# **GIOVANNA ROCHA NUNES**

Perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e qualidade da carne de cordeiros submetidos ao transporte rodoviário e tratados com vitamina E



# GIOVANNA ROCHA NUNES

# Perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e qualidade da carne de cordeiros submetidos ao transporte rodoviário e tratados com vitamina E

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

# Departamento:

Clínica Médica

# Área de concentração:

Clínica Veterinária

#### Orientadora:

Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2850  $\mathsf{FMVZ}$ 

Nunes, Giovanna Rocha

Perfil brownia rooma Perfil brownia rooma Perfil brownia Rooma Roo 67 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira.

1. Alfa-tocoferol. 2. Cortisol. 3. Estresse. 4. TAS. 5. TBARS. I. Título.

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO





## FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

# Comissão de Ética no uso de animais

# CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo do perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e qualidade da carne de cordeiros submetidos ao transporte rodoviário e tratados com vitamina E", protocolado sob o nº 2422/2011, utilizando 24 (vinte e quatro) ovinos, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/10/2011.

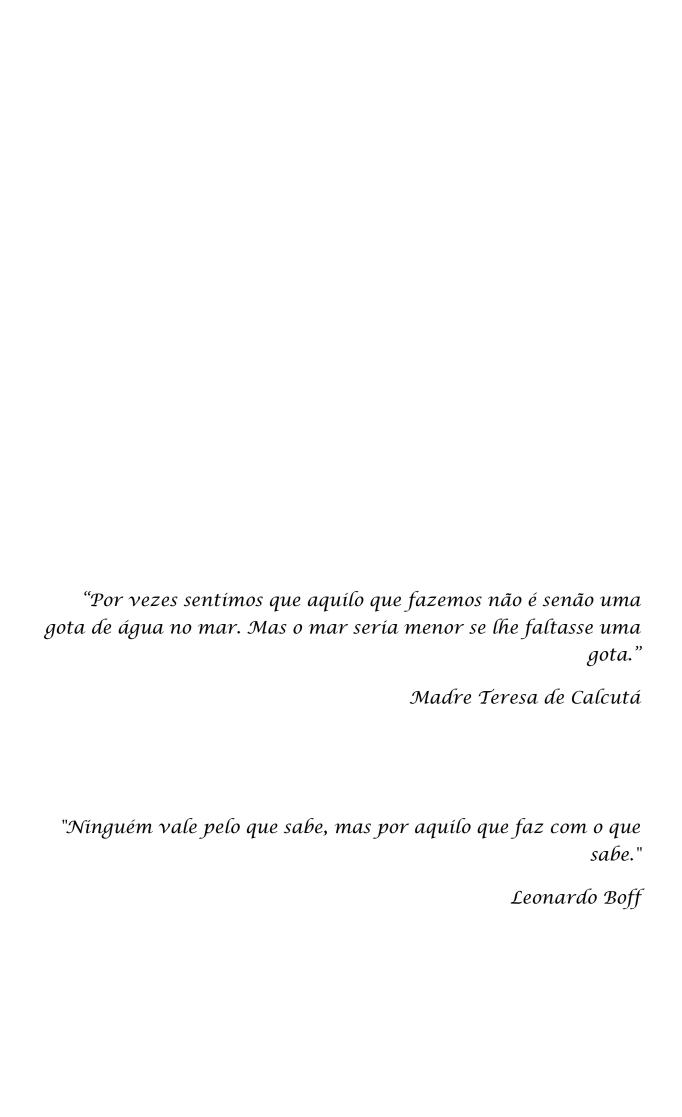
We certify that the Research "Study of biochemical profile, oxidative metabolism and meat quality of lambs subjected to road and treated with vitamin E", protocol number 2422/2011, utilizing 24 (twenty-four) sheep, under the responsibility Profa. Dra. Maria Claudia Araripe Sucupira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/26/2011.

São Paulo, 27 de outubro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni Presidente

# FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NUNES, Giovanna Rocha	a
	olismo oxidativo e qualidade da carne de cordeiros rodoviário e tratados com vitamina E
	Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências
Data://	
1	Banca Examinadora
Prof.Dr	
Instituição:	Julgamento:
Prof.Dr	
Instituição:	Julgamento:
Prof.Dr	
Instituição:	



Dedíco este trabalho aos meus país José e Joana, à mínha avó Celeste e ao meu amado Tíago.

Ofereço este trabalho à Profa. María Claudía Ararípe Sucupíra.

#### **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais José e Joana, por todo o amor e apoio incondicionais que me deram ao longo da vida. Minha formação pessoal e profissional só foi possível por tê-los sempre ao meu lado.

À minha avó e madrinha Celeste, por se tornar meu anjo-da-guarda desde o momento em que nasci.

Aos meus avôs Manuel e Orlando, por estarem sempre ao meu lado iluminando meus caminhos.

Ao meu amado Tiago, por todo amor, amizade e companheirismo ao longo dos nossos quatro anos de relacionamento. Ao seu lado descobri o verdadeiro significado para "alma gêmea".

À Profa. Maria Claudia Araripe Sucupira, pela amizade e ensinamentos que se iniciaram na graduação, se estenderam ao mestrado e, certamente, irão durar por toda a vida. Agradeço, principalmente, pelo privilégio de ser sua orientada e pela confiança depositada em mim ao colocar sob minha condução uma pesquisa tão grandiosa. Devo agradecer também pela paciência dispensada a minha pessoa. Tenho plena consciência de que muitas vezes fui teimosa, impaciente e difícil de orientar!

À amiga e companheira de pós-graduação Aline Morgado, por toda a amizade e cumplicidade desde os anos de graduação. Seu apoio (em todos os sentidos) foi essencial durante este experimento de mestrado.

À Alessandra Lima, Rebeca Weigel, Priscilla Nascimento e Vanessa Storillo pela amizade, companheirismo e imensurável ajuda neste experimento. Sem a ajuda da "Família Sucupira", este experimento não seria possível.

Aos amigos Ana Paula, Samir e Maria Eugenia pela amizade, companheirismo e cumplicidade desde a graduação. Vocês são os amigos que qualquer pessoa gostaria de ter sempre ao seu lado!

Aos alunos de iniciação científica André Martins, Fernanda Barbosa, Beatriz Villas Boas e Paola Junqueira, pelo cuidado com os animais, auxílio nas coletas e análises de dados.

À amiga Clara Mori, pela amizade e ajuda com as análises laboratoriais dentro e fora do horário de expediente! Sua ajuda foi essencial para que cada amostra coletada se tornasse um dado neste estudo.

Às técnicas Samantha, Claudia, Marli, Maria Helena e Maria Luisa (Maú), pelo agradável convívio (quase diário!) nos laboratórios e pela disposição em sempre me ajudar.

Às funcionárias Dona Carmem e Edna (Dinha), pela simpatia e por nunca deixaram faltar material de laboratório do decorrer desta pesquisa.

Aos funcionários Agnaildo e Abelardo (Dinho), pelo auxílio nas coletas e cuidados diários com os cordeiros.

Aos funcionários Elias e Geraldo, pelos cuidados com os animais aos finais de semana e feriados.

À Profa. Alice Maria Melville Paiva Della Libera da FMVZ-USP, pelos ensinamentos e contribuição à minha formação acadêmica com a iniciação científica.

À amiga Renata Farinelli, que mesmo muito ocupada com suas análises, não me negou ajuda nos momentos finais (e mais trabalhosos) deste experimento.

À Profa. Angélica Cravo da FMVZ-USP, pelo auxílio na confecção do projeto e pela realização das análises de qualidade da carne.

Ao Prof. Paulo Mazza da FMVZ-USP, pela realização das análises estatísticas e por sua disposição em sempre nos ajudar.

Ao Prof. Guilherme Nogueira e aos funcionários do Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba, pela realização das análises de cortisol.

À Profa. Ivanete Susin da ESALQ-USP, pelo auxílio na confecção do projeto e por sua disponibilidade em sempre nos ajudar a qualquer dúvida que surgia.

Ao Prof. Stefano Hagen da FMVZ-USP, pelas palavras sempre sábias nos momentos difíceis deste e de outros experimentos da Família Sucupira.

Aos colegas de pós-graduação no VCM pelo agradável convívio diário.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, pela minha formação como Médica Veterinária.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa e do auxilio para realização dessa pesquisa.

A Deus, pela proteção e por colocar em meu caminho pessoas tão maravilhosas com quem posso contar em todos os momentos de minha vida.

#### **RESUMO**

NUNES, G. R. Perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e qualidade da carne de cordeiros submetidos ao transporte rodoviário e tratados com vitamina E. [Biochemical profile, oxidative metabolism and meat quality of lambs subjected to road and treated with vitamin E]. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos da administração intramuscular de alfa-tocoferol (vitamina E) sobre marcadores de estresse fisiológico e oxidativo, além de características relacionadas à qualidade da carne de cordeiros submetidos a transporte rodoviário de curta duração. Vinte e quatro cordeiros, mestiços das raças Santa Inês e Dorper, com idade e peso vivo médios ao abate de 138 dias e 43,6 kg, respectivamente, foram distribuídos em três grupos experimentais nos quais receberam, aos seis e três dias antes do transporte, pela via intramuscular, uma aplicação de solução fisiológica; 10 UI; ou 20 UI de acetato de DL-alfa-tocoferol, por quilo de peso metabólico. O transporte teve duração de quatro horas e na chegada ao abatedouro, os cordeiros desembarcaram em curral de espera, onde permaneceram por 19 horas até o momento do abate. Nos momentos T0 (imediatamente antes do embarque e transporte); T1 (imediatamente após transporte e desembarque); T2 (três horas após transporte e desembarque) e T3 (imediatamente antes do abate) foi aferida a temperatura retal e coletadas amostras de sangue por punção da veia jugular para determinação das concentrações séricas de ureia, creatinina, albumina, proteína total, colesterol e cortisol; concentrações plasmáticas de glicose, beta-hidroxibutirato (BHB), lactato e ácidos graxos não esterificados (AGNE); atividade sérica da creatinofosfoquinase (CK); contagem de hemácias e leucócitos totais; relação neutrófilos:linfócitos; volume globular (VG); atividades eritrocitárias da superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR); concentração de glutationa reduzida (GSH); status antioxidante total do soro (TAS) e concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Após o abate, as carcaças foram mantidas por 24 horas sob refrigeração a 2°C para que pudessem ser

determinados o pH (pH24h) e coloração (L\*, a\*, b\*) do músculo Longissimus dorsi, além de coletadas amostras para posterior avaliação da força de cisalhamento (FC), perdas de peso por cozimento (PPC) e produtos da oxidação lipídica após 30 dias de congelamento (TBARS 30). Houve efeito de interação entre momento e tratamento para lactato, sendo observado efeito linear de tratamento no momento T2, com maiores (P= 0,0111) valores dessa variável nos animais que receberam 20 UI de vitamina E. Ocorreu efeito linear de tratamento (P=0,0149) sobre os valores de TAS. Foi observado efeito de desvio da linearidade para albumina, L\* e b\*. Animais que receberam 10 UI de vitamina E apresentaram menores concentrações de albumina (P= 0,0447) e maiores valores (P=0,0042 e P=0,0082) de L\* e b\*. Com exceção da temperatura retal e GR, foi observado efeito de momento para todos os outros marcadores de estresse fisiológico e oxidativo. O transporte rodoviário de curta duração, mesmo quando realizado de maneira adequada, gera estresse nos animais. Estímulos potencialmente nocivos no momento prévio ao abate levaram a estresse de maior intensidade que aquele oriundo do transporte. A administração intramuscular de alfa-tocoferol aumentou o status antioxidante total do soro de cordeiros submetidos a transporte rodoviário de curta duração, entretanto não foi capaz de minimizar as alterações decorrentes do estresse fisiológico e oxidativo e de melhorar a qualidade da carne destes animais.

Palavras-chave: Alfa-tocoferol, Cortisol, Estresse, TAS, TBARS.

#### **ABSTRACT**

NUNES, G. R. Biochemical profile, oxidative metabolism and meat quality of lambs subjected to road and treated with vitamin E. [Perfil bioquímico, metabolismo oxidativo e qualidade da carne de cordeiros submetidos ao transporte rodoviário e tratados com vitamina E]. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The present study aimed to evaluate the effects of intramuscular alpha-tocopherol (vitamin E) administration on markers of oxidative and physiological stress, as well characteristics related to meat quality of lambs subjected to road short transport. Twenty-four lambs, Santa Inês and Dorper crossbred, age and average live weight at slaughter of 138 days and 43.6 kg, respectively, were divided into three experimental groups. Each group received an intramuscular application of saline solution or 10 IU or 20 IU of DL-alpha-tocopherol per kg of metabolic body weight at six and three days before transportation. The transportation lasted four hours until the slaughterhouse. After unloading, lambs rested in pen for 19 hours until the time of slaughter. At T0 (immediately prior to boarding and transportation), T1 (immediately after transport and unloading), T2 (three hours after transporting and landing) and T3 (immediately before slaughter) rectal temperature was measured and blood samples were collected by jugular vein puncture for determination of serum urea, creatinine, albumin, total protein, cholesterol and cortisol; plasma concentrations of glucose, beta-hydroxybutyrate (BHB), lactate and non-esterified fatty acids (NEFA); serum activities of aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT) and creatine kinase (CK), erythrocyte and total leukocyte count, ratio neutrophil: lymphocytes, packed cell volume (PCV), erythrocyte activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR), concentration of reduced glutathione (GSH), serum total antioxidant status (TAS) and the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). After slaughter, carcasses were kept for 24 hours under refrigeration at 2 °C and were analyzed for Longissimus Dorsi pH (pH24h) and color (L \*, a \*, b \*), and collected samples for subsequent evaluation of shear force (SF), cooking weight loss (CWL) and products of lipid oxidation after 30 days of freezing (TBARS 30). There was an interaction

between time and treatment for lactate and was observed a linear effect at the time T2, with increased (P = 0.0111) values of this variable in the animals receiving 20 IU of vitamin E. A linear effect of treatment (P = 0.0149) on the TAS values was observed. Deviation from linearity effect for albumin, L \* and b \* were seen. Animals that received 10 IU of vitamin E showed lower concentrations of albumin (P = 0.0447) and higher (P = 0.0042 and P = 0.0082) L \* and b \* values. Except for rectal temperature and GR, moment effect was observed for all other markers of oxidative and physiological stress. The short road transportation, even when done properly, produces stress in animals. Potentially harmful stimuli at the time prior to slaughter led to higher stress intensity than that coming from the transport. Intramuscular administration of alpha-tocopherol increased serum total antioxidant status of lambs subjected to short duration road transport, however was not able to minimize changes arising from physiological and oxidative stress and improve the meat quality of these animals.

Keywords: Alpha-tocopherol. Cortisol. Stress. TAS. TBARS.

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
3	CAPÍTULO 1: MARCADORES DE ESTRESSE FISIOLÓGICO CORDEIROS TRATADOS COM ALFA-TOCOFEROL E SUBMETIDOS TRANSPORTE RODOVIÁRIO DE CURTA DURAÇÃO	S A
3.1	INTRODUÇÃO	21
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.2.1	Animais e protocolo experimental	21
3.2.3	Preparo das amostras de sangue e procedimentos analíticos	23
3.2.4	Análise estatística	23
3.3	RESULTADOS	25
3.4	DISCUSSÃO	30
3.5	CONCLUSÕES	34
4	CAPÍTULO 2: BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO CORDEIROS TRATADOS COM ALFA-TOCOFEROL E SUBMETIDOS	
	TRANSPORTE RODOVIÁRIO DE CURTA DURAÇÃO	
4.1		35
	INTRODUÇÃO	
4.2	INTRODUÇÃO MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.2 4.2.1		36 37
	MATERIAIS E MÉTODOS	36 37 37
4.2.1	MATERIAIS E MÉTODOS  Animais e protocolo experimental	36 37 38
4.2.1 4.2.2	MATERIAIS E MÉTODOS  Animais e protocolo experimental  Preparo das amostras de sangue e procedimentos analíticos	36 37 38
4.2.1 4.2.2 4.2.3	MATERIAIS E MÉTODOS	36 37 38 39
4.2.1 4.2.2 4.2.3 4.3	MATERIAIS E MÉTODOS	36 37 38 39 40
4.2.1 4.2.2 4.2.3 4.3 4.4	MATERIAIS E MÉTODOS	36 37 38 39 40 43

REFER	RÊNCIAS	.61
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	.60
	CONCLUSÕES	
5.4	DISCUSSÃO	. 55
5.3	RESULTADOS	. 54
5.2.3	Análise estatística	. 54
5.2.2	Abate e análises de qualidade da carne	. 53
5.2.1	Animais e protocolo experimental	. 51
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	. 51

# 1 INTRODUÇÃO

O transporte é uma prática inevitável com a qual os animais de produção se deparam ao menos uma vez durante suas vidas (NWE et al., 1996). Em várias regiões do mundo, o transporte rodoviário é a forma mais frequente e economicamente importante de condução de animais, seja para venda, exposição em feiras agropecuárias, atendimento veterinário e, principalmente, para o abate. Dados do IBGE (2011) apontam que, no ano de 2011, o rebanho ovino nacional era composto por 17,6 milhões de cabeças e mesmo num país com dimensões continentais como o Brasil, o transporte rodoviário é a forma predominante de condução de animais.

O transporte é considerado o maior estressor para os animais de produção (KNOWLES; WARRISS, 2000) e pode ter efeitos deletérios para a saúde, bem-estar e também para qualidade da carne destes animais. O impacto do transporte depende não somente da duração e natureza da viagem, mas também de experiências prévias e condições às quais os animais de produção estão expostos (FISHER et al., 2010). Indicadores fisiológicos e comportamentais geralmente são usados para quantificar o estresse e, em casos de animais para corte, características relacionadas à qualidade da carne também são consideradas (TARRANT, 1990).

Na tentativa de amenizar os efeitos deletérios do transporte nos animais de produção, diferentes terapias foram propostas (SCHAEFER; JONES; STANLEY, 1997; PEETERS et al., 2005; ALI; AL-QARAWI; MOUSA, 2006; MINKA et al., 2009; AKTAS et al., 2011). Deve-se ressaltar o crescente interesse pela utilização de vitaminas antioxidantes, com destaque para a vitamina E, que se apresenta como o principal antioxidante lipossolúvel nos sistemas biológicos.

# 2 REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil, assim como em grande parte dos países do mundo, o transporte rodoviário é a forma mais praticada e economicamente mais importante de transporte de animais de produção. Entretanto, é no momento do transporte que ocorrem grande parte dos problemas que prejudicam o bem-estar animal e a qualidade do produto final.

Segundo Knowles (1998), o estresse de transporte pode ser dividido em três categorias: estresse físico; estresse fisiológico e estresse psicológico, apesar de haver sobreposição entre eles. Estressores físicos são aqueles que demandam trabalho físico por parte do animal e incluem o esforço no embarque e desembarque e o esforço requerido para manter a postura e equilíbrio durante o transporte. O estresse fisiológico pode ser medido em termos de desafio fisiológico, pelo grau de inanição e desidratação e também pela extensão da mobilização de reservas corporais para manter o metabolismo ou para superar lesão ou doença. Estresse psicológico é aquele que é percebido pelo animal consciente e, portanto, muito difícil de ser mensurado de maneira objetiva. O estresse psicológico pode ser causado pelo ambiente novo e desconhecido associado aos sons e odores; pela presença de um predador (cão pastor, por exemplo) ou um humano; pelo desejo de comer ou beber; ou pela mistura com animais desconhecidos.

Os diferentes níveis de estresse psicológico determinam a grande variabilidade observada nos resultados obtidos em estudos que tentam quantificar de estresse nos animais de produção durante o manejo e transporte. O fator "novidade" é um estressor muito poderoso. A resposta ao medo em determinada situação é difícil de prever porque depende de experiências prévias do animal quanto à manipulação ou transporte. O manejo que o animal recebe em momentos precoces de sua vida terá efeito em sua resposta fisiológica a estressores durante sua fase adulta (GRANDIN, 1997).

O estresse é um mecanismo de defesa, uma modificação progressiva dos mecanismos fisiológicos, para permitir que o indivíduo responda ao agente estressor. Embora seja um mecanismo de proteção, causa numerosas alterações estruturais e funcionais no organismo e pode aumentar a susceptibilidade a doenças e/ou induzir alterações fisiológicas. A resposta do organismo ao estresse é o

aumento na produção e liberação de hormônios, neurotransmissores e eicosanóides. Por conseguinte, pode provocar alterações em todos os órgãos e sistemas (BISPO; PEREIRA, 1994).

Comparado a outros animais de produção, os ovinos são particularmente mais tolerantes ao transporte rodoviário por apresentarem pernas curtas e, portanto, um centro de gravidade mais baixo. Estes animais são mais estáveis que bovinos durante o transporte, o que se reflete na facilidade com que eles se deitam e levantam durante o transporte e na baixa incidência de quedas durante a viagem (KENT, 1997).

As grandes alterações causadas pelo estresse de transporte podem levar também ao estresse oxidativo, definido como acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são moléculas oxidantes resultantes de processos metabólicos normais e sua formação é limitada fisiologicamente por sistemas antioxidantes endógenos e exógenos (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN, 1993). Embora sejam sinalizadores endógenos envolvidos no controle de processos como apoptose e inflamação (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007), quando ocorre desbalanço entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes, a consequência é o estresse oxidativo (CELI, 2011).

DNA, proteínas e, principalmente, lipídios são alvos naturais das EROs. Os lipídeos são importantes constituintes da membrana celular e quando sofrem dano oxidativo, há o comprometimento da integridade celular em todo organismo animal.

Nos animais cuja criação é voltada para o corte, a oxidação lipídica torna-se uma fonte de perdas econômicas. A oxidação lipídica é uma das maiores causas de deterioração da carne durante seu armazenamento e, além de alterações na coloração, este processo é responsável por alterações em sabor, odor e valor nutricional (MORRISSEY et al., 1994; ATAY et al., 2009). A oxidação lipídica pode resultar em rancidez, deterioração da cor, textura e sabor da carne fresca, congelada e cozida, além de estar diretamente relacionada com a oxidação do pigmento, contudo esta associação não está bem esclarecida. Do ponto de vista da cor da carne, pode ser que radicais produzidos durante a oxidação lipídica atuem diretamente, na oxidação do pigmento, danificando os sistemas de redução do pigmento (LIU et al., 1995). Além disso, a presença de agentes oxidativos resulta no desenvolvimento de sabores estranhos ("off-flavors") devido à oxidação das duplas ligações da gordura, denominada oxidação lipídica (autoxidação) juntamente com

outros processos de degradação da carne armazenada e posteriormente cozida (TROUT, 2003). O processo de degradação lipídica influencia não somente na cor e sabor da carne, mas também em outras características importantes, tais como aroma, capacidade de retenção de água e produção de compostos prejudiciais à saúde humana.

Em sistemas de produção animal, a substância antioxidante mais conhecida é a vitamina E. Vitamina E é o termo utilizado para um grupo de tocoferóis e tocotrienóis dos quais o α-tocoferol possui grande importância por ação antioxidante. Esta vitamina é o principal antioxidante lipossolúvel nos sistemas biológicos, sendo o alfa-tocoferol sua forma biologicamente ativa mais importante (LAUZURICA et al., 2005).

A suplementação dietética com vitamina E aumenta não só quantidade de alfa-tocoferol no plasma (KASAPIDOU et al., 2012) como também a quantidade desta substância em músculos e gordura, neutralizando os radicais livres antes da oxidação lipídica se propagar nos ácidos graxos insaturados nas membranas celulares (LIU; LANARI; SCHAEFER, 1995).

A terapia antioxidante fornece tratamento potencialmente importante e de baixo custo para situações em que pode ocorrer maior produção de EROs (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007), portanto a suplementação intramuscular com vitamina E deve ser considerada quando se busca minimizar os danos causados pelo transporte rodoviário em animais de produção.

.

3 CAPÍTULO 1: MARCADORES DE ESTRESSE FISIOLÓGICO EM CORDEIROS TRATADOS COM ALFA-TOCOFEROL E SUBMETIDOS A TRANSPORTE RODOVIÁRIO DE CURTA DURAÇÃO

# 3.1 INTRODUÇÃO

O transporte de animais de produção combina estressores físicos e psicológicos gerados pelo embarque e desembarque, reagrupamento social, ruídos, vibrações, temperaturas extremas, privação de alimento e água, dentre outros fatores. Estes fatores podem ser estímulos individualmente estressantes, tornandose ainda mais nocivos quando em combinação (GRANDIN, 1997; EARLEY; MURRAY, 2010).

Os animais respondem de forma imediata a mudanças em seu ambiente através de alterações em parâmetros comportamentais e fisiológicos. A identificação de situações estressantes permite que medidas sejam empregadas para evitar o estresse ou, ao menos, minimizar seus danos, promovendo a manutenção da saúde e bem–estar, além do potencial econômico dos animais de produção (FANZIO; FERLAZZO, 2003).

As alterações fisiológicas causadas por estresse influenciam no aumento do catabolismo, condição que pode levar a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), também chamadas de radicais livres (WERNICKI et al., 2006). O emprego de terapias antioxidantes com a finalidade de proteger ou reparar membranas celulares dos danos gerados pelos EROs pode ser uma medida apropriada quando se busca minimizar os efeitos do estresse de transporte nos diferentes sistemas do organismo de animais de produção.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da administração intramuscular de alfa-tocoferol (vitamina E) sobre os marcadores de estresse fisiológico em cordeiros submetidos a transporte rodoviário de curta duração.

#### 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.2.1 Animais e protocolo experimental

Vinte e quatro ovinos machos, hígidos, mestiços das raças Santa Inês e Dorper, não castrados, com idades entre 130 e 145 dias e peso vivo médio de 43,6

kg ao abate foram utilizados. Os animais permaneceram 75 dias confinados em baias coletivas nas dependências do Centro de Pesquisa em Doenças Nutricionais e Metabólicas, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) até o dia do transporte para o abatedouro. Dos 75 dias de confinamento, 15 dias consistiram na adaptação dos animais à dieta; nos 60 dias restantes, os ovinos receberam dieta composta por 80% de concentrado comercial (Tech Ovin Pasto, Socil) e 20% de feno de Tifton 85 (*Cynodon spp*) picado, em quantidade necessária e suficiente para garantir 10% de sobras. A água foi oferecida *ad libitum*. A tabela 1 mostra a composição bromatológica dos alimentos que compuseram a dieta.

Tabela 1 – Composição do feno e do concentrado comercial utilizados durante o período experimental - São Paulo – 2012

Composição do feno					
MS, %	89,42				
PB, %	11,58				
FDN, %	82,74				
Composição do concentrado comercial*					
MS, %	90,38				
PB, %	17,17				
FB, %	10,79				
EE, %	2,49				
EB, kcal/g	4,07				

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FB: fibra bruta; EE: extrato etéreo; EB: energia bruta. \* Vitamina E (mínimo): 8,75 UI/kg, segundo níveis de garantia do fabricante.

Uma semana antes do transporte, de acordo com o ganho de peso no período de confinamento, os cordeiros foram distribuídos em quatro blocos de seis animais. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso com repetição, com três tratamentos: Controle; 10 UI; e 20 UI de vitamina E. Aos seis e três dias antes do transporte, os animais receberam, pela via intramuscular, ou uma aplicação de solução fisiológica (grupo Controle); ou 10 UI; ou 20 UI por quilo de peso metabólico (peso vivo <sup>0,75</sup>) de vitamina E na forma de acetato de DL-alfa-tocoferol (Monovin E<sup>®</sup>, Bravet).

O transporte para o abatedouro teve duração de 4 horas e foi realizado em caminhão específico para este fim. O veículo possuía 3,10 m de comprimento x 2,36 m de largura x 2,20 m de altura, o que resultou numa densidade de 0,30 ovinos por m². O trajeto foi totalmente percorrido em vias e rodovias pavimentadas. A temperatura ambiente e umidade relativa do ar durante o percurso foram registradas por meio do dispositivo EL-USB-2-LCD+ (Lascar Electronics).

Após a chegada ao abatedouro, os animais desembarcaram em curral de espera sem cobertura e com água disponível *ad libitum*, onde permaneceram até o momento do abate.

Nos momentos T0 (imediatamente antes do embarque e transporte); T1 (imediatamente após transporte e desembarque); T2 (três horas após transporte e desembarque) e T3 (imediatamente antes do abate) foram coletadas amostras de sangue por punção da veia jugular.

# 3.2.2 Preparo das amostras de sangue e procedimentos analíticos

As amostras de sangue foram coletadas em tubos a vácuo sem anticoagulante e tubos com EDTA ou fluoreto de Sódio como anticoagulantes.

As amostras de sangue com EDTA foram destinadas a contagem de hemácias e leucócitos totais no analisador hematológico automático modelo ABC Vet, marca ABX®, além da confecção do esfregaço sanguíneo para a contagem diferencial de leucócitos por microscopia e determinação do volume globular (VG). O VG foi determinado a partir da centrifugação a 13000 g por 5 minutos de microcapilares contendo sangue total.

As amostras de sangue com fluoreto de sódio foram centrifugadas a 400 *g* por 5 minutos para separação do plasma, que permaneceu armazenado a -20°C para posterior determinação das concentrações de glicose, beta-hidroxibutirato (BHB), lactato e ácidos graxos não esterificados (AGNE) no analisador bioquímico automático Randox, modelo RX Daytona®, utilizando-se, respectivamente, os kits comerciais GL 3815, RB 1007, LC 3980 e FA 115 da Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, Antrim, Reino Unido).

Os tubos contendo amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugados a 400 g por 10 minutos para separação do soro, que permaneceu armazenado a -20°C para posteriores análises. As concentrações séricas de ureia, creatinina, albumina, proteína total e colesterol e atividade sérica da enzima creatinofosfoquinase (CK) foram determinadas, respectivamente, com os kits comerciais UR 3825, CR 3814, AB 3800, TP 4001, CH 3810 e CK 110 também da Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, Antrim, Reino Unido). A concentração sérica de cortisol foi determinada por radioimunoensaio por meio do kit comercial Coat-a-Count - TKCO5 (Siemens Medical Solution Diagnostics, Los Angeles, CA, EUA).

#### 3.2.3 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa SAS (Versão 9.3, 2010) utilizando o procedimento MIXED, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk, e a busca por "outliers" através do procedimento UNIVARIATE do SAS. Os dados que não atenderam à premissa da normalidade dos resíduos foram submetidos à transformação logarítmica. Transformados ou não, os dados foram submetidos à análise de variância para delineamento em blocos, adicionado do fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diferentes momentos de coleta. O modelo contemplou, como causas de variação, o efeito de tratamento, efeito de momento e efeito de interação momento\*tratamento, como fatores fixos, bem como efeito de bloco e efeito de interação momento\*bloco, como efeitos aleatórios.

O efeito de dose de vitamina E foi avaliado por regressão polinomial, através do uso de polinômios ortogonais, decompondo-se o efeito de tratamento em efeito linear e efeito de desvio da linearidade.

A análise de efeito de tratamento por momento somente foi realizada quando a interação entre efeito de momento e efeito de tratamento foi significativa. Quando o efeito de momento foi verificado, as médias entre os momentos foram comparadas através do teste de Tukey.

No estudo de relação entre duas variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson.

Para todos os testes avaliados considerou-se o nível de significância de 5%.

#### 3.3 RESULTADOS

Os valores médios (mínima-máxima) observados para temperatura ambiente e umidade relativa do ar durante o trajeto rodoviário de 4 horas foram de 27,5°C (25,5-29°C) e 60,1% (56-66%), respectivamente.

Para a temperatura retal dos cordeiros não foram observados efeito de interação entre momento e tratamento, efeito de tratamento e efeito de momento. Os valores encontrados foram de 39,65 °C para o grupo controle; 39,66 °C para o grupo 10 UI e 39,76 °C para o grupo 20 UI.

Nas tabelas 2 e 3, estão apresentados os valores médios, erro padrão da média e probabilidade estatística para os marcadores de estresse fisiológico, em função dos tratamentos.

Tabela 2 – Valores de média da concentração sérica de ureia, creatinina, albumina, proteína total, colesterol e cortisol; concentração plasmática de glicose, beta-hidroxibutirato (BHB), lactato e ácidos graxos não esterificados (AGNE) e atividade sérica da creatinofosfoquinase (CK) nos diferentes tratamentos, com os respectivos erros padrão das médias e probabilidades estatísticas - São Paulo – 2012

Variáveis	Tratamentos			- EPM¹	Efeito <sup>2</sup>		- <b>M</b> 3	T*M <sup>4</sup>
Variavcis	Controle	10 UI	20 UI	L: !*!	L	DL		
Ureia, mmol/L	9,32	8,99	8,93	0,12	NS <sup>5</sup>	NS	0,0012	NS
Creatinina, µmol/L	78,76	81,27	86,30	1,73	NS	NS	0,0002	NS
Albumina, g/L	35,84	34,77	35,78	0,18	NS	0,0447	0,0001	NS
Proteína Total, g/L	63,72	65,44	64,57	0,46	NS	NS	0,0001	NS
Log CK, U/L a 30 °C	4,86	4,73	4,68	0,04	NS	NS	0,0001	NS
Glicose, mmol/L	5,35	5,50	5,48	0,08	NS	NS	0,0001	NS
Lactato, mmol/L	2,18	2,39	2,16	0,15	NS	NS	0,0001	0,0308
BHB, mmol/L	0,48	0,45	0,48	0,02	NS	NS	0,0017	NS
AGNE, µmol/L	459,94	432,66	466,25	52,62	NS	NS	0,0001	NS
Colesterol, mmol/L	1,70	1,66	1,53	0,03	NS	NS	0,0014	NS
Cortisol, µg/dL	1,33	1,31	1,59	0,10	NS	NS	0,0001	NS

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>EPM: Erro padrão da média.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Efeito: Valor de P para o teste de polinômios ortogonais decomposto em efeito linear (L) e efeito de desvio da linearidade (DL).

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>M: Efeito de momento.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>T\*M: Efeito de interação entre momento e tratamento.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>NS: P>0,05.

Não foi observado efeito de interação entre momento e tratamento e efeito de tratamento para as concentrações de ureia, creatinina, proteína total, glicose, BHB, AGNE, colesterol e cortisol e para a atividade de CK. Entretanto, para todas estas variáveis e também para as concentrações de albumina, houve efeito de momento (Tabela 2).

Para a variável lactato, ocorreu efeito de interação entre momento e tratamento, sendo que no momento T2, observou-se efeito linear de tratamento (P= 0,0111). A equação de regressão em T2 foi Y= 1,14 + 0,0321x (R²= 0,26), onde "Y" é a concentração de lactato e "x" é o nível de vitamina E.

Dentre as variáveis abordadas no estudo, o efeito do tratamento com alfatocoferol somente foi observado para as concentrações de albumina. O efeito observado para esta variável foi o de desvio da linearidade, sendo que os animais tratados com 10 UI de vitamina E apresentaram os mínimos valores para as concentrações de albumina. A equação de regressão encontrada para esta variável foi Y= 35,84 - 0,2123x + 0,0146x² (R²= 0,08), onde "Y" é a cromaticidade e "x" é o nível de vitamina E.

Não foram observados efeito de interação entre momento e tratamento e efeito de tratamento para a contagem de hemácias e leucócitos totais, VG e relação neutrófilos:linfócitos. Entretanto, para todas estas variáveis, observou-se efeito de momento (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de média de hemácias, leucócitos totais, relação neutrófilos:linfócitos e volume globular nos diferentes tratamentos, com os respectivos erros padrão das médias e probabilidades estatísticas - São Paulo – 2012

Variáveis	Tratamentos			- EPM¹ -	Efeito <sup>2</sup>		- <b>M</b> 3	<b>T</b> *M <sup>4</sup>
variaveis	Controle	10 UI	20 UI	L: 141	L	DL	141	1 141
Hemácias, x10 <sup>6</sup> /μL	9,07	9,17	9,60	0,09	NS <sup>5</sup>	NS	0,0001	NS
VG, %	35,59	34,44	36,52	0,30	NS	NS	0,0001	NS
Log Leucócitos Totais, x10³/µL	2,02	2,23	2,11	0,02	NS	NS	0,001	NS
Log Relação Neutrófilos:Linfócitos	1,20	1,27	1,26	0,04	NS	NS	0,0001	NS

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>EPM: Erro padrão da média.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Efeito: Valor de P para o teste de polinômios ortogonais decomposto em efeito linear (L) e efeito de desvio da linearidade (DL).

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>M: Efeito de momento.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>T\*M: Efeito de interação entre momento e tratamento.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>NS: P>0,05.

As tabelas 4 e 5 mostram os valores de média geral e erro padrão da média de todas as variáveis abordadas neste estudo, com exceção de albumina e lactato, nos diferentes momentos.

Tabela 4 – Valores de média geral (n=24) e erro padrão da média da concentração sérica de ureia, creatinina, proteína total, colesterol e cortisol; concentração plasmática de glicose, beta-hidroxibutirato (BHB) e ácidos graxos não esterificados (AGNE) e atividade sérica da creatinofosfoquinase (CK) e probabilidades estatísticas nos diferentes momentos - São Paulo – 2012

Variáveis		Momentos <sup>1</sup>						
variaveis	Т0	T1	T2	Т3	Р			
Uréia, mmol/L	9,07 <sup>b</sup>	8,67 <sup>c</sup>	8,84 bc	9,74 <sup>a</sup>	0,0012			
	± 0,23	± 0,23	± 0,20	± 0,21				
Creatinina, µmol/L	75,78 <sup>b</sup>	75,14 <sup>b</sup>	79,45 <sup>b</sup>	98,27 <sup>a</sup>	0,0002			
	± 8,98	± 11,36	± 9,09	± 22,89				
Proteína Total, g/L	61,18 <sup>d</sup>	65,61 <sup>b</sup>	63,97 <sup>c</sup>	67,55 <sup>a</sup>	0,0001			
_	± 0,81	± 0,82	± 0,77	± 0,84				
Log CK, U/L a 30°C	4,39 <sup>c</sup>	4,61 <sup>b</sup>	4,96 <sup>a</sup>	5,08 <sup>a</sup>	0,0001			
	± 0,03	± 0,06	± 0,07	± 0,06				
Glicose, mmol/L	5,05 <sup>c</sup>	5,47 <sup>b</sup>	5,18 <sup>bc</sup>	6,09 <sup>a</sup>	0,0001			
	± 0,07	± 0,16	± 0,09	± 0,18				
BHB, mmol/L	0,83 <sup>a</sup>	0,34 <sup>b</sup>	0,36 <sup>b</sup>	0,36 <sup>b</sup>	0,0017			
	± 0,05	± 0,01	± 0,01	± 0,02				
AGNE, µmol/L	62,83 <sup>b</sup>	162,25 <sup>b</sup>	341,54 <sup>b</sup>	1245,17 <sup>a</sup>	0,0001			
-	± 2,06	± 20,25	± 25,49	± 80,97				
Colesterol, mmol/L	1,59 <sup>b</sup>	1,61 <sup>b</sup>	1,58 <sup>b</sup>	1,75 <sup>a</sup>	0,0014			
	± 0,06	± 0,06	$\pm 0.05$	± 0,06				
Cortisol, µg/dL	0,79 <sup>c</sup>	1,45 <sup>b</sup>	0,87 <sup>c</sup>	2,51 <sup>a</sup>	0,0001			
	± 0,10	± 0,14,	± 0,11	± 0,19				

¹Momentos: T0: imediatamente antes do embarque e transporte; T1: imediatamente após transporte e desembarque; T2: três horas após transporte e desembarque e T3: imediatamente antes do abate. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças (P<0,05) entre os momentos.

Imediatamente após o transporte, a concentração de ureia foi menor (P= 0,0012) que os valores verificados em T0 e sua máxima concentração foi observada em T3. As variáveis creatinina, AGNE e colesterol apresentaram comportamentos semelhantes neste estudo, sendo que em T3 observamos suas máximas concentrações. Em T0 observamos a maior concentração de BHB (P= 0,0017). A concentração sérica de proteína total foi mais elevada (P=0,0001) em T1 quando comparado ao momento basal e três horas após o transporte, esta concentração

diminuiu em relação a T1, porém ainda mantinha valor mais elevado que aquele observado em T0. Entretanto, foi em T3 que a concentração de albumina apresentou seu maior valor. A atividade da CK, em log, elevou-se imediatamente após o transporte (P=0,0001). Em T2 e T3, a atividade da CK apresentou valores ainda mais elevados quando comparados a T1 e T0. A concentração de glicose elevou-se (P=0,0001) imediatamente após o transporte e alcançou sua máxima concentração em T3. Em T1, a concentração de cortisol mostrou-se elevada (P=0,0001) em relação a T0. Em T2, após três horas de descanso, estes valores retornaram aos níveis basais, alcançando seu máximo valor em T3.

Tabela 5 – Valores de média geral (n=24) e erro padrão da média de hemácias, leucócitos totais, relação neutrófilos:linfócitos, volume globular e probabilidades estatísticas nos diferentes momentos - São Paulo – 2012

Variáveis		- Р			
variaveis	T0	T1	T2	Т3	• Р
Hemácias, x10 <sup>6</sup> /µL	8,92 <sup>b</sup>	9,27 <sup>b</sup>	9,01 <sup>b</sup>	9,91 <sup>a</sup>	0,0001
	± 0,15	± 0,15	± 0,17	± 0,17	
Volume Globular, %	33,90 <sup>c</sup>	36,00 <sup>b</sup>	34,20 <sup>c</sup>	37,96 <sup>a</sup>	0,0001
	± 0,50	± 0,49	± 0,56	± 0,51	
Log Leucócitos Totais, x10³/µL	2,05 <sup>b</sup>	2,16 <sup>a</sup>	2,22 a	2,04 <sup>b</sup>	0,001
	± 0,04	± 0,05	± 0,05	± 0,03	
Log Relação Neutrófilos:Linfócitos	0,94 <sup>b</sup>	1,46 <sup>a</sup>	1,33 <sup>a</sup>	1,28 <sup>a</sup>	0,0001
	± 0,32	± 0,46	± 0,35	± 0,32	

¹Momentos: T0: imediatamente antes do embarque e transporte; T1: imediatamente após transporte e desembarque; T2: três horas após transporte e desembarque e T3: imediatamente antes do abate. Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças (P<0,05) entre os momentos.

Em relação aos valores basais, o número de hemácias somente se elevou (P=0,0001) em T3. Imediatamente após o transporte, observamos elevação nos valores VG (P=0,0001). Três horas após o desembarque dos animais, os valores de VG voltaram aos níveis basais, porém no momento pré-abate observamos seus maiores valores. O número de leucócitos totais, em log, se elevou (P=0,001) imediatamente após o transporte e desembarque dos animais, permanecendo elevado em T2, contudo retornou aos valores basais em T3. A relação neutrófilos:linfócitos, em log, foi menor (P=0,0001) em T0 quando comparada a T1, T2 e T3.

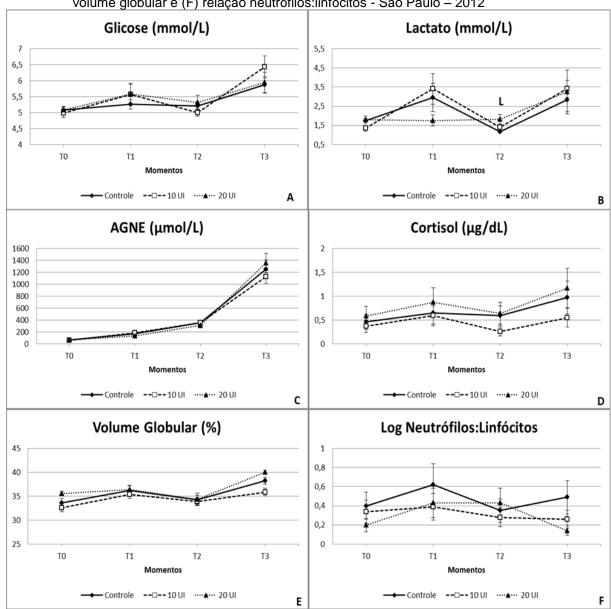
Os resultados do estudo das relações entre cortisol e as variáveis glicose, AGNE e VG estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 – Coeficiente de correlação de Pearson (r) e probabilidades estatísticas no estudo da relação entre cortisol e as variáveis glicose, ácidos graxos não esterificados (AGNE) e volume globular (VG) - São Paulo – 2012

	Glicose	AGNE	VG
Cortisol	0,5024	0,7466	0,5879
	P< 0,0001	P< 0,0001	P< 0,0001

Na figura 1 estão representados os gráficos das concentrações plasmáticas de glicose, lactato e AGNE; concentrações séricas de cortisol; volume globular e relação neutrófilos:linfócitos nos diferentes tratamentos, em função dos momentos.

Figura 1 – Marcadores fisiológicos de estresse nos diferentes tratamentos, em função dos momentos, em cordeiros tratados com alfa-tocoferol e submetidos a transporte a transporte rodoviário de curta duração. (A): concentração plasmática de glicose; (B) concentração plasmática de lactato; (C) concentração plasmática de AGNE; (D) concentração sérica de cortisol; (E) volume globular e (F) relação neutrófilos:linfócitos - São Paulo – 2012



#### 3.4 DISCUSSÃO

A temperatura retal não foi influenciada por tratamento ou momento de coleta e, nos três grupos experimentais, manteve-se dentro dos valores de referência (39,5 a 40,5°C) estabelecidos para cordeiros (PUGH, 2002). Trabalhando com vitaminas antioxidantes, Aktas et al. (2011) não verificaram influência da administração intramuscular da associação vitamínica ADE ou de vitamina E + selênio sobre a temperatura de bovinos submetidos a transporte rodoviário durante 22 horas.

Em situações de estresse, ocorre ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, resultando em aumento dos níveis circulantes de cortisol (NWE et al., 1996). Em resposta ao transporte, observamos aumento do cortisol em T1 e após três horas de descanso, em T2, os níveis desta variável já haviam retornado aos valores basais. Kannan et al. (2000) verificaram que após uma hora de descanso, os níveis de cortisol mostravam-se bastante diminuídos em relação aqueles observados imediatamente pós-transporte rodoviário de caprinos. Em T3, as concentrações de cortisol apresentaram elevação de grande magnitude em resposta a algum estímulo estressor nos momentos prévios ao abate. As concentrações de cortisol variam de acordo com ritmo circadiano, apresentando os valores mais altos pela manhã e mais baixos no período da tarde (ZIMERMAN et al., 2011). As coletas nos momentos T0 e T3 ocorreram no período da manhã, portanto o aumento nas concentrações de cortisol no pré-abate devem ser creditadas a um estímulo estressor e não ao ritmo circadiano.

Flutuações nas concentrações de cortisol e glicose estão intimamente relacionadas ao funcionamento da adrenal (NWE et al., 1996). Em condições estressantes, os glicocorticoides plasmáticos estão aumentados e a síntese de glicose acelerada, primariamente pela quebra de glicogênio hepático. Kannan et al. (2000) notou que em caprinos, a elevação de glicose foi precedida por elevação da concentração de cortisol em resposta ao stress. Em todos os momentos deste estudo, a concentração de glicose foi maior que os valores de referência de 2,78 – 4,44 mmol/L estabelecidos por Kaneko et al. (1997). Observamos que em T1 houve aumento da glicemia como resposta ao estresse gerado causado pelo transporte. Em T3 observamos que, em paralelo ao aumento dos valores de cortisol, ocorreu também o pico de máximo de glicose. Aktas et al. (2011) verificaram que a

concentração de glicose aumentou após o transporte em todos os grupos de bovinos, porém no grupo que recebeu o complexo vitamínico ADE a glicemia foi maior que nos grupos que não receberam suplementação ou receberam vitamina E + selênio. No presente estudo, a relação positiva moderada entre as variáveis cortisol e glicose reforça o fato das variações nas concentrações desta última serem oriundas de estímulos estressores.

As concentrações séricas de ureia e creatinina podem aumentar durante situações estressantes devido ao catabolismo proteico e vasoespasmo renal causados pela liberação de catecolaminas e cortisol (FINCO, 1997; KNOWLES; WARRIS, 2000). Em todos os momentos de coleta, as concentrações de ureia e creatinina mostraram-se, respectivamente, elevadas e diminuídas em relação aos valores de referência estabelecidos para a espécie (KANEKO et al., 1997). Em relação aos valores observados em T0, a concentração de ureia diminuiu imediatamente após o transporte e apresentou valor máximo em T3, enquanto a concentração de creatinina não se alterou com o transporte, apresentando seu valor máximo também em T3. Estes comportamentos levam a crer que o transporte propriamente dito não causou estas alterações, e sim algum fator relacionado ao período de descanso pré-abate. Bórnez, Linares e Vergara (2009) não observaram alteração nas concentrações de ureia imediatamente após transporte rodoviário de cordeiros, porém depois quinze horas de descanso pré-abate com privação de alimento, concentrações desta variável estavam elevadas. Em relação às concentrações de creatinina, estes pesquisadores observaram seu aumento logo após o transporte e também depois do período de descanso pré-abate.

De acordo com Kaneko et al. (1997), o cortisol causa diminuição na concentração de proteína total devido ao seu efeito catabólico. Entretanto, Broom (2003) refere que em situações de estresse de transporte os valores de proteína total encontram-se aumentados pela privação de água. No presente estudo, observamos que as concentrações de proteína total se elevaram imediatamente após o transporte e diminuíram em T3, depois que os animais tiveram acesso a fonte de água, entretanto ainda apresentavam valores elevados em relação a T0. Após o período de descanso pré-abate, os valores de proteína total foram máximos, mesmo havendo fonte de água potável no curral de espera. Apesar das concentrações de proteína total se apresentarem dentro dos valores de referência estabelecidos por Kaneko et al. (1997) para a espécie ovina em todos os momentos

avaliados neste estudo, é provável que os cordeiros apresentassem algum grau de desidratação por não ingerirem adequada quantidade de água. Segundo Tádich et al. (2009), ovinos não ingerem água de fontes desconhecidas.

A enzima CK é um marcador de atividade ou dano muscular (EARLEY; MURRAY, 2010). Foi observado aumento da atividade de CK imediatamente após o transporte, provavelmente relacionado ao esforço físico realizado pelos animais durante os procedimentos de embarque e desembarque e da manutenção da postura durante o movimento do caminhão (DE LA FUENTE et al., 2012). Somente no momento T2, ou seja, três horas após o desembarque dos animais foi observada a maior atividade de CK, que permaneceu elevada mesmo após o descanso préabate. Kannan et al. (2000) também verificaram que existe um intervalo de tempo após a finalização do transporte para que sejam observados os maiores valores de CK. Estes pesquisadores verificaram atividade máxima de CK somente depois uma a duas horas do desembarque dos caprinos. Embora fosse esperado efeito da administração de vitamina E sobre a atividade de CK, o mesmo não ocorreu. Nockels, Odde e Craig (1996) observaram que em simulação de estresse com a administração de ACTH e epinefrina, embora todos os animais apresentassem aumento de CK, a amplitude da elevação desta enzima foi menor nas novilhas suplementadas com vitamina E. Este benefício foi creditado à função antioxidante da vitamina E, que auxilia na manutenção da integridade das membranas das células musculares ao reduzir lipoperoxidação.

Assim como a atividade de CK, as concentrações plasmáticas de lactato se elevam quando há atividade muscular excessiva. O consumo do glicogênio muscular, como resultado de esforço muscular excessivo ou liberação de catecolaminas, leva a produção de grandes quantidades de ácido lático que será lançado na corrente sanguínea. Embora observado efeito de tratamento em T2 para o lactato, este não se mostrou benéfico, já que os animais que receberam a vitamina E apresentaram maiores concentrações de lactato que o grupo controle.

Em relação ao metabolismo lipídico, o cortisol tem como efeitos o aumento no catabolismo de colesterol e aumento nas concentrações de AGNE (NAFIZI et al., 2003). Observamos que as concentrações de colesterol e AGNE nos momentos T1 e T2 permaneceram iguais aos níveis basais, porém em T3 houve uma marcada elevação destas concentrações, de modo paralelo à elevação no cortisol. O aumento em AGNE é também relacionado à privação de alimento (BROOM, 2003). Kannan et

al. (2003) observaram aumento de AGNE em caprinos mantidos em repouso ou transportados durante duas horas, sendo os dois grupos mantidos sob privação de alimento durante doze horas. Entretanto, a intensidade da elevação de AGNE no grupo de caprinos transportados foi maior que naquele mantido em repouso. A ausência de elevação de BHB, um indicador de jejum prolongado, em T3 e a presença de relação forte positiva entre AGNE e cortisol ao longo do estudo, levam a crer que as alterações observadas em T3 são oriundas de estresse e não somente de jejum prolongado.

Aumento nas concentrações de cortisol pode levar a contração esplênica, refletindo em elevação na contagem de hemácias e nos valores de VG. Em T1, observamos aumento de VG em resposta ao estresse causado pelo transporte, porém em T2, estes valores já haviam retornado aos níveis basais. Assim como para as concentrações de cortisol, observamos valores máximos de hemácias e VG em T3, porém ainda dentro dos valores de referência para a espécie (BYERS; KRAMER, 2010). A relação moderada positiva entre cortisol e VG aumenta possibilidade de que as variações nas concentrações desta última sejam oriundas de estímulos estressores e não de desidratação.

O aumento nos níveis circulantes de cortisol frequentemente causa alteração no leucograma de ruminantes, sendo esta decorrente do aumento no número de neutrófilos e diminuição nos linfócitos (TORNQUIST; RIGAS, 2010). Observamos no presente estudo que os valores de leucócitos totais se elevaram imediatamente após o transporte e somente retornaram aos níveis basais após 19 horas de descanso, porém em todos os momentos esta variável manteve seus valores no intervalo de referência descrito para a espécie ovina (BYERS; KRAMER, 2010). Em situações de estresse, quando há aumento de neutrófilos e diminuição de linfócitos, a relação entre estas células fica alterada, alcançando valores superiores a 1,00 (TORNQUIST; RIGAS, 2010). No momento T0, o valor observado para a relação neutrófilos:linfócitos foi de 1,70 e, imediatamente após o transporte, esta relação subiu para 3,74, permanecendo elevada nos momentos restantes. Apesar da relação neutrófilos:linfócitos apresentar valor acima de 1,00 antes mesmo do transporte, a magnitude da elevação desta relação imediatamente após o transporte deixa bastante claro a forte influência da liberação de glicocorticoides.

Diante do cenário apresentado, é bastante improvável que somente a privação de alimento durante o período de descanso pré-abate tenha ocasionado as

alterações observadas em T3. Gáal et al. (1993) observaram diminuição nas concentrações de glicose e elevação das concentrações de AGNE, colesterol e ureia em ovinos submetidos a jejum alimentar de 12 horas, porém não mensurou o cortisol.

Duas horas antes da coleta no momento T3, os animais ficaram expostos a uma chuva de grande magnitude (ventos de 16 km/h e taxa da chuva de 43 mm/h), pois o curral de espera onde estavam alojados era desprovido de cobertura. Além disso, no momento T3, não foi possível isolar os animais dos estímulos estressores inerentes à espera numa linha de abate, mesmo que esta apresentasse caráter experimental. Estas informações e os dados apresentados ao longo deste estudo indicam que as alterações nos marcadores fisiológicos estão mais relacionadas a estímulos estressores do que ao jejum alimentar propriamente dito.

### 3.5 CONCLUSÕES

- O transporte causou estresse fisiológico nos cordeiros.
- Estímulos estressores no momento pré-abate causaram estresse fisiológico de maior magnitude que aquele gerado no transporte.
- A administração intramuscular de vitamina E somente teve efeito sobre as concentrações de lactato, no momento T2, e concentrações de albumina.
- Os efeitos de tratamento observados para as concentrações de lactato, no momento T2, e para as concentrações de albumina não refletiram benefícios esperados quando da suplementação com vitamina E.

4 CAPÍTULO 2: BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CORDEIROS TRATADOS COM ALFA-TOCOFEROL E SUBMETIDOS A TRANSPORTE RODOVIÁRIO DE CURTA DURAÇÃO

# 4.1 INTRODUÇÃO

Manejo, transporte, embarque e desembarque, além da privação de alimentos antes do abate são práticas inevitáveis que podem influenciar não só a rentabilidade do produto final, mas também o bem-estar dos animais de produção (KANNAN et al., 2000). O estresse gerado pelo transporte, mesmo aquele realizado de maneira adequada, pode levar a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), também chamadas de radicais livres. As EROs são moléculas oxidantes resultantes de processos metabólicos normais e sua formação é limitada fisiologicamente por sistemas antioxidantes endógenos e exógenos (MILLER; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA; MADSEN, 1993). Embora sejam sinalizadores endógenos envolvidos no controle de processos como apoptose e inflamação (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007), quando ocorre desbalanço entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes, a consequência é o estresse oxidativo (CELI, 2011).

Nestas condições o DNA, proteínas e, principalmente, lipídios são alvos naturais de oxidação. Quando estes últimos sofrem dano oxidativo, por serem importantes constituintes da membrana celular, pode haver grande comprometimento da integridade das células (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007).

As formas de minimizar ou evitar o estresse oxidativo são a redução na geração das substâncias oxidantes ou então o aumento das substâncias antioxidantes. Estas últimas são compostas pelo sistema antioxidante interno, do qual fazem parte enzimas e proteínas, e pelos antioxidantes exógenos, normalmente provenientes da dieta. Dentre os antioxidantes exógenos, destacam-se as vitaminas, das quais os tocoferóis (vitamina E) são considerados eficientes inibidores da peroxidação de lipídios *in vivo* (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A terapia antioxidante fornece tratamento potencialmente importante e de baixo custo para distúrbios relacionados ao estresse oxidativo (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007). Estudos demostram a eficácia da suplementação oral de ovinos com vitamina E sobre os biomarcadores de estresse oxidativo (SGORLON et al., 2005; BODAS et al., 2011), porém pouco se sabe sobre sua suplementação parenteral preventiva, principalmente, em situações reais de estresse como no transporte para o abatedouro.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da administração intramuscular de alfa-tocoferol (vitamina E) sobre os biomarcadores de estresse oxidativo em cordeiros submetidos a transporte rodoviário de curta duração.

#### 4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.2.1 Animais e protocolo experimental

Vinte e quatro ovinos machos, hígidos, mestiços das raças Santa Inês e Dorper, não castrados, com idades entre 130 e 145 dias e peso vivo médio de 43,6 kg ao abate foram utilizados. Os animais permaneceram 75 dias confinados em baias coletivas nas dependências do Centro de Pesquisa em Doenças Nutricionais e Metabólicas, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) até o momento do transporte para o abatedouro. Dos 75 dias de confinamento, 15 dias consistiram na adaptação dos animais à dieta; nos 60 dias restantes, os ovinos receberam dieta composta por 80% de concentrado comercial (Tech Ovin Pasto, Socil) e 20% de feno de Tifton 85 (*Cynodon spp*) picado, em quantidade necessária e suficiente para garantir 10% de sobras. A água foi oferecida *ad libitum*. A tabela 7 mostra a composição bromatológica dos alimentos utilizados.

Tabela 7 – Composição do feno e do concentrado comercial utilizados durante o período experimental - São Paulo – 2012

Composição do feno					
MS, %	89,42				
PB, %	11,58				
FDN, %	82,74				
Composição do concentrado comercial*					
MS, %	90,38				
PB, %	17,17				
FB, %	10,79				
EE, %	2,49				
EB, kcal/g	4,07				

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FB: fibra bruta; EE: extrato etéreo; EB: energia bruta. \* Vitamina E (mínimo): 8,75 UI/kg, segundo níveis de garantia do fabricante.

Uma semana antes do transporte, de acordo com o ganho de peso no período de confinamento, os cordeiros foram distribuídos em quatro blocos de seis animais. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso com repetição, com três tratamentos: Controle; 10 UI; e 20 UI de vitamina E. Aos seis e três dias antes do transporte, os animais receberam, pela via intramuscular, ou uma aplicação de solução fisiológica (grupo Controle); ou 10 UI; ou 20 UI por quilo de peso metabólico (peso vivo <sup>0,75</sup>) de vitamina E na forma de acetato de DL-alfa-tocoferol (Monovin E<sup>®</sup>, Bravet).

O transporte para o abatedouro teve duração de 4 horas e foi realizado em caminhão específico para este fim. O veículo possuía 3,10 m de comprimento x 2,36 m de largura x 2,20 m de altura, o que resultou numa densidade de 0,30 ovinos por m². O trajeto foi totalmente percorrido em vias e rodovias pavimentadas. A temperatura ambiente e umidade relativa do ar durante o percurso foram registradas por meio do dispositivo EL-USB-2-LCD+ (Lascar Electronics®).

Após a chegada ao abatedouro, os animais desembarcaram em curral de espera sem cobertura e com água disponível ad libitum, onde permaneceram até o momento do abate.

Nos momentos T0 (imediatamente antes do embarque e transporte); T1 (imediatamente após transporte e desembarque); T2 (três horas após transporte e desembarque) e T3 (imediatamente antes do abate) foram coletadas amostras de sangue por punção da veia jugular.

#### 4.2.2 Preparo das amostras de sangue e procedimentos analíticos

As amostras de sangue foram coletadas em tubos a vácuo sem anticoagulante e tubos com EDTA ou heparina de lítio como anticoagulantes.

A concentração da glutationa reduzida (GSH) foi determinada por método colorimétrico a partir de amostras de sangue total obtidas nos tubos de coleta com EDTA (BEUTLER; DURON; KELLY, 1963).

As amostras de sangue com heparina de lítio foram centrifugadas a 1270 g por 10 minutos a 4°C para separação do plasma, que permaneceu armazenado a -

80°C para posterior análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por meio do TBARS Assay Kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EUA). As hemácias sedimentadas resultantes desta centrifugação foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada. Entre as lavagens, ocorreram duas centrifugações a 458 g por 10 minutos a 4°C, com aceleração e parada lentas. Ao final destes procedimentos, duas alíquotas de concentrado de hemácias foram armazenadas a -80°C, por período máximo de 30 dias, para posterior determinação das atividades eritrocitárias da superóxido dismutase (SOD), glutationa redutase (GR) e glutationa peroxidase (GPx) no analisador automático Randox, modelo RX Daytona®, utilizando-se, respectivamente, os kits SD 125, GR 2306 e RS 505 da Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, Antrim, Reino Unido).

A determinação do status antioxidante total (TAS) do soro foi realizada por meio do kit NX 2332 da Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, Antrim, Reino Unido) com amostras armazenadas, por período máximo de 30 dias, a -80°C após centrifugação a 400 g por 10 minutos dos tubos sem anticoagulante.

#### 4.2.3 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa SAS (Versão 9.3, 2010) utilizando o procedimento MIXED, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk, e a busca por "outliers" através do procedimento UNIVARIATE do SAS. Os dados foram submetidos à análise de variância para delineamento em blocos, adicionado do fator medidas repetidas no tempo, referentes aos diferentes momentos de coleta. O modelo contemplou, como causas de variação, o efeito de tratamento, efeito de momento e efeito de interação momento\*tratamento, como fatores fixos, bem como efeito de bloco e efeito de interação momento\*bloco, como efeitos aleatórios.

O efeito de dose de vitamina E foi avaliado por regressão polinomial, através do uso de polinômios ortogonais, decompondo-se o efeito de tratamento em efeito linear e efeito de desvio da linearidade.

A análise de efeito de tratamento por momento somente foi realizada quando a interação entre efeito de momento e efeito de tratamento foi significativa. Quando o efeito de momento foi verificado, as médias entre os momentos foram comparadas através do teste de Tukey.

No estudo de relação entre duas variáveis foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson.

Para todos os testes avaliados considerou-se o nível de significância de 5%.

### 4.3 RESULTADOS

Durante o trajeto rodoviário de 4 horas, a temperatura ambiente média foi de 27,5°C, com mínima e máxima de 25,5 e 29,0°C, respectivamente, e a umidade média foi de 60%, com 56 e 66% de valores mínimo e máximo, respectivamente.

Na tabela 8 estão apresentados os valores de média, erro padrão da média e probabilidade estatística para os biomarcadores de estresse oxidativo, em função dos tratamentos.

Tabela 8 – Valores de média de atividade eritrocitária da superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR), concentração de glutationa reduzida (GSH), status antioxidante total do soro (TAS) e concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos diferentes tratamentos, com os respectivos erros padrão das médias e probabilidades estatísticas - São Paulo - 2012

Variáveis	Tratamentos			EPM <sup>1</sup>	Efeito <sup>2</sup>		М³	T*M <sup>4</sup>
	Controle	10 UI	20 UI	L1 1V1	L	DL	141	
SOD, U/g Hb	2519,65	2461,79	2354,69	31,88	NS <sup>5</sup>	NS	0,0018	NS
GPx, U/g Hb	1144,85	1164,59	1130,21	9,23	NS	NS	0,0001	NS
GR, U/g Hb	1,87	1,99	2,01	0,06	NS	NS	NS	NS
GSH, mg/dL	27,25	27,79	29,92	0,55	NS	NS	0,0001	NS
TAS, mmol/L	1,09	1,13	1,18	0,02	0,0149	NS	0,0001	NS
TBARS, µM MDA	8,20	7,73	7,73	0,26	NS	NS	0,0001	NS

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>EPM: Erro padrão da média.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Efeito: Valor de P para o teste de polinômios ortogonais decomposto em efeito linear (L) e efeito de desvio da linearidade (DL).

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>M: Efeito de momento.

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup>T\*M: Efeito de interação entre momento e tratamento.

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup>NS: P>0,05.

Não foi observado efeito de interação entre momento e tratamento para os biomarcadores de estresse oxidativo apresentados neste estudo. O efeito do tratamento com vitamina E somente foi verificado no TAS. Os valores de TAS aumentaram linearmente com a administração intramuscular de alfa-tocoferol. No entanto, para todas as outras variáveis, com exceção da GR, verificou-se efeito de momento (Tabela 8).

A tabela 9 mostra os valores de média geral e erro padrão da média da atividade eritrocitária da superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR), concentração de glutationa reduzida (GSH), status antioxidante total do soro (TAS) e concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos diferentes momentos.

Tabela 9 – Valores de média geral (n=24) e erro padrão da média da atividade eritrocitária da superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR), concentração de glutationa reduzida (GSH), status antioxidante total do soro (TAS) e concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e probabilidades estatísticas nos diferentes momentos - São Paulo – 2012

Variáveis		P			
variaveis	ТО	T1	T2	Т3	Г
SOD, U/g Hb	2311,33 <sup>b</sup>	2469,51 <sup>ab</sup>	2539,28 <sup>a</sup>	2474,46 <sup>a</sup>	0,0018
, G	± 75,74	± 56,30	± 59,54	± 55,05	
GPx, U/g Hb	1205,82 <sup>a</sup>	1183,48 <sup>a</sup>	1099,74 <sup>b</sup>	1097,30 <sup>b</sup>	0,0001
. •	± 16,32	± 17,95	± 13,97	± 14,50	
GR, U/g Hb	1,93	2,03	1,85	2,01	NS <sup>2</sup>
	± 0,08	± 0,17	± 0,13	± 0,12	
GSH, mg/dL	28,80 <sup>b</sup>	27,80 <sup>b</sup>	25,42 <sup>c</sup>	31,31 <sup>a</sup>	0,0001
_	± 1,05	± 0,94	± 1,00	± 1,10	
TAS, mmol/L	1,11 <sup>b</sup>	1,32 <sup>a</sup>	0,92 <sup>c</sup>	1,18 <sup>b</sup>	0,0001
	± 0,04	± 0,01	± 0,04	± 0,03	
TBARS, µM MDA	7,12 <sup>b</sup>	7,29 <sup>b</sup>	7,19 <sup>b</sup>	9,85 <sup>a</sup>	0,0001
• •	± 0,46	± 0,41	± 0,37	± 0,63	

<sup>1</sup>Momentos: T0: imediatamente antes do embarque e transporte; T1: imediatamente após transporte e desembarque; T2: três horas após transporte e desembarque e T3: imediatamente antes do abate. <sup>2</sup>NS: P>0.05.

Letras minúsculas distintas na mesma linha indicam diferenças (P<0,05) entre os momentos.

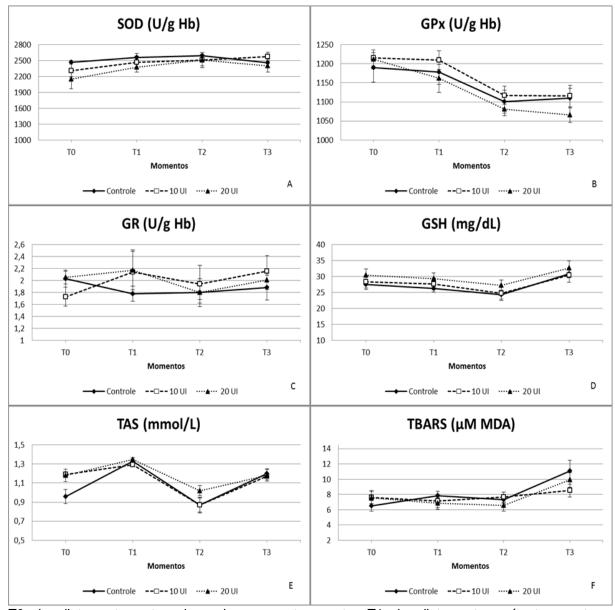
Houve elevação (P= 0,0018) da atividade eritrocitária da SOD nos momentos T2 e T3 em relação ao valor basal, observado no momento prévio ao transporte. Em relação à atividade eritrocitária da GPx, verificou-se comportamento oposto, pois três horas após o transporte e imediatamente antes do abate, a atividade da GPx foi

menor (P=0,0001) que nos momentos T0 e T1. A atividade eritrocitária da GR não foi afetada (P=0,5352) pelo momento de coleta. A concentração da GSH diminuiu (P= 0,0001) três horas após o transporte. Entretanto, sua máxima concentração foi atingida imediatamente antes do abate. O TAS teve maiores e menores valores (P= 0,0001) em T1 e T2, respectivamente. Imediatamente antes do abate, os valores retornaram aos teores basais. A maior concentração de TBARS (P=0,0001) foi observada imediatamente antes do abate.

Verificou-se relação negativa fraca (r= - 0,212; P= 0,038) entre as atividades eritrocitárias da SOD e GPx,

Na figura 2 estão representados os gráficos dos biomarcadores de estresse oxidativo avaliados neste estudo nos diferentes tratamentos, em função dos momentos.

Figura 2 – Biomarcadores de estresse oxidativo nos diferentes tratamentos, em função dos momentos, em cordeiros tratados com alfa-tocoferol e submetidos a transporte rodoviário de curta duração. (A): atividade eritrocitária da superóxido dismutase; (B) atividade eritrocitária da glutationa peroxidase; (C) atividade eritrocitária da glutationa redutase; (D) concentração de glutationa reduzida; (E) status antioxidante total do soro e (F) concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico - São Paulo – 2012



T0: imediatamente antes do embarque e transporte; T1: imediatamente após transporte e desembarque; T2: três horas após transporte e desembarque e T3: imediatamente antes do abate.

#### 4.4 DISCUSSÃO

A SOD é a enzima responsável por catalisar a dismutação do radical ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, sendo considerada a primeira

defesa contra as EROs (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; CELI, 2011). O peróxido de hidrogênio formado nesta reação é extremamente tóxico para as membranas celulares (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006) e sua remoção é catalisada pelas enzimas catalase e GPx, sendo que esta última utiliza a GSH como substrato para a reação (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007).

Em relação aos valores basais (T0), a atividade da SOD mostrou-se significativamente aumentada em T2 e T3. Por se tratar de uma defesa de primeira ordem, variações na atividade da SOD podem estar refletindo uma perturbação na homeostase do sistema antioxidante no organismo dos cordeiros, provavelmente, causada pela produção de EROs no transporte e momento pré-abate. Observamos também que a atividade da SOD se manteve constante nos momentos T1, T2 e T3, possivelmente, pelo fato do concentrado comercial fornecido para os animais durante o experimento apresentar quantidade adequada de zinco, cobre e manganês para sustentar a síntese endógena da SOD (CELI; DI TRANA; QUARANTANA, 2008).

Em todos os momentos avaliados, os valores da atividade da SOD mostraram-se superiores ao intervalo de referência de 948,65 a 1011,50 U/g Hb, estabelecido por Nazifi et al. (2010) para ovinos adultos saudáveis.

Quando a atividade da SOD está aumentada, a produção de peróxidos de hidrogênio também se eleva e, supostamente, deveria ser observado elevação simultânea nas atividades da catalase e da GPx, além de aumento na disponibilidade da GSH (CELI, 2011).

No presente estudo, observamos que a atividade da GPx em T1 permaneceu semelhante aos valores basais, porém mostrou-se diminuída nos momentos T2 e T3. Verificou-se relação negativa fraca (r= - 0,212; P= 0,038) entre as atividades da SOD e GPx, o que reforça ainda mais o caráter contraditório de seus comportamentos. Mesmo quando a atividade da GPx não apresenta o comportamento esperado, o organismo pode se defender do dano oxidativo por outras rotas como, por exemplo, pela catalase (DRÖGE, 2002). Neste estudo a atividade da catalase não foi avaliada, porém a avaliação do comportamento da GSH aponta que a dismutação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água foi realizada.

A GSH tem importante papel na proteção das células contra o dano oxidativo, agindo como substrato e cofator da GPx, além de também reagir diretamente contra

o peróxido de hidrogênio em reação catalisada pela glutationa oxidase (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008; CELI, 2010). A GPx catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em água a partir de duas moléculas de GSH, gerando, nesta reação, uma molécula de GSSG (glutationa oxidada). A GSSG é, então, reduzida pela GR, regenerando a GSH a partir do NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida) (JORDÃO JR. et al., 1998; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG e depleção de GSH (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), sendo a relação GSH/GSSG uma ferramenta importante na avaliação da dinâmica antioxidante.

Apesar da GSSG não ter sido mensurada neste estudo, observamos que em T2 houve clara depleção da GSH. Ainda em T2, podemos observar que a diminuição nas concentrações da GSH se deu em paralelo à inibição da atividade da GPx. Podemos inferir que a diminuição de seu substrato, no caso a GSH, foi o motivo para a inibição da GPx em T2. Entretanto, em T3 as concentrações de GSH se elevaram a valores acima dos basais, porém a atividade da GPx não tem o mesmo comportamento, e sua atividade permaneceu igual àquela observada em T2.

A atividade da GR não foi afetada pelos momentos de coleta, o que prejudica ainda mais a compreensão dos comportamentos da GSH e GPx na ausência da determinação de GSSG. Nota-se que no intervalo entre T2 e T3 houve regeneração da GSH. É provável que com a adoção de ao menos mais um ponto de coleta entre T2 e T3 fosse possível observar o efeito de momento para a atividade da GR.

A determinação do status antioxidante total considera a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes no plasma ou soro, fornecendo, em uma única análise, informações relevantes e que podem efetivamente descrever o equilíbrio dinâmico entre pró-oxidantes e antioxidantes no organismo (GHISELLI et al., 2000; CELI, 2011). A análise da capacidade antioxidante do soro foi uma ferramenta útil na avaliação do estresse de transporte em bezerros (PREGEL et al., 2005) e pode ser utilizada na avaliação do efeito de tratamentos antioxidantes, principalmente, quando os resultados são expressos como mudanças em relação aos valores basais (GHISELLI et al., 2000).

O TAS foi a única variável do presente estudo influenciada pela aplicação da vitamina E pela via intramuscular. O efeito observado foi linear: quanto maior a dose de vitamina E, melhor o status antioxidante total dos cordeiros. Ao contrário do que relatam alguns autores (PREGEL et al., 2005; BODAS et al., 2011), observamos que

o TAS apresentou maiores e menores concentrações imediatamente (T1) e três horas após o transporte (T2), respectivamente. Pregel et al. (2005) verificaram que a capacidade antioxidante do soro de bovinos transportados durante cinco horas foi menor imediatamente após ao transporte, comparado aos valores obtidos após dois meses de descanso. Bodas et al. (2011) verificaram que, em cordeiros, os valores de TAS diminuíram imediatamente após transporte de quatro horas e aumentaram após quatro horas de descanso.

A interpretação de mudanças no status antioxidante total do soro depende das condições sob as quais este status é determinado. O aumento nos valores de TAS não é, necessariamente, uma condição desejável se isto é devido a uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo (CASTILLO et al., 2006). Da mesma maneira, a diminuição nos valores do status antioxidante total do soro não é, necessariamente, uma condição indesejada quando a peroxidação lipídica diminui (CASTILLO et al., 2006). No presente estudo, as alterações no status antioxidante total ao longo dos momentos não estão de acordo com as pesquisas de Pregel et al. (2005) e Bodas et al. (2011), mas podemos inferir que, nas condições deste experimento, seu comportamento, juntamente com as outras defesas antioxidantes, foi importante para que se evitasse a peroxidação lipídica, somente exacerbada em T3.

Lipídios, em particular os poli-insaturados, são alguns dos substratos mais susceptíveis aos danos causados pelos radicais livres (CELI, 2010). A peroxidação lipídica, resultante do dano oxidativo a células e tecidos, é considerada bom indicador de estresse oxidativo (NAZIFI et al., 2010). O malondialdeído (MDA) é um dos mais abundantes produtos de baixo peso molecular resultantes da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (LYKKESFELDT; SVENDSEN, 2007). O MDA reage prontamente com o ácido tiobarbitúrico, produzindo um pigmento vermelho que pode ser medido por espectrofotometria na forma de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (JANERO, 1990).

Nos momentos avaliados neste estudo, com exceção de T3, não foi observada exacerbação da peroxidação lipídica mensurada no plasma. Somente em T3, as defesas antioxidantes não foram capazes de evitar a peroxidação dos lipídios. Tal evento pode ter se dado pela exaustão/consumo das defesas antioxidantes ou pelo fato de naquele momento o estímulo estressor ser tão exacerbado que o sistema antioxidante não foi capaz de evitar o dano oxidativo. Comparado aos

valores basais, Bodas at al. (2011) verificaram aumento na concentração de TBARS em cordeiros suplementados com vitamina E na dieta e transportados durante quatro horas, indicando que a vitamina E não foi capaz de evitar a peroxidação lipídica resultante do estresse oxidativo do transporte. Já Aktas et al. (2011) verificaram que a administração intramuscular ou da associação vitamínica ADE ou de vitamina E e selênio, principalmente neste último caso, foram determinantes para prevenir a peroxidação lipídica e estresse oxidativo associados ao transporte rodoviário de longa duração em bovinos.

Observamos que, em T1 e T2, o estresse causado pelo transporte rodoviário dos cordeiros não foi suficiente para gerar dano oxidativo, porém no momento préabate verificamos exacerbação da peroxidação lipídica, decorrente de algum estímulo estressor impossibilitado de ser identificado em tempo por não haver uma coleta no intervalo de 15 horas entre os momentos T2 e T3. Duas horas antes da coleta em T3, os animais ficaram expostos a uma chuva de grande magnitude (ventos de 16 km/h e taxa da chuva de 43 mm/h), pois o curral de espera onde estavam alojados era desprovido de cobertura. Além disso, no momento T3, não foi possível isolar os animais dos estímulos estressores inerentes à espera numa linha de abate, mesmo que esta apresentasse caráter experimental. Diante destes fatos, fica prejudicada a identificação do estímulo que culminou no estresse oxidativo observado momento imediato ao abate dos cordeiros. É bastante improvável que privação de alimento durante o período de descanso pré-abate seja responsável pelas variações observadas nos biomarcadores do estresse oxidativo durante o estudo. Gáal et al. (1993) observaram que as concentrações plasmáticas de MDA se elevaram somente após três dias de privação de alimento.

Apesar de não serem observados efeitos da vitamina E nos biomarcadores avaliados, com exceção do TAS, as defesas antioxidantes dos animais foram efetivas contra os EROs gerados no transporte. Entretanto, como já discutido neste trabalho, estas defesas não foram suficientes diante dos estímulos estressores ao final do experimento. Durante o período de confinamento, os animais receberam dieta composta por 80% de concentrado comercial e é provável que esta alimentação contivesse níveis adequados e suficientes de nutrientes requeridos da síntese dos antioxidantes endógenos (CELI; DI TRANA; QUARANTANA, 2008).

Devido à escassez de estudos sobre o uso da vitamina E, administrada pela via intramuscular, em cordeiros submetidos a situações estressantes, fica

comprometida a avaliação de doses e momentos de aplicação adotados neste estudo. Em estudo realizado por Aktas et al. (2011) com bovinos transportados durante 22 horas, a aplicação, pela via intramuscular, de 1500 UI de acetato de DL-alfa-tocoferol + 5 mg de selênio apenas 6 horas antes do transporte foi eficaz na prevenção de aumento na peroxidação lipídica. Em média, os animais dos grupos 10 e 20 UI receberam, respectivamente, 160 UI e 334 UI de vitamina E em cada uma das aplicações (6 e 3 dias antes do transporte) e nestas doses e momentos de aplicação já foi possível verificar efeito linear da vitamina E sobre os valores de TAS.

Cada biomarcador de estresse oxidativo tem suas vantagens e desvantagens, e por essa razão nenhuma medida única pode descrever adequadamente o estresse oxidativo (CELI, 2011). Diante deste cenário, é válido ressaltar que a avaliação de vários biomarcadores de estresse oxidativo é importante para monitorar com segurança os benefícios do uso de terapia antioxidante em animais submetidos à situação potencialmente estressante como o transporte para o local de abate.

### 4.5 CONCLUSÕES

- O transporte, propriamente dito, não causou estresse oxidativo nos cordeiros.
- Estímulos estressores n\u00e3o identificados levaram ao estresse oxidativo no momento pr\u00e9- abate.
- O TAS mostrou-se um bom marcador na avaliação de terapias antioxidantes.
- A administração intramuscular de alfa-tocoferol, nas doses e momentos avaliados, aumentou o status antioxidante total do soro dos cordeiros.

5 CAPÍTULO 3: QUALIDADE DA CARNE DE CORDEIROS SUPLEMENTADOS COM VITAMINA E PELA VIA INTRAMUSCULAR

# 5.1 INTRODUÇÃO

Cortes cárneos geralmente são adquiridos pelo consumidor após sua exposição em estabelecimentos comerciais por períodos de tempo variáveis (DUFRASNE et al., 2000). Durante o período de exposição, podem ocorrer mudanças em cor e sabor da carne, seja ela comercializada de maneira resfriada ou congelada.

Dentre as características relacionadas à qualidade da carne, a cor de um corte é a mais importante delas, pois influencia diretamente sua aceitabilidade pelos consumidores (MUCHENJE et al., 2009). Perda de cor nos cortes cárneos está intimamente relacionada à oxidação de seus pigmentos e lipídios (SHERBECK et al., 1995).

A oxidação lipídica é uma das maiores causas de deterioração da carne durante seu armazenamento e, além de alterações na coloração, este processo é responsável por alterações em sabor, odor e valor nutricional (MORRISSEY et al., 1994; ATAY et al., 2009). Alterações no sabor estão relacionadas à rancidez oxidativa, principalmente, quando o teor de ácidos graxos insaturados da carne é alto (MACIT et al., 2003b).

Oferecer produtos com cor e sabor agradáveis, garantindo que estas características mantenham-se estáveis durante todo o período de armazenamento, com maior segurança e menores custos, tornou-se um desafio para a indústria da carne. Com o objetivo de prolongar a vida de prateleira da carne ovina, o uso de embalagens a vácuo ou com atmosfera modificada tem sido frequente (MOHAMED et al., 2008). Em paralelo ao uso destas embalagens, verifica-se a crescente utilização de substâncias antioxidantes a fim de prolongar ainda mais a vida de prateleira da carne ovina. A resistência ao uso de substâncias sintéticas nos alimentos fez crescer o interesse pelo uso de antioxidantes naturais, como a vitamina E que é usualmente suplementada na alimentação dos animais de produção (MORRISSEY et al., 1994) e tem como benefícios o aumento na estabilidade de pigmentos e lipídios da carne (LAUZURICA et al., 2005).

A vitamina E é o principal antioxidante lipossolúvel nos sistemas biológicos, sendo o alfa-tocoferol sua forma biologicamente ativa mais importante (LAUZURICA et al., 2005). A suplementação dietética com vitamina E aumenta a quantidade de

alfa-tocoferol depositada em músculos e gordura, neutralizando os radicais livres antes da oxidação lipídica se propagar nos ácidos graxos insaturados nas membranas celulares (LIU; LANARI; SCHAEFER, 1995).

Vários estudos comprovaram os benefícios da suplementação dietética de vitamina E sobre características relacionadas à qualidade da carne de ovinos (GUIDERA et al., 1997; MACIT et al., 2003a, b; LAUZURICA et al., 2005; ATAY et al., 2009; KASAPIDOU et al., 2012) e outros animais de produção (CHEAH; CHEAH; KRAUSGRILL, 1995; DUFRASNE et al., 2000), entretanto pouco se sabe sobre a suplementação parenteral dessa vitamina (MAIORANO et al., 2005).

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da suplementação intramuscular de vitamina E sobre características relacionadas à qualidade da carne de cordeiros mestiços das raças Santa Inês e Dorper.

#### 5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 5.2.1 Animais e protocolo experimental

Vinte e quatro ovinos machos, hígidos, mestiços das raças Santa Inês e Dorper, não castrados, com idades entre 130 e 145 dias e peso vivo médio de 43,6 kg ao abate foram utilizados. Os animais permaneceram 75 dias confinados em baias coletivas nas dependências do Centro de Pesquisa em Doenças Nutricionais e Metabólicas, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) até o momento do transporte para o abatedouro. Dos 75 dias de confinamento, 15 dias consistiram na adaptação dos animais à dieta; nos 60 dias restantes, os ovinos receberam dieta composta por 80% de concentrado comercial (Tech Ovin Pasto, Socil) e 20% de feno de Tifton 85 (*Cynodon spp*) picado, em quantidade necessária e suficiente para garantir 10% de sobras. A água foi oferecida *ad libitum*. A tabela 10 mostra a composição bromatológica dos alimentos utilizados.

Tabela 10 – Composição do feno e do concentrado comercial utilizados durante o período experimental - São Paulo – 2012

Composição do feno					
MS, %	89,42				
PB, %	11,58				
FDN, %	82,74				
Composição do concentrado comercial*					
MS, %	90,38				
PB, %	17,17				
FB, %	10,79				
EE, %	2,49				
EB, kcal/g	4,07				

MS: matéria seca; PB: proteína bruta; FDN: fibra em detergente neutro; FB: fibra bruta; EE: extrato etéreo; EB: energia bruta. \* Vitamina E (mínimo): 8,75 UI/kg, segundo níveis de garantia do fabricante.

Oito dias antes do abate, de acordo com o ganho de peso no período de confinamento, os cordeiros foram distribuídos em quatro blocos de seis animais. O delineamento experimental adotado foi o de blocos ao acaso com repetição, com três tratamentos: Controle; 10 UI; e 20 UI de vitamina E. Aos sete e quatro dias antes do abate, os animais receberam, pela via intramuscular, ou uma aplicação de solução fisiológica (grupo Controle); ou 10 UI; ou 20 UI por quilo de peso metabólico (peso vivo <sup>0,75</sup>) de vitamina E na forma de acetato de DL-alfa-tocoferol (Monovin E<sup>®</sup>, Bravet).

Os animais foram transportados, durante quatro horas, do local do confinamento para local de abate em caminhão específico para este fim. Após a chegada ao abatedouro, os cordeiros desembarcaram em curral de espera, onde permaneceram por 19 horas até o momento do abate, com água disponível ad libitum.

#### 5.2.2 Abate e análises de qualidade da carne

O abate dos animais foi realizado no Abatedouro-Escola da Prefeitura do Campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo e a desossa, no entreposto comercial VPJ Alimentos, também na cidade de Pirassununga, 24 horas após o abate. Os cordeiros foram insensibilizados por meio de pistola pneumática e, imediatamente, foi efetuada a sangria. Após esfola e completa evisceração, as carcaças foram mantidas sob refrigeração a 2°C durante 24 horas. Ao final do período de refrigeração, foi determinado o pH (pH24h) por meio de medidor de pH portátil (HI 99163, Hanna) no músculo *Longissimus dorsi* (LD) da meia carcaça direita, na altura da 12ª costela.

Durante a desossa, foi avaliada a coloração de amostras do músculo LD na região entre a 12ª e 13ª costelas. A cor dos cortes foi determinada com auxílio de colorímetro portátil (Minolta Color Reader CR-10) com fonte de luz D65, ângulo de observação de 10º e abertura da célula de medida de 30 mm, usando-se a escala L\*, a\*, b\* do sistema CIELab, onde L\* representa a luminosidade e a\* e b\* representam, respectivamente, a intensidade das cores vermelha e amarela. Ainda durante a desossa, amostras do músculo LD foram retiradas, identificadas, embaladas e congeladas a -20°C para posteriores análises de perdas de peso por cocção (PPC), maciez objetiva (representada pela força de cisalhamento – FC) e oxidação de lipídios.

Os procedimentos para cozimento dos bifes destinados a análise de FC e PPC foram realizados segundo a AMSA (1995). As amostras foram assadas em forno elétrico a 170°C, até atingirem a temperatura interna de 71°C. Após o cozimento, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente até seu resfriamento e depois mantidas em refrigerador doméstico a 4°C por uma noite. Na etapa seguinte foram retirados três cilindros de treze milímetros de diâmetro de cada amostra de carne, no sentido das fibras, com auxílio de um vazador elétrico. A maciez objetiva da carne, representada pela força de cisalhamento, foi mensurada com aparelho Warner-Bratzler Shear Force, considerando como resultado final o valor médio obtido entre os três cilindros. As perdas de peso por cozimento (PPC) foram determinadas pela diferença de peso antes e depois do cozimento [PPC= (Pi-Pf)/Pi], expressas em %. Os produtos da oxidação lipídica, expressados como

substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), foram mensurados nas amostras de carne congeladas a -20°C por 30 dias, segundo metodologia proposta por Buege e Aust (1978).

#### 5.2.3 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa SAS (Versão 9.3, 2010) utilizando o procedimento MIXED, sendo anteriormente verificada a normalidade dos resíduos, pelo teste de Shapiro-Wilk, e a busca por "outliers" através do procedimento UNIVARIATE do SAS. O efeito de dose de vitamina E foi avaliado por regressão polinomial, através do uso de polinômios ortogonais, decompondo-se o efeito de tratamento em efeito linear e efeito de desvio da linearidade. Para todos os testes avaliados considerou-se nível de significância de 5%.

#### 5.3 RESULTADOS

Na tabela 11 estão apresentados, em função dos tratamentos, os valores de média, erro padrão da média e probabilidade estatística para as variáveis relacionadas à qualidade da carne.

Tabela 11 – Valores de média de pH após 24 horas de abate (pH24h), força de cisalhamento (FC), perdas de peso por cozimento (PPC), coloração das amostras de carne (L\*, a\*, b\*) e oxidação lipídica após 30 dias de congelamento (TBARS 30) nos diferentes tratamentos, com os respectivos erros padrão das médias e probabilidades estatísticas

Variáveis	Tratamentos			EPM <sup>1</sup>	Efeito <sup>2</sup>	
	Controle	10 UI	20 UI	LF IVI	L	DL
pH24h	5,67	5,61	5,71	0,02	NS³	NS
FC, kg	4,10	4,43	4,30	0,17	NS	NS
PPC, %	20,17	20,50	19,89	0,52	NS	NS
L*	27,12	30,50	27,69	0,54	NS	0,0042
a*	16,11	14,98	16,21	0,39	NS	NS
b*	10,14	11,61	10,57	0,24	NS	0,0082
TBARS 30, mg MDA/ kg carne	0,92	1,01	1,14	0,08	NS	NS

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>EPM: Erro padrão da media

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>Efeito: Valor de P para o teste de polinômios ortogonais decomposto em efeito linear (L) e efeito de desvio da linearidade (DL).

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>NS: P>0,05.

Dentre as variáveis abordadas no estudo, o efeito do tratamento com vitamina E somente foi observado para as cromaticidades L\* e b\*. O efeito observado para estas variáveis foi o de desvio da linearidade, sendo que os animais tratados com 10 UI de vitamina E apresentaram os máximos valores para as cromaticidades L\* e b\*. As equações de regressão encontradas para estas variáveis foram, respectivamente, Y= 27,12 + 0,6473x - 0,0309x² (R²= 0,33) e Y= 10,15 + 0,2721x - 0,0125x² (R²= 0,29), onde "Y" é a cromaticidade e "x" é o nível de vitamina E.

### 5.4 DISCUSSÃO

O pH final (24 a 48 horas *post mortem*) é um fator determinante para a qualidade da carne (HOFFMAN et al., 2003). A depleção das reservas de glicogênio muscular por estresse crônico antes do abate pode resultar em pH final elevado, favorecendo formação da carne DFD (dark, firm and dry), sigla que em português significa "escura, dura e seca". A carne DFD é pouco atraente para os consumidores devido a sua coloração escura e aparência seca, além de ser mais susceptível a deterioração bacteriana (DE LA FUENTE et al., 2010). Devine et al. (1993) verificaram que amostras do músculo *Longissimus dorsi* de cordeiros com pH final acima de 5,80 apresentaram baixa aceitação em painel sensorial.

As médias de pH final (após 24 horas do abate) encontradas nos três grupos experimentais estão abaixo de 5,80, ou seja, valor considerado adequado para a espécie, revelando que as práticas de manejo adotadas no pré-abate não geraram estresse capaz de causar depleção das reservas de glicogênio muscular, diminuindo assim a possibilidade de formação da carne DFD (DEVINE et al., 1993).

Não foi observado efeito da suplementação intramuscular de vitamina E sobre os valores de pH24h. Maiorano et al. (2005) também não observaram efeito da suplementação intramuscular de vitamina E, na forma de acetato de DL-alfatocoferil, sobre o pH24h trabalhando com cordeiros de 61 ou 70 dias de idade, ao abate, suplementados ou não com 250 UI de vitamina E aplicada pela via intramuscular uma vez por semana durante cinco semanas. Esses pesquisadores verificaram que o pH24h do LD somente foi afetado pela idade dos animais, sendo

que cordeiros com 70 dias de idade apresentaram maior pH24h. Mesmo trabalhando com cordeiros de maior idade ao abate (138 dias), observamos pH24h médio de 5,66, valor intermediário entre 5,60 e 5,68, valores médios observados por Maiorano et al. (2005) para os cordeiros com 61 e 70 dias ao abate, respectivamente. Quando a vitamina E foi suplementada na dieta dos cordeiros, Macit et al. (2003a), Lauzurica et al. (2005) e Kasapidou et al. (2012) também não observaram seus efeitos sobre o pH24h.

A maciez da carne pode ser mensurada de maneira subjetiva por meio de um painel sensorial, ou de maneira objetiva, quando se utiliza equipamento para determinar a força necessária para o cisalhamento de uma seção da amostra de carne (ALVES; GOES; MANCIO, 2005), como no caso deste estudo. Quanto maior a força de cisalhamento, menor é a maciez apresentada pelo corte cárneo (MUCHENJE et al., 2009). A maciez varia, principalmente, devido a mudanças na estrutura das proteínas miofibrilares (miosina e actina) do músculo no período entre o abate do animal e o consumo da carne (MUIR et al., 2000).

No presente estudo, a maciez objetiva da carne não foi influenciada pela suplementação com vitamina E. Em estudo realizado por Macit et al. (2003b) com cordeiros suplementados durante 75 dias com 45 mg de vitamina E na dieta, a FC também não sofreu influência do tratamento. Os valores médios de força de cisalhamento encontrados para os grupos controle, 10 UI e 20 UI foram de, respectivamente, 4,10; 4,43 e 4,30 kg. Estes valores foram superiores à FC encontrada por Macit et al. (2003b) para os grupos controle e tratado (2,80 e 3,20 kg, respectivamente), entretanto, ainda foram inferiores a 4,50 kg, valor verificado por Knapp et al. (1989) como limite para que o consumidor classificasse a carne bovina como macia e aceitável. Aparentemente, a suplementação com vitamina E não alterou a estrutura das proteínas miofibrilares.

As perdas de peso por cozimento estão relacionadas ao rendimento da carne quando preparada para o consumo. Maiores quantidades de gordura intra e intermuscular levarão a menores perdas de peso por cozimento (PPC), resultando em carnes mais suculentas, pois a gordura atua como barreira de proteção contra a perda da umidade (SAÑUDO et al.,1997; COSTA et al., 2011). Okeudo e Moss (2005) verificaram que o teor de umidade foi responsável por 30 % (r=0,55) da variação nas PPC, enquanto os lipídios intramusculares representarem 10,30 % (r=0,32), sugerindo que a perda de umidade é o fator determinante mais importante.

A suplementação intramuscular de vitamina E não influenciou os valores de PPC. Macit et al. (2003b) também não verificaram efeito da suplementação de vitamina E sobre as PPC, obtendo valor médio de 30,70 %. Este valor foi 10,51 % maior que o valor médio encontrado neste estudo (20,19 %). Em bovinos, Dufrasne et al. (2000) observaram valor médio de 28,05 %, sendo que estes pesquisadores também não verificaram efeito da suplementação dietética de vitamina E sobre as PPC. Em nosso experimento, a deposição de gordura intra e intermuscular, de maneira indireta, não foi influenciada pela suplementação intramuscular de vitamina E. Entretanto, o valor médio das PPC observado em nosso estudo foi numericamente menor que o valor encontrado por Macit et al. (2003b). Esta diferença pode estar relacionada às raças dos cordeiros utilizados nestes experimentos, pois em ambos os casos os animais recebiam dietas com alto teor de concentrado. Costa et al. (2011) verificaram que dieta com alto teor de concentrado favoreceu o acúmulo de gordura na carcaça, sendo que cordeiros mestiços das raças Santa Inês e Dorper apresentavam maior quantidade dessa gordura que animais da raça Santa Inês ou sem raça definida.

A cor do músculo é determinada pela quantidade de mioglobina e pelas proporções relativas desse pigmento, que pode ser encontrado na forma mioglobina reduzida (Mb, cor púrpura), oximioglobina (MbO2, cor vermelha) e metamioglobina (MetMb, cor marrom) (SILVA SOBRINHO et al., 2005). O aspecto visual da carne fresca é muito importante, já que a descoloração de sua superfície pode ser interpretada pelo consumidor como uma condição de insalubridade. A oxidação dos pigmentos e de lipídios são processos que resultam nos maiores defeitos de qualidade que a carne fresca pode apresentar durante sua estocagem e venda para o consumidor (MACIT et al., 2003b). A estabilidade e melhora na cor da carne pela vitamina E é devido, principalmente, a sua habilidade de prevenir a oxidação da mioglobina e/ou oximioglobina a metamioglobina (CHEAH; CHEAH; KRAUSGRILL, 1995).

A suplementação com vitamina E, via intramuscular, não afetou os valores de a\*, porém os valores encontrados para L\* e b\* foram maiores no grupo 10 UI, ou seja, a carne dos animais deste grupo era mais luminosa e com maiores teores de amarelo. Os valores observados para L\* e a\* são mais elevados, enquanto os valores de b\* são menores que aqueles observados por Costa et al. (2011) na carne de cordeiros mestiços das raças Santa Inês e Dorper. A luminosidade da carne está

relacionada a seu conteúdo de água (RIPPOL; JOY; MUÑOZ, 2011) e o valor de b\* reflete a coloração amarelada da gordura intramuscular (MUCHENJE et al., 2009). Ao contrário do que observamos, Maiorano et al. (2005) não verificaram efeito da vitamina E administrada pela via intramuscular na coloração da carne aos 45 minutos e 24 horas *post mortem*, entretanto verificaram que cordeiros mais jovens apresentavam maior valor de L\* e menor valor de a\*. Quando suplementada na alimentação, a vitamina E também não influenciou a cor dos cortes cárneos de cordeiros (GUIDERA et al., 1997; MACIT et al., 2003a, b; ATAY et al., 2009) e bovinos (DUFRASNE et al., 2000).

Maiorano et al. (2005) administraram para cada um dos animais do grupo tratado um total de 1250 UI de vitamina E, sendo a última dose de 250 UI aplicada sete dias antes do abate. Em nosso estudo, em média, os animais dos grupos 10 e 20 UI receberam, respectivamente, 160 UI e 334 UI de vitamina E em cada uma das aplicações (sete e quatro dias antes do abate) e nestas doses e momentos de aplicação verificamos seus efeitos sobre a cor dos cortes cárneos. Entretanto, os efeitos da vitamina E observados neste estudo não podem ser relacionados à maior qualidade da carne. Era esperado que a vitamina E atuasse sobre a capacidade de retenção da água nos cortes cárneos, evitando, em curto prazo, o aumento da luminosidade proveniente da elevada umidade superficial. Na literatura pesquisada, não foram encontrados trabalhos que relacionem suplementação de vitamina E e aumento nos valores de b\*. Os valores de b\* refletem a quantidade de pigmentos carotenoides presentes no tecido adiposo intra e intermuscular (COSTA et al., 2011) e não estão relacionados diretamente a melhoria na qualidade da carne.

Segundo Guidera et al. (1997), quando as células sofrem injúria pelo congelamento, os processos oxidativos são favorecidos e, portanto, a incorporação do alfa-tocoferol nas membranas celulares melhora o sistema de defesas antioxidantes e é um meio efetivo de estabilizar a carne crua durante sua estocagem congelada.

Os produtos da oxidação lipídica nos cortes cárneos congelados por 30 dias não foram influenciados pela suplementação intramuscular de vitamina E. Ao contrário de nossos resultados, ao analisar cortes cárneos congelados a -20 °C durante 14 ou 28 dias, Lauzurica et al. (2005) encontraram maiores valores de TBARS no grupo controle em comparação aos grupos de cordeiros suplementados com 250, 500 ou 1000 mg de vitamina E por quilo de alimento durante 37 dias,

entretanto estas diferenças não eram observadas antes do congelamento. Em período de congelamento mais longo (cinco meses), Guidera et al. (1997) também verificaram maiores valores de TBARS na carne dos cordeiros que receberam dieta controle em relação aqueles suplementados durante 10 semanas antes do abate com 1000 mg de vitamina E por quilo de alimento. Em cortes cárneos de ovinos mantidos apenas sob refrigeração a 4 °C por períodos que variaram entre 2 a 12 dias, a suplementação dietética de vitamina E mostrou-se capaz de minimizar a oxidação lipídica (GUIDERA et al., 1997; MACIT et al., 2003a, b; KASAPIDOU et al., 2012). Observamos valor médio de 1,02 mg MDA /kg de carne congelada durante 30 dias. Segundo Rippol, Joy e Muñoz (2011), 1,00 mg MDA/ kg de carne é o valor limite de TBARS que reflete um grau de rancificação ainda aceitável em provas sensoriais.

## 5.5 CONCLUSÕES

- A administração intramuscular de vitamina E, nas doses e momentos avaliados, não influenciou os valores de pH24h, FC, PPC, cromaticidade a\* e TBARS 30.
- A administração intramuscular de vitamina E teve efeito de desvio da linearidade sobre os valores das cromaticidades L\* e b\*, sendo estes maiores no grupo que recebeu a vitamina E na dose de 10 UI por quilo de peso metabólico aos sete e quatro dias antes do abate.
- Maiores valores para cromaticidades L\* e b\* não são resultados desejados quando a suplementação com vitamina E tem como objetivo melhorar a qualidade da carne.

# 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O transporte rodoviário de curta duração, mesmo quando realizado de maneira adequada, causa estresse nos animais. Bem como um transporte adequado, é importante garantir que os animais tenham descanso pré-abate com menor exposição possível a estímulos que possam desencadear estresse, já que no presente estudo observamos que estímulos negativos nesse momento geraram estresse de maior intensidade que aquele oriundo do transporte.

Quando se opta pela suplementação de alfa-tocoferol como terapia antioxidante, o efeito linear crescente de tratamento sobre os valores de TAS pode ser considerado um bom resultado. No entanto, a suplementação intramuscular de alfa-tocoferol em animais submetidos a estresse deve ser melhor estudada para que seus benefícios possam ser ampliados.

## **REFERÊNCIAS**

- AKTAS, M. S.; OZKANLAR, S.; KARAKOC, A.; AKCAY, F.; OZKANLAR, Y. Efficacy of vitamin E + selenium and vitamin A + D + E combinations on oxidative stress induced by long-term transportation in Holstein dairy cows. **Livestock Science**, v. 141, p. 76-79, 2011.
- ALI, B. H.; AL-QARAWI, A. A.; MOUSA, H. M. Stress associated with road transportation in desert sheep and goats, and the effect of pretreatment with xylazine or sodium betaine. **Research in Veterinary Science**, v. 80, p. 343-348.
- ALVES, D. D.; GOES, R. H. T. B.; MANCIO, A. B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 135-149, 2005.
- AMSA. AMERICAN MEAT SCIENCE ASSOCIATION. Research guidelines for cookery, sensory evaluation and tenderness measurements of fresh meat. Chicago, IL.: National Livestock and Meat Board, 1995.
- ATAY, O.; GÖKDAL, Ö; EREN, V.; ÇETİNER, Ş.; YIKILMAZ, H. Effects of dietary vitamin E supplementation on fattening performance, carcass characteristics and meat quality traits of Karya male lambs. **Archiv für Tierzucht**, v. 52, n. 6, p. 618-626, 2009.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutatione. **Journal Laboratory Clinical Medicine**, v. 61, n. 5, p. 882-888, 1963.
- BISPO, D.L.N.; PEREIRA, O.C.M. Importância do Conhecimento das Alterações Induzidas pelo Estresse, em Animais Domésticos. **Interciência**, v. 19, n. 02, p. 72-74, 1994.
- BODAS, R.; PRIETO, N.; LÓPEZ-CAMPOS, O; GIRÁLDEZ, F. J.; ANDRÉS, S. Naringin and vitamin E influence the oxidative stability and lipid profile of plasma in lambs fed fish oil. **Research in Veterinary Science**, v. 91, p. 98-102, 2011.
- BÓRNEZ, R.; LINARES, M. B.; VERGARA, H. Haematological, hormonal and biochemical blood parameters in lamb: Effect of age and blood sampling time. **Livestock Science**, v. 121, p. 200-206, 2009.
- BROOM, D. M. Transport stress in cattle and sheep with details of physiological, ethological and others indicators. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 110, p. 83-89, 2003.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymalogy**, v. 52, p. 302-310, 1978.

- BYERS, S. R.; KRAMER, J. W.; Normal hematology of sheep and goats. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p. 836–842.
- CASTILLO, C.; HERNÁNDEZ, J.; VALVERDE, I.; PEREIRA, V.; SOTILLO, J.; LÓPEZ ALONSO, M.; BENEDITO, J. L. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidante status (TAS) during lactation in daury cows, **Research in Veterinary Science**, v. 80, p. 133-139, 2006.
- CELI, P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 33, n. 2, p. 233-240, 2011.
- CELI, P. The role of oxidative stress in small ruminants' health and production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 348-363, 2010. Suplemento especial.
- CELI, P.; DI TRANA, A.; QUARANTA, A. Metabolic profile and oxidative status in goats during the peripartum peripartum period. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, p. 1004-1008, 2008.
- CHEAH, K. S.; CHEAH, A. M.; KRAUSGRILL, D. I. Effect of dietary supplementation of vitamin E on pig meat quality. **Meat Science**, v. 39, p. 255-264, 1995.
- COSTA, R. G.; SANTOS, N. M.; SOUSA, W. H.; QUEIROGA, C. R. E.; AZEVEDO, P. S.; CARTAXO, F. Q. Qualidade física e sensorial da carne de cordeiros de três genótipos alimentados com rações formuladas com duas relações volumoso:concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 8, p. 1781-1787, 2011.
- DE LA FUENTE, J.; GONZÁLEZ DE CHÁVARRI, E.; SÁNCHEZ, M.; VIEIRA, C.; LAUZURICA, S.; DIAZ, M. T.; .; PÉREZ, C. The effects of journey duration and space allowence on the behavioural and biochemical measurements of stress responses in suckling lambs during transport to na abattoir. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 142, p. 30-41, 2012.
- DE LA FUENTE, J.; SÁNCHEZ, M.; PÉREZ, C.; LAUZURICA, S.; VIEIRA, C.; GONZÁLEZ DE CHÁVARRI; DIAZ, M. T. Physiological response and carcass and meat quality of suckling lambs in relation to transport time and stocking density during transport by road. **Animal**, v. 4, n. 2, p. 250-258, 2010.
- DEVINE, C. E.; GRAAFHUIS, A. E.; MUIR, P. D.; CHRYSTALL, B. B. The effect of growth rate and ultimate pH on meat quality of lambs. **Meat Science**, v. 35, p. 63-77, 1993.
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.
- DUFRASNE, I.; MARCHE, C.; CLINQUART, A.; HORNICK, J. L.; VAN EENAEME, C.; ISTASSE, L. Effects of dietary vitamin E supplementation on performance and meat characteristics in fattening bulls from the Belgian Blue breed. **Livestock Production Science**, v. 65, p. 197-201, 2000.

- EARLEY, B.; MURRAY, M. The effect of road and sea transport on inflammatory, adrenocortical, metabolic and behavioural responses of weanling heifers. **BMV Veterinary Research**, v. 36, n. 06, p. 01-13, 2010.
- FANZIO, E.; FERLAZZO, A. Evaluation of stress during transport. **Veterinary Research Communications**, v. 27, p. 519-524, 2003. Suplemento 1.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FINCO, D. R. Kidney Function. In: KANEKO J.J.; HARVEY, D.W.; BRUSS, W.L. Clinical biochemistry of domestic animals. New York: Academic Press, 1997. p. 441–484.
- FISHER, A. D.; NIEMEYER, D. O.; LEA, J. M.; LEE, C.; PAULL, D. R.; REED, M. T.; FERGUSON, D. M. The effects os 12, 30, or 48 hours of road transport on the physiological and behavioral responses of sheep. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 2144-2152, 2010.
- GAÁL, T.; MÉZES, M.; MISKUCZA, O.; RIBICZEY-SZABÓ, P. Effect of fasting on blood lipid peroxidation parameters of sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 55, p. 104-107, 1993.
- GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total antioxidante capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, p. 1106-1114, 2000.
- GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 249-257, 1997.
- GUIDERA, J.; KERRY, J. P.; BUCKLEY, D. J.; LYNCH, P. B.; MORRISSEY, P. A. The effect of dietary vitamin E supplementation on the quality of fresh and frozen lamb meat. **Meat Science**, v. 45, p. 33–43, 1997.
- HOFFMAN, L. C.; MULLER, M.; CLOETE, S. W. P.; SCHMIDT, D. Comparison of six crossbred lamb types: sensory, physical and nutritional meat quality characteristics. **Meat Science**, v. 65, p. 1265–1274, 2003.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTMA, A. Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção pecuária municipal 2011.** IBGE, Seção Estatística. 2011. Disponível em: <a href="mailto:<a href="mailto:<a href="mailto:</a> <a href="mailto:<a href="mailt
- JANERO, D.R. Malondialdehyde and thiobarbituric acidreactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990.

- JORDÃO JR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutationa reduzida e da vitamina E. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 31, p. 434-449, 1998.
- KANEKO J.J.; HARVEY, D.W.; BRUSS, W.L. Clinical biochemistry of domestic animals. New York: Academic Press, 1997. 932p.
- KANNAN, G.; KOUAKOU, B.; TERRILL, T. H.; GELAYE, S. Endocrine, blood metabolite, and meat quality changes in goats as influenced by short-term, preslaughter stress. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1499-1507, 2003.
- KANNAN, G.; TERRILL, T. H.; KOUAKOU, B.; GAZAL, O. S.; GELAYE, S.; AMOAH, E. A.; SAMAKÉ, S. Transportation of goats: effects on physiological stress responses and live weight loss. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1450-1457, 2000.
- KASAPIDOU, E.; WOOD, J. D.; RICHARDSON, R. I.; SINCLAIR, L. A.; WILKINSON, R. G; ENSER, M. Effect of vitamin E supplementation and diet on fatty acid composition and on meat colour and lipid oxidation of lamb leg steaks displayed in modified atmosphere packs. **Meat Science**, v. 90, p. 908–916, 2012.
- KENT, J. E. Stress in transported sheep. **Comparative Haematology International**, v. 7, p. 162-166, 1997.
- KNAPP, R. H; TERRY, C. A; SAVELL, J. W; CROSS, H. R; MIES, W. L; EDWARDS, J. W. Charcacterization of cattle types to meet specific beef targets. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 2294-2308, 1989.
- KNOWLES, G. T.; WARRISS, P. D. Stress physiology of animals during transport. In: GRANDIN, T. **Livestock Handling and Transport.** Wallingford: CABI International, 2000. p. 385-407.
- LAUZURICA, S.; DE LA FUENTE, J.; DÍAZ, M. T.; ÁLVAREZ, I.; PÉREZ, C.; CAÑEQUE, V. Effect of dietary supplementation of vitamin E on characteristics of lamb meat packed under modified atmosphere. **Meat Science**, v. 70, p. 639–646, 2005.
- LIU, Q.; LANARI, M. C.; SCHAEFER, D. M. A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 3131-3140, 1995.
- LYKKESFELDT, J.; SVENDSEN, O. Oxidants and antioxidants is disease: oxidative stress in farm animals. **The Veterinary Journal**, v. 173, p. 502-511, 2007.
- MACIT, M.; AKSAKAL, V.; EMSEN, E., AKSU, M. I.; KARAOGLU, M.; ESENBUGA, N. Effects of vitamin E supplementation on performance and meat quality traits of Morkaraman male lambs. **Meat Science**, v. 63, p. 51–55, 2003a.
- MACIT, M.; AKSAKAL, V.; EMSEN, E.; ESENBUGA, N.; AKSU, M. I. Effects of vitamin E supplementation on fattening performance, non-carcass components and retail cut percentages, and meat quality traits of Awassi lambs. **Meat Science**, v. 64, p. 01-06, 2003b.

- MAIORANO, G.; PRISCIANTELLI, A.; CAVONE, C.; GAMBACORTA, M.; MANCHISI, A. Influence of vitamin E treatment starting time on lamb meat quality. **Italian Journal of Animal Science**, v. 4, p. 363-365, 2005. Suplemento 2.
- MILLER, J. K.; BRZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; MADSEN, F. C. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 2812-2823, 1993.
- MINKA, N. S.; AYO, J. O.; SACKEY, A. K. B.; ADELAIYE, A. B. Assessment and scoring of stresses imposed on goats during handling, loading, road transportation and unloading, and the effect of pretreatment with ascorbic acid. **Livestock Science**, v. 125, p. 275-282, 2009.
- MOHAMED, A.; JAMILAH, B.; ABBAS, K. A.; RAHMAN, R. A. A review on lipid oxidation of meat in active and modified atmosphere packaging and usage of some stabilizers. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 6, p. 76-81, 2008.
- MORRISEY, P. A.; BUCKLEY, D. J.; SHEEHY, P. J. A; MONAHAN, . Vitamin E and meat quality. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 53, p. 289, 1994.
- MUCHENJE, V.; DZAMA, K.; CHIMONYO, M.; STRYDOM, P. E.; HUGO, A.; RAATS, J. G. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: a review. **Food Chemistry**, v. 112, p. 279-289, 2009.
- MUIR, P. D.; WALLACE, G. J.; DOBBIE, P. M.; BOWN, M. D. A comparison of animal performance and carcass and meat quality characteristics in Hereford, Hereford x Friesian, and Friesian steers grazed together at pasture. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 43, p. 193–205, 2000.
- NAZIFI, S.; GHAFARI, N.; FARSHNESHANI, F.; RAHSEPAR, M.; RAZAVI, S. M. Reference values of oxidative stress parameters in adult Iranian Fat-Tailed sheep. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 30, n. 1, p. 13-16, 2010.
- NAZIFI, S.; SAEB, M.; ROWGHANI, E.; KAVEH, K. The influences of thermal stress on serum biochemical parameters of Iranian fat-tailed sheep and their correlation with triiodothyronine (T3), thyroxine (T4) and cortisol concentrations.

  Comparative Clinical Pathology, v. 12, p. 135-139, 2003.
- NOCKELS, C. F.; ODDE, K. G.; CRAIG, A. M. Vitamin E supplementation and stress affect tissue alpha-tocopherol content of beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 672-677, 1996.
- NWE, T.M.; HORI, E.; MANDA, M.; WATANABE, S. Significance of catecholamines and cortisol levels in blood during transportation stress in goats. **Small Ruminant Research**, v. 20, p. 129-135, 1996.
- OKEUDO, N. J.; MOSS, B. W. Interrelationships amongst carcass and meat quality characteristics of sheep. **Meat Science**, v. 69, p. 01-08, 2005.
- PEETERS, E.; NEYT, A.; BECKERS, F.; DE SMET, S.; AUBERT, A. E.; GEERS, R. Influence of supplemental magnesium, tryptophan, vitamin C, and vitamin E on

- stress responses of pigs to vibration. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 1568-1580, 2005.
- PREGEL, P.; BOLLO, E.; CANNIZZO, F. T.; BIOLATTI, B.; CONTATO, E.; BIOLATTI, P. G. Antioxidant capacity as reliable marker of stress in dairy calves transported by road. **Veterinary Record**, v. 156, p. 53-54, 2005.
- PUGH, D. G. Sheep and goat medicine. Philadelphia: Saunders, 2002. p. 468.
- RIPPOL, G.; JOY, M.; MUÑOZ, F. Use of dietary vitamin E and selenium (Se) to increase the shelf life of modified atmosphere packaged light lamb meat. **Meat Science**, v. 87, p. 88-93, 2011.
- ROCHE, M.; RONDEAU, P.; SINGH, N. R.; TARNUS, E.; BOURDON, E. The antioxidant properties of serum album. **FEBS Letters**, v. 582, n. 13, p. 1783-1787, 2008.
- SAÑUDO, C.; CAMPO, M. M.; SIERRA, I.; MARÍA, G. A.; OLLETA, J. L.; SANTOLARIA, P. Breed effect on carcass and meat quality of suckling lambs. **Meat Science**, v. 46, n. 4, p. 357-365, 1997.
- SCHAEFER, A. L.; JONES, S. D. M.; STANLEY, R. W. The use of electrolyte solutions for reducing transport stress. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 258-265, 1997.
- SGORLON, S.; STRADAIOLI, G.; ZANIN, D.; STEFANON, B. Biochemical and molecular responses to antioxidant supplementation in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 64, p. 143-151, 2005.
- SHERBECK, J. A.; WULF, D. M.; MORGAN, J. B.; TATUM, J. D.; SMITH, G. C.; WILLIAMS, S. N. Dietary supplementation of vitamin E to feedlot cattle affects beef retail display properties. **Journal of Food Science**, v. 60, p. 250–252, 1995.
- SILVA SOBRINHO, A. G.; PURCHAS, R. W.; KADIM, I. T.; YAMAMOTO, S. M. Características de qualidade da carne de ovinos de diferentes genótipos e idades ao abate. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 1070-1078, 2005.
- TADICH, N.; GALLO, C.; BRITO, M. L.; BROOM, D. M. Effects of weaning and 48 h transport by road and ferry on some blood indicators of welfare in lambs. **Livestock science**, v. 121, p. 132-136, 2009.
- TARRANT, P. V. Transportation of cattle by road. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 28, p. 153-170, 1990.
- TORNQUIST, S. J.; RIGAS, J. Interpretation of ruminant leukocyte responses. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. p. 307–313.
- WERNICKI, A.; URBAN-CHMIEL, R.; KANKOFER, M.; MIKUCKI, P.; PUCHALSKI, A.; TOKARZEWSKI, S. Evaluation of plasma cortisol and TBARS levels in claves after short-term transportation. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 157, n. 01, p. 30-34, 2006.

ZIMERMAN, M.; GRIGIONI, G.; TADDEO, H.; DOMINGO, E. Physiological stress responses and meat quality traits of kids subjected to different pre-slaughter stressors. **Small Ruminant Research**, v. 100, p. 137-142, 1996.