTTI, D. S.; DUARTE, T. F.; FÉLEX, S. S. S.; PEREIRA FILHO, J. M. P.; MADRUGA, M. S. Propriedades físicas e sensoriais da carne de cordeiros Santa Inês terminados em dietas com diferentes níveis de caroço de algodão integral (*Gossypiumhirsutum*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.30, n.2, p.372-377, 2010.

ZHAO, J. X.; LIU, X. D.; LI, K.; LIU, W. Z.; REN, Y. S.; ZHANG, J.X. Different dietary energy intake affects skeletal muscle development through an Akt-dependent pathway in Dorper × Small Thin-Tailed crossbred ewe lambs. **Domestic Animal Endocrinology**, 57, 63–70, 2016.

ANEXO A – PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de hambúrguer de carne de cordeiros alimentados com distintos níveis de caroço de algodão

Pesquisador: Renius de Oliveira Mello

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 40264114.4.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 936.005

Data da Relatoria: 10/03/2015

Apresentação do Projeto:

Projeto de doutorado que trata do desenvolvimento de hambúrguer de carne ovina alimentados com distintos níveis de caroço de algodão.

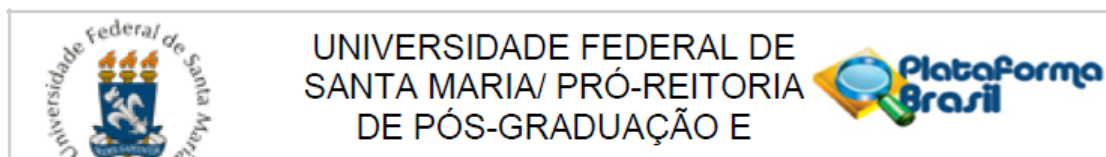
Objetivo da Pesquisa:

Geral: desenvolvimento de hambúrguer de carne de cordeiros Ile de France terminados em confinamento com dietas contendo diferentes concentrações de caroço de algodão.

Específicos:

- Avaliar a composição química da carne de cordeiro utilizada na elaboração dos produtos;
- Desenvolver formulação de hambúrguer de carne de cordeiros alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de caroço de algodão;
- Caracterizar hambúrgueres desenvolvidos, através da composição físico-química, teor de colesterol, perfil lipídico, sensorial, textura e propriedades tecnológicas;
- Avaliar a oxidação lipídica (TBARS), oxidação de pigmentos (cor), pH e atividade de água no decorrer da vida útil dos produtos;
- Verificar se a presença de caroço de algodão na dieta dos cordeiros afeta a qualidade do produto

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 936.005

elaborado e, em caso positivo, que nível de caroço de algodão promove esta alteração.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: são considerados mínimos, pois os produtos bem como os ingredientes utilizados em suas formulações são destinados para fins alimentícios e comumente utilizados pela população. Os provedores serão aconselhados a desistir de participar em caso de alergias ou intolerância a qualquer ingrediente da formulação. Ainda, terão liberdade em participar ou não da pesquisa, assim como deixar de participar em qualquer momento, sem acarretar qualquer penalidade ou prejuízo.

Benefícios: oportunidade de degustar hambúrguer de carne de cordeiro com diferentes atributos sensoriais e colaborar na escolha daquela que mais lhe agrada. Adicionalmente, sua participação irá beneficiar a comunidade científica, as indústrias de alimentos e a sociedade em geral, ao contribuir na construção do conhecimento dos parâmetros sensoriais e de aceitação dos produtos testados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados de modo suficiente.

Recomendações:

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. Acompanhe as orientações disponíveis, evite pendências e agilize a tramitação do seu projeto.

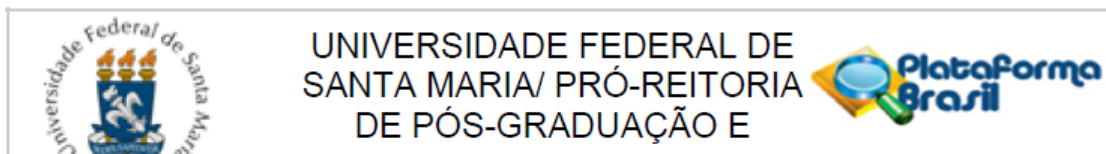
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer anterior foram resolvidas de modo suficiente.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 936.005

Necessita Apreciação da CONEP:

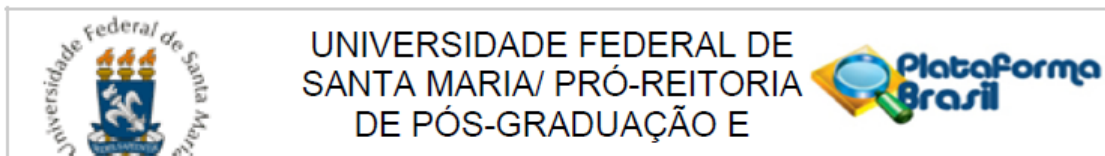
Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SANTA MARIA, 21 de Janeiro de 2015

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE ALMÔNDEGA DE CARNE DE CORDEIROS ALIMENTADOS COM DISTINTOS NÍVEIS DE CAROÇO DE ALGODÃO

Pesquisador: Renius de Oliveira Mello

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 40246214.3.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 934.222

Data da Relatoria: 12/01/2015

Apresentação do Projeto:

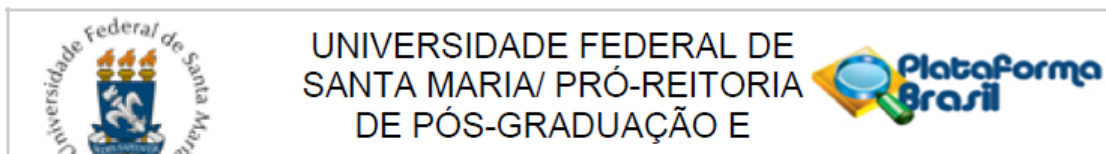
Projeto de doutorado e trata do desenvolvimento de almondega de carne ovina, como alternativa para ampliar o consumo de carne ovina.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Desenvolvimento de almôndega de carne de cordeiros Ile de France alimentados com distintos níveis de caroço de algodão.

Específicos: Avaliar a composição química da carne de cordeiro utilizada na elaboração dos produtos; Desenvolver formulação de almôndega de carne de cordeiros alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de caroço de algodão; Caracterizar as almôndegas desenvolvidas, através da composição físico-química, teor de colesterol, perfil lipídico, sensorial, textura e propriedades tecnológicas; Avaliar a oxidação lipídica (TBARS), oxidação de pigmentos (cor), pH e atividade de água no decorrer da vida útil dos produtos; Verificar se a presença de caroço de algodão na dieta dos cordeiros afeta a qualidade do produto elaborado e, em caso positivo, que nível de caroço de algodão promove esta alteração.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 934.222

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: são considerados mínimos, pois os produtos bem como os ingredientes utilizados em suas formulações são destinados para fins alimentícios e comumente utilizados pela população. Os provedores serão aconselhados a desistir de participar em caso de alergias ou intolerância a qualquer ingrediente da formulação. Ainda, terão liberdade em participar ou não da pesquisa, assim como deixar de participar em qualquer momento, sem acarretar qualquer penalidade ou prejuízo.

Benefícios: oportunidade de degustar almôndega de carne de cordeiro com diferentes atributos sensoriais e colaborar na escolha daquela que mais lhe agrada. Adicionalmente, sua participação irá beneficiar a comunidade científica, as indústrias de alimentos e a sociedade em geral, ao contribuir na construção do conhecimento dos parâmetros sensoriais e de aceitação dos produtos testados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados adequadamente.

Recomendações:

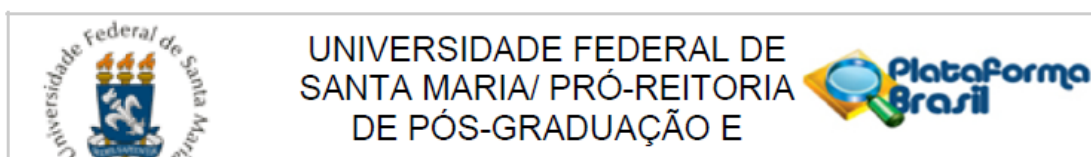
Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. Acompanhe as orientações disponíveis, evite pendências e agilize a tramitação do seu projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Padronizar os riscos e benefícios do projeto e plataforma com o do TCLE.

Colocar no TCLE, como rodapé, o endereço do comitê de ética (está somente na primeira página). Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
 Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 934.222

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SANTA MARIA, 17 de Janeiro de 2015

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi CEP: 97.105-970
UF: RS Município: SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com