UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CÁRMEN MARIA LUCAS PEDRO GARRINE

**Efeitos de dois níveis de sulfato de cobre e cobre metionina no
metabolismo e oxidação de lipídios em ovinos**

Pirassununga
2013

CÁRMEN MARIA LUCAS PEDRO GARRINE

**Efeitos de dois níveis de sulfato de cobre e cobre metionina no
metabolismo e oxidação de lipídios em ovinos**

“Versão corrigida”

Tese apresentada à Faculdade
de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos da Universidade de
São Paulo, como parte dos
requisitos para a obtenção do
Título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade
e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcus Antônio
Zanetti

Pirassununga
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia
de Alimentos da Universidade de São Paulo

G241e Garrine, Cármén Maria Lucas Pedro
Efeitos de dois níveis de sulfato de cobre e cobre metionina no metabolismo e oxidação de lipídios em ovinos / Cármén maria Lucas Pedro Garrine. -- Pirassununga, 2013.
94 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Zootecnia.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal
Orientador: Prof. Dr. Marcus Antônio Zanetti.

1. Antioxidantes 2. Colesterol 3. Enzimas
4. Minerais. I. Título.

DEDICATÓRIA

Às minhas filhas:

Stívellan Olga Garrine Bule e Kiemy Aurora garrine Bule

pela força e motivação;

Ao meu marido:

Joaquim Casimiro Simeão Bule,

pela compreensão e apoio durante toda minha carreira acadêmica, e apesar da distância muito me incentivou para que esse sonho se tornasse realidade;

À memória dos meus pais:

Lucas P. Garrine e Luísa F. J. Guambe,

Que não puderam presenciar este momento, mas sempre me apoiaram e muitas vezes se abdicaram de tudo em prol da minha educação.

Se não fosse por eles não seria a pessoa que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

À Deus Pela vida que me deu e por ser a luz que guia o meu caminho em todos os momentos da minha vida.

Ao CNPq-Brasil e o Ministério da Ciência e Tecnologia de Moçambique, por possibilitar a realização do doutorado numa Instituição Ensino Superior brasileira o que permitiu a produção da presente tese.

Ao Prof. Dr. Marcus Antonio Zanetti, pela competência, orientação, apoio ao projeto e principalmente por me ter aceito como orientada mesmo estando em outro país.

Aos meus irmãos, Isabel, Rufina e Dionísio pelo apoio, amizade, companheirismo e estímulo para continuação realização dos meus estudos.

A colega e amiga Carolina Yumi Cascão Yoshikawa pelo companheirismo na realização deste projeto e apoio incondicional dentro e fora da faculdade.

As professoras: Mariza Pires e Catarina Gomide, em cujos laboratórios foram realizadas as análises e aos técnicos de laboratório Silvana, Rosilda, Roseli e Rafael, pela boa vontade, apoio e assistência no laboratório durante a realização das análises.

Ao professor Júlio Cesar de Carvalho Balieiro pela ajuda com a análise estatística dos dados deste projeto.

À pós-doutoranda Lisia Bertonha Correa pela grande colaboração e apoio técnico e financeiro nas análises da carne.

Ao colega Pacheco pelo apoio na realização das cirurgias de biopsias.

A Leonilda Ester e ao Paulo Cesar por conceder o laboratório CEPTOX e apoiar na realização de análises bioquímicas do soro.

A Roberta e ao Cunha, pelo apoio na análise de minerais.

Aos amigos Laurinda Augusto, Atanásio Vidane e Cesaltina Tchamo, pela compreensão e apoio moral nesta trilha que juntos caminhos.

Ao Professor Arlindo Netto pelo apoio técnico durante a realização do experimento.

Ao pessoal da Coordenadoria da Cooperação internacional em nome da Clélia Godoy e Prof. Dr. Raul Franzollin Neto, pelo apoio e orientação para minha integração.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelo suporte prestado.

Aos funcionários do CEBER e colegas pela grande ajuda na execução do experimento e das análises laboratoriais.

Aos funcionários da fábrica de ração e do matadouro pelo apoio e disposição.

Aos amigos Renata Conti, Laurinda Augusto e Fernando Garcia pela grande ajuda no experimento.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste projeto.

RESUMO

Efeitos de dois níveis de sulfato de cobre e cobre metionina no metabolismo e oxidação de lipídios em ovinos

O cobre está associado ao metabolismo de lipídios, sendo bastante importante na redução do colesterol, e à estabilidade oxidativa da carne, por fazer parte de algumas enzimas antioxidantes. Atributos esses que tornam cada vez mais interessante a pesquisa do uso do mineral em várias espécies, com vista a melhorar a qualidade de vida dos consumidores, uma vez que se pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares e câncer, assim como dos fornecedores de carne pelo possível aumento da vida de prateleira e das características organolépticas do produto. Desse modo, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito da suplementação com dois níveis de sulfato de cobre e cobre metionina sobre o metabolismo de lipídios e colesterol e estabilidade oxidativa lipídica da carne em cordeiros Merino x Texel. Para o efeito, um experimento foi conduzindo na FZEA, USP de Pirassununga utilizando 40 cordeiros Merino x Texel, que foram distribuídos aleatoriamente em 5 tratamentos, totalizando 8 animais em cada. Os animais foram alojados em gaiolas individualizadas para estudo de metabolismo e o experimento teve a duração de 120 dias. Os tratamentos usados foram: controle, sem adição; suplementação com 10 ou 30 mg de Cu/Kg de MS na forma de sulfato de Cobre; suplementação com 10 ou 30 mg de Cu/Kg de MS na forma de cobre metionina. Foram feitas biópsias do fígado dos animais no tempo zero para análise de cobre e colhidas amostras de sangue para dosagem sérica de Cu. Nos dias 0, 28 e 56 foram colhidas amostras de sangue para dosagem de colesterol total, HDL e triglicerídeos. Ao final do experimento, os animais foram abatidos para colheita de amostras de fígado para determinação dos teores de Cu; dosagem das enzimas glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSH), atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GP-x) e determinação dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). No momento da desossa foi medida a espessura da gordura subcutânea entre a 12^a e 13^a costela. No mesmo momento, foram colhidas amostras do músculo *longissimus* para

dosagem de colesterol total, análise de perfil de ácidos graxos e TBARS. O músculo *longissimus* esquerdo foi retirado e congelado a vácuo por 12 meses, após os quais amostras foram colhidas e expostas no expositor refrigerado a 4°C para estudo da estabilidade oxidativa lipídica que foi acompanhada pelos valores de TBARS nos dias 0, 3 e 6. A suplementação com cobre proporcionou maior acúmulo de Cu no fígado ($P<0,05$), porém, a concentração do elemento no músculo não foi alterada pela suplementação. Não houve diferença significativa ($P>0,05$) para espessura de gordura subcutânea, concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol total, HDL e LDL entre os tratamentos controle e suplementação com cobre, independentemente da fonte. A suplementação com cobre alterou o perfil de ácidos graxos da carne ($P<0,05$), com aumento na proporção do ácido láurico (C12:0) do grupo controle comparado com os demais tratamentos ($P<0,05$). Houve redução da concentração de colesterol no músculo *longissimus* ($P<0,05$) dos cordeiros suplementados com Cu em relação ao grupo controle, acompanhado de redução ($P<0,05$) da concentração da GSH e aumento da GSSG no fígado ($P<0,05$). Não houve efeito da suplementação para níveis de TBARS no fígado ($P>0,05$), mas houve efeito significativo ($P<0,10$) no *longissimus* colhido no momento da desossa. A suplementação com Cu não teve efeito sobre os valores de TBARS para as amostras dispostas na vida de prateleira, porém, houve aumento linear desses valores ao longo do tempo. A suplementação com Cu aumentou a atividade da SOD e GP-x ($P<0,05$) no fígado. Estes resultados sugerem que o cobre pode ser usado para melhorar a qualidade de carne sem afetar a sua estabilidade oxidativa lipídica.

Palavras-chave: antioxidantes, colesterol, enzimas, minerais.

ABSTRAT

Effects of two levels of copper sulphate and copper-methionine on metabolism and lipid oxidation in sheep

Copper is associated with lipid metabolism, becoming very important in reducing cholesterol and oxidative stability of meat, because it is part of some antioxidant enzymes. These attributes make interesting the research of this mineral in various animal species to improve the quality life of consumers, since they can reduce the risk of cardiovascular diseases and cancers, as well as of the suppliers of the meat due to the possibility of increase the shelf life and organoleptic characteristics. So the aim of this study was to determine the effect of two levels of copper sulphate and copper methionine on lipid and cholesterol metabolism and lipid oxidative stability in meat of Merino x Texel lambs. For that, an experiment was conducted in the Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, at the Pirassununga Campus using forty male lambs, Merino x Texel, randomly distributed into 5 treatments groups of 8 animals each. The animals were housed in individualized cages for the study of sheep metabolism, for a period of 120 days. Treatments used were: control, without addition of Cu (Co); 10 or 30 mg of Cu/kg of DM in the form of Cu sulphate (CuSO_4); 10 or 30 mg of Cu/kg of DM in the form of copper methionine (Cu-methionine). Liver biopsies were carried out in all animals to determine initial hepatic Cu level. On day 0, 28 and 56 of the experiment blood were collected for analysis of total cholesterol, HDL cholesterol (HDL) and triglycerides. At the end of the experiment, animals were humanely slaughtered and liver samples were collected for later for analysis of Cu, reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), glutathione peroxidase (GP-x), superoxide dismutase (SOD) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). After 24 hours of cooling, left carcasses halves were sawed into two parts between the 12th and the 13th rib to obtain the fat thickness (EGSC). During sawing muscle sample from *m. longissimus* were collected for determination of cholesterol, fatty acids profiles and TBARS. At the same time, *m. longissimus* muscle entire was collected and frozen under vacuum for

12 months for study of oxidative stability. After that, steaks of *m. longissimus* were collected and exposed to "display life" (DL) (4°C) to study oxidative stability which was accompanied by TBARS values on days 0, 3 and 6. The copper supplementation resulted in higher concentration and accumulation of Cu in the liver ($P<0.05$), however, the concentration of Cu in muscle was not altered by supplementation ($P>0.05$). There was no significant effect ($P>0.05$) for fat thickness, serum triglycerides, total cholesterol, HDL and LDL between control and copper supplementation regardless of the source. The copper supplementation altered the fatty acid profile of the meat ($P<0.05$), with an increase in the proportion of lauric acid (C12: 0) in the control group compared with the other treatments ($P<0.05$). Copper supplementation reduced cholesterol concentration in *m. longissimus* ($P<0.05$) in supplemented lambs compared to the control group, this reduction was accompanied by reduction concentrations of GSH ($P<0.05$) and increasing of oxidized glutathione (GSSG) in the liver ($P<0.05$). There was no effect of Cu supplementation for TBARS in the liver however, there was significant effect on *m. longissimus* collected during sawing ($P<0.10$). There was no effect of Cu supplementation for TBARS in the *m. longissimus* exposed in the "Display Life after 12 months vacuum freezing ($P>0.05$), but there was a linear increase in TBARS values during this period. Cu supplementation increased the activity of SOD and GP-x ($P<0.05$) in the liver. These results suggest that copper can be used to improve meat quality without affecting the oxidative stability.

Keywords: antioxidants, cholesterol, enzymes, minerals.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Composição centesimal da Ração.....	58
Tabela 2.2 Concentrações médias de cobre (base seca) em mg/kg de fígado de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre	62
Tabela 2.3 Espessura de gordura subcutânea (EGSC) de ovinos, Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.....	63
Tabela 2.4 Perfil de ácidos graxos (%) do músculo <i>longissimus</i> de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.....	64
Tabela 2.5 Concentrações médias de triglicerídeos e colesterol total, Colesterol HDL e LDL no plasma, em mg/dl e de colesterol (mg/100g de carne) no músculo <i>longissimus</i> de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu ao longo do experimento.....	66
Tabela 2.6 Concentrações médias da GSH e GSS em $\mu\text{mol/g}$ de fígado e relação GSH/GSSG de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.....	68
Tabela 3.1 Composição centesimal da Ração.....	78
Tabela 3.2 Concentrações médias de cobre (base seca) em mg/kg de fígado e músculo <i>longissimus</i> de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.....	82
Tabela 3.3 Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína e glutational peroxidase (GP-x), em nmol/minuto/mg de proteína, no fígado de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.....	84
Tabela 3.4 Médias de TBARS, em mg/kg de fígado e do músculo <i>longissimus</i> de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.....	86

Lista de Abreviaturas

Cu - cobre

CuSO₄ - sulfato de cobre

DL - Display Life

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EGSC - espessura de gordura subcutânea na carcaça

Fe - ferro

g - grama

GR - glutathione redutase

GSH - glutathione reduzida

GP-x - glutathione peroxidase

GSSG - glutathione oxidada

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HMG-CoA - 3-hidroxi-3metil-glutaril-CoA

kg - quilograma

L – litro

mL mililitro

mg - miligrama

mm – milímetros

m. longissimus – músculo *longissimus*

N₂ – nitrogênio

MS - matéria seca

SOD - superóxido dismutase

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1.1	Introdução.....	16
1.2	O elemento mineral cobre.....	19
1.3	O metabolismo de cobre	20
1.4	Funções fisiológicas do cobre	22
1.5	Deficiência de cobre.....	23
1.6	Toxicidade do cobre.....	24
1.7	Necessidades de cobre	26
1.8	Metabolismo e degradação de lipídios em ruminantes	27
1.8.1	Cobre e metabolismo de Colesterol	27
1.8.2	Cobre e metabolismo de ácidos graxos.....	32
1.9	Cobre e estabilidade Oxidativa em lipídios	38
	CAPÍTULO 2. EFEITOS DE DOIS NÍVEIS DE SULFATO DE COBRE E COBRE METIONINA NO METABOLISMO DE LIPÍDIOS EM OVINOS MERINO X TEXEL	53
2.1	INTRODUÇÃO	55
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	57
2.2.1	Local e Período.....	57
2.2.2	Animais.....	57
2.2.3	Instalações e manejo inicial	57
2.2.4	Tratamentos	58
2.2.5	Procedimento experimental	58
2.2.6	Procedimento Analítico.....	59
2.2.6.1	Cobre no fígado.....	59
2.2.6.2	Composição de ácidos graxos do músculo.....	60
2.2.6.3	Análise de colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos	60
2.2.6.4	Determinação da GSH e GSSH.....	61
2.2.7	Delineamento experimental	61

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
2.4 CONCLUSÕES	68
CAPÍTULO 3. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM DOIS NÍVEIS DE SULFATO DE COBRE E COBRE METIONINA NA OXIDAÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE DAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASE E GLUTATIONA PEROXIDASE EM CORDEIROS MERINO X TEXEL	
3.1 INTRODUÇÃO	73
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	75
3.2.1 Local e período do experimento.....	76
3.2.5 Abate e coleta de amostras	78
3.2.3 Congelamento a vácuo.....	79
3.2.4 Vida de prateleira ou “display life” (DL).....	79
3.2.5 Procedimento analítico	79
3.2.5.1 Oxidação lipídica	79
3.2.5.2 Atividade das enzimas antioxidantes	80
3.2.6 Delineamento experimental	81
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
3.3.1 Cobre no fígado e músculo <i>longissimus</i>	82
3.3.2 Enzimas antioxidantes	83
3.3.3 Peroxidação lipídica	84
3.3.3.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	84
3.4 CONCLUSÕES	90
3.5 RECOMENDAÇÕES.....	90

1 CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Introdução

A ovinocultura está presente em praticamente todos os continentes devido principalmente ao grande poder de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações que esta espécie possui. Os maiores rebanhos estão distribuídos nos países da Ásia, África e Oceania (VIANA, 2008). O Brasil é o 19º maior produtor de ovinos do mundo e o primeiro da América do Sul, com um efetivo de 16812100 cabeças e uma produção 80000 toneladas de carne em 2009 (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2011). Segundo o levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil contava com um rebanho de 16.811.721 cabeças de ovinos em 2009, distribuídas por todo o país, porém, concentradas em grande número na região nordeste com 9.566.968 cabeças. A região sudeste constitui o 4º maior produtor desta espécie com 762.133 cabeças, destacando-se o Estado de São Paulo com um grande crescimento na criação desta espécie detendo mais da metade (452.281 cabeças) da região (IBGE, 2009).

O consumo de carne ovina ainda é limitado em comparação a outros produtos de origem animal. O grande desafio da ovinocultura mundial está em elevar o consumo do produto, principalmente em grandes centros mundiais, o que acarretará na maior demanda desta carne no mercado internacional. Assim, o incremento de consumo, por exemplo, nos Estados Unidos e União Europeia, beneficiará os países produtores de carne de qualidade, inclusive o Brasil (VIANA, 2008). Deste modo, a ovinocultura se apresenta como uma das opções do agronegócio brasileiro, em virtude de o Brasil possuir baixa oferta para o consumo interno da carne ovina e dispor dos requisitos necessários para ser um exportador desta carne, como: grande produção, extensão territorial, mão-de-obra de baixo custo, rebanho expressivo, entre outros. Em Moçambique, onde também existe uma grande extensão territorial e mão-de-obra de baixo custo o melhoramento das condições de produção e consequente incremento na quantidade e qualidade do produto pode constituir uma oportunidade para o desenvolvimento da ovinocultura e oferta interna deste produto.

Tendo em vista este grande potencial, bem como a procura de produtos de alta qualidade em relação ao mercado consumidor, que proporcionem melhorias na

qualidade de vida, através de alimento com elevado teor proteico, baixos níveis de colesterol e ácidos graxos saturados e ainda teores satisfatórios de vitaminas e minerais, as pesquisas visam suprir estas necessidades mercadológicas.

A carne ovina como a dos outros ruminantes é rica em diversos nutrientes, sendo frequentemente relacionada às doenças cardiovasculares pela sua proporção de ácidos graxos saturados e pelo teor de colesterol. Alguns experimentos sugeriram que a suplementação de cobre (Cu) proporciona redução da concentração de colesterol no músculo *longissimus*, bem como o aumento dos ácidos graxos insaturados em detrimento aos saturados. Assim efeito da suplementação de Cu na produção de carnes mais saudáveis traria benefícios à saúde pública.

Segundo Luza e Speisky (1996), o Cu na sua forma iônica é considerado um elemento pró-oxidante e pode estimular a peroxidação lipídica no alimento ou no trato intestinal, porém, possui alta capacidade de se ligar a proteínas como, a superóxido dismutase que funciona como antioxidante. Entretanto, o Cu orgânico não possui essa propriedade pró-oxidante, podendo ser mais benéfico aos animais. Desse modo, a utilização de Cu na forma orgânica pode melhorar o status de Cu no organismo e, conseqüentemente, incrementar os bons resultados obtidos com o seu uso na suplementação principalmente com relação ao metabolismo de lipídios e possível redução do colesterol na carne e parâmetros oxidativos, entre outros. Por outro lado, os resultados da suplementação de Cu variam não apenas de acordo com a forma química, mas também em função da espécie e raça animal, tornando-se interessantes estudos com ovinos de raças criadas no Brasil como é o caso do cruzamento Merino x Texel.

Outro aspecto importante a salientar, é que a carne ovina é comercializada principalmente na forma de cortes congelados e atualmente há uma grande demanda por produtos de conveniência, o que leva a necessidade dos produtores fornecerem a carne em cortes refrigerados, prontos para o preparo e consumo rápido. Porém a carne refrigerada é mais susceptível a alterações que comprometem as suas características organolépticas.

Diante do acima exposto, objetivou-se estudar o efeito da suplementação de dois níveis e duas fontes de cobre sulfato de cobre (CuSO_4) e cobre-metionina (Cu-metionina) sobre o metabolismo de lipídios, estabilidade oxidativa lipídica e atividade

das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GP-x) em cordeiros Merino x Texel.

1.2 O elemento mineral cobre

O estudo do elemento cobre (Cu) iniciou-se em 1925, quando se descobriu sua importância sinérgica com o ferro na formação da hemoglobina (MAYNARD, 1984). O Cu também está diretamente ligado à maturação da hemácia e no funcionamento do sistema enzimático. Participa da formação do tecido ósseo e conjuntivo e do sistema imunológico. É importante para a integridade do sistema nervoso central e da musculatura cardíaca (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999; SPEARS, 2000; MCDOWELL, 2003). O cobre é um elemento essencial ao organismo; faz parte de várias enzimas cobre dependentes, desempenha importante papel como biocatalizador do ferro, é utilizado na hematopoiese, na formação da elastina e do colágeno e contribui para a integridade do sistema nervoso central (MARQUES et al., 2003).

A primeira evidência conclusiva de que o cobre é essencial para processos biológicos foi reportada por Hart e colaboradores em 1928, quando demonstraram que o elemento está relacionado à síntese de hemoglobina e foi necessário para recuperação de anemia em ratos (BAKER; AMMERMAN, 1995). Esta importante descoberta foi logo seguida por evidência de que Cu é essencial para o crescimento e para prevenção de uma gama de distúrbios clínicos e patológicos em animais de todas as espécies. Estas investigações permitiram reconhecer que algumas doenças ou distúrbios como ataxia enzoótica de cordeiros, queratinização e/ou despigmentação da lã e pêlo, anemia, ruptura da aorta de coelhos, suínos, cobaias e galinhas, e fragilidade dos ossos eram sinais de deficiências de Cu e poderiam ter sido evitadas com a suplementação de Cu (McDOWELL, 2003).

Segundo Luza e Speisky (1996), o cobre encontra-se distribuído em todos os tecidos do organismo animal, mas sua maior concentração verifica-se no fígado. Os ruminantes, que apresentam alta capacidade de armazenamento de Cu nos hepatócitos, a concentração do elemento no fígado pode ser muito maior em relação aos restantes tecidos. Underwood (1977) reportou experimento em que foi encontrada uma concentração de Cu no fígado de ovinos de 72-79% do total dos restantes tecidos.

1.3 O metabolismo de cobre

A absorção do Cu pode acontecer em todo o segmento gastrointestinal dependendo da espécie, embora alguns locais do intestino delgado tenham um maior papel na sua absorção. Davis e Mertz (1987) demonstraram uma maior atividade de absorção no estômago de humanos e intestino delgado de ovinos. McDowell (2003) acrescentou ainda que existem evidências de que a absorção intestinal do Cu é regulada pela necessidade do organismo, e que a metalotioneína na célula epitelial do intestino tem um papel chave nesta regulação.

Após a absorção intestinal, o cobre entra para a corrente sanguínea, pela circulação portal, ligado a transcupreína e albumina, as duas formas em que pode ser rapidamente levado até ao fígado (LUZA; SPEISKY, 1996). No fígado, que é o órgão central do metabolismo do elemento, e cuja concentração reflete o teor que está sendo ingerido de acordo com McDowell (2003), o Cu é armazenado como eritrocupreína, ceruloplasmina ou nas várias enzimas que contêm Cu, presentes nas células (ANDRIGUETTO, 1981). Os átomos de cobre removidos pelo fígado ou são retidos pelas células do parênquima, excretados na bile, ou liberados de volta para o plasma. Na circulação pós-hepática, a ceruloplasmina, albumina, transcupreína e, certos aminoácidos ligados ao cobre são os principais constituintes que transportam e distribuem o cobre no plasma circulante, sendo que a ceruloplasmina representa uma forma particularmente eficaz para a transferência do metal a partir do plasma para os tecidos extra-hepáticos (LUSA; SPEISKY, 1996). De acordo com estes autores, no plasma sanguíneo de mamíferos, cerca de 90% do Cu plasmático está na forma de ceruloplasmina.

Na maioria das espécies estudadas, a alta percentagem de Cu ingerido aparece nas fezes. A maior parte deste é o Cu não absorvido, mas a excreção mais ativa ocorre via biliar. Quantidades intermediárias são excretadas através da urina, leite e secreções intestinais e uma quantidade muito pequena pela respiração (GOONERATNE; BUCKLEY; CHRISTENSEN, 1989; McDOWELL, 2003).

Em muitas espécies animais é absorvido entre 5-10% do Cu ingerido por animais adultos e 15-30% por animais jovens (McDOWELL, 2003). Em ruminantes, apenas 1-3% do Cu é absorvido, sendo que os pré-ruminantes apresentam uma eficiência de absorção semelhante a dos monogástricos e mais eficiente que os ruminantes adultos. Num estudo sobre a variação de disponibilidade do cobre da

dieta em cordeiros na fase de aleitamento ou desmamados, Suttle (1975) verificou uma absorção de 47% do Cu da dieta na fase de aleitamento contra 8-10% após o desmame. A baixa absorção de cobre em ruminantes é em grande parte devido às complexas interações que ocorrem no ambiente ruminal, como a ligação dos minerais a fibra nos alimentos e/ou ligação dos minerais aos componentes de fibra não digerida no trato gastrointestinal (SPEARS, 2003).

A absorção de Cu é alta no período de deficiência em relação ao período em que o nível adequado é atingido. Por outro lado, a absorção intestinal do cobre pode ser influenciada pela sua forma química e interação com outros fatores dietéticos como presença de níveis elevados de cálcio, enxofre, ferro, zinco cádmium e molibdênio. Outros fatores que influenciam a absorção de Cu incluem, a presença de quelantes como aminoácidos e citratos que aumentam a absorção; agentes ligadores como fibra e bÍlis que podem reduzir a absorção (McDOWELL, 2003; SPEARS, 2003). A mudança na forma química pela qual o cobre está presente nos alimentos pode afetar a sua disponibilidade, pois o capim fresco é menos eficiente para aumentar o depósito do elemento em bovinos do que o feno ou capim desidratado, com teores iguais de cobre (ANDRIGUETO, 1981).

A revisão de Spears (2003) indicou que alta concentração de molibdênio na dieta em combinação com moderada a alta concentração de enxofre na dieta resulta na formação de tiomolibdatos (mono-, di-, tri- e tetramolibdatos) no rúmen. Os tiomolibdatos reduzem a absorção de cobre, e certas espécies de tiomolibdatos podem ser absorvidas e sistemicamente interferir com o metabolismo de cobre. Os tiomolibdatos associados com a digesta sólida do rúmen (bactÉrias, protozoÁrios e partículas não digerÍveis) formam um complexo insolúvel com o Cu, os Cupro-tiomolibdatos (Cu-TMs) que são insolúveis e indisponÍveis para absorção mesmo em condições ácidas. Independentemente do molibdênio, altos níveis dietéticos de enxofre reduzem a absorção de cobre, talvez através de formação de sulfeto de cobre, composto altamente insolúvel que não pode ser absorvido (SUTTLE, 1991). Este autor reportou ainda que os efeitos sistêmicos no metabolismo de cobre atribuídos a absorção de tiomolibdatos incluem: o aumento da excreção biliar de cobre das reservas do fÍgado; a forte ligação do cobre à albumina plasmática, o que resulta em transporte reduzido de cobre disponÍvel para processos bioquímicos e a remoção de cobre a partir de metaloenzimas.

Existem evidências de diferenças genéticas no uso ou absorção sistêmica de cobre. Wiener et al. (1978) comparando as respostas na concentração plasmática de Cu para reposição oral e intravenosa do elemento, usaram cordeiros das raças North Ronaldsay (Orkney), Scottish Blackface, Welsh mountain e cruzamentos destas com o North Ronaldsay e concluíram que as grandes diferenças entre os grupos em resposta à administração oral de Cu foram em grande parte atribuíveis às diferenças raciais na eficiência de sua absorção. Outros estudos também indicaram a existência de diferenças raciais na concentração plasmática de Cu usando animais da mesma idade e de raças diferentes, em condições similares de pastagem com administração de iguais quantidades de Cu (WIENER; FIELD; JOLLY, 1970; WIENER et al., 1974; WIENER; HERBERT; FIELD, 1976; HARRISON; VANRYSEN; BARROWMAN, 1987; GOONERATNE; BUCKLEY; CHRISTENSEN, 1989).

1.4 Funções fisiológicas do cobre

O Cu é um elemento essencial requerido para respiração celular, formação dos ossos, função cardíaca, desenvolvimento do tecido conectivo, mielinização da medula espinhal, queratinização e pigmentação de tecidos. O Cu serve também como um essencial cofator catalítico para várias metaloenzimas fisiologicamente importantes incluindo a citocromo oxidase, lisil oxidase, Cu-Zn superóxido desmutase, dopamina β -hydroxylase e tirosinase (McDOWELL, 2003).

O Cu tem um importante papel na absorção e mobilização do ferro para a formação de hemoglobina, onde baixos níveis de ferro são encontrados no soro em casos de deficiência de Cu, o que está relacionado no atraso da maturação e tempo de vida curta dos glóbulos vermelhos (GABRIELLI et al. 2000). A relação do cobre com o sistema imunitário é através da enzima Zn e Cu superóxido dismutase e, seu papel é importante no sistema fagocitário dos macrófagos (URIU-ADAMS; KEEN, 2005).

Um grande número de estudos demonstrou o efeito do Cu no metabolismo de lipídios em várias espécies animais, reduzindo os níveis de colesterol e melhorando o perfil de ácidos graxos (FRIEDEWA; FREDRICK; LEVY, 1972; ENGLE et al., 2000b; ENGLE et al., 2000a; ENGLE; FELLNER; SPEARS, 2001; ENGLE, 2011). Segundo McDowell (2003), o elemento está presente em pelo menos três enzimas

que parecem ter importante efeito na defesa antioxidante: as superóxido dismutases (SODs) largamente distribuídas no meio extra- e intracelular, a ceruloplasmina extracelular e Cu-metioninas intracelulares.

1.5 Deficiência de cobre

A deficiência de cobre provoca uma grande variedade de manifestações clínicas em diferentes espécies, sendo a anemia o sintoma geral em todas as espécies (ANDRIGUETTO, 1981). A grande variedade de desordens por deficiência de Cu em ruminantes incluem os seguintes sinais: anemia, diarreia severa, fraqueza, depressão do crescimento, alteração da coloração dos pêlos, infertilidade temporária, falhas cardíacas e fragilidade dos ossos longos (GOONERATNE; BUCKLEY; CHRISTENSEN, 1989; UNDERWOOD; SUTTLE, 1999; McDOWELL, 2003; BLACK; FRENCH, 2004).

Há evidências crescentes de que a imunocompetência de animais com deficiência de Cu é menor do que em animais com Cu adequado. A função de leucócitos parece ser prejudicada em ovinos e bovinos com baixa atividade de superóxido dismutase. Evidências de que a diminuição da resistência à infecção clínica é uma consequência da deficiência de Cu em condições práticas foi fornecido por Woolliams et al. (1986) a partir de observações em ovelhas geneticamente selecionadas em pastagem melhorada.

A desmielinização do sistema nervoso central ou ataxia neonatal é uma das desordens que ocorre em animais recém-nascidos cujas matrizes consumiram pastagem ou alimento pobre em Cu e, pode ocorrer logo após o nascimento ou algumas semanas depois do nascimento. Os sinais clínicos incluem: paralisia espástica, incoordenação dos membros posteriores, andar cambaleante e com as pernas rígidas. Esta doença foi reportada por vários autores em condições experimentais e naturais em cordeiros e vitelos (WIENER; FIELD, 1966; WIENER; SAMPFORD, 1969; WIENER et al., 1978; PICCO et al., 2001; McDOWELL, 2003; NOURI; RASOOLI; MOHAMMADIAN, 2005).

No Rio Grande do Sul, foram reportados dois quadros clínicos associados à carência de cobre em bovinos. O primeiro caracterizava-se por hipomielinogênese congênita e apresentava um quadro clínico caracterizado pelo nascimento de bezerros com opistótomo e incapacidade para se manter em pé. No outro, o quadro

clínico era caracterizado por mortes súbitas. Análises de Cu no fígado durante vários anos indicaram teores baixos (1,3 a 8,4) ppm–base seca (b.s.) (TOKARNIA et al., 1999; MARQUES et al., 2003). Mais tarde foi realizado um estudo na mesma região para verificar se as mortes súbitas eram causadas por intoxicação por pastagem ou por carências de cobre onde, conclui-se que se tratava de carências de do elemento (MARQUES et al., 2003).

1.6 Toxicidade do cobre

A intoxicação crônica e aguda por Cu é encontrada em várias partes do Mundo. Esta pode acontecer nos animais domésticos quando encontrados em pastagem naturais com quantidades elevadas de cobre, em casos de consumo de dietas com alto nível do elemento, assim como pode acontecer mesmo tendo níveis adequados de Cu, mas com baixas concentrações de Mo e S, ou ainda consumo de sais com alta concentração de cobre (UNDERWOOD, 1983).

Existem variações consideráveis na tolerância a toxicidade por cobre em várias espécies e raças animais, por exemplo, a Merino é mais tolerante ao Cu dietético que as outras raças de ovinos (McDOWELL, 2003). Os ruminantes são mais sensíveis do que o não ruminantes. Outros fatores que podem afetar o máximo nível de Cu tolerável incluem: o tempo de exposição, idade, nível de concentração de Cu no fígado no início da exposição ao elemento, toxinas dietéticas que podem afetar a funcionalidade do fígado e induzir crises hemolíticas e concentrações dietéticas de zinco e ferro (NRC, 2005).

Os níveis de Cu toleráveis em ruminantes foram calculados assumindo níveis normais de enxofre e molibdênio na dieta. Assim, de acordo com o NRC (2005), o nível máximo de Cu tolerável em ovinos é de 15 mg/kg de MS da dieta.

Em ovinos, o fígado contém aproximadamente metade do total de cobre da carcaça (LANGLANDS et al., 1984). Níveis de Cu superiores a 500 mg/kg no fígado e de 100mg/kg nos rins indicam a ocorrência da intoxicação de acordo com Riet-Correa et al. (1989) contudo, os sinais clínicos geralmente não ocorrem até que se alcance uma concentração de 1000 mg/kg ou mais de MS no fígado (UNDERWOOD; SUTTLE, 1999). A concentração dietética de Cu necessária para causar toxicose em ovinos varia bastante de acordo com os estudos e é grandemente afetada por fatores genéticos e dietéticos. De acordo com NRC (1980),

o nível de cobre na forma de sulfato de cobre (CuSO_4) que provoca intoxicação aguda em ovinos é de 9-20 mg/kg de peso vivo e em bovinos é de 20 mg/kg de peso vivo. Adicionalmente o NRC (2005), reportou estudos que indicaram casos de intoxicação crônica resultantes do consumo de CuSO_4 nas doses de 20-30 mg/kg de PV ou ainda de 18 a 33.5 mg/kg de MS durante meses. Contudo, alimentação de ovelhas com até 30 mg/kg de Cu na forma de sulfato de cobre e cobre proteinado não causou uma toxicidade observável durante o período de 73 dias (ECKERT et al., 1999).

De acordo com o NRC (1980), a intoxicação por cobre pode levar o animal à anemia, prejudicar o crescimento e ocasionar problemas reprodutivos e, em estágios mais avançados, vômitos, salivação, convulsão, paralisia, podendo levar a morte. A intoxicação pode se apresentar em duas formas. A primeira caracteriza-se pela intoxicação aguda, decorrente da ingestão abrupta de elevadas quantidades de Cu num curto período de tempo, na qual o animal apresenta uma severa gastroenterite logo após a uma alta ingestão desse mineral. A outra, denominada de intoxicação crônica, onde o acúmulo de Cu é progressivo podendo durar meses a anos, é a mais comum e caracteriza-se pelo acúmulo de Cu principalmente no fígado, sem manifestações de sinais clínicos; posteriormente, sob algum fator desconhecido, o Cu é liberado causando uma hemólise maciça, e que provocará icterícia e hemoglobinúria. Durante a fase pré-hemolítica ocorre necrose do fígado e as enzimas do soro, indicativas de danos no fígado (aspartato aminotransferase, glutamato desidrogenase e sorbitol desidrogenase) apresentam valores elevados, mas o nível de cobre no soro geralmente apresenta-se normal (HOWELL; GOONERATNE, 1987).

Foram reportados dois surtos de intoxicação crônica por Cu em ovinos, com morte de pelo menos 21 animais. Os valores de Cu no fígado, em quatro dos cinco animais, oscilaram entre 1212 e 2071 mg/kg e no rim entre 124 e 159 mg/kg (PILATI; BARROS; GIUDICE, 1990). Diversos casos de intoxicação espontânea por cobre têm sido diagnosticados no Brasil (TOKARNIA et al., 1999; RIBEIRO; RODRIGO; SMIDELRE, 2007; RIET-CORREA et al., 1989).

1.7 Necessidades de cobre

Os requerimentos de cobre em ovinos são dependentes de fatores dietéticos e genéticos tornando difícil calcular as exigências, sem especificar as condições para que se aplica. Concentrações de enxofre e molibdênio são os principais fatores que influenciam os requerimentos de cobre na dieta. Estes minerais formam complexos insolúveis com o cobre, reduzindo assim sua absorção e aumento dos níveis dietéticos necessários para atender às exigências (NRC, 1985).

Embora seja impossível definir requerimentos exatos para o cobre, várias estimativas da quantidade de cobre que deve ser fornecida na dieta de ovinos foram feitas. Na revisão de 1975 do NRC citada no NRC (2006) , foi sugerido que um requerimento de Cu de 5 mg/kg para ovinos alimentados com dietas contendo níveis normais de enxofre e molibdênio e mais tarde elevou-se o valor para 7-11 mg/kg de MS ingerida (NRC, 1985). O NRC (1985) referiu-se ainda ao uso de uma abordagem fatorial que estimou as exigências de ovelhas para o cobre da seguinte forma: para ovinos em crescimento entre 5 e 40 kg de peso vivo, 1,0-5,1 mg de Cu/kg de MS da dieta , para manutenção de ovinos adultos, 4,6 a 7,4 mg de Cu/kg MS da dieta; para a gestação, 6,2-7,5 mg de Cu/kg de MS da dieta e para a lactação, 4,6-8,6 mg de Cu/kg MS da ração . Estas recomendações não levaram em conta as diferenças individuais ou genética, mas sugerem fatores de ajuste para as dietas que não contenham os níveis normais de enxofre (2,5 g/kg MS) e molibdênio (2-3 mg/kg MS).

Mais recentemente estimou-se o requerimento de Cu em 4,3 – 28,4 mg/kg de MS. Esta última estimativa foi baseada em coeficientes de absorção de 0,06; 0,03 e 0,015 para volumosos mais concentrados, pasto verde normal e pasto rico em molibdênio. Portanto, a grande variação nos coeficientes de absorção do Cu combinados com variados níveis de absorção dos antagonistas (Mo, S, Fe, Cd e Zn) e interações metabólicas (Mo, Zn, Cd, esteroides, resposta imune) significa que os requerimentos de Cu definidos fornecem apenas uma medida aproximada das exigências na dieta (NRC, 2006).

1.8 Metabolismo e degradação de lipídios em ruminantes

1.8.1 Cobre e metabolismo de Colesterol

O colesterol é um álcool de origem exclusivamente animal, essencial para manter a saúde e diversas funções no organismo animal. É precursor de sais biliares, hormônios esteróides e vitamina D, desempenhando importante função no metabolismo de cálcio e fósforo. Na maioria dos mamíferos, o principal local de síntese do colesterol endógeno é o fígado (SIPERSTEIN, 1970; ENGLE, 2001). Liepa, Betz e Linder (1978) afirmaram que nos ruminantes o principal local de síntese de colesterol é o intestino delgado e tecido adiposo, com o fígado produzindo uma pequena proporção do colesterol endógeno total. Esta afirmação foi feita com base nos resultados encontrados num experimento que realizaram com o objetivo de determinar a taxa de síntese de colesterol em vários tecidos de cabritos ruminantes (R) e não-ruminantes (NR). Para o efeito, os cabritos R foram alimentados com uma quantidade leite de cabra equivalente a 15% do seu peso corporal por dia durante um mês, seguida de uma dieta não purificada a base de feno de gramíneas por três meses, enquanto os cabritos NR foram alimentados com uma quantidade equivalente de leite de cabra a 15% do peso corporal por dia durante 4 meses. As taxas de síntese do colesterol foram medidas a partir de acetato e glicose (precursores da síntese de colesterol) e determinadas para o tecido adiposo, cérebro, fígado e intestino delgado. Quando o acetato foi usado como precursor, observou-se que 71% e 90% da síntese de colesterol total em todos os tecidos medidos ocorreram no tecido adiposo dos cabritos R e cabritos NR, respectivamente. Quando a glicose foi utilizada como o precursor, o intestino delgado e tecido adiposo foram responsáveis por 58% e 29% do total da síntese do colesterol em cabritos R, enquanto que nos cabritos NR, o tecido adiposo sintetizou 60% do colesterol total e o intestino sintetizou apenas 20%. Com a glicose como precursor, o cérebro sintetizou 10% e 19% do total de colesterol nos cabritos R e NR, respectivamente. Com os dois precursores, o fígado teve uma contribuição menor para a síntese de colesterol tanto para os cabritos R como para os NR.

O colesterol é sintetizado a partir do acetil-CoA em quatro etapas. Na primeira etapa três moléculas de acetil-CoA condensam-se para formar o β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) através de duas reações catalisadas pelas enzimas

tiolase e HMG-CoA sintetase. A terceira reação é o passo decisivo, sem retorno, onde ocorre a redução do HMG-CoA em mevalonato, para o qual duas moléculas de NADPH doam cada uma delas dois elétrons, sendo esta etapa catalisada pela HMG-CoA redutase (DAVID; COX, 2006). A semelhança dos outros órgãos, esta transformação do HMG-CoA a mevalonato é a etapa limitante da síntese de colesterol (STRANDBERG; TILVIS, 1988). Na segunda etapa ocorre a conversão do mevalonato em duas unidades de isopreno ativado, onde três grupos fosfatos são transferidos de três moléculas de ATP para o mevalonato. Segue-se a etapa da condensação de seis unidades de isopreno ativadas para formar o esqualeno e na quarta e última etapa o esqualeno é convertido em metil esteróides, que após várias reações que incluem a perda de grupos metila é transformado em colesterol (DAVID; COX, 2006).

O consumo de Cobre dietético em concentrações fisiológicas demonstrou ter efeito na alteração do metabolismo lipídico em várias espécies (ENGLE, 2011). Um possível mecanismo para a redução de concentração de colesterol observada no soro e tecidos em animais suplementados com cobre pode ser a concentração elevada de cobre no fígado. Kim, Chao e Allen (1992) demonstraram que a deficiência de cobre em ratos causa hipercolesterolemia devido ao aumento hepático das concentrações glutathiona reduzida (GSH), o que aumenta a atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA- redutase) no fígado, a enzima limitante na síntese de colesterol. Altas concentrações de Cu no fígado podem regular indiretamente biossíntese do colesterol, diminuindo a glutathiona reduzida (GSH) e aumentando a glutathiona oxidada (GSSG) (KIM; CHAO; ALLEN, 1992; BAKALLI et al., 1995). O decréscimo da GSH intracelular ocorre através da proteção das células hepáticas dos efeitos tóxicos dos radicais livres, provenientes da alta concentração de cobre. O cobre, ao entrar nas células do fígado, é rapidamente complexado pela GSH e transferido para metalotioneína, a forma pela qual ele é armazenado (FREEDMAN; CIRIOLO; PEISACH, 1989). Na sua recente revisão de 2011, Engle relatou que vários autores reportaram que o aumento das concentrações celulares de glutathiona oxidada (GSSG) diminui a atividade da HMG-CoA redutase e que com uma diminuição da HMG-CoA redutase, o fluxo de carbono através da via mevalonato seria reduzido, diminuindo assim, a síntese de colesterol.

Em experimento realizado com frangos de corte alimentados com dieta controle a base de milho e farelo de soja, do nascimento até os 42 dias de vida, ou pela dieta controle suplementada com 250 mg de Cu/kg na forma de sulfato de cobre pentahidratado (por 35 ou 42 dias), observaram que houve uma redução de colesterol de 11,8% no soro e 20,4% no músculo do peito nas aves suplementadas (BAKALLI et al., 1995).

Resultados semelhantes foram encontrados em experimento com suínos no qual Armstrong et al. (2001) determinaram se as concentrações farmacológicas de diferentes fontes de cobre afetariam o metabolismo de lipídios e colesterol. E observaram que 100 mg/kg de cobre na forma de citrato de cobre diminuiu os níveis de colesterol sérico no 12º dia da fase de terminação. Em outro trabalho nesta espécie, Rey, Lopez-Bote e Buckley (2004) suplementaram a dieta de animais criados em confinamento ou em regime extensivo com cobre e/ou vitamina E, para observar o efeito sobre o colesterol total, lipídios neutros e polares e oxidação do colesterol no músculo *longissimus*. O teor de colesterol total do músculo não foi significativamente afetado. No entanto, a relação colesterol:fosfolipídio foi alta e consequentemente a fluidez da membrana foi menor nos animais alimentados em forma extensiva quando comparados aos animais confinados e suplementados com o cobre.

Em ruminantes, as concentrações séricas totais de colesterol e as concentrações de colesterol do músculo *longissimus* têm sido reduzidas devido à suplementação de Cu em novilhos (ENGLE; SPEARS, 2000a; ENGLE et al. 2000a; ENGLE; SPERAS, 2000b). Porém, nos pequenos ruminantes, principalmente a espécie ovina carrega mais estudos, em virtude de até então, existir um número limitado de estudos neste sentido.

Engle et al. (2000a) realizaram experimento para determinar o efeito de diferentes níveis e fontes de Cu no metabolismo de lipídios e colesterol em bovinos da raça Angus e cruzamentos Angus-Hereford em crescimento e terminação. Os animais foram suplementados com CuSO₄, citrato de cobre (C₆H₄Cu₂O₇), cobre proteinado e cloreto de cobre tribásico (Cu₂OH₃Cl), nas doses de 20 ou 40mg de Cu/kg de MS para todas as fontes. O colesterol sérico não foi afetado durante a fase de crescimento, entretanto, reduziu aos 84, 96, 116 dias da fase de terminação nos

animais suplementados com cobre em relação ao grupo controle. A concentração de colesterol no músculo *longissimus* reduziu com a suplementação de cobre.

Em outro experimento, estudou-se o efeito de cobre no metabolismo lipídico, desempenho e fermentação ruminal em bovinos da raça Angus e Herefordxangus na fase de terminação, suplementando com 10 ou 20 mg/kg de MS de CuSO₄ e obtiveram diminuição do colesterol sérico e do músculo *longissimus*, a partir do 56º dia. Os resultados indicaram que a suplementação com Cu em dietas concentradas contendo 4,9 mg de Cu/kg de MS alterou o metabolismo de colesterol em novilhos (ENGLE; SPEARS, 2000b).

Com o objetivo de determinar o efeito da suplementação com Cu e óleo de soja sobre metabolismo de lipídios no rúmen e nos tecidos e características de carcaça de novilhos Angus na fase de terminação, foi conduzido experimento onde, se concluiu que a suplementação com cobre reduziu os níveis de colesterol enquanto o óleo de soja teve tendência a aumentar os níveis de colesterol no plasma. As concentrações de Cu hepático foram altas nos animais que receberam Cu e baixas nos animais suplementados com óleo de soja (ENGLE et al., 2000c). Nesta mesma raça, Johnson e Engle (2003) objetivando investigar o efeito da fonte de Cu sobre o metabolismo de lipídios e colesterol, em novilhos Angus, usaram Cu na forma de CuSO₄ e Cu complexado a aminoácido (Cu Availa) dividiram os animais em 5 grupos: um controle sem Cu, 2 grupos recebendo 10 mg de Cu/kg de MS de CuSO₄ e Cu complexado a aminoácido e outros dois grupos recebendo 20 mg/kg de CuSO₄ e Cu complexado a aminoácido. Os ácidos graxos não-esterificados do plasma foram semelhantes entre os tratamentos. Novilhos recebendo 10 mg Cu / kg de MS de Cu availa apresentaram maior concentração plasmática de colesterol total em relação a novilhos recebendo 10 mg Cu/kg de MS de CuSO₄.

Em bovinos da raça Simental, Engle e Spears (2001) conduziram um experimento a fim de avaliar os efeitos de 0, 10 ou 40mg/kg de MS na forma de CuSO₄, sobre o desempenho, características de carcaça e metabolismo de lipídios na fase de crescimento e terminação. Observou-se que as concentrações plasmáticas de Cu foram altas nos novilhos suplementados a partir dos 56 dias da fase de crescimento e permaneceram altas durante toda a fase de terminação. O Cu no fígado foi alto nos novilhos suplementados no final da fase de crescimento e dos 84 dias até ao fim da fase de terminação, sendo que, os novilhos que receberam 40

mg de Cu tiveram níveis mais altos. Os níveis de colesterol plasmático e do músculo *longissimus* não sofreram alterações entre os tratamentos, indicando que a suplementação com Cu em bovinos da raça Simental não teve efeito no metabolismo de colesterol. É interessante destacar que os bovinos dessa raça são os mais sensíveis à deficiência de cobre.

Em bovinos leiteiros, um experimento foi conduzido para determinar os efeitos do cobre dietético sobre o “status” de Cu, colesterol sérico e perfil de ácidos graxos no leite em vacas holandesas. Grupos de três vacas semelhantes em paridade, dias em lactação e produção de leite foram designados aleatoriamente para um dos três seguintes tratamentos: 1) controle (sem suplementação de Cu), 2) 10 mg de Cu / kg de MS a partir de sulfato de Cu (CuSO_4), e 3) 40 mg de Cu / kg de MS de CuSO_4 . Concentrações de Cu no fígado foram maiores nas vacas suplementadas com Cu no final do estudo (61 dias). Vacas recebendo 40 mg de Cu / kg de MS tiveram maiores concentrações de Cu no fígado do que as vacas que receberam 10 mg de Cu. As concentrações totais de colesterol sérico foram maiores em vacas recebendo Cu suplementar. Vacas recebendo 40 mg de Cu/kg de MS apresentaram concentrações mais elevadas de colesterol do que as vacas que receberam 10 mg de Cu, contrariando os resultados referenciados com novilhos de carne (ENGLE; FELLNER; SPEARS, 2001).

Em ovinos, experimento foi conduzido para determinar o efeito do cobre dietético (Cu) sobre o desempenho, características de carcaça e o metabolismo lipídico em cordeiros Dorper x Mongólia. Os animais foram suplementados com níveis de cobre de 0, 10 e 20 mg/kg de MS na forma de Cu –lisina ou cloreto de cobre tribásico ($\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$; TBCC). O desempenho não foi afetado pela suplementação. A suplementação com cobre aumentou a concentração sérica de triglicerídeos, reduziu a concentração de colesterol total no soro e a concentração de dos ácidos graxos não esterificados tendeu a reduzir. No entanto, as concentrações de colesterol-HDL e colesterol-LDL no soro não foram afetadas pelos tratamentos (CHENG et al.; 2008)

1.8.2 Cobre e metabolismo de ácidos graxos

O extenso metabolismo de lipídios que tem um impacto significativo sobre o perfil de ácidos graxos, disponíveis para a absorção e utilização de tecidos ocorre no rúmen. Os dois principais processos que ocorrem no rúmen são a hidrólise de ligações éster dos lipídios dos alimentos e a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados, a qual reduz o número de duplas ligações dos ácidos graxos insaturados (AGI) advindos das fontes de gorduras (LOCK et al., 2006). A hidrólise de lipídios da dieta é predominantemente realizada pelas bactérias ruminais, com pouca evidência para um papel dos protozoários e fungos do rúmen, ou de lipases salivares e vegetais. A extensão da hidrólise é geralmente elevada (> 85%), podendo ser afetada por alguns fatores como o nível de gordura dietética, o baixo pH do rúmen e utilização de ionóforos que podem inibir o crescimento e atividade das bactérias (DOREAU; DEMEYER; VAN NEVEL, 1997; BAUMAN; LOCK, 2006). Grande parte da hidrólise dos triglicerídeos é feita pelas lipases microbianas (HENDERSON; HODGKISS, 1973).

Polan, Tove e McNeill (1964) desenvolveram um modelo de ensaio de biohidrogenação para demonstrar que várias espécies de bactérias interagem para converter, por exemplo, o ácido linoleico a ácido 9-*cis*, o ácido linoleico conjugado 11-*trans* (CLA) a ácido *trans*-vacênico (TVA) e o (C18:1 *t*11) ao ácido esteárico. Parte do CLA e TVA são absorvidos intactos (sem serem transformados). Uma das particularidades do metabolismo de ácidos graxos dos ruminantes é que eles podem sintetizar ácidos graxos essenciais a partir do grupo metila terminal da cadeia acil do ácido graxo. Por exemplo, o ácido esteárico (18:0) pode ser desaturado em ácido oleico (18:1) pelas enzimas desaturase no fígado, no tecido adiposo, tecido da mucosa intestinal e da glândula mamária (DRACKLEY, 2000). Investigação de Griinari et al. (2000) demonstrou que o TVA pode ser desaturado pela enzima acetil Δ^9 - desaturase no tecido para formar CLA assim, como confirmou a importância fundamental da atividade desta enzima na produção de ácido miristoleico (C14:1), oleico (C18:1 *cis*) e palmitoleico (C16:1). Portanto, ambas as fontes de CLA contribuem para o CLA no leite e carne de ruminantes.

A outra grande fonte de ácidos graxos dos ruminantes é de origem endógena sendo que, o tecido adiposo é o local anatómico responsável por mais de 90%, da sua biossíntese (VERNON, 1980). A glicose e o acetato constituem as principais

fontes de carbono para a síntese de ácidos graxos no tecido adiposo em suínos e ruminantes (NAFIKOV; BEITZ, 2007). Smith e Crouse (1984) mostraram que a especificidade do substrato pode variar com o local de depósito, como é o caso do tecido adiposo intramuscular de bovinos de corte, onde a glicose, em vez de acetato parece ser o substrato primário para a síntese dos ácidos graxos. De acordo com Nafikov e Beitz (2007), alguns estudos explicaram que a glicose foi um precursor pobre para ácidos graxos de cadeia longa devido à baixa atividade de enzima de clivagem do citrato (ATP:citrato liase) e da enzima málica (NADPH-malato desidrogenase) nos tecidos lipogênicos de ruminantes em comparação com os dos ratos. Assim, o acetato e não a glicose foi considerado o principal gerador de acetil-CoA citosólico para síntese de ácidos graxos que ocorre no citoplasma. Outras fontes de carbono para síntese de ácidos graxos incluem: lactato, piruvato, propionato, metilmalonato, butirato e β -hidroxibutirato.

A principal fonte de hidrogênio para a síntese de ácidos graxos é o nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Três vias principais podem gerar citosólico NADPH para síntese de ácidos graxos: via pentose fosfato, malato desidrogenase, e via de isocitrato desidrogenase. Vernon (1980) resumiu os dados de vários investigadores e indicou que, em ruminantes cerca de 50-80% da NADPH necessário para a síntese de ácidos graxos no tecido adiposo é produzido pela oxidação da glicose através via das pentoses, pela ação das enzimas glicose 6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase. O restante do NADPH é gerado através da via isocitrato desidrogenase NADP-isocitrato desidrogenase, constituindo até 50% da NADPH necessária para a síntese dos ácidos graxos na glândula mamária. A contribuição da via malato desidrogenase para a produção de NADPH pela ação da enzima NADP-malato desidrogenase em ruminantes é insignificante por causa da baixa atividade da enzima málica em ruminantes (NAFIKOV; BEITZ, 2007).

A síntese endógena de ácidos graxos conta ainda com a atividade de várias enzimas na conversão de acetato e glicose em ruminantes nomeadamente, acetil-CoA sintetase; acetil-CoA carboxilase; ácido graxo sintetase; enzimas da glicólise (hexoquinase, frutose 1,6-difosfato de aldolase, fosfoglucomutase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase); piruvato desidrogenase; citrato sintetase e ATP-citrato-liase (VERNON, 1980).

O sistema acil desidrogenase de gorduras (responsável pela insaturação dos ácidos graxos, principalmente o palmítico e esteárico) parece ser o provável responsável pelo mecanismo pelo o qual é observado um aumento de ácidos graxos insaturados no músculo *longissimus* em novilhos suplementados com cobre (THOMPSON; ALLEN; MEADE, 1973; HO; ELLIOT, 1974; ENGLE, 2011). A alimentação com concentrações farmacológicas de cobre aumentaram a atividade da enzima acil dessaturase no fígado ou tecido adiposo em suínos. A suplementação com 250 mg de Cu/kg de MS de CuSO₄ em suínos reduziu a proporção de ácidos esteárico e palmítico com concomitante aumento no ácido mirístico de cadeia média, bem como os principais ácidos graxos de cadeia longa nos depósitos de gordura (HO; ELLIOT, 1974). Em bezerros alimentados com sucedâneo de leite contendo 1.000 mg de Cu/L, a atividade aparente da enzima delta-9-dessaturase no fígado e coração foi maior do que nos bezerros do grupo controle alimentados com substituto do leite contendo 10 mg de Cu/L (JENKINS; KRAMER, 1989). Os achados destes últimos autores foram consistentes com relatos do aumento do Cu dietético promover atividade da delta-9-dessaturase em fígado de ratos e suínos (CUNNANE, 1982).

De acordo com a revisão de Engle (2011), outro possível mecanismo para o aumento observado na composição de ácidos graxos insaturados no músculo *longissimus* de bovinos suplementados com Cu, pode ser devido ao efeito do elemento na biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos insaturados. Biohidrogenação de C18:2 inicia com a isomerização das moléculas *cis*-9, *cis*-12 em *cis*-9 *trans*-11 C18:2 como o primeiro intermediário. O passo seguinte é a redução da dupla ligação *cis*-9, resultando em *trans* C18:1 como o segundo intermediário. Esta etapa envolve uma redutase usando doadores de elétrons. O passo final é outra redução, resultando em C18:0. O Cobre pode inibir biohidrogenação de C18:2, interferindo com a formação de um centro eletronegativo envolvido na transferência de hidrogênio na isomerização de C18:2.

A adição de 20 ou 40 mg de Cu/kg de MS em dietas de crescimento e terminação de bovinos aumentou as proporções de ácidos graxos polinsaturados na gordura total no músculo *longissimus* (ENGLE et al. 2000a). O isômero *trans* C18:1, um intermediário da biohidrogenação, foi diminuído no músculo *longissimus* em bovinos suplementados com Cu, indicando um efeito de Cu na biohidrogenação.

Mais pesquisas são necessárias para determinar o efeito de Cu na biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos insaturados (ENGLE, 2011).

No experimento de Engle e Spears (2000b), onde se avaliou também o efeito de cobre no metabolismo lipídico verificou-se que a concentração de ácidos graxos polinsaturados foi alta em novilhos que receberam cobre. Esses resultados corroboram com Engle et al. (2000c), onde se observou um aumento do 18:3 e diminuição de isômeros 18:1 *trans* no líquido ruminal nos novilhos suplementados com cobre.

Engle e Spears (2004) estudando o efeito do sistema de pastejo ou confinamento, alto nível de óleo de milho e cobre sobre o ácido linoleico conjugado (CLA) e outros ácidos graxos no músculo *longissimus* de novilhos Angus em terminação, observaram que os novilhos em pastagem com consumo limitado de concentrado tiveram concentrações de CLA no músculo *longissimus* aproximadamente três vezes maior do que aqueles que receberam milho convencional. Novilhos suplementados tenderam ao aumento do CLA e os novilhos em pastagem tiveram baixo C16:0 e alto C10:0, C17:0, C18:0, C20:3 e ácidos graxos poli-insaturados totais em relação aos animais que receberam milho convencional. A concentração muscular de C18:1 *trans* e C17:0 foi baixa para os animais suplementados com cobre. Esses resultados indicaram que bovinos em pastagem, com limitado consumo de grão aumentaram o nível de CLA no músculo *longissimus* e que a suplementação com cobre altera a composição de ácidos graxos no mesmo músculo. Não houve alteração de níveis de colesterol sérico.

Johnson e Engle (2003) objetivando estudar os efeitos de diferentes concentrações e fontes de cobre no metabolismo lipídico em novilhos da raça Angus, em terminação, conduziram um experimento em que concluíram que os animais que receberam 20mg de cobre por kg de MS, na forma de Cu avaiila, tiveram uma baixa concentração plasmática de triglicerídeos quando comparados com aqueles suplementados com 20mg/kg de MS de Cu na forma de CuSO₄. O perfil de ácidos graxos no músculo *longissimus* foi similar em todos os tratamentos.

Na raça Simental, Engle e Spears (2001) avaliaram o desempenho, características de carcaça e metabolismo lipídico em novilhos em terminação em função da variação de cobre suplementado na dieta (10 ou 40 mg/kg MS na forma de sulfato de Cu), concluíram que não houve diferença entre tratamentos na

composição dos ácidos graxos no músculo e tecido adiposo subcutâneo, indicando que o cobre suplementado não teve efeito no metabolismo lipídico nesta raça.

Engle, Fellner e Spears (2001) conduziram um experimento para analisar os efeitos de cobre dietético no colesterol e no perfil de ácidos graxos do leite e soro em vacas holandesas, constataram que houve menor concentração de ácidos graxos de dienos 18:1 *trans* e dienos 18-conjugados no leite das vacas suplementadas com o cobre quando comparadas com o leite das vacas não suplementadas. As vacas que receberam 40 mg de Cu/kg de MS tiveram alto teor de C12:0 e baixo de C18:2 e ácidos graxos poli-insaturados totais no leite quando comparadas com aquelas que receberam 10mg/kg de MS. Os resultados desse experimento indicaram que a suplementação com cobre altera o metabolismo de lipídios em vacas com alta produção de leite e que a suplementação de 40 mg de cobre/kg MS por 61 dias pode elevar a concentração hepática de cobre a níveis considerados tóxicos.

Existe um número limitado de estudos sobre o efeito de cobre sobre o perfil lipídico em pequenos ruminantes particularmente em ovinos. Em trabalho realizado com o objetivo de estudar o efeito de altas concentrações de cobre no perfil lipídico do soro, características e composição de carcaça em cabritos da raça Bôer espanhola, foi administrado cobre na forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Determinou-se o perfil lipídico no soro, nos dias 14 e 122 e, no último dia os animais foram abatidos para avaliação das características da carcaça. O colesterol e os triglicérides do soro não foram alterados significativamente entre os tratamentos, contudo houve uma redução dos ácidos graxos não esterificados em função do aumento da suplementação de cobre Solaiman et al. (2006).

Cummins, Solaiman e Bergen (2008), trabalhando com cabritos da mesma raça, a fim de avaliar o efeito da suplementação dietética com o cobre sobre o perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do tecido adiposo, observaram que houve uma diminuição significativa dos ácidos graxos C14:0 e C16:0 em tecido adiposo subcutâneo e o C15:0 foi aumentando linearmente com o aumento do cobre. A suplementação com cobre não influenciou a estabilidade oxidativa do músculo ou do tecido adiposo subcutâneo. Estes resultados indicaram que a composição dos lipídios pode diferir em função do depósito e dietas com cobre podem resultar em respostas variáveis na composição de ácidos graxos.

Uma série de estudos confirmou que o cobre na dieta, afeta a espessura da gordura subcutânea na região 12^a costela (ENGLE; SPEARS, 2000a; ENGLE et al. 2000a, ENGLE et al. 2000b).

Para investigar a possível relação de cobre e metabolismo lipídico subcutâneo, Engle et al. (2000b) utilizaram 48 Angus e Hereford×Angus para determinar os efeitos de Cu no metabolismo de lipídios e de catecolaminas. Concentrações de ácidos graxos não esterificados foram menores após a administração de noradrenalina em novilhos suplementados com cobre. Além disso, a espessura do tecido adiposo subcutâneo na 12^a costela tendeu a ser menor em novilhos recebendo Cu suplementar. Estes resultados concordaram com pesquisas anteriores indicando que Cu na dieta diminui a espessura do tecido adiposo subcutâneo na 12^a costela (WARD; SPEARS, 1997; ENGLE et al. 2000a).

A tendência para uma maior concentração de noradrenalina plasmática em jejum e pós-alimentação em novilhos suplementados com Cu indica que a suplementação de Cu pode ter aumentado a lipólise do tecido adiposo, causando a redução observada na espessura do tecido adiposo subcutâneo na 12^a costela. No entanto, o aumento da concentração de ácidos graxos não esterificados na circulação, como um indicador de aumento da lipólise, não foi detectado em bovinos suplementados com Cu em relação aos controles durante as fases de crescimento e terminação. Se as concentrações de norepinefrina foram ligeiramente maiores em novilhos suplementados com Cu, então as taxas lipolíticas podem ter sido um pouco maiores em relação aos controles, no entanto, as diferenças nas taxas lipolíticas entre os tratamentos podem ter sido muito pequenas para detectar diferenças nas concentrações séricas de ácidos graxos não esterificados.

Em um experimento similar, Johnson e Engle (2003) utilizaram 48 novilhos Angus alimentados individualmente para examinar os efeitos de Cu nas taxas lipolíticas do tecido adiposo subcutâneo *in vitro*. Aos 74 dias da fase de terminação, foi retirada amostra de tecido adiposo subcutâneo, obtida a partir de biópsias de três novilhos de cada tratamento para determinar as taxas lipolíticas basais e estimuladas *in vitro*. Os novilhos foram depois abatidos, após terem recebido a dieta de acabamento por 145 dias. A espessura do tecido adiposo subcutâneo da 12^a costela tendeu a ser menor nos novilhos suplementados em relação aos do grupo

controle. As taxas lipolíticas basais e estimuladas pela adrenalina in vitro do tecido adiposo subcutâneo foram maiores em novilhos suplementados com Cu em relação aos controles, indicando que Cu pode desempenhar um papel no metabolismo lipídico no tecido adiposo subcutâneo. A taxa lipolítica basal foi de aproximadamente 23% maior em novilhos suplementados quando comparados com os controles. No entanto, a adição de adrenalina estimulou a lipólise em 55 e 50% no controle e novilhos suplementados, respectivamente. Portanto, a lipólise basal parece ser reforçada pela suplementação de Cu, mas não estimulada pela epinefrina. Estes dados indicam que Cu pode ter uma influência sobre os mecanismos celulares que controlam a lipólise e não no número de receptores ou sensibilidade das catecolaminas. Esses achados estão de acordo com pesquisas anteriores, onde a suplementação de Cu para ovelhas deficientes em cobre aumentou taxas lipolíticas basais e estimuladas do tecido adiposo subcutâneo (SINNETT-SMITH; WOOLLIAMS, 1987).

Em outro experimento conduzido por Engle e Spears (2000b), trabalhando com novilhos da raça Angus suplementados com cobre, não encontraram uma redução na espessura da gordura subcutânea nos animais suplementados, resultados estes, que corroboraram com (ENGLE et al. 2000c; SOLAIMAN et al. 2006). Escores para o marmoreio no músculo *longissimus* foram similares para os dois tratamentos (ENGLE; SPEARS 2000b; SOLAIMAN et al., 2006).

Em ovinos, no estudo de Cheng et al. (2008), onde cordeiros Dorper x Mongólia foram suplementados com níveis de cobre de 0, 10 e 20 mg/kg de MS na forma de Cu –lisina ou cloreto de cobre tribásico ($\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$; TBCC), o perfil de ácidos graxos não foi afetado pela suplementação com cobre entretanto houve uma redução na ESGS e aumento a concentração sérica de triglicerídeos, indicando que a suplementação com Cu alterou o metabolismo lipídico.

1.9 Cobre e estabilidade Oxidativa em lipídios

De acordo com Ferrari (1998), a fração lipídica dos alimentos está relacionada a diversas propriedades organoléticas como: aroma, coloração, textura e suculência; estabilidade das proteínas e vida de prateleiras sob congelamento e refrigeração. O autor na sua revisão relatou ainda que os lipídios podem ser divididos em duas partes distintas: a fosfolipídica, que compõe as membranas das células e de

organelas e a triglicerídica, que constitui os lipídios neutros, presentes em adipócitos ou no interior das células musculares, sendo que os fosfolipídios apresentam maior susceptibilidade à oxidação. Os lipídios são susceptíveis ao ataque por radicais livres e sua oxidação pode ser muito prejudicial devido a sua continuidade como uma reação em cadeia.

A oxidação de lipídios pode ser definida como sendo uma cascata de eventos bioquímicos, resultantes da ação de radicais livres sobre os lipídios das membranas celulares, gerando principalmente radicais alcoxila e peroxila (CURI et al., 2002). O processo é dividido em três fases: a iniciação, a propagação e a terminação. Na iniciação é retirado um átomo de hidrogênio da molécula de ácido graxo insaturado, forma-se então um dieno conjugado onde duas duplas ligações são intercaladas por uma simples. Esses podem sofrer várias reações, em meio aeróbico se combinam com o oxigênio formando um peróxido, o qual pode abstrair outro hidrogênio de outro ácido graxo, promovendo assim a etapa de propagação. O dieno também pode se combinar com um átomo de hidrogênio abstraído para formar um hidroperóxido lipídico ou atacar uma dupla ligação na mesma cadeia, gerando peróxidos cíclicos, aos quais também podem propagar a peroxidação lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Na decomposição dos hidroperóxidos são gerados radicais peroxila e alcoxila, onde íons metálicos como o Cu^+ e Cu^{++} podem catalisar essa reação (ESTERBAUER et al. 1992). A etapa de terminação se caracteriza pela aniquilação dos radicais pela presença de antioxidantes, ou pela reação de dois radicais lipídicos originando outros produtos. Os principais produtos finais da oxidação lipídica compreendem os derivados da decomposição dos hidroperóxidos, como alcoóis, aldeídos cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos que são voláteis e comprometem as características sensoriais dos alimentos (FERRARI, 1998; ARAÚJO, 1995).

De acordo com a revisão de Ferrari (1998), assim como os ácidos graxos, o colesterol também sofre oxidação lipídica. Este sofre o ataque de radicais de oxigênio que provocam a abstração de um átomo de hidrogênio do carbono 7 dando origem a dois 7-hidroperóxidos epimétricos termicamente instáveis que acabam originando óxidos de colesterol (7-hidroxicolesterois, 7cetocolesterol), todavia, epóxidos, colestenonas, colestenoides colestenano-dióis são formados em carnes.

O principal problema dos óxidos de colesterol está relacionado à aterosclerose além de serem mutagênicos e cancerígenos.

O TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) é uma das análises mais populares e comumente usadas para detecção da oxidação lipídica em carnes, visto que produtos primários de oxidação lipídica constituem-se principalmente de hidroperóxidos, os quais são rapidamente decompostos em várias substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico, particularmente carbonilas, sendo o malonaldeído o elemento mais importante (ADDIS, 1986; FERNANDEZ; PEREZ-ALVAREZ; FERNANDEZ-LOPEZ, 1997).

Segundo Pearson et al. (1983) e Addis (1986), o malonaldeído é um dialdeído de 3 carbonos com grupos carbonil nas posições C-1 e C-3, considerado o maior produto secundário da oxidação lipídica. Como um aldeído bifuncional, é muito reativo, podendo interagir através de ligações cruzadas com DNA e proteínas, promovendo aberrações cromossômicas e redução da capacidade de síntese proteica, respectivamente.

De acordo com Buckley, Morrissey e Gray (1995), a oxidação lipídica pode ser afetada pela dieta, pela presença de antioxidantes ou de pró-oxidantes. E, o Cu é considerado um elemento pró-oxidante, porém, nas células hepáticas o Cu não está presente na forma livre iônica e sim ligado a proteínas, que inativam sua ação pró-oxidante (LUZA; SPEISKY, 1996).

Do ponto de vista biológico, antioxidante podem ser definidos como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ABDALLA, 1993). Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação e a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcóxila e peróxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (NAMIKI, 1990).

Para inibir a oxidação lipídica o organismo conta com algumas enzimas antioxidantes. A ação das enzimas glutathione peroxidase (GP-x) e glutathione reductase (GR) está relacionada com redução e oxidação da glutathione (GSH e GSSG). A GR age na regeneração de GSH a partir da GSSG (MURRAY et al.,

1998). A GP-x, juntamente com a superóxido dismutase (SOD) e a catalase protegem as células contra os problemas causados pelos radicais livres (NURNBERG; WEGNER; ENDER, 1998). De acordo com Jones e Suttle, (1981), a SOD é uma importante enzima funcionalmente associada com o Cu em diferentes tecidos e, possui um grande papel na regulação do metabolismo celular dependente do O_2 . A falta de SOD e consequente aumento no O_2 extracelular associado com a deficiência de Cu pode, portanto, realçar os danos oxidativos, o suficiente para danificar a função normal da célula (SHARMA et al., 2005).

Segundo Lauridsen, Hojsgaard e Sorensen (1999), a vitamina E e as enzimas antioxidantes assim como a SOD e a GP-x podem inibir a oxidação lipídica e aumentar a estabilidade de tecidos vivos e de alimentos como a carne. Entretanto, os autores acrescentam que ainda não está claro como a atividade das enzimas antioxidantes no *post-mortem* é afetada pela capacidade antioxidante total do músculo vivo.

A suplementação de Cu proporcionou aumento na atividade da SOD até o 56º dia da fase de crescimento de bovinos (WARD; SPEARS, 1997). Xin et al. (1991) verificaram o efeito da suplementação de Cu sobre a SOD e GSH-Px, em bovinos da raça holandesa e verificaram que a atividade da SOD nas células vermelhas do sangue e no sangue total diminuiu no grupo Cu-deficiente e que a atividade da GSH-Px não foi afetada pelo Cu (SHARMA et al., 2005).

Rey e Lopez-Bote (2001), com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação dietética de Cu e/ou vitamina E na composição e oxidação do músculo *longissimus* em suínos verificaram menor oxidação lipídica com a suplementação de vitamina E, enquanto a suplementação de Cu não afetou a susceptibilidade à oxidação lipídica.

Lauridsen, Hojsgaard e Sorensen (1999) estudando o efeito da suplementação de Cu e vitamina E no status oxidativo do músculo de suínos homogeneizaram amostras de músculo e incubaram com ferro para induzir a oxidação, a qual foi mensurada pelo teste de TBARS. No músculo *P. maior*, a adição de Cu na dieta inibiu a taxa de oxidação. O efeito foi significativo após 80 minutos de incubação ($p=0,02$), porém nenhuma diferença entre os níveis de Cu na dieta foram observados. A oxidação lipídica no músculo *longissimus* não foi influenciada pelas dietas com Cu.

Lauridsen, Hojsgaard e Sorensen (1999) investigaram os efeitos da suplementação de diferentes níveis de Cu e vitamina E no status oxidativo e antioxidativo, em termos de sangue e fígado, em suínos em crescimento. Para o efeito, avaliaram a concentração de antioxidantes (α -tocoferol, vitamina E, SOD, GP-x), pró-oxidante (Cu), concentração de lipídios, composição de ácidos graxos, TBARS, entre outros. Não foi encontrado efeito pró-oxidante do Cu. A suplementação com Cu aumentou a concentração de Cu e α -tocoferol no fígado. A concentração de gordura, a composição de ácidos graxos e a atividade da SOD e da GP-x no fígado não foram afetadas pelos tratamentos. Os tratamentos também não influenciaram a susceptibilidade do plasma para oxidação lipídica, medida pelo TBARS, entretanto, houve tendência à redução no nível de TBARS no plasma em suínos alimentados com dietas contendo Cu. A progressão do TBARS no fígado foi reduzida pela adição de vitamina E e Cu, indicando um efeito antioxidativo de ambos os nutrientes.

Em experimento realizado com objetivo de examinar os efeitos do sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) na composição de ácidos graxos e oxidativa estabilidade oxidativa no músculo e tecido adiposo de cabritos de raça Boer x Espanhol, os animais foram alimentados com 0, 100, ou 200 mg de Cu suplementar por dia, durante um período de 98 dias. Após os quais foram abatidos, e colhidas amostras de músculo *longissimus*, tecido adiposo subcutâneo da região do esterno e tecido adiposo mesentérico. A suplementação de Cu na dieta não influenciou a estabilidade oxidativa no músculo ou tecido adiposo subcutâneo. A suplementação de cobre em 200 mg/dia resultou em um aumento significativo do malondialdeído no tecido adiposo mesentérico em comparação com os grupos que receberam 0 ou 100 mg/dia (CUMMINS; SOLAIMAN; BERGEN, 2008).

Em ovinos foi realizado um experimento para determinar os efeitos de diferentes fontes e níveis de cobre sobre o nível plasmático de superóxido dismutase (SOD) e peroxidação lipídica em cordeiros Dorper x Mongólia. Os animais foram suplementados com níveis de cobre de 0, 10 e 20 mg/kg de MS na forma de Cu – lisina ou cloreto de cobre tribásico ($\text{Cu}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$; TBCC). O cobre reduziu as concentrações de malondialdeído (MDA) no plasma e no fígado, mas não afetou a concentração do MDA no músculo. Houve ainda um aumento da atividade da superóxido dismutase (SOD) no plasma. Os autores concluíram que a

suplementação de Cu aumentou da actividade plasmática da SOD e a estabilidade oxidativa lipídica no plasma, mas não influenciou a estabilidade oxidativa lipídica no músculo dos cordeiros (CHENG, et al., 2011).

REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. S. P. Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **Ars Curandi-Clinica Medica**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 10, p.141-164, 1993.

ADDIS, P. B. Occurrence of lipid oxidation-products in foods. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 24, n. 10-11, p. 1021-1030, Oct-Nov. 1986. Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/0278691586902838/1-s2.0-0278691586902838-main.pdf?_tid=75d5b71e-3781-11e3-8d41-00000aacb35d&acdnat=1382051671_87790c4ab9ac5bd40291c7c28535444a >. Acesso em: 15 nov. 2011.

ANDRIGUETO, J. M. E. A. Os minerais na nutrição animal. In: _____. **Nutrição animal**. São Paulo: Nobel, 1981. p. 173-255.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington: AOAC, 1996. 1298 p.

ARAÚJO, J. M. A. Consequências biológicas da oxidação de lipídios. In: _____. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Ed. UFV, 1995.

ARMSTRONG, T. A. et al. Effect of pharmacological concentrations of dietary copper on lipid and cholesterol metabolism in pigs. **Nutrition Research**, New York, v. 21, n. 9, p. 1299-1308, Sept. 2001. Disponível em: < http://ac.els-cdn.com/S0271531701003323/1-s2.0-S0271531701003323-main.pdf?_tid=417fa726-3782-11e3-827c-00000aab0f26&acdnat=1382052013_3cb35eb790b28445cc5ae54f7ad199c0 >. Acesso em : 12 ago. 2011.

BAKALLI, R. I. et al. Dietary copper in excess of nutritional-requirement reduces plasma and breast muscle cholesterol of chickens. **Poultry Science**, Savoy, v. 74, n. 2, p. 360-365, Feb. 1995. Disponível em: < ISI>://WOS:A1995QF15400017>. Acesso em: 29 nov. 2011.

BAKER, D. H.; AMMERMAN, C. B. Cooper bioavailability. In: AMMERMAN, C. B.; BAKER, D. H.; LEWIS, A. J. (Ed.). **Bioavailability of nutrients for animals**. London: Academic Press, 1995. p.127-149.

BAUMAN, D. E.; LOCK, A. L. Concepts in lipid digestion and metabolism in dairy cows. In: EASTRIDGE, M. L. **Proceedings of the Tri-State Dairy Nutrition Conference**, Columbus, p. 1-14, 2006 2006. Disponível em: < ISI>://WOS:000237674800001>. Acesso em: 29 nov. 2011.

BLACK, D. H.; FRENCH, N. R. Effects of three types of trace element supplementation on the fertility of three commercial dairy herds. **Veterinary Record**, London, v. 154, n. 21, p. 652-658, May. 2004. Disponível em: < ISI>://WOS:000222305900012>. Acesso em: 17 nov. 2011.

BUCKLEY, D. J.; MORRISSEY, P. A.; GRAY, J. I. Influence of dietary vitamin-e on the oxidative stability and quality of pig meat. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 73, n. 10, p. 3122-3130, Oct. 1995. Disponível em: < ISI>://WOS:A1995TA50500034>. Acesso em: 2 dez. 2011.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**. Maryland Heights, v. 52, p.302-310, 1978. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6>. Acesso em: 2 dez. 2011.

CHENG, J. et al. Effects of dietary copper source and level on performance, carcass characteristics and lipid metabolism in lambs. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v. 21, n. 5. p. 685-691. May. 2008.

CHENG, J. et al. Effects of different copper sources and levels on plasma superoxide dismutase, lipid peroxidation, and copper status of lambs. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 144, n. 1-3, p. 570-579, Dec. 2011. Disponível em: <ISI>://WOS:000298192900056>. Acesso em: 2 dez. 2011.

CUMMINS, K. A.; SOLAIMAN, S. G.; BERGEN, W. G. The effect of dietary copper supplementation on fatty acid profile and oxidative stability of adipose depots in Boer x Spanish goats. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 86, n. 2, p. 390-396, Feb. 2008. Disponível em: <http://www.journalofanimalscience.org/content/86/2/390>. Acesso em: 1 set. 2011.

CUNNANE, S. C. Differential regulation of essential fatty-acid metabolism to the prostaglandins - possible basis for the interaction of zinc and copper in biological-systems. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 21, p. 73-90, 1982. Disponível em: < ISI>://WOS:A1983RU59000003 >. Acesso em: 1 dez. 2011.

CURI, R. et al. **Entendendo a gordura os ácidos graxos**. 2. ed. Barueri: Manole, 2002.

DAVID, L. N.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

DAVIS, G. K. E.; MERTZ, W. **Trace elements in human and animal nutrition**. New York: Academic Press, 1987.

DRACKLEY, J. K. Lipid metabolism. In: D´MELLO, J. P. F. **Farm animal metabolism and nutrition**. Edinburgh: CABI Publishing, 2000. p. 97-119. Disponível em: < ISI>://CCC:000167398500005 >. Acesso em: 02 dez. 2011.

DOREAU, M.; DEMEYER, D.; VAN NEVEL, C. Transformations and effects of unsaturated fatty acids in the rumen. Consequences on milk fat secretion. In: WELCH, R. A. S. **Milk composition production and biotechnology**. Belgium: CAB, 1997. Cap.

5, p. 73-92. Disponível em: <ISI>://WOS:000071390400005>. Acesso em: 02 dez. 2011.

DU, Z. et al. Utilization of copper in copper proteinate, copper lysine, and cupric sulfate using the rat as an experimental model. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 74, n. 7, p. 1657-1663, Jul. 1996. Disponível em: <ISI>://WOS:A1996UX57800026>. Acesso em: 25 nov. 2011.

ECKERT, G. E. et al. Copper status of ewes fed increasing amounts of copper from copper sulfate or copper proteinate. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 77, n. 1, p. 244-249, Jan. 1999. Disponível em: <ISI>://WOS:000078553000031>. Acesso em: 7 out. 2011.

ENGLE, T. E. Role of trace minerals in immunity and lipid metabolism in cattle. In: LYONS, T. P.; JACQUES, K. A. (Ed.). **Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium**. Nottingham: Nottingham University Press, 2001. p. 267-283.

_____. Copper and lipid metabolism in beef cattle: a review. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 89, n. 2, p. 591-596, Feb. 2011. Disponível em: <ISI>://WOS:000286509800029>. Acesso em: 12 ago. 2011.

ENGLE, T. E.; FELLNER, V.; SPEARS, J. W. Copper status, serum cholesterol, and milk fatty acid profile in Holstein cows fed varying concentrations of copper. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 84, n. 10, p. 2308-2313, Oct 2001. ISSN 0022-0302. Disponível em: <ISI>://WOS:000171887800023>. Acesso em: 12 ago. 2011.

ENGLE, T. E.; SPEARS, J. W. Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 9, p. 2446-2451, Sep. 2000a. Disponível em: <ISI>://WOS:000089071500028>. Acesso em: 30 nov. 2011.

_____. Dietary copper effects on lipid metabolism, performance, and ruminal fermentation in finishing steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 9, p. 2452-2458, Sep. 2000b. Disponível em: <ISI>://WOS:000089071500029>. Acesso em: 30 nov. 2011.

_____. Performance, carcass characteristics, and lipid metabolism in growing and finishing Simmental steers fed varying concentrations of copper. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 79, n. 11, p. 2920-2925, Nov. 2001. Disponível em: <ISI>://WOS:000172643000022>. Acesso em: 12 ago. 2011.

_____. Effect of finishing system (feedlot or pasture), high-oil maize, and copper on conjugated linoleic acid and other fatty acids in muscle of finishing steers. **Animal Science**, Cambridge, v. 78, p. 261-269, Apr. 2004. Disponível em: <ISI>://WOS:000222788100009>. Acesso em: 12 ago. 2011.

ENGLE, T. E. et al. Effects of dietary copper source and concentration on carcass characteristics and lipid and cholesterol metabolism in growing and finishing steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 4, p. 1053-1059, Apr. 2000a. Disponível em: <ISI>://WOS:000088217900033>. Acesso em: 29 nov. 2011.

_____. Effects of soybean oil and dietary copper on ruminal and tissue lipid metabolism in finishing steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 10, p. 2713-2721, Oct. 2000c. Disponível em: <ISI>://WOS:000089913600028>. Acesso em: 29 nov. 2011.

_____. Dietary copper effects on lipid metabolism and circulating catecholamine concentrations in finishing steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 10, p. 2737-2744, Oct. 2000b. Disponível em: <ISI>://WOS:000089913600031>. Acesso em: 30 nov. 2011.

ESTERBAUER, H. et al. The role of lipid-peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radical Biology and Medicine**, Philadelphia, v. 13, n. 4, p. 341-390, Oct. 1992. Disponível em: <ISI>://WOS:A1992JN28200009>. Acesso em: 2 dez. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO).

Statistical. 2011. Disponível em:

<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>. Acesso em: 7 jul. 2011.

FERNANDEZ, J.; PEREZ-ALVAREZ, J. A.; FERNANDEZ-LOPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 345-353, Jul. 1997. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0308814696001148/1-s2.0-S0308814696001148-main.pdf?_tid=90fbb72a-3789-11e3-b4f9-00000aacb35d&acdnat=1382055153_690e32e5d40ea1df621a1382ccf5095d>. Acesso em: 2 dez. 2011.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.11, p. 3-14. 1998.

FREEDMAN, J.H., CIRIOLO, M.R.; PEISACH, J. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 264, n. 10, p.5598-5605. 1989. Disponível em:<ISI>://WOS:A1989T999200046. Acesso em: 2 dez. 2011.

FRIEDEWA, W. T.; FREDRICK, D. S.; LEVY, R. I. Estimation of concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972. Disponível em: <ISI>://WOS:A1972M604800001>. Acesso em: 28 set. 2011.

GABRIELLI, L. et al. Interaction between copper and iron metabolism in the human intestinal Caco-2 cells. In: ROUSSEL, A. M.; ANDERSON, R. A.; FAVREIR, A. E. **Trace elements in man and animals**. [New York]: Springer, 2000. p. 63-64. 2000. Disponível em: <ISI>://WOS:000165695000012>. Acesso em: 14 nov. 2011.

GOONERATNE, S. R.; BUCKLEY, W. T.; CHRISTENSEN, D. A. Review of copper deficiency and metabolism in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 69, n. 4, p. 819-845, Dec. 1989. Disponível em: <ISI>://WOS:A1989CP09300001>. Acesso em: 28 set. 2011.

GRANNER, D. K.; MAYES, P. A. **Harper: bioquímica**. São Paulo: Atheneu, 1998.

GRINARI, J. M. et al. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 9, p. 2285-2291, Sep. 2000. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/content/130/9/2285.full>>. Acesso em: 14 nov. 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford: University Press, 2007

HARRISON, T. J.; VANRYSEN, J. B. J.; BARROWMAN, P. R. The influence of breed and dietary molybdenum on the concentration of copper in tissues of sheep. **South African Journal of Animal Science-Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Veekunde**, Hatfield, v. 17, n. 2, p. 104-110, Jun. 1987. Disponível em: <ISI>://WOS:A1987H975900011>. Acesso em: 14 nov. 2011.

HENDERSON, C. e HODGKISS, W. An electron microscopic study of *anaerovibrio lipolytica* (strain 5s) and its lipolytic enzyme. **Journal of General Microbiology**, Berks, v. 76, n. 2, p. 389-393, 1973. doi:10.1099/00221287-76-2-389.

HO, S. K.; ELLIOT, J. I. Fatty acid composition of porcine depot fat as related to the effect of supplemental dietary copper on the specific activities of fatty acid desaturase systems. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 54, p. 23-28. 1974. doi:10.4141/cjas74-004

HOWELL, J. M.; GOONERATNE, S. R. The pathology of copper toxicity in animals. In: HOWELL, J. M.; GAWTHORNE, J. M. (Ed). **Copper in animals and man**. Boca Raton: CRC Press, 1987. v. 2.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Agropecuária**. Brasília, 2009. Disponível em: <http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?Vcodigo=PPM01&sv=59&t=efetivo-dos-rebanhos-por-tipo-de-rebanho>. Acesso em: 7 jul. 2011.

JENKINS, K. J.; KRAMER, J. K. G. Influence of excess dietary copper on lipid composition of calf tissues. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 72, n. 10, p. 2582-2591, 1989. doi:10.3168/jds.S0022-0302(89)79399-1.

JOHNSON, L. R.; ENGLE, T. E. The effects of copper source and concentration on lipid metabolism in growing and finishing Angus steers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 16, n. 8, p. 1131-1136, Aug. 2003. Disponível em: <ISI>://WOS:000183244800007>. Acesso em: 12 ago. 2011.

JONES, D. G.; SUTTLE, N. F. Some effects of copper deficiency on leucocytes function in sheep and cattle. **Research in Veterinary Science**, London, v. 31, p.151-156, 1981.

KIM, S.; CHAO, P. Y.; ALLEN, K. G. D. Inhibition of elevated hepatic glutathione abolishes copper deficiency cholesterolemia. **Faseb Journal**, Bethesda, v. 6, n. 7, p. 2467-2471, Apr. 1992. Disponível em: <ISI>://WOS:A1992HP03000013 >. Acesso em: 28 nov. 2011.

LANGLANDS, J. P. et al. Deposition of copper, manganese, selenium and zinc in merino sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 35, n. 5, p. 701-707, 1984. Disponível em: <ISI>://WOS:A1984TG57500009>. Acesso em: 20 nov. 2011.

LAURIDSEN, C.; HOJSGAARD, S.; SORENSEN, M. T. Influence of dietary rapeseed oil, vitamin E, and copper on the performance and the antioxidative and oxidative status of pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 77, n. 4, p. 906-916, Apr. 1999. Disponível em: <ISI>://WOS:000084444800015>. Acesso em: 2 dez. 2011.

LAURIDSEN, C. et al. Antioxidative and oxidative status in muscles of pigs fed rapeseed oil, vitamin E, and copper. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 77, n. 1, p. 105-115, Jan. 1999. Disponível em: <ISI>://WOS:000078553000013>. Acesso em: 2 dez. 2011.

LIEPA, G. U.; BEITZ, D. C.; LINDER, A. R. Cholesterol synthesis in ruminating and nonruminating goats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 108, p. 535-543, 1978.

LOCK, A. L. et al. Concepts in fat and fatty acid digestion in ruminants. **Proceedings Intermountain Nutrition Conference**. [New York], 2006. p. 85-100.

LUZA, S. C.; SPEISKY, H. C. Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 63, n. 5, p. S812-S820, May. 1996. Disponível em: < ISI>://WOS:A1996UG91900024>. Acesso em: 30 set. 2011

MARQUES, A. P. et al. Mortes súbitas em bovinos associadas à carência de cobre. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro. v. 23, n. 1, p. 21-32, 2003.

MAYNARD, L. A. **Nutrição animal**. 3. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1984. p. 260-280.

MCDOWELL, L. **Minerals in animal and human nutrition**. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. p. 235-270.

MURRAY, R. K. et al. **Harper: bioquímica**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

NAMIKI, M. Antioxidants antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 29, n. 4, p. 273-300, 1990. Disponível em: <ISI>://WOS:A1990EG53600003>. Acesso em: 24 nov. 2011.

NAFIKOV, R. A.; BEITZ, D. C. Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 137, n. 3, p. 702-705, Mar. 2007. Disponível em: < http://jn.nutrition.org/content/137/3/702.full>. Acesso em: 24 nov. 2011.

NURNBERG, K.; WEGNER, J.; ENDER, K. Factors influencing fat composition in muscle and adipose tissue of farm animals. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 56, p. 145-156, Nov. 1998. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0301622698001882/1-

s2.0-S0301622698001882-main.pdf?_tid=20df5ab8-378f-11e3-88c5-00000aacb35d&acdnat=1382057542_86367aff530597588002827fc067c533>. Acesso em: 24 nov. 2011.

NOURI, M.; RASOOLI, A.; MOHAMMADIAN, B. Enzootic ataxia in lambs. **Indian Veterinary Journal**, Chennai, v. 82, n. 9, p. 1007-1008, Sep 2005. ISSN 0019-6479. Disponível em: <ISI>://WOS:000233505100036>. Acesso em: 17 nov. 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Mineral tolerance of domestic animal**. Washington: National Academic Press, 1980.

_____. **Nutriente requeriments of sheep**. Washington: National Research Council, 1985.

_____. **Mineral tolerance of animals**. 2nd ed. Washington: The National Academic Press, 2005.

_____. **Nutriente requirements of small ruminants: sheep, goats, vervids and New World camelids**. Washington: National Research Council, 2006.

PEARSON, A. M. et al. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. **Food Technology**, Chicago, v. 37, n. 7, p. 121-129, 1983. Disponível em: <ISI>://WOS:A1983QY76900011>. Acesso em: 24 nov. 2011.

PICCO, S. J. et al. DNA damage induced by copper deficiency in cattle assessed by the Comet assay. **Mutation research-genetic toxicology and environmental mutagenesis**, Amsterdam, v. 498, n. 1-2, p. 1-6, Nov. 2001. Disponível em: http://ac.els-cdn.com/S138357180100242X/1-s2.0-S138357180100242X-main.pdf?_tid=e7e9e65e-3817-11e3-aefe-00000aacb35e&acdnat=1382116287_85e71ce839b5edb84df0547c638b82b9>. Acesso em: 17 nov. 2011.

PILATI, C.; BARROS, S. C.; GIUDICE, J. C. L. Intoxicação crônica por cobre em ovinos. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 9, p. 31-34. 1990.

POLAN, C. E.; TOVE, S. B.; MCNEILL, J. J. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 88, n. 4, p. 1056-1064, 1964. Disponível em: <ISI>://WOS:A19643903B00042>. Acesso em: 17 nov. 2011.

REY, A. I.; LOPEZ-BOTE, C. J. Effect of dietary copper and vitamin E supplementation, and extensive feeding with acorn and grass on longissimus muscle composition and susceptibility to oxidation in Iberian pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 85, n. 9-10, p. 281-292, Oct. 2001. Disponível em: <ISI>://WOS:000172886100002 >. Acesso em: 24 nov. 2011.

REY, A. I.; LOPEZ-BOTE, C. J.; BUCKLEY, J. D. Effect of feed on cholesterol concentration and oxidation products development of longissimus dorsi muscle from Iberian pigs. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, Carlow, v. 43, n. 1, p. 69-83, 2004. Disponível em: <ISI>://WOS:000225996700006>. Acesso em: 30 nov.

2011.

RIBEIRO, L. A. O.; RODRIGO, N. C.; SMIDELRE, W. A. Intoxicação crônica por cobre em ovelhas pastoreadas em pomar de videiras adubado com cama aviária. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 208-211, 2007.

RIET-CORREA, F. et al. intoxicação crônica por cobre em ovinos do Rio Grande do sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 3-4, p. 51-54, 1989.

SHARMA, M. C. et al. Copper status and enzyme, hormone, vitamin and immune function in heifers. **Research in Veterinary Science**, London, v. 79, n. 2, p. 113-123, Oct. 2005. Disponível em: <ISI>://WOS:000230549600005>. Acesso em: 24 nov. 2011.

SINNETT-SMITH, P. A.; WOOLLIAMS, J. A. Adipose tissue metabolism and cell size: variation between subcutaneous sites and the effect of copper supplementation. **Animal Production**, Cambridge, v. 45, n. 1, p.75–80. 1987. doi:10.1017/S0003356100036643.

SIPERSTEIN, M. D. Regulation of cholesterol biosynthesis in normal and malignant tumors. In: Horecker, B. L.; Stadtman, E. R. (Ed.). **Current topics in cellular regulation**, New York: Academic Press, 1970. v. 2, p. 65-100.

SMITH, S. B.; CROUSE, J. D. Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose-tissue. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 114, n. 4, p. 792-800, 1984. Disponível em: <ISI>://WOS:A1984SN56500020>. Acesso em: 24 nov. 2011.

SOLAIMAN, S. G. et al. The effects of high levels of supplemental copper on the serum lipid profile, carcass traits, and carcass composition of goat kids. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 84, n. 1, p. 171-177, Jan. 2006. Disponível em: <ISI>://WOS:000236120300020>. Acesso em: 1 set. 2011.

SPEARS, J. W. Micronutrients and immune function in cattle. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 59, n. 4, p. 587-594, Nov. 2000. Disponível em: <ISI>://WOS:000165757500012>. Acesso em: 12 dez. 2011.

_____. Trace mineral bioavailability in ruminants. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 133, n. 5, p. 1506S-1509S, May. 2003. Disponível em: <ISI>://WOS:000182828100020>. Acesso em: 12 out. 2011.

STRANDBERG, T. E.; TILVIS, R. S. Physiological and pharmacological regulation of small intestinal cholesterol synthesis. **General Pharmacology**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 321-329. 1988. doi:10.1016/0306-3623(88)90024-9

SUTTLE, N. F. Changes in availability of dietary copper to young lambs associated with age and weaning. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 84, n. 02, p. 255-261, 1975. Disponível em: <ISI>://WOS:A1975W191600011>. Acesso em: 10 out. 2011.

_____. The interactions between copper, molybdenum, and sulfur in ruminant nutrition.

Annual Review of Nutrition, Palo Alto, v. 11, p. 121-140, 1991. Disponível em: <ISI>://WOS:A1991FX66500006>. Acesso em: 17 out. 2011.

THOMPSON, E. H.; ALLEN, C. E.; MEADE, R. J. Influence of copper on stearic acid desaturation and fatty acid composition in the pig. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 36, p. 868–873, 1973.

TOKARNIA, C. H. et al. Deficiências e desequilíbrios minerais em bovinos e ovinos revisão dos estudos realizados no Brasil de 1987 a 1998. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 19, v. 47-62, 1999.

UNDERWOOD, E. J. **Trace elements in human and animal nutrition**. 4. ed. San Francisco: Academic Press, 1977.

_____. **Los minerales en la nutrición del gadando**. Zaragoza: Acribia, 1983.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. **The mineral nutrition of livestock**. 3. ed. New York: CAB, 1999.

URIU-ADAMS, J. Y.; KEEN, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. **Molecular Aspects of Medicine**, Kidlington, v. 26, p. 268-298. 2005. Acesso em: 17 out. 2011.

VERNON, R. G. Lipid metabolism in the adipose tissue of ruminant animals. **Progress in Lipid Research**, Kidlington, v. 19, n. 1–2, p. 23-106, 1980. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0163782780900077>. Acesso em: 17 out. 2011.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista de Ovinos**, Porto Alegre, v. 4, 2008.

WARD, J. D.; SPEARS, J. W. Long-term effects of consumption of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on copper status, performance, and carcass characteristics of cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 75, n. 11, p. 3057-3065, Nov. 1997. Disponível em: <ISI>://WOS:A1997YD63400031>. Acesso em: 1 dez. 2011.

WIENER, G.; FIELD, A. C. Blood copper-levels in sheep in relation to genetic factors parity and previous swayback history. **Nature**, London, v. 209, n. 5025, p. 835-836, 1966. Disponível em: <ISI>://WOS:A19667314500074>. Acesso em: 17 nov. 2011.

WIENER, G.; FIELD, A. C.; JOLLY, G. M. Concentration of minerals in blood of genetically diverse groups of sheep .4. Factors influencing seasonal changes in copper concentration. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 75, p. 489-495, 1970. Disponível em: <ISI>://WOS:A1970H915400017>. Acesso em: 2 nov. 2011.

WIENER, G. et al. Copper levels in liver and brain of dead lambs in relation to breed, age at death and cause of death. **Journal of Comparative Pathology**, Cambridge, v. 84, n. 1, p. 27-38, 1974. Disponível em: <ISI>://WOS:A1974S087200004>. Acesso em: 8 nov. 2011.

WIENER, G.; HERBERT, J. G.; FIELD, A. C. Variation in liver and plasma copper concentrations of sheep in relation to breed and hemoglobin type. **Journal of Comparative Pathology**, Cambridge, v. 86, n. 1, p. 101-109, 1976. Disponível em: <ISI>://WOS:A1976BM24200014 >. Acesso em: 8 nov. 2011.

WIENER, G.; SAMPFORD, M. R. Incidence of swayback among lambs with particular reference to genetic factors. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 73, p. 25-31, 1969. Disponível em: <ISI>://WOS:A1969D818600003>. Acesso em: 17 nov. 2011.

WIENER, G. et al. Breed differences in copper-metabolism in sheep. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 91, p. 433-441, 1978. Disponível em: <ISI>://WOS:A1978FS18100020>. Acesso em: 8 nov. 2011.

WOOLLIAMS, C. et al. Studies on lambs from lines genetically selected for low and high copper status. **Animal Production**, Cambridge, v. 43, n. 2, p. 293-301, 1986.

XIN, Z. et al. Effects of copper status on neutrophil function, superoxide-dismutase, and copper distribution in steers. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 74, n. 9, p. 3078-3085, Sep. 1991. Disponível em: <ISI>://WOS:A1991GC66700033 >. Acesso em: 2 dez. 2011.

CAPÍTULO 2. EFEITOS DE DOIS NÍVEIS DE SULFATO DE COBRE E COBRE METIONINA NO METABOLISMO DE LIPÍDIOS EM OVINOS MERINO X TEXEL

RESUMO

O estudo foi conduzido com 40 cordeiros Merino x Texel para determinar os efeitos do sulfato de cobre e cobre-metionina sobre o metabolismo de lipídios e colesterol. Os cordeiros foram distribuídos aleatoriamente em 5 tratamentos, com 8 animais em cada. Os tratamentos usados foram: controle, sem adição de cobre na dieta; adição de 10 ou 30 mg de Cu/Kg de MS na forma de sulfato de cobre na dieta; adição de 10 ou 30 mg de Cu/Kg de MS na forma de cobre-metionina na dieta. O experimento teve a duração de 120 dias. No início do experimento fez biópsia do fígado para análise de Cu no tempo zero. Nos dias 0, 28 e 56 foram colhidas amostras de sangue para dosagem sérica de colesterol total, colesterol HDL (HDL), colesterol LDL (LDL) e triglicérides e, ao final, todos os animais foram abatidos para colheita de fígado para análise de glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG) e de músculo *longissimus* para análise de Cu, colesterol total e determinação do perfil lipídico. A concentração hepática de cobre e colesterol no músculo *longissimus* foi maior ($P < 0,05$) nos animais que receberam cobre suplementar. A concentração de colesterol total, HDL, LDL e triglicérides no soro bem como a espessura de gordura subcutânea não diferiram entre os tratamentos ($P > 0,05$). Os animais suplementados com Cu tiveram uma menor concentração de GSH e maior de GSSG ($P < 0,05$). O grupo controle demonstrou uma maior percentagem do ácido láurico (C12:0) no *longissimus* comparado com os demais tratamentos ($P < 0,05$). Estes resultados indicam que a suplementação com cobre na dieta, independentemente da fonte e nível resultou em aumento da concentração hepática do elemento, reduziu a concentração de colesterol no *longissimus*, diminuiu a concentração de GSH e aumentou da concentração de GSSG no fígado e teve efeito mínimo sobre o perfil de ácidos graxos nos cordeiros Texel x Merino.

Palavras-chave: colesterol, ácidos graxos, glutathione, ovinos.

ABSTRACT

The study was conducted with 40 lambs Merino x Texel in order to determine the effects of copper sulphate and copper-methionine on the lipid and cholesterol metabolism. The lambs were randomly distributed into 5 treatments, with 8 animals each. The treatments were: control, without copper additions; 10 or 30 mg of Cu/Kg DM in the form of copper sulphate; 10 or 30 mg of Cu/Kg DM in the form of copper-methionine. The experiment lasted 120 days. At the beginning of the experiment was carried liver biopsy for analysis of Cu. On days 0, 28 and 56 blood samples were collected for analysis of serum total cholesterol, HDL-cholesterol (HDL), LDL-cholesterol (LDL) and triglycerides and at the end the animals were slaughtered to collection the liver for analysis of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) and *m. longissimus* for analysis of Cu, total cholesterol and lipid profile determination. The hepatic concentration of copper was higher ($P<0.05$) in the animals that received supplemental copper in diet. The concentration of total cholesterol, HDL, LDL and triglycerides in the serum, as well as the subcutaneous fat thickness (SFTU) did not differ between treatments ($P>0.05$). The supplementation of copper regardless of source or level produced a reduction in the cholesterol concentration in the *m. longissimus* muscle, decreased concentration of GSH and increased concentrations of GSSG in the liver ($P<0.05$). The control group showed a higher percentage of lauric acid (C12:0) in the *m. longissimus* as compared to other treatments ($P<0.05$). These outcomes indicate that supplementation with copper regardless the source and level in the diet resulted in increased hepatic concentration of the element, reduced the cholesterol concentration in *m. longissimus* muscle, decreased concentration of GSH and increased concentration of GSSG in the liver and had minimal effect on the fatty acid profile of lipid in Texel x Merino lambs.

Keywords: cholesterol, fatty acids, glutathione, sheep.

2.1 INTRODUÇÃO

A busca por produtos alimentícios saudáveis tem sido uma preocupação cada vez maior tanto pelos produtores quanto pelos consumidores em geral. A carne ovina como a dos outros ruminantes é rica em nutrientes, mas não raro, é relacionada às doenças cardiovasculares pela sua proporção de ácidos graxos saturados e pelo teor de colesterol.

O cobre (Cu) é um elemento essencial exigido por várias espécies animais incluindo os ovinos, para uma série de funções bioquímicas; sua absorção pode ser influenciada pela presença de quelantes como aminoácidos e citratos que aumentam a sua absorção (McDOWELL, 2003; SPEARS, 2000; UNDERWOOD; SUTTLE, 1999).

Algumas pesquisas sugeriram que o Cu dietético em concentrações fisiológicas pode também afetar o metabolismo de lipídios no tecido subcutâneo em ruminantes, mas não estão esclarecidos os mecanismos pelos quais o elemento atua na redução da espessura da gordura subcutânea (EGSC). Ward e Spears (1997) foram os primeiros a relatar o efeito de Cu sobre a EGSC com base em resultados de experimento com novilhos. Uma série de estudos confirmou que o cobre na dieta, afeta a EGSC na região da 12^a costela (ENGLE; SPEARS, 2000a; ENGLE et al. 2000a, ENGLE et al. 2000b, SOLAIMAN et al., 2006; CHENG et al., 2008). Para investigar a possível relação de cobre e metabolismo lipídico subcutâneo, Engle et al. (2000b) utilizaram novilhos Angus e Hereford x Angus, e observaram uma tendência para de redução da EGSU e concentrações de norepinefrina ligeiramente maiores nos novilhos suplementados, mas as taxas lipolíticas não diferiram entre os tratamentos. Assim, postularam que as taxas lipolíticas podem ter sido um pouco maiores em relação aos controles, no entanto, as diferenças entre os tratamentos podem ter sido pequenas demais para se detectar diferenças nas concentrações séricas de ácidos graxos não esterificados. Johnson e Engle (2003) examinaram os efeitos de Cu nas taxas lipolíticas do tecido adiposo subcutâneo *in vitro* e observam que a lipólise basal parece ser reforçada pela suplementação de Cu, mas não estimulada pela epinefrina e concluíram que o Cu pode ter uma influência sobre os mecanismos celulares que controlam a lipólise e não o número de receptores ou sensibilidade das catecolaminas. Achados que estão de acordo com pesquisa anterior, onde a suplementação de Cu em ovelhas

deficientes do elemento aumentou a taxa lipolítica basal e estimulada do tecido adiposo subcutâneo (SINNETT-SMITH; WOOLLIAMS, 1987).

O sistema acil desidrogenase de gorduras (responsável pela insaturação dos ácidos graxos, principalmente o palmítico e esteárico) parece ser o provável responsável pelo mecanismo pelo o qual é observado um aumento de ácidos graxos insaturados no músculo *longissimus* em novilhos suplementados com cobre (THOMPSON; ALLEN; MEADE, 1973; HO; ELLIOT, 1974; ENGLE, 2011). Uma alteração no metabolismo de lipídios foi também observada em caprinos (CUMMINS; SOLAIMAN; BERGEN, 2008; DATTA; MONDAL; BISWAS, 2007; SOLAIMAN et al., 2006) em bovinos (CORREA et al. 2012; JOHNSON; ENGLE, 2003; ENGLE et al., 2000a) e em aves (BAKALLI et al., 1995). Além disso, em alguns estudos constatou-se que a suplementação de Cu diminuiu a espessura da gordura subcutânea (EGSC) em novilhos (ENGLE et al., 2000a; ENGLE; SPEARS, 2000a) e em caprinos (SOLAIMAN et al., 2006). No entanto, a suplementação com 10 ou 40 mg de Cu / kg de MS em bovinos da raça Simental não teve efeito sobre o metabolismo dos lipídios (ENGLE; SPEARS, 2001). É importante ressaltar que esta raça tem um metabolismo de Cu diferente.

Kim, Chao e Allen. (1992) demonstraram que a deficiência de cobre em ratos causou hipercolesterolemia devido ao aumento hepático das concentrações glutatona reduzida (GSH), o que aumenta a atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA- redutase) no fígado, que é a enzima limitante na síntese de colesterol. Assim, altas concentrações de Cu no fígado podem regular indiretamente a biossíntese do colesterol, diminuindo a glutatona reduzida (GSH) e aumentando a glutatona oxidada (GSSG) (KIM; CHAO; ALLEN, 1992; BAKALLI et al., 1995). De acordo com Engle (2011), o aumento das concentrações celulares de glutatona oxidada (GSSG) diminui a atividade da HMG-CoA redutase e que com uma diminuição da HMG-CoA redutase, o fluxo de carbono através da via mevalonato seria reduzido, diminuindo assim, a síntese de colesterol. A redução na concentração de colesterol no músculo *longissimus* acompanhada pela redução da concentração de GSH, foi também observada recentemente por Correa et al. (2012), em estudo sobre o efeito de dois níveis e duas fontes de cobre no metabolismo de lipídios em bovinos Nelore.

Existem poucos estudos sobre os efeitos da suplementação com Cu sobre o metabolismo lipídico em ovinos, principalmente sobre a relação entre o Cu e alteração das concentrações do colesterol sérico e no músculo *longissimus*, GSH e GSSG hepáticas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi de determinar os efeitos de sulfato de cobre (CuSO_4) e cobre metionina (Cu-metionina) sobre o metabolismo lipídico em ovinos Merino x Texel.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Local e Período

O experimento foi conduzido na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga-SP, por um período de 120 dias.

2.2.2 Animais

Foram utilizados 40 ovinos, machos não castrados resultantes do cruzamento Merino x Texel, com peso vivo médio de $22 \pm 0,46$ kg na fase de engorda, tendo sido abatidos com $41,82 \pm 0,51$ kg.

2.2.3 Instalações e manejo inicial

Os animais foram alojados em gaiolas para estudo de metabolismo, instaladas em galpão coberto equipado com cortinas laterais, com comedouros e bebedouros individuais.

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos à colheita de fezes para exame de contagem de ovos de parasitas gastrointestinais por grama (OPG) e, em seguida foram desparasitados com oxibendazole e submetidos a uma fase de adaptação de 40 dias para promover a mudança gradual da dieta e realizar a biópsia de fígado. Durante esse período os animais receberam a dieta experimental sem adição de cobre para permitir a depleção do elemento. Ainda neste período de adaptação, foram realizadas biópsias do fígado em todos os animais utilizando o procedimento descrito por Miles, Wilkinson e McDowell (2001) para análise de cobre no tempo zero. Posteriormente à cirurgia, os animais receberam doses injetáveis de antibiótico e anti-inflamatório Pencivet® PLUS PPU via intramuscular na dose de 1 mL/10 kg de peso vivo durante 3 dias, seguidos de um período de recuperação de 15 dias.

2.2.4 Tratamentos

Os cordeiros foram distribuídos aleatoriamente em 5 tratamentos, totalizando 8 animais por tratamento. Os tratamentos usados foram: controle, sem adição de Cu (Co); adição de 10 ou 30 mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de Cu (CuSO_4) na dieta; adição de 10 ou 30 mg de Cu/kg de MS na forma de cobre metionina (Cu-metionina) na dieta.

Os animais receberam ração total, e sua composição porcentual está presente na tabela 2.1. Esta foi elaborada para conter um teor de proteína bruta de 14% e 65% de nutrientes digestíveis totais (NDT). A composição bromatológica da ração final foi: matéria seca 91%, proteína bruta 15,80% Extrato etéreo 6,9%, matéria mineral 5,40%, carboidratos fibroso 31,82 e carboidratos não fibroso 40%. O teor de cobre na ração basal foi de 9 mg/kg de MS.

Tabela 2.1 Composição centesimal da Ração

Ingrediente	Porcentagem (%)
Fubá de Milho	55,3
Casca Algodão	25,0
Farelo Soja	16,0
Óleo Soja	1,0
Calcário Calcítico	1,2
Vitaminas*	0,5
Minerais**	0,5
Total	100

* Composição de vitaminas por quilograma de produto: Vitamina A (400000 UI) e vitamina E (4000 UI)

** Composição dos minerais por quilograma de produto: Iodo 100 mg, Ferro 4000 mg, Cobalto 40 mg, Manganês 3000 mg, Selênio 40 mg, Zinco 4000 mg, Enxofre 40g e Cloreto de sódio 216 g.

2.2.5 Procedimento experimental

Diariamente foram colhidas e pesadas as sobras da alimentação para que semanalmente fosse ajustada a quantidade de alimento a fornecer, totalizando 3% do peso vivo para cada animal, quantia essa que foi dividida em dois tratos (pela manhã e à tarde).

Nos dias 0, 28 e 56 do experimento foram efetuadas as seguintes medições e colheitas: pesagens dos animais após jejum completo de 18 horas, colheitas de sangue por punção da veia jugular, em tubos de vácuo sem anticoagulante para análises de cobre, colesterol total, colesterol HDL (HDL) e triglicerídeos.

Ao final do experimento, os animais foram abatidos. Ao final do experimento, os animais foram abatidos com peso vivo médio de $41,82 \pm 0,51$ kg no matadouro escola da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS) após um período de jejum de 16 horas. Estes foram insensibilizados com concussão cerebral com uso de uma pistola de ar comprimido e abatidos por sangria pela veia jugular em posição vertical. Depois se fez a esfolagem, evisceração, inspeção, serragem das carcaças ao meio e toalete. No momento do abate foram colhidas amostras de fígado que foram congeladas para análise posterior de Cu. No mesmo momento colheram-se amostras de fígado em triplicata que foram embrulhadas em papel alumínio e congelados em nitrogênio líquido para análise dos peptídeos, glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG).

As carcaças foram mantidas em câmara frigorífica a 0°C até ao término do *rigor-mortis*. Após 24 horas de resfriamento, as metades carcaças esquerdas foram serradas em duas partes entre a 12ª e a 13ª costelas para obtenção da espessura de gordura (EGSC), com auxílio de uma régua, sendo os resultados expressos em milímetros (mm). Durante a desossa, foram colhidos bifes de 2,5 cm de espessura do músculo *longissimus* da carcaça esquerda a partir da 13ª costela em direção cranial. Desses bifes foram amostras em triplicata e colocados em papel de alumínio, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior avaliação do colesterol e perfil de ácidos graxos.

2.2.6 Procedimento Analítico

2.2.6.1 Cobre no fígado

O cobre no fígado foi analisado por espectrofotometria de absorção atômica, tendo sido retirado um fragmento sempre da mesma região do órgão, lavado em água destilada deionizada, seco em papel absorvente descartável e pesado em balança de precisão. Essas determinações foram feitas no laboratório de Minerais do Departamento de Zootecnia da FZEA-USP.

2.2.6.2 Composição de ácidos graxos do músculo

A composição de ácidos graxos do músculo *longissimus* foi realizada na FMVZ- Pirassununga. A extração de lipídios da carne foi determinado pelo método de (BLIGH; DYER, 1959; CHRISTIE, 1982; SMEDES; THOMASEN, 1996). A gordura separada foi metilada e os ésteres metílicos foram formados de acordo com Kramer, Fellner e Dugan (1997). Dois padrões internos C18:0 e C19:0 foram utilizados para corrigir as perdas durante o processo de metilação.

Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (GC Shimatzu 2010, com injeção automática), usando coluna capilar SP-2560 (100 m x 0,25 mm de diâmetro com 0,02 mm de espessura, Supelco, Bellefonte, PA). A temperatura inicial foi de 70°C por 4 minutos (13 °C/minuto) até chegar a 175 °C, mantendo-se por 27 minutos. Depois, um novo aumento de 4 °C/minuto, foi iniciado até 215 °C, mantendo-se durante 31 minutos. Hidrogênio (H₂) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 40 cm/s. Durante o processo de identificação foram utilizados quatro padrões: standard C4-C24 de ácidos graxos (Supelco ® TM 37), ácido vacênico C18:1 trans-11 (V038-1G, Sigma®), C18 CLA:2 trans-10, cis-12 (UC-61M 100mg), CLA e C18:2 cis-9, trans-11 (UC-60M 100mg), (NU-CHEK-PREP EUA ®) para identificação dos ácidos graxos que são formados durante a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados.

2.2.6.3 Análise de colesterol total, HDL, LDL e triglicerídeos

O colesterol total, HDL e triglicérides foram analisados pelo método enzimático através de kits enzimáticos da marca Bioclin (QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda, Belo Horizonte - MG - Brasil).

O colesterol LDL foi estimado pela fórmula de Friedewald, Levi e Fredrickson (1972): [Cholesterol LDL = Total Cholesterol – Cholesterol HDL – (Triglycerides/5)].

O colesterol no músculo foi determinado pelo método enzimático segundo Saldanha, Mazalli e Bragagnolo (2004) com uso do kit enzimático da marca Bioclin (QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda, Belo Horizonte - MG - Brasil). As amostras de músculo foram previamente pesadas e trituradas. Após homogeneização com KOH (50%) e álcool etílico em e banho Maria, foi acrescentada água destilada e em seguida foi usado o hexano para separação das fases. Essa extração foi repetida

mais duas vezes e 3 mL do extrato hexânico foi transferido para um tubo de vidro, sendo realizada então a secagem sob N_2 . Os próximos passos foram adição de isopropanol, reagente enzimático, banho Maria e leitura da absorbância.

2.2.6.4 Determinação da GSH e GSSG

As determinações de GSH e GSSG no fígado, e consequente relação GSH/GSSG, foram feitas segundo Tietze (1969). A glutatona total foi mensurada, após homogeneização do tecido em ácido sulfossalicílico 5%, pelo método de reciclagem na presença de ácido ditionitrobenzóico (DTNB), NADPH e GR. A formação do ácido titionitrobenzóico (TNB), que é um produto colorido absorvido a 412nm, é proporcional à quantidade de GSH (e GSSG) das amostras e foi monitorada espectrofotometricamente por 3 minutos. A GSSG foi determinado pela derivação direta do GSH ao homogenizar outra amostra do mesmo tecido na presença de N-etilmaleimida (NEM 12,5nM), seguida por hidrólise alcalina.

2.2.7 Delineamento experimental

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento. Os dados de EGSC, colesterol na carne, ácidos graxos, e cobre no fígado foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), utilizando o PROC GLM do programa SAS. Em caso de resultados significativos na ANOVA, as médias foram analisadas por contrastes, utilizando o teste Scheffé.

Para os parâmetros séricos, que foram analisados a cada 28 dias, foi utilizado o PROC MIXED do SAS. As médias foram comparadas por meio de contrastes e foi adotado um nível de 5% de significância. Foi adotado o seguinte modelo estatístico: $Y_{ijr} = \mu + T_i + D_j + TD_{ij} + e_{ij}(r)$. Em que: Y_{ijr} = é o valor observado para a variável em estudo referente ao tratamento i no bloco j ; μ = média de todas variáveis experimentais para a variável em estudo; T_i = efeito particular do tratamento e no valor observado Y_{ij} ; D_j = efeito dos dias de avaliação no valor observado Y_{ij} ; TD_{ij} = interação entre o tratamento e os dias de avaliação no valor observado Y_{ij} ; $e_{ij}(r)$ = erro associado a observação Y_{ij} .

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações médias de cobre no fígado de ovinos durante o período experimental estão apresentadas na Tabela 2.2.

A concentração hepática deste mineral foi maior nos animais suplementados ($P < 0,05$) comparados com o grupo controle. Adicionalmente, os animais que receberam 30mg/kg de MS de Cu-metionina apresentaram maior concentração de Cu no fígado ($P < 0,05$), comparados aos animais que receberam 10 mg/kg de MS da mesma fonte (tabela 2.2). Este resultado indica que o fígado é o órgão central do metabolismo do cobre e sua concentração reflete o teor de Cu que está sendo ingerido (McDOWELL, 2003).

Tabela 2.2 Concentrações médias de cobre (base seca) em mg/kg de fígado de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.

Variável Cu fígado (mg/kg)	Tratamentos (mg de Cu /kg de MS)					EPM	Contrastes ortogonais			
	Co 0	CuSO ₄ 10	CuSO ₄ 30	Cu- metionina 10	Cu- metionina 30		A	B	C	D
Biópsia	39,90	47,85	48,83	29,51	60,77	13,34	0,65	0,81	0,96	0,11
Abate	168,01	247,86	284,95	263,02	341,29	23,33	<0,01	0,13	0,27	0,02

Co = Dieta controle (sem cobre suplementar)

EPM = erro padrão da média

A = controle comparado aos demais; B = tratamento com Cu na forma de CuSO₄ comparado ao de Cu-metionina; C = 10 mg/kg de MS de CuSO₄ comparado com 30 mg/kg de MS de CuSO₄; D = 10 mg/kg de MS de Cu-metionina comparado com 30 mg/kg de MS de Cu-metionina.

Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) da suplementação de cobre para EGSC (tabela 2.3). Este resultado pode ser explicado pelo fato dos animais terem obtido semelhança no peso ao abate ($41,82 \pm 0,51$ kg) e rendimento de carcaça fria ($49,53 \pm 0,70$ %) independentemente dos tratamentos.

O resultado obtido no presente estudo foi consistente com o reportado em estudo similar com bovino Nelore (CORREIA et al., 2012) entretanto, não foi semelhante aos encontrados em estudos similares com bovinos, caprinos e ovinos, onde a suplementação com Cu reduziu a EGSC (WARD; SPEARS, 1997; ENGLE; SPEAR, 2000b; ENGLE et al. 2000b; ENGLE et al. 2000c; SOLAIMAN et al. 2006; CHENG et al., 2008).

Tabela 2.3 Espessura de gordura subcutânea (EGSC) de ovinos, Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.

Variável	Tratamentos (mg de Cu /kg de MS)					EPM	Contrastes ortogonais			
	Co 0	CuSO ₄ 10	CuSO ₄ 30	Cu- metionina 10	Cu- metionina 30		A	B	C	D
EGSU (mm)	5,00	5,25	5,14	4,28	4,64	0,63	0,80	0,25	0,91	0,71

Co = Dieta controle (sem cobre suplementar)

EPM = erro padrão da média

A = controle comparado aos demais; B = tratamento com Cu na forma de CuSO₄ comparado ao de Cu-metionina; C = 10 mg/kg de MS de CuSO₄ comparado com 30 mg/kg de MS de CuSO₄; D = 10 mg/kg de MS de Cu-metionina comparado com 30 mg/kg de MS de Cu-metionina.

Pesquisa avaliando o efeito da suplementação de Cu sobre a composição de ácidos graxos no músculo *longissimus* é limitada em cordeiros, assim, a comparação direta é difícil. No presente estudo, verificou uma redução da concentração do ácido láurico (C12:0) ($P < 0,05$) e aumento da concentração dos ácidos graxos insaturados ($P < 0,10$) nos animais suplementos independentemente da fonte e nível (tabela 2.4). Este resultado não está de acordo com o relatado em estudo semelhante em ovinos, usando 10 mg ou 20 Cu/kg MS de Cu-lisina e 10 ou 20 mg Cu/kg de cloreto de cobre tribásico [Cu₂(OH)₃Cl] por Cheng et al. (2008).

A alteração no perfil de ácidos graxos observada no presente estudo está de acordo com o observado em bovinos por vários autores (CORREA et al., 2012; ENGLE; SPEAR, 2004; JOHNSON; ENGLE, 2003; ENGLE; SPEAR 2000b; ENGLE et al., 2000a; ENGLE et al., 2000c) sendo que, de um modo geral, o Cu favorece o aumento dos ácidos graxos insaturados e polinsaturados e diminuição dos ácidos graxos saturados. Em caprinos da raça Bôer x espanhola foi verificada uma diminuição do ácido mirístico (C14:0) e ácido palmítico (C16:0) no tecido adiposo subcutâneo e um aumento linear do ácido pentadecanóico (C15:0) no músculo *longissimus* em função da adição de Cu na dieta, segundo os autores, os resultados indicaram que a composição dos lipídios pode diferir em função do depósito e que dietas com cobre podem resultar em respostas variáveis na composição de ácidos graxos (CUMMINS; SOLAIMAN; BERGEN, 2008).

Tabela 2.4 Perfil de ácidos graxos (%) do músculo *longissimus* de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.

Ácidos graxos (%)	Tratamentos (mg de Cu /kg de MS)					EPM	Contrastes			
	Co 0	CuSO ₄ 10	CuSO ₄ 30	Cu-metion. 10	Cu-metion. 30		A	B	C	D
C10:0 (Cáprico)	0,12	0,12	0,13	0,13	0,14	0,01	0,34	0,42	0,82	0,66
C12:0 (Láurico)	0,13	0,05	0,04	0,05	0,05	0,02	<0,01	0,96	0,77	0,90
C14:0 (Mirístico)	2,07	2,06	2,16	2,16	2,08	0,12	0,70	0,96	0,54	0,65
C14:1 (Miristoléico)	0,10	0,08	0,12	0,10	0,13	0,02	0,89	0,52	0,15	0,25
C15:0 (Pentadecanóico)	0,01	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01	0,57	0,42	0,67	0,06
C16:0 (Palmítico)	27,18	27,34	27,68	27,82	27,05	0,47	0,57	0,89	0,62	0,27
C16:1 (Palmitole.)	1,45	1,64	1,71	1,78	1,59	0,11	0,06	0,93	0,67	0,23
C17:0 (heptadecanóico)	0,46	0,35	0,54	0,56	0,66	0,15	0,67	0,30	0,40	0,63
C17:1 (heptadecanóico cis-10)	0,44	0,45	0,58	0,52	0,57	0,11	0,43	0,82	0,40	0,75
C18:0 (Estearíco)	14,60	15,18	14,52	14,24	15,25	0,71	0,80	0,89	0,52	0,34
C18:1 t11 (vacenico)	1,45	1,56	1,82	1,58	1,70	0,17	0,24	0,77	0,30	0,63
C18:1 n9,c (Oléico)	46,09	46,66	46,24	47,58	47,10	0,60	0,22	0,15	0,63	0,58
C18:2 n6,c (Linoléico)	4,00	4,20	4,19	3,40	4,30	0,40	0,96	0,40	0,98	0,12
C20:0 (Araquídico)	0,10	0,09	0,05	0,09	0,08	0,02	0,37	0,52	0,20	0,93
C18:2 c9, t11 (CLA)	0,28	0,29	0,27	0,30	0,35	0,03	0,50	0,12	0,60	0,25
Saturados	46,7	45,21	45,14	45,05	45,35	0,77	0,53	0,97	0,95	0,79
Insaturados	53,82	54,89	54,92	55,25	55,74	0,74	0,09	0,43	0,97	0,65
Insat./Saturados	1,21	1,22	1,22	1,23	1,23	0,04	0,66	0,76	0,90	0,97
Monoinsaturados	49,53	50,39	50,46	51,55	51,08	0,65	0,06	0,19	0,94	0,62
Poli-insaturados	4,28	4,49	4,46	3,70	4,66	0,39	0,92	0,46	0,95	0,10
Saturados C18	14,60	15,18	14,52	14,24	15,25	0,71	0,80	0,89	0,52	0,34
Insaturados C18	51,82	52,71	52,51	52,86	53,46	0,69	0,16	0,44	0,84	0,56

Co = Dieta controle (sem cobre suplementar)

EPM = erro padrão da média

A = controle comparado aos demais; B = tratamento com Cu na forma de CuSO₄ comparado ao de Cu-metionina; C = 10 mg/kg de MS de CuSO₄ comparado com 30 mg/kg de MS de CuSO₄; D = 10 mg/kg de MS de Cu-metionina comparado com 30 mg/kg de MS de Cu-metionina.

Saturados = C10:0 + C12:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C20:0 ;

Insaturados = C14:1 + C16:1 + C17:1 + C18:1 t11 + C18:1 n9,c + C18:2 n6,c + C18:2 c9, t11;

Monoinsaturados = C14:1 + C16:1 + C17:1 + C18:1 t11 + C18:1 n9,c; Poli-insaturados = C18:2 n6,c + C18:2 c9, t11;

Insaturados C18 = C18:1 t11 + C18:1 n9,c + C18:2 n6,c + C18:2 c9, t11; Saturados C18 = C18:0

As concentrações médias de triglicérides, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL no soro e colesterol total no músculo *longissimus* dos ovinos Merino x Texel estão apresentadas na tabela 2.5. Não foi verificado efeito da suplementação com Cu sobre estes parâmetros séricos no período experimental ($P>0,05$). Entretanto, houve efeito quadrático em relação ao tempo nos parâmetros analisados tendo se obtido as seguintes equações de regressão: triglicérides ($y = 27.375 + 0,008839x - 0,00411x^2$), colesterol total ($y = 88,6 + 0,6759x - 0,01397 x^2$), colesterol HDL ($y = 38.2564 - 0,1044x + 0,00755 x^2$) e colesterol LDL ($y = 45,825 + 0,7235x - 0,1921x^2$).

O resultado de colesterol total e triglicerídeos no presente trabalho é consistente com resultados obtidos em pesquisa com caprinos Bôer x Espanhola (SOLAIMAN et al., 2006). O mesmo foi concluído por Engle et al. (2000a) em experimento em bovinos Angus e cruzamentos Angus x Hereford em crescimento e terminação, onde os triglicerídeos e ácidos graxos não esterificados não foram afetados pelo tratamento e o colesterol sérico não foi afetado durante a fase de crescimento, igualmente, os níveis de colesterol plasmáticos e do músculo *longissimus* em bovinos da raça Simental não foram afetados pelo tratamento (ENGLE; SPEARS, 2001). Vários autores encontraram uma redução da concentração de triglicérides e/ou colesterol com a suplementação dietética com Cu em ovinos (CHENG et al., 2008), em caprinos (DATTA, MONDAL e BISWAS, 2007); em bovinos (JOHNSON; ENGLE, 2003; ENGLE et al., 2000a) e em aves (BAKALLI et al., 1995). Assim, não são conhecidas as causas para esta diferença de resultados em relação ao colesterol. O elevado coeficiente de variação observado no presente estudo (37,57%) pode ter contribuído para não existência de diferenças estatísticas na concentração de triglicerídeos entre os tratamentos. No entanto, mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos houve uma redução tanto do colesterol total como de triglicerídeos (6,72% e 29,04%) respectivamente, ao longo do período experimental.

As concentrações do colesterol-HDL e LDL foram similares entre os tratamentos ($P>0,05$), provavelmente também devido ao elevado coeficiente de variação (29,98 e 45,03%) respectivamente (Tabela 2.5). Entretanto, houve uma redução de 43,40% de LDL e aumento de 46,53% de HDL ao longo do período experimental, o que pode ser saudável. Os resultados são consistentes com os de

Cheng et al. (2008) em experimento realizado para determinar o efeito do cobre dietético sobre o desempenho, características de carcaça e metabolismo lipídico em cordeiros castrados Dorper x Mongolia. Contrariamente, Engle et al. (2000a) observaram uma redução das concentrações de HDL, LDL na fase de terminação de bovinos que receberam Cu suplementar. Resultado semelhante em caprinos foi reportado por Datta, Mondal e Biswas (2007).

Tabela 2.5 Concentrações médias de triglicerídeos e colesterol total, Colesterol HDL e LDL no plasma, em mg/dl e de colesterol (mg/100g de carne) no músculo *longissimus* de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu ao longo do experimento.

Variáveis	Tratamentos (mg de Cu /kg de MS)					EPM	Contrastes ortogonais			
	Co 0	CuSO ₄ 10	CuSO ₄ 30	Cu- metionina 10	Cu- metionina 30		A	B	C	D
Colesterol (mg/100g mús.)	74,38	67,00	66,82	65,84	64,74	0,70	<0,01	0,19	0,92	0,53
Tempo (dias)					Efeito tempo					
					0	28	56			
Triglicérides (mg/dl)	27,375 ± 1,37		26,625 ± 1,37		19,425 ± 1,37		Q<0,001			
Colest. plasma (mg/dl)	88,6 ± 2,59		96,575 ± 2,59		82,65 ± 2,59		Q<0,001			
Colest. HDL (mg/dl)	38,375 ± 1,80		41,3393 ± 1,80		56,2321 ± 1,8		Q<0,001			
Colesterol LDL (mg/dl)	45,825 ± 2,39		51,025 ± 2,39		25,9378 ± 2,39		Q<0,001			

Co = Dieta controle (sem cobre suplementar)

EPM = erro padrão da média

A = controle comparado aos demais; B = tratamento com Cu na forma de CuSO₄ comparado ao de Cu-metionina; C = 10 mg/kg de MS de CuSO₄ comparado com 30 mg/kg de MS de CuSO₄; D = 10 mg/kg de MS de Cu-metionina comparado com 30 mg/kg de MS de Cu-metionina.

Houve efeito significativo ($P<0,05$) da suplementação de Cu sobre o colesterol no músculo *longissimus*, sendo que os grupos suplementados independentemente dos níveis e fonte de Cu tiveram menor quantidade de colesterol quando comparados com o grupo controle (tabela 2.5).

A concentração média de glutathiona reduzida (GSH) no grupo controle foi maior em relação aos demais tratamentos ($P<0,05$). O grupo que recebeu 30 mg/kg de MS de CuSO₄ teve maior concentração de GSH que o grupo que recebeu 10 mg/kg de MS da mesma fonte de Cu ($P<0,05$). O grupo tratado com 30 mg/kg de MS de Cu-metionina obteve maior concentração de glutathiona oxidada (GSSH) quando

comparado com os demais tratamentos. A relação GSH/GSSG foi similar ($P>0,05$), em todos os tratamentos (tabela 2.6). Apesar de não haver diferença, houve uma tendência clara na redução da relação nos grupos suplementados, pois, na comparação entre o controle e os suplementados o P foi igual a 0,05 e na comparação dos níveis 10 e 30 mg de Cu-metionina o P foi igual a 0,06.

Relata-se que a suplementação com Cu pode regular indiretamente a biossíntese do colesterol, pois a alta concentração de Cu no fígado diminui a concentração hepática da glutathiona reduzida, em seguida, a atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), a qual é a enzima limitante na síntese do colesterol, é potencialmente reduzida, diminuindo deste modo a síntese de colesterol (BAKALLI et al., 1995; KIM; CHAO; ALLEN, 1992). Por outro lado, o aumento das concentrações celulares de glutathiona oxidada reduz a atividade da HMG-CoA redutase e que com uma diminuição da HMG-CoA redutase, o fluxo de carbono através da via mevalonato seria reduzido, diminuindo assim, a síntese de colesterol (ENGLE, 2011).

A redução de colesterol no *longissimus* dos animais tratados com cobre no presente estudo (tabela 2.5) sustenta a relação entre este, o Cu hepático, GSH, GSSG e HMG-CoA redutase acima, uma vez que foi observado também um aumento da concentração de cobre no fígado (tabela 2.2), uma redução significativa da concentração de GSH e aumento da GSSG e em função do tratamento com cobre (tabela 2.6). Embora não tenha sido analisada, provavelmente teria se verificado uma redução da HMG-CoA redutase.

Resultados semelhantes de colesterol no *longissimus* foram encontrados em experimentos com suínos usando concentrações farmacológicas de diferentes fontes de Cu (REY; LOPEZ-BOTE; BUCKLEY, 2004; ARMSTRONG et al., 2001); em novilhos (ENGLE; SPEARS, 2000a; ENGLE; SPEARS, 2000b; ENGLE et al. 2000a; ENGLE et al. 2000b; ENGLE et al. 2000c).

Tabela 2.6 Concentrações médias da GSH e GSS em $\mu\text{mol/g}$ de fígado e relação GSH/GSSG de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.

Variav. ($\mu\text{mol/g}$ fígado)	Tratamentos (mg de Cu/kg de MS)					EPM	Contrastes ortogonais			
	Co 0	CuSO ₄ 10	CuSO ₄ 30	Cu- metion. 10	Cu- metion. 30		A	B	C	D
GSH	3,23	2,70	2,24	2,68	2,51	0,15	<0,01	0,44	0,047	0,44
GSSG	0,011	0,013	0,12	0,015	0,027	0,004	0,21	0,03	0,97	0,03
GSH/GSSG	594,28	346,23	305,96	458,96	107,28	126,93	0,05	0,74	0,82	0,06

Co = Dieta controle (sem cobre suplementar)

EPM = erro padrão da média

A = controle comparado aos demais; B = tratamento com Cu na forma de CuSO₄ comparado ao de Cu-metionina; C = 10 mg/kg de MS de CuSO₄ comparado com 30 mg/kg de MS de CuSO₄; D = 10 mg/kg de MS de Cu-metionina comparado com 30 mg/kg de MS de Cu-metionina.

2.4 CONCLUSÕES

A suplementação com cobre independentemente da fonte, reduziu os níveis de GSH e aumentou os níveis de GSSG no fígado, reduziu a concentração de colesterol no músculo *longissimus*, teve efeito sobre a composição de ácidos graxos no músculo *longissimus* em ovinos Merino x Texel.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao convênio o CNPq – Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT) - Moçambique e Universidade Eduardo Mondlane por possibilitarem a realização de estudos numa Instituição de Ensino Superior (IES) brasileira o que permitiu a produção do presente artigo científico.

REFERÊNCIAS

- ARMSTRONG, T. A. et al. Effect of pharmacological concentrations of dietary copper on lipid and cholesterol metabolism in pigs. **Nutrition Research**, New York, v. 21, n. 9, p. 1299-1308, Sep. 2001. doi:10.1016/S0271-5317(01)00332-3.
- BAKALLI, R. I. et al. Dietary copper in excess of nutritional-requirement reduces plasma and breast muscle cholesterol of chickens. **Poultry Science**, Savoy, v. 74, n. 2, p. 360-365, Feb. 1995. doi:10.3382/ps.0740360.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. C. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959. doi:10.1139/o59-099. doi:10.1139/o59-099.
- CHENG, J. et al. Effects of Dietary Copper Source and Level on Performance, Carcass Characteristics and Lipid Metabolism in Lambs. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v. 21, n. 5. p. 685 – 691. May. 2008. doi: 10.1007/s12011-011-9065-2.
- CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 23, p. 1072-1075, 1982. Disponível em: < ISI>:// WOS: A1982PK62000016. Acesso em: 12 ago. 2011.
- CORREA, L. B. et al. Effect of supplementation of two sources and two levels of copper on lipid metabolism in Nellore beef cattle. **Meat Science**, Amsterdam, v. 91. p. 466-471. Feb. 2012. doi:10.1016/j.meatsci.2012.02.033.
- CUMMINS, K. A.; SOLAIMAN, S. G.; BERGEN, W. G. The effect of dietary copper supplementation on fatty acid profile and oxidative stability of adipose depots in Boer x Spanish goats. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 86, n. 2, p. 390-396, Feb. 2008. doi:10.2527/jas.2006-671.
- DATTA, C. M.; MONDAL, K.; BISWAS, P. Influence of dietary inorganic and organic form of copper salt on performance, plasma lipids and nutrient utilization of Black Bengal (*Capra hircus*) goat kids. **Animal Feeding Science Technology**, Amsterdam, v.135. p. 191-209, 2007. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.06.008.
- ENGLE, T. E. Copper and lipid metabolism in beef cattle: A review. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 89, n. 2, p. 591-596, Feb. 2011. Disponível em: < ISI>://WOS:000286509800029 >. Acesso em: 12 ago. 2011.
- ENGLE, T. E.; SPEARS, J. W. Effects of dietary copper concentration and source on performance and copper status of growing and finishing steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 9, p. 2446-2451, Sep. 2000a. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000089071500028. Acesso em: 12 ago. 2011.
- _____. Dietary copper effects on lipid metabolism, performance, and ruminal fermentation in finishing steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 9, p. 2452-2458, Sep 2000b. Disponível em: <ISI>://WOS:000089071500029. Acesso em: 12 ago. 2011.

ENGLE, T. E.; SPEARS, J. W. Performance, carcass characteristics, and lipid metabolism in growing and finishing Simmental steers fed varying concentrations of copper. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 79, n. 11, p. 2920-2925, Nov. 2001. Disponível em: <ISI>://WOS:000172643000022. Acesso em: 02 mar. 2011.

_____. Effect of finishing system (feedlot or pasture), high-oil maize, and copper on conjugated linoleic acid and other fatty acids in muscle of finishing steers. **Animal Science, Cambridge**, v. 78, p. 261-269, Apr. 2004. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000222788100009. Acesso em: 02 mar. 2011.

ENGLE, T. E. et al. Effects of dietary copper source and concentration on carcass characteristics and lipid and cholesterol metabolism in growing and finishing steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 4, p. 1053-1059, Apr. 2000a. Disponível em: <ISI>://WOS:000088217900033. Acesso em: 14 abr. 2011.

_____. Effects of soybean oil and dietary copper on ruminal and tissue lipid metabolism in finishing steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 10, p. 2713-2721, Oct 2000c. Disponível em: <ISI>://WOS:000089913600028. Acesso em: 14 abr. 2011.

_____. Dietary copper effects on lipid metabolism and circulating catecholamine concentrations in finishing steers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 10, p. 2737-2744, Oct. 2000b. Disponível em: <ISI>://WOS:000089913600031. Acesso em: 14 abr. 2011.

FRIEDEWALD W. T.; LEVI R. I.; FREDRICKSON D. S. Estimation of the concentration of low density lipoproteins cholesterol in plasma without use of the ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, Chicago, v. 18. p.499-502, 1972. Disponível em: <ISI>://WOS:A1972M604800001. Acesso em: 14 abr. 2011.

HO, S. K.; ELLIOT, J. I. Fatty acid composition of porcine depot fat as related to the effect of supplemental dietary copper on the specific activities of fatty acid desaturase systems. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 54, p. 23-28, 1974. doi:10.4141/cjas74-004.

JOHNSON, L. R.; ENGLE, T. E. The effects of copper source and concentration on lipid metabolism in growing and finishing Angus steers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 16, n. 8, p. 1131-1136, Aug. 2003. Disponível em: < ISI>://WOS:000183244800007>. Acesso em: 14 abr. 2011.

KRAMER, J. K. G.; FELLNER, V.; DUGAN, M. E. R. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, Heidelberg, v. 32, p. 1219-1228, 1997.

KIM, S.; CHAO, P. Y.; ALLEN, K. G. D. Inhibition of elevated hepatic glutathione abolishes copper deficiency cholesterolemia. **Faseb Journal**, Bethesda, v. 6, n. 7, p. 2467-2471, Apr. 1992. Disponível em: < ISI>://WOS:A1992HP03000013 >. Acesso em: 24 abr. 2011.

McDOWELL, L. **Minerals in animal and human nutrition**. Amsterdam: Elsevier Science, 2003. p. 235-270.

MILES, P. H.; WILKINSON, N. S.; McDOWELL, L. R. **Analysis of minerals for animal nutrition research**. Gainesville: Department of Animal Sciences – University of Florida, 2001.

REY, A. I.; LOPEZ-BOTE, C. J.; BUCKLEY, J. D. Effect of feed on cholesterol concentration and oxidation products development of longissimus dorsi muscle from Iberian pigs. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, Carlow, v. 43, n. 1, p. 69-83, 2004. Disponível em: <ISI>://WOS:000225996700006>. Acesso em: 24 abr. 2011.

SALDANHA, T.; MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, p. 109-113, 2004. doi:10.1590/S0101-20612004000100020.

SINNETT-SMITH, P. A. e WOOLLIAMS, J. A. Adipose tissue metabolism and cell size: Variation between subcutaneous sites and the effect of copper supplementation. **Animal Production**, Cambridge, v. 45, p. 75–80, 1987. doi: 10.1017/S0003356100036643.

SMEDES, F.; THOMASEN, T. K. Evaluation of the Bligh and Dyer lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 32, p. 681-688, 1996. doi:10.1016/0025-326x(96)00079-3.

SOLAIMAN, S. G. et al. The effects of high levels of supplemental copper on the serum lipid profile, carcass traits, and carcass composition of goat kids. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 84, n. 1, p. 171-177, Jan. 2006. Disponível em: < ISI>://WOS:000236120300020>. Acesso em: 20 jul. 2011.

SPEARS, J. W. Micronutrients and immune function in cattle. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 59, n. 4, p. 587-594, Nov. 2000. doi: 10.1017/S0029665100000835.

TIETZE, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram 552 amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian 553 blood and other tissues. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 27, p. 502– 522. 1969.

THOMPSON, E. H., ALLEN, C. E. e R. J. MEADE. Influence of copper on stearic acid desaturation and fatty acid composition in the pig. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 36, p. 868–873. 1973.

UNDERWOOD, E. J.; SUTTLE, N. **The mineral nutrition of livestock**. 3. ed. New York: CAB, 1999.

WARD, J. D.; SPEARS, J. W. Long-term effects of consumption of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on copper status, performance, and carcass characteristics of cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 75, n. 11, p.

3057-3065, Nov. 1997. Disponível em: <ISI>://WOS:A1997YD63400031 >. Acesso em: 1 dez. 2011.

CAPÍTULO 3. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM DOIS NÍVEIS DE SULFATO DE COBRE E COBRE METIONINA NA OXIDAÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE DAS ENZIMAS SUPERÓXIDO DISMUTASE E GLUTATIONA PEROXIDASE EM CORDEIROS MERINO X TEXEL

RESUMO

Com o presente estudo objetivou-se determinar os efeitos de dois níveis de sulfato de cobre e cobre-metionina sobre a estabilidade oxidativa lipídica no músculo *longissimus* e fígado, avaliada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GP-x) no fígado. Para o efeito, foi conduzido um experimento com 40 cordeiros Merino x Texel que foram distribuídos aleatoriamente em 5 tratamentos, com 8 animais cada. Os tratamentos usados foram: controle, sem adição de Cobre na dieta; adição de 10 ou 30 mg de Cu/Kg de MS na forma de sulfato de Cobre na dieta; adição de 10 ou 30 mg de Cu/Kg de MS na forma de cobre-metionina na dieta. O experimento teve a duração de 120 dias e, ao final, todos os animais foram abatidos para colheita de fígado para análise da atividade da SOD, GP-x e determinação de TBARS e de músculo *longissimus* para análise de TBARS no momento da desossa, 12 meses após congelamento à vácuo e 3 e 6 dias após exposição em balcão refrigerador a 4 °C. A atividade da SOD e da GP-x foram maiores ($P < 0,05$) nos animais que receberam cobre suplementar na dieta. Houve diferença estatística entre tratamentos ($P < 0,10$) dos valores de TBARS no *longissimus* obtido no momento da desossa. Os valores do TBARS do dia da desossa não diferiram estatisticamente daqueles encontrados após 12 meses de congelamento à vácuo ($P < 0,05$). Não houve efeito significativo dos tratamentos ($P > 0,05$) nos valores de TBARS no *longissimus* durante o período de “display life” (DL), entretanto, houve um aumento linear destes valores ao longo do período em referência. Estes resultados indicam que a suplementação com cobre na dieta, independentemente da fonte e nível resultou em aumento da concentração hepática das enzimas antioxidantes e não teve efeitos prejudiciais na estabilidade oxidativa do músculo *longissimus* em cordeiros Merino x Texel.

Palavras chave: colesterol, ácidos graxos, lipídios, ovinos.

ABSTRACT

The present study aimed to determine the effects of two levels of copper sulphate and copper-methionine on lipid oxidative stability in the *longissimus* muscle and liver, measured by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GP-x) in the liver. For this purpose, an experiment was conducted with 40 Texel x Merino lambs, randomly distributed into 5 treatments with 8 animals each. The treatments were: control, without copper additions; 10 or 30 mg of Cu/Kg DM in the form of copper sulphate; 10 or 30 mg of Cu/Kg DM in the form of copper-methionine. The experiment lasted 120 days, and at the end the animals were slaughtered to liver sample collection for analysis of the activity of SOD, GP-x and TBARS analysis, and *longissimus* muscle for TBARS analysis at the sawing, 12 months after vacuum freezing, 3 and 6 days after exposure in a refrigerator at 4°C. The SOD and GP-x activities was higher ($P<0.05$) in animals receiving supplemental copper in the diet. There was statistical difference between treatments ($P<0.10$) of TBARS values of *longissimus* muscle obtained at the time of boning. The TBARS values of *longissimus* obtained at boning day did not differ from those found after 12 months of freezing under vacuum ($P<0.05$). There was no significant difference between treatments ($P>0.05$) of TBARS values in *longissimus* during the "display life" (DL), however, there was a linear increase of these values over the days of DL. These results indicate that dietary supplementation with copper, regardless of source and level resulted in increased hepatic concentration of antioxidant enzymes in the liver and had no detrimental effects on oxidative stability of the *longissimus* muscle in Merino x Texel lambs.

Keywords: cholesterol, fatty acids, lipids, sheep.

3.1 INTRODUÇÃO

A fração lipídica dos alimentos está relacionada a diversas propriedades organolépticas, como aroma, coloração, textura e suculência; estabilidade das proteínas, vida de prateleiras sob o congelamento e conteúdo calórico (FERRARI, 1998). A oxidação lipídica é considerada o principal fator de perda de qualidade e das propriedades funcionais da carne e seus produtos (JENSEN; LAURIDSEN; BERTELSEN, 1998).

Os lipídios são suscetíveis ao ataque de radicais livres e a oxidação pode ser extremamente prejudicial, devido à sua propensão para uma reação em cadeia. Assim como os ácidos graxos, o colesterol também sofre oxidação lipídica. A oxidação de lipídios pode ser descrita como uma cascata de eventos bioquímicos que resultam da ação dos radicais livres sobre os lipídios das membranas celulares, gerando principalmente radicais peroxila e alcoxila (FERRARI, 1998). Os lipídios em produtos cárneos oxidam facilmente, causando o desenvolvimento de odor e sabor desagradáveis, conhecido como "sabor de ranço" reduzindo o seu período de vida útil (CURI et al., 2002).

A oxidação lipídica pode ser afetada por vários fatores *ante e post-mortem*: - dieta, conteúdo e concentração de pró-oxidantes (Fe, mioglobina), níveis de antioxidantes (α -tocoferol, histidina contendo di-peptídeos e enzimas tais como glutathione peroxidase (GP-x), superóxido dismutase (SOD) e catalase), o conteúdo e a composição de gordura do músculo, bem como do grau de processamento, embalagem e armazenamento (JENSEN; LAURIDSEN; BERTELSEN, 1998; REY; LOPEZ-BOTE, 2001).

Alguns estudos mostraram que, dependendo da forma em que o cobre é encontrado, ele pode ter efeito pró- ou antioxidante. Quando numa forma iônica, o cobre é um elemento pró-oxidante e pode estimular a oxidação de lipídios, no entanto, este mineral tem uma elevada capacidade de se ligar a proteínas, reduzindo este efeito. Por outro lado, apesar do Cu ser considerado um elemento pró-oxidante, nas células hepáticas ele não está presente na forma livre iônica, mas sim ligado a proteínas, que inativam sua ação pró-oxidante (LUZA; SPEISKY, 1996). Adicionalmente, o cobre pode ser encontrado como um cofator em muitas metaloenzimas, tais como citocromo oxidase e Cu, Zn-superóxido dismutase (SOD),

que representam a primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (McCORD; FRIDOVIC, 1969).

De acordo com Jones e Suttle (1981) e McCord e Fridovic (1969), a SOD é uma importante enzima funcionalmente associada com o Cu em diferentes tecidos e, possui um papel fundamental na regulação do metabolismo celular dependente do O_2 . A falta de SOD e consequente aumento no O_2 extracelular associado com a deficiência de Cu pode, portanto, realçar os danos oxidativos, o suficiente para danificar a função normal da célula (SHARMA et al., 2005).

Durante o metabolismo dos músculos após o abate, que difere entre os tipos de músculo, o processo de oxidação lipídica pode não ser rigorosamente controlado, devido à debilidade do sistema de defesa antioxidante, e isso pode afetar as características de qualidade de carne fresca. Como logo após o abate os animais estão em homeostase, pode ser que ainda não haja oxidação (LAURIDSEN et al., 1999a). Por isso é interessante promover algum estresse, tal como diferentes formas de conservar a carne, para que se possa ver melhor o papel deste mineral.

Sabendo que o consumo da carne ovina está aumentando no Brasil e em Moçambique em particular, sendo esta comercializada na forma de cortes congelados, aliado ao fato da tendência dos consumidores terem cada vez mais preferência por produtos de conveniência, o que impulsiona os fornecedores a colocar no mercado cortes refrigerados prontos para um rápido preparo e consumo, objetivou-se com este trabalho, estudar o efeito da suplementação de dois níveis de sulfato de cobre e cobre-metionina sobre a estabilidade oxidativa lipídica da carne, medida pelo TBARS e atividade das enzimas SOD e GP-x no fígado em ovinos Merino x Texel.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local e período do experimento

O experimento foi conduzido na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, campus de Pirassununga-SP, por um período de 120 dias.

3.2.2 Animais, instalações e manejo inicial.

Foram utilizados 40 ovinos, machos não castrados resultantes do cruzamento Merino x Texel, com peso vivo médio de $22 \pm 0,46$ kg na fase de engorda, tendo sido abatidos com $41,82 \pm 0,51$ kg de peso vivo. Os animais foram alojados em gaiolas para estudo de metabolismo, instaladas em galpão coberto equipado com cortinas laterais, com comedouros e bebedouros individuais.

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos à colheita de fezes para exame de contagem de ovos de parasitas gastrointestinais por grama (OPG) e, em seguida foram desparasitados com oxibendazole e submetidos a uma fase de adaptação de 40 dias para promover a mudança gradual da dieta. Durante esse período os animais receberam a dieta experimental sem adição de cobre para permitir a depleção do elemento. Foram ainda realizadas biópsias do fígado em todos os animais utilizando o procedimento descrito por Miles, Wilkinson e McDowell (2001) para análise de cobre no tempo zero durante o período de adaptação. Posteriormente à cirurgia, os animais receberam doses injetáveis de antibiótico e anti-inflamatório Pencivet® PLUS PPU via intramuscular na dose de 1 mL/10 kg de peso vivo durante 3 dias, seguidos de um período de recuperação de 15 dias.

3.2.3 Tratamentos

Os cordeiros foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos de tratamentos com 8 animais cada. Os tratamentos usados foram: controle, sem adição de Cu (CO) na dieta; adição na dieta de 10 ou 30 mg de Cu/kg de MS na forma de sulfato de Cu (CuSO_4); adição na dieta de 10 ou 30 mg de Cu/kg de MS na forma de cobre metionina (Cu-metionina).

Os animais receberam a ração total em duas porções iguais às 07:00 e 17:00 horas, e sua composição porcentual está presente na tabela 3.1. Esta foi elaborada para conter um teor de proteína bruta de 14% e 65% de nutrientes digestíveis totais (NDT). A composição bromatológica da ração final foi: - matéria seca 91%, proteína bruta 15,80% Extrato etéreo 6,9%, matéria mineral 5,40%, carboidratos fibroso 31,82 e carboidratos não fibroso 40%. O teor de cobre na ração basal foi de 9 mg/kg de MS.

Tabela 3.1 Composição centesimal da Ração

Ingrediente	Porcentagem (%)
Fubá de Milho	55,3
Casca Algodão	25,0
Farelo Soja	16,0
Óleo Soja	1,0
Calcário Calcítico	1,2
Vitaminas*	0,5
Minerais**	0,5
Total	100

* Composição de vitaminas por quilograma de produto: Vitamina A (400000 UI) e vitamina E (4000 UI).

** Composição dos minerais por quilograma de produto: Iodo 100 mg, Ferro 4000 mg, Cobalto 40 mg, Manganês 3000 mg, Selênio 40 mg, Zinco 4000 mg, Enxofre 40g e Cloreto de sódio 216 g.

3.2.4 Procedimento experimental

Diariamente foram colhidas e pesadas as sobras da alimentação para que semanalmente fosse ajustada a quantidade de alimento a fornecer, totalizando 3% do peso vivo para cada animal.

3.2.5 Abate e coleta de amostras

Ao final do experimento, os animais foram abatidos com peso vivo médio de $41,82 \pm 0,51$ kg no matadouro escola da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga (PCAPS) após um de jejum completo de 16 horas.

No momento do abate colheram-se amostras de fígado em triplicata que foram embalados em papel alumínio e congelados em nitrogênio líquido para análise de superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GP-x), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e cobre.

As carcaças foram mantidas em câmara frigorífica a 0°C até o estabelecimento do *rigor-mortis*. Após 24 horas de resfriamento, o lado esquerdo de cada carcaça foi dividido entre 12ª e 13ª costelas, amostras do músculo *longissimus* (2,5 cm de espessura) a partir da 13ª costela em direção cranial foram obtidas. Dessas amostras foram colhidos 5 gramas em triplicata e colocados em papel de alumínio, e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior avaliação de TBARS

e cobre. No mesmo momento foi retirado o lombo esquerdo completo de cada animal para congelamento à vácuo e posterior análise de vida de prateleira ou “display life” (DL).

3.2.3 Congelamento a vácuo

As amostras de um lombo inteiro de cada animal foram embalados à vácuo em sacos plásticos de filme de alta barreira ao oxigênio (200 milímetros x 310 milímetros, código B530FZ, Cryovac, Brasil) e congeladas ($1,0 \pm 2,0$ °C) por 12 meses. Após este período, foram retiradas 5g em triplicata e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análise de TBARS (TBARS 12 Meses).

3.2.4 Vida de prateleira ou “display life” (DL)

Após 12 meses de congelamento a vácuo, três amostras de bifes de 2,5 cm de espessura de cada lombo foram colocados individualmente sobre em bandejas de poliestireno absorvente e envolvido com um filme de cloreto de polivinilo (PVC), e colocados em balcão expositor refrigerado (modelo vertical, 125 LX, Auden, Brasil), a 4°C durante 3 ou 6 dias. Nestes dias específicos, a bandeja referente a cada animal foi removida do balcão expositor refrigerado e três sub-amostras (5 g cada) foram retiradas e congeladas em nitrogênio líquido para análise de TBARS (TBARS 3 dias e 6 dias após descongelamento).

3.2.5 Procedimento analítico

3.2.5.1 Oxidação lipídica

3.2.5.1.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A oxidação lipídica das amostras de fígado e músculo longissimus, foi mensurada através da metodologia proposta por Vyncke (1970, 1975) com modificações. Desta forma, cinco gramas das amostras foram homogeneizadas com 15 mL de solução de ácido tricloroacético (TCA) 7,5% (g/mL), contendo EDTA 0,1% (g/mL) e propilgalato 0,1% (g/mL), por 30 segundos a 25.000 rpm em homogeneizador (marca IKA, modelo Turrax T18) e filtradas com papel filtro Whatman n.1. O filtrado obtido foi incubado na proporção de 1:1 com ácido

tiobarbitúrico (TBA) 0,02 M em banho-maria em ebulição por 40 minutos. As absorbâncias dos ensaios foram medidas em comprimento de onda de 532 e 600 nm em espectrofotômetro (marca Beckman Coulter, modelo DU800). A absorbância da amostra foi considerada como a diferença entre a absorbância a 532 nm e a absorbância a 600 nm, que corrige possível turbidez da amostra. Os valores de TBARS foram calculados a partir de curva padrão com diferentes diluições de TEP (1,1,3,3 Tetraetoxipropano) entre 0,02 a 1,1 µg/mL, e expressos como mg de malondialdeído por Kg de amostra.

3.2.5.2 Atividade das enzimas antioxidantes

3.2.5.2.1 Extração das enzimas SOD e GP-x

Para extração das enzimas SOD e GP-x, as amostras de fígado foram homogeneizadas com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,4; na proporção 1:10 (g/mL), em homogeneizador (marca IKA, modelo turrax T25) por 60 segundos a 25000 rpm. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm (centrífuga marca Eppendorf modelo 5810R) por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados para determinação da atividade da SOD e GP-x.

3.2.5.2.2 Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pelo método enzimático através do kit RANSOD (Randox Laboratories, Reino Unido). Este método emprega a xantina e xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxido, os quais reagem com 2-(4-iodofenil)-3(4 nitrofenol)-5-cloreto de feniltetrazol (I.N.T) para formar um composto vermelho de formazan. A atividade do superóxido dismutase é medida através do grau de inibição desta reação. A atividade da SOD foi expressa em µmol por minuto por miligrama de proteína (µmol/min/mg de proteína).

3.2.5.2.3 Glutationa Peroxidase (GP-x)

A atividade da GP-x foi determinada pelo método de Panglia e Valentim (1967), através do kit RANSEL (Randox Laboratories, Reino Unido). Este método tem como base o decréscimo da concentração do NADPH a 340 nm. A atividade da GP-x foi expressa em nmol/min/mg prot.

3.2.5.2.4 Determinação de proteínas

O conteúdo de proteínas do sobrenadante das amostras de fígado foi determinado em espectrofotômetro (Beckman, modelo DU-800) pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina sérica bovina para construção da curva padrão.

3.2.6 Delineamento experimental

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com oito repetições por tratamento. Os dados de cobre no músculo e/ou fígado, TBARS no fígado, SOD e GP-x foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA), utilizando o procedimento GLM do programa SAS. Em caso de resultados significativos na ANOVA, foram analisados os contrastes abaixo, utilizando o teste Scheffé:

$$\hat{Y}_1 = m_1 - m_2 - m_3 - m_4 - m_5$$

$$\hat{Y}_2 = m_2 + m_3 - m_4 - m_5$$

$$\hat{Y}_3 = m_2 - m_3$$

$$\hat{Y}_4 = m_4 - m_5$$

Para o TBARS no tempo, foi utilizado o PROC MIXED do SAS. As médias foram comparadas por meio de contrastes e foi adotado um nível de 5% de significância.

- (i) Em caso de efeito principal de tratamentos significativo, foram avaliados os contrastes anteriormente mencionados, por meio de teste de Scheffé.
- (ii) Em caso de efeito dos dias de avaliação significativo, foi realizada uma análise de regressão, visando avaliar o comportamento da variável resposta em questão em função do tempo.
- (iii) Em caso de interação significativa, seriam realizadas análises de regressão visando avaliar o comportamento de cada tratamento em função do tempo.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Cobre no fígado e músculo *longissimus*

Ao final do período experimental verificou-se uma maior concentração do cobre no fígado dos animais suplementados quando comparados ao grupo controle ($P < 0,05$) (tabela 3.2). O grupo que recebeu 30mg/kg de MS de Cu-metionina apresentou maior concentração de Cu no fígado ($P < 0,05$), comparado ao grupo de animais que recebeu 10 mg/kg de MS da mesma fonte (tabela 3.2). Isto ocorreu porque este órgão ser o principal centro de metabolismo e de reserva do elemento (McDOWELL, 2003). Em relação ao músculo *longissimus*, não foi observada diferença significativa na concentração de cobre. Cheng et al. (2011), Correa et al. (2012), também observaram uma aumento do cobre no fígado em função da suplementação com o Cu em ovinos e bovinos respectivamente. No trabalho de Cheng et al. (2011) também não foi observado efeito da suplementação com o elemento sobre o nível de cobre no músculo. Em estudos para determinar os efeitos de Cu e vitamina E sobre a oxidação lipídica em suínos, a concentração de cobre no músculo *longissimus* não foi afetada pelos tratamentos (REY; LOPEZ-BOTE, 2001; REY; LOPEZ-BOTE; BUCKLEY, 2004).

Tabela 3.2 Concentrações médias de cobre (base seca) em mg/kg de fígado e músculo *longissimus* de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de cobre.

Variáveis Cu (mg/kg)	Tratamentos (mg de Cu /kg de MS)					EPM	Contrastes ortogonais			
	Co 0	CuSO ₄ 10	CuSO ₄ 30	Cu- metionina 10	Cu- metionina 30		A	B	C	D
Fígado biópsia	39,90	47,85	48,83	29,51	60,77	13,34	0,65	0,81	0,96	0,11
Fígado abate	168,01	247,86	284,95	263,02	341,29	23,33	<0,01	0,13	0,27	0,02
<i>longissimus</i>	1,77	1,95	2,08	1,83	2,00	0,11	0,11	0,39	0,41	0,26

Co = Dieta controle (sem cobre suplementar)

EPM = erro padrão da média

A = controle comparado aos demais; B = tratamento com Cu na forma de CuSO₄ comparado ao de Cu-metionina; C = 10 mg/kg de MS de CuSO₄ comparado com 30 mg/kg de MS de CuSO₄; D = 10 mg/kg de MS de Cu-metionina comparado com 30 mg/kg de MS de Cu-metionina.

3.3.2 Enzimas antioxidantes

3.3.2.1 Superóxio Dismutase (SOD)

A suplementação com cobre, independentemente da fonte e nível proporcionou maior atividade da SOD no fígado dos cordeiros ($P < 0,05$), quando comparado ao grupo controle. Os animais suplementados com Cu-metionina apresentaram maior atividade da SOD em relação aos suplementados com CuSO_4 ($P < 0,05$). Entretanto, não houve efeito significativo da suplementação com cobre entre os níveis dentro de cada fonte ($P > 0,05$) (tabela 3.3).

O aumento significativo da atividade da SOD no fígado ($P < 0,05$) acompanhou os valores obtidos na concentração de Cu neste órgão. Este resultado sustenta que a SOD é uma importante enzima funcionalmente associada com o Cu em diferentes tecidos, portanto, a suplementação com esse mineral pode aumentar sua atividade, (JONES; SUTTLE, 1981). Um aumento da atividade da SOD no fígado ou sangue em função da suplementação com cobre foi também reportado em experimentos com ovinos, suínos e bovinos (XIN et al., 1991; WARD; SPEARS, 1997; LAURIDSEN et al., 1999; LAURIDSEN; HOJSGAARD; SORENSEN, 1999; SHARMA et al., 2005; SENTHILKUMAR et al., 2009; CORREA, 2010; CHENG et al., 2011). Entretanto, não se observou efeito significativo da atividade desta enzima no fígado de suínos (LAURIDSEN; HOJSGAARD; SORENSEN, 1999), e em eritrócitos de cordeiros (DEZFOULIAN et al., 2012).

3.3.2.2 Glutathione Peroxidase (GP-x)

Os valores referentes à atividade da GP-x acompanharam os valores da SOD. A suplementação com cobre, independentemente da fonte proporcionou maior atividade da GP-x no fígado dos cordeiros ($P < 0,05$), quando comparado ao grupo controle. Os animais suplementados com Cu-metionina apresentaram maior atividade da GP-x em relação aos suplementados com CuSO_4 ($P < 0,05$). Entretanto, não houve efeito significativo da suplementação com cobre entre os níveis dentro de cada fonte ($P > 0,05$) (tabela 3.3).

Alguns autores relataram uma correlação entre atividade de GP-x e concentração de Cu. De acordo com Uriu-Adams e Keen (2005), a deficiência de Cu pode diminuir a atividade de determinadas enzimas do sistema de defesa de

antioxidantes não dependentes de Cu incluindo a catalase e a selênio glutathione peroxidase (Se-GP-x). Foi também reportado que a atividade da GP-x diminuiu no fígado e plasma de suínos, ratos e humanos com deficiência de Cu (BALEVSKA; RUSSANOV; KASSABOVA, 1981; DOVE; EWAN, 1991; PROHASKA; SUNDE; ZINN, 1992).

Outra possível explicação para o aumento da GP-x no presente estudo, seria o aumento de Cu no fígado, que pode aumentar a atividade da enzima SOD e, conseqüentemente, aumentar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), aumentando dessa forma a necessidade de síntese de GP-x, fundamental para degradação do H_2O_2 , reduzindo assim, os danos oxidativos (URIU-ADAMS; KEEN, 2005; PROHASKA; SUNDE; ZINN, 1992; FREEDMAN; CIRIOLO; PEISACH, 1989)

Tabela 3.3 Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), em $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína e glutathione peroxidase (GP-x), em $\text{nmol}/\text{minuto}/\text{mg}$ de proteína, no fígado de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.

Variáveis	Tratamentos					EPM	Contrastes ortogonais			
	Co 0	CuSO 4 10	CuSO ₄ 30	Cu- metion. 10	Cu- metion. 30		A	B	C	D
SOD ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ prot)	22,41	30,42	31,36	37,86	38,31	1,27	<0,01	<0,01	0,61	0,80
GP-x ($\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ prot)	247,27	318,55	300,60	410,79	348,71	0,006	<0,01	<0,01	0,61	0,07

Co = Dieta controle (sem suplementação de cobre); EPM = erro padrão da média

A = controle comparado aos demais; B = tratamento com Cu na forma de CuSO_4 comparado ao de Cu-metionina; C = 10 mg/kg de MS de CuSO_4 comparado com 30 mg/kg de MS de CuSO_4 ; D = 10 mg/kg de MS de Cu-metionina comparado com 30 mg/kg de MS de Cu-metionina.

3.3.3 Peroxidação lipídica

3.3.3.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O teste TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) é uma das análises mais populares e comumente usadas para detectar a oxidação lipídica em carnes, visto que os produtos primários de oxidação lipídica constituem-se principalmente de hidroperóxidos, os quais são rapidamente decompostos em várias substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico, particularmente carbonilas, sendo o malondialdeído o elemento mais importante (ADDIS, 1986; FERNANDEZ; PEREZ-ALVAREZ; FERNANDEZ-LOPEZ, 1997). Adicionalmente, as substâncias reativas ao

ácido tiobarbitúrico são normalmente utilizadas como um marcador para o desenvolvimento de sabores de ranço na carne (GREENE, CUMUZE, 1982; LANARI, SCHAEFER, SCHELLER, 1995; JENSEN, LAURIDSEN, BERTELSEN, 1998; CAMPO et al., 2006; KASAPIDOU et al., 2012).

Os valores de TBARS no fígado e no músculo *longissimus* estão representados na tabela 3.4. Não houve efeito significativo ($P>0,05$) para os valores de TBARS no fígado. Segundo Luza e Speisky (1996), o Cu é considerado um elemento pró-oxidante, mas como no fígado ele não está presente na forma iônica livre, mas sim ligado a proteínas, estas, podem inativar a sua ação pró-oxidante.

Por outro lado, de acordo com Dillard e Tappel (1984), a peroxidação lipídica no fígado induzida por danos por cobre é manifestada pelo aumento na produção de TBARS, o que não foi observado no presente experimento, uma vez que não houve diferença significativa entre os cordeiros tratados e o grupo controle, embora tenha havido um aumento da concentração de Cu no fígado (tabela 3.2) nos animais suplementados. Assim, pode-se dizer que as doses do elemento usadas não causaram efeito tóxico.

Os níveis de TBARS no fígado também não tiveram diferença significativa entre tratamentos em novilhos Nelore, em estudo para determinar o efeito de dois níveis e duas fontes de Cu sobre o metabolismo e oxidação de lipídios (CORREA, 2010). Entretanto, em estudo para determinar os efeitos de diferentes fontes e níveis de cobre (Cu) sobre a atividade da SOD no plasma, peroxidação lipídica e, “status” de Cu em cordeiros, observou-se uma redução da concentração plasmática e hepática de malondialdeído (MDA) que é uma das principais substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico medidas no TBARS (CHENG et al., 2011).

Tabela 3.4 Médias de TBARS, em mg/kg de fígado e do músculo *longissimus* de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu.

TBARS (mg/kg)	Tratamentos (mg de Cu /kg de MS)					EPM	Contrastes ortogonais			
	Co 0	CuSO ₄ 10	CuSO ₄ 30	Cu- metionina 10	Cu- metionina 30		A	B	C	D
Fígado	0,899	0,988	1,020	0,515	0,974	0,046	0,18	0,14	0,63	0,22
<i>longissi mus</i>	0,164	0,146	0,172	0,079	0,105	0,026	0,188	0,018	0,508	0,504
Desossa	Tempo (dias)					Efeito tempo				
Dispal Life	Abate		12 Meses		3 dias descongelada	6 dias descongelada				
	0,133 ± 0,160 ^C		0,152 ± 0,158 ^C		2,578 ± 0,158 ^B	3,987 ± 0,158 ^A	Q<0,001			

Co = Dieta controle (sem cobre suplementar)

EPM = erro padrão da média

A = controle comparado aos demais; B = tratamento com Cu na forma de CuSO₄ comparado ao de Cu-metionina; C = 10 mg/kg de MS de CuSO₄ comparado com 30 mg/kg de MS de CuSO₄; D = 10 mg/kg de MS de Cu-metionina comparado com 30 mg/kg de MS de Cu-metionina.

Médias seguidas da mesma letra não tem diferença significativa (P>0,05); médias seguidas de letras diferentes tem diferenças significativas (P<0,05)

Segundo McDowell (2003), o Cu tem efeito antioxidante *in vivo*, mas também pode ser pró-oxidante *in vitro* e acúmulo nos tecidos pode permitir um estresse oxidativo. Isto não foi verificado no presente experimento, pois, não houve efeito significativo da suplementação nos valores de TBARS no fígado. De acordo com Lauridsen et al. (1999), como logo após o abate os animais estão em homeostase, o processo de oxidação lipídica pode não ser rigorosamente controlado, devido à debilidade do sistema de defesa antioxidante. Este fato pode explicar ausência de diferenças significativa entre os tratamentos nos valores de TBARS no fígado, embora tenha se verificado um aumento das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutatona peroxidase neste órgão.

Houve efeito significativo dos tratamentos (P<0,10) no TBARS no músculo *longissimus* coletado no momento da desossa (tabela 3.4) sendo que, os animais suplementados tiveram valores menores de TBARS quando comparados com o grupo controle. Na análise de contrastes, verificou-se um aumento significativo (P<0,05) dos valores de TBARS no músculo *longissimus* dos cordeiros que

receberam sulfato de cobre em relação aos grupos que receberam Cu-metionina. A redução dos níveis de TBARS nos animais suplementados pode ter ocorrido devido o aumento das enzimas antioxidantes SOD e GP-x no fígado (tabela 3.3)

Cheng et al. (2011); Cummins, Solaiman e Bergen (2008) não encontraram efeito do cobre sobre a estabilidade oxidativa no músculo *longissimus* de cordeiros e cabritos respectivamente, colhidos no momento da desossa. Adicionalmente, em experimento no qual foram avaliados os efeito de Cu e da vitamina E sobre a composição e oxidação do músculo *longissimus* em suínos, foi observado que a suplementação com Cu não afetou a susceptibilidade à oxidação lipídica enquanto que a vitamina E reduziu esta susceptibilidade (LAURIDSEN et al., 1999; LAURIDSEN; HOJSGAARD; SORENSEN, 1999; REY e LOPEZ-BOTE, 2001).

Cava et al. (2000), encontraram menores valores de TBARS para os grupos com suplementação de Cu e α -tocoferol, quando comparados com o controle em estudo que objetivou determinar o efeito de α -tocoferol e CuSO₄ na susceptibilidade à oxidação da carne em suínos, indicando que possivelmente a combinação de Cu com vitamina E pode dar melhor efeito na estabilidade oxidativa das carnes.

A semelhança do presente estudo foi observada uma redução dos valores do TBARS em função da suplementação com cobre em estudo sobre efeitos de diferentes fontes e níveis de cobre no desempenho, “status” de Cu, fermentação ruminal, metabolismo e oxidação de lipídios em bovinos nelore (CORREA, 2010).

Os valores de TBARS do músculo *longissimus* logo após o congelamento à vácuo por 12 meses não diferiram significativamente daqueles encontrados no momento no momento da desossa ($P>0,05$) (tabela 3.4), indicando que a carne ovina pode ser conservada congelada à vácuo por pelo menos 12 meses. Possivelmente, a ausência de oxigênio nestas amostras pode ter contribuído para a inexistência de efeito significativo nestes valores de TBARS. Assim pode-se deduzir que houve efeito do Cu na manutenção da estabilidade oxidativa lipídica da carne neste período.

O resultado da estabilidade da carne congelada à vácuo no presente experimento, está de acordo com aquele encontrado em trabalho visando avaliar a estabilidade física e química e microbiológica de carne embalada a vácuo estocada sob refrigeração e congelamento onde, foram encontrados valores de no máximo de

0,3 mg/kg de músculo *longissimus* de cordeiros congelado a vácuo, que também são considerados aceitáveis (FERNANDES, 2011).

Um aspecto importante a realçar é a relação dos níveis de TBARS com o sabor de ranço. Valores de TBARS inferiores a 0,56 mg/kg de carne obtidos com base na metodologia de Vyncke (1975) foram considerados aceitáveis pois, não seriam suficientes para percepção de um sabor de ranço (KASAPIDOU et al., 2012). Assim, pode-se afirmar que a carne colhida no momento do abate e 12 meses após congelamento no presente trabalho não tinha sabor a ranço porque os valores de TBARS foram inferiores a aqueles referidos por Kasapidou et al. (2012). Igualmente, a diferença observada nos valores de TBARS entre os cordeiros suplementados com CuSO_4 e Cu-metionina (tabela 3.4) não seriam suficientes para a percepção do sabor de ranço.

Fig. 1 Valores de TBARS (mg de malondialdeído/kg) do músculo *longissimus* de ovinos Merino x Texel recebendo dieta controle ou suplementados com diferentes fontes e níveis de Cu expostos em balcão expositor refrigerado durante 6 dias após descongelamento.

Em relação à estabilidade oxidativa lipídica no músculo *longissimus* exposto ao balcão expositor refrigerado após 12 meses de congelamento, não foi observado efeito significativo dos tratamentos nos valores de TBARS ($P > 0,05$) sobre a vida de

prateleira ou "display life" (DL), entretanto observou-se um crescimento linear desses valores durante o período de avaliação desse parâmetro. Os valores de TBARS no DL e a regressão linear do TBARS no músculo *longissimus* exposto ao DL após 12 meses de congelamento à vácuo estão apresentados na tabela 3.4 e figura 1.

A teoria de Lauridsen et al., (1999) anteriormente referenciada e a presença de oxigênio na embalagem de PVC podem sustentar o aumento linear dos valores de TBARS ($P < 0,05$) observados ao longo do tempo nas amostras dispostas no Display Life no balcão expositor refrigerado (4°C) independentemente dos tratamentos.

3.4 CONCLUSÕES

A suplementação com cobre na dieta de cordeiros Merino x Texel aumentou a concentração de cobre no fígado, mas não teve influencia na concentração do elemento no músculo *longissimus*. O Cu contribuiu significativamente para o aumento das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GP-x) no fígado. A suplementação com cobre melhorou a estabilidade oxidativa no músculo *longissimus* na desossa e 12 meses após congelamento à vácuo, medida através do nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Mas não se verificou efeito pro-oxidante no fígado indicando que dietas podem ser suplementadas com 10 ou 30 mg/kg de MS de sulfato de cobre ou Cu-metionina sem quaisquer efeitos prejudiciais sobre os níveis de antioxidante no fígado e estabilidade oxidativa lipídica do músculo *longissimus* em cordeiros Merino x Texel.

3.5 RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados desta pesquisa, recomendam-se futuros estudos sobre a estabilidade oxidativa em carnes de ovinos combinando a suplementação com cobre e Vitamine E.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao convênio o CNPq - MCT Moçambique e Universidade Eduardo Mondlane por possibilitarem a realização de estudos numa Instituição de Ensino Superior (IES) brasileira o que permitiu a produção do presente artigo científico.

REFERÊNCIAS

ADDIS, P. B. Occurrence of lipid oxidation-products in foods. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 24, n. 10-11, p. 1021-1030, Oct.-Nov. 1986. Disponível em: < ISI>://WOS:A1986F722600004>. Acesso em: 01 dez. 2011.

BALEVSKA, P. S.; RUSSANOV, E. M.; KASSABOVA, T. A. Studies on lipid-peroxidation in rat-liver by copper deficiency. **International Journal of Biochemistry**, Kidlington, v. 13, n. 4, p. 489-493, 1981. Disponível em: < ISI>://WOS:A1981LK85100012>. Acesso em: 12 ago. 2011.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantizations of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Philadelphia, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAVA, R. et al. Effect of free-range rearing and α -tocoferol and copper supplementation on fatty acid profiles and susceptibility to lipid oxidation of fresh meat from Iberian pigs. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 68, p. 51-59. 2000.

CHENG, J. et al. Effects of Different Copper Sources and Levels on Plasma Superoxide Dismutase, Lipid Peroxidation, and Copper Status of Lambs. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 144, n. 1-3, p. 570-579, Dec. 2011. Disponível em: < ISI>://WOS:000298192900056>. Acesso em: 12 ago. 2011.

CORREA, L. B. **Efeitos de diferentes fontes e níveis de cobre no desempenho, "status" de Cu, fermentação ruminal, metabolismo e oxidação de lipídios em bovinos**. 2010. 124 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

CORREA, L. B. et al. Effect of supplementation of two sources and two levels of copper on lipid metabolism in Nellore beef cattle. **Meat Science**, Amstredam, v. 91, n. 4, p. 466-471, Aug. 2012. Disponível em: < ISI>://WOS:000304296300013>. Acesso em: 12 ago. 2011.

CUMMINS, K. A.; SOLAIMAN, S. G.; BERGEN, W. G. The effect of dietary copper supplementation on fatty acid profile and oxidative stability of adipose depots in Boer x Spanish goats. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 86, n. 2, p. 390-396, Feb. 2008. Disponível em: < ISI>://WOS:000253443800018>. Acesso em: 12 ago. 2011.

CURI, R. et al., (Eds.). **Entendendo a gordura os ácidos graxos**. 2. ed. Barueri: Manole, 2002.

DEZFOULIAN, A. H. et al. Influence of different levels and sources of copper supplementation on performance, some blood parameters, nutrient digestibility and mineral balance in lambs. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 147, n. 1-3, p. 9-19, Aug. 2012. Disponível em: < ISI>://WOS:000306161900002>. Acesso em: 12 ago. 2011.

DILLARD, C. J.; TAPPEL, A. L. Lipid-peroxidation and copper toxicity in rats. **Drug and Chemical Toxicology**, New York, v. 7, n. 5, p. 477-487, 1984 1984. Disponível em: < ISI>://WOS:A1984TV89700005>. Acesso em: 13 ago. 2011.

DOVE, C. R.; EWAN, R. C. Effect of vitamin-e and copper on the vitamin-e status and performance of growing pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 69, n. 6, p. 2516-2523, Jun 1991. Disponível em: <ISI>://WOS:A1991FW98200029>. Acesso em: 13 ago. 2011.

FERNANDES, R. P. P. **Estabilidade da carne de cordeiros em diferentes condições de congelamento**. 2011. 170 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

FERNANDEZ, J.; PEREZALVAREZ, J. A.; FERNANDEZLOPEZ, J. A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 345-353, Jul. 1997. ISSN 0308-8146. Disponível em: <ISI>://WOS:A1997WW48200004>. Acesso em: 13 ago. 2011.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas bilológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 11, p. 3-14. 1998.

FREEDMAN, J. H.; CIRIOLO, M. R.; PEISACH, J. The role of glutathione in copper-metabolism and toxicity. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 264, n. 10, p. 5598-5605, Apr. 1989. Disponível em: <ISI>://WOS:A1989T999200046>. Acesso em: 12 ago. 2011.

JENSEN, C.; LAURIDSEN, C.; BERTELSEN, G. Dietary vitamin E: Quality and storage a stability of pork and poultry. **Trends in Food Science and Technology**, Kidlington, v. 9, n. 2, p. 62-72, Feb. 1998. Disponível em: <ISI>://WOS:000073353400003>. Acesso em: 12 ago. 2011.

JONES, D. G.; SUTTLE, N. F. Some effects of copper deficiency on leucocytes function in sheep and cattle. **Research in Veterinary Science**, London, v. 31, p. 151-156. 1981.

KASAPIDOU, E. et al. 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**, Amsterdam, v. 90, p. 908-916, 2012. doi: 10.1016/j.meatsci.2011.11.031.

LAURIDSEN, C. et al. Antioxidative and oxidative status in muscles of pigs fed rapeseed oil, vitamin E, and copper. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 77, n. 1, p. 105-115, Jan. 1999a. Disponível em: <ISI>://WOS:000078553000013>. Acesso em: 12 ago. 2011.

LAURIDSEN, C.; HOJSGAARD, S.; SORENSEN, M. T. Influence of dietary rapeseed oil, vitamin E, and copper on the performance and the antioxidative and oxidative status of pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 77, n. 4, p. 906-916, Apr. 1999b. Disponível em: <ISI>://WOS:000084444800015>. Acesso em: 12 ago. 2011.

LUZA, S. C.; SPEISKY, H. C. Liver copper storage and transport during development: Implications for cytotoxicity. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 63, n. 5, p. S812-S820, May. 1996. Disponível em: <ISI>://WOS:A1996UG91900024>. Acesso em: 12 ago. 2011.

McCORD, J. M.; FRIDOVIC. I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969. Disponível em: <ISI>://WOS:A1969E736300001>. Acesso em: 12 ago. 2011.

McDOWELL, L. **Minerals in animal and human nutrition**. Amsterdam: Elsevier, 2003. p. 235-270.

MILES, P. H.; WILKINSON, N. S.; McDOWELL, L. R. **Analysis of minerals for animal nutrition research**. Gainesville: Department of Animal Sciences – University of Florida, 2001.

PANGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Philadelphia, v. 70, p. 158-169, 1967.

PROHASKA, J. R.; SUNDE, R. A.; ZINN, K. R. Livers from copper-deficient rats have lower glutathione-peroxidase activity and messenger-rna levels but normal liver selenium levels. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 3, n. 8, p. 429-436, Aug. 1992. Disponível em: <ISI>://WOS:A1992JH76400008>. Acesso em: 29 nov. 2011.

REY, A. I.; LOPEZ-BOTE, C. J. Effect of dietary copper and vitamin E supplementation, and extensive feeding with acorn and grass on longissimus muscle composition and susceptibility to oxidation in Iberian pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 85, n. 9-10, p. 281-292, Oct. 2001. Disponível em: <ISI>://WOS:000172886100002>. Acesso em: 29 nov. 2011.

REY, A. I.; LOPEZ-BOTE, C. J.; BUCKLEY, J. D. Effect of feed on cholesterol concentration and oxidation products development of longissimus dorsi muscle from Iberian pigs. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, Carlow, v. 43, n. 1, p. 69-83, 2004. Disponível em: <ISI>://WOS:000225996700006>. Acesso em: 29 nov. 2011.

SENTHILKUMAR, P. et al. Effect of different level and source of copper supplementation on immune response and copper dependent enzyme activity in lambs. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 41, n. 4, p. 645-653, Apr. 2009. Disponível em: <ISI>://WOS:000264334400031>. Acesso em: 17 nov. 2011.

SHARMA, M. C. et al. Copper status and enzyme, hormone, vitamin and immune function in heifers. **Research in Veterinary Science**, London, v. 79, n. 2, p. 113-123, Oct. 2005. Disponível em: <ISI>://WOS:000230549600005>. Acesso em: 17 nov. 2011.

TARLADGIS, B. G. et al. A distillation method for determining the quantitative determination of malondialdehyde in rancid foods. **JAACS**, Heidelberg, v. 37, p. 44-48, 1960. doi:10.1007/BF02630824.

URIU-ADAMS, J. Y.; KEEN, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. **Molecular Aspects of Medicine**, Kidlington, v. 26, p. 268-298. 2005. doi:10.1016/j.mam.2005.07.015

VYNCKE, W. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette seifen anstrichmittel**, Weinheim, v. 72, p. 1084-1087, 1970. doi:10.1002/lipi.19700721218.

_____. Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber Scombrus* L.). **Fette seifen anstrichmittel**, Weinheim, v. 77, n. 6, p. 239-240, 1975. doi:10.1002/lipi.19750770610.

WARD, J. D.; SPEARS, J. W. Long-term effects of consumption of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on copper status, performance, and carcass characteristics of cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 75, n. 11, p. 3057-3065, Nov. 1997. Disponível em: <ISI>://WOS:A1997YD63400031>. Acesso em: 12 ago. 2011.

XIN, Z. et al. Effects of copper status on neutrophil function, superoxide-dismutase, and copper distribution in steers. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 74, n. 9, p. 3078-3085, Sep. 1991. Disponível em: <ISI>://WOS:A1991GC66700033>. Acesso em: 12 ago. 2011.