Universidade de São Paulo
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Rodrigo Lemos Meirelles

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE
ANTIOXIDANTES NATURAIS EM TECIDOS
BOVINOS DA RAÇA BRANGUS**

Pirassununga

2009

Rodrigo Lemos Meirelles

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE
ANTIOXIDANTES NATURAIS EM TECIDOS
BOVINOS DA RAÇA BRANGUS**

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 Antonio
Zanetti

Pirassununga

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

M514e	<p>Meirelles, Rodrigo Lemos</p> <p>Efeitos da suplementação de antioxidantes naturais em tecidos bovinos da raça Brangus / Rodrigo Lemos Meirelles. -- Pirassununga, 2009.</p> <p>75 f.</p> <p>Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Zootecnia.</p> <p>Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Marcus Antonio Zanetti.</p> <p>1. Antioxidantes 2. Minerais 3. TBARS. I. Título.</p>
-------	--

A pessoa que mais amo,

Flávia

Dedico

Agradecimentos

A Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, por ter sido uma segunda casa

Ao professor Zanetti, pelo apoio, conselhos e compreensão

A todos os funcionários da Fzea que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho

A todos os amigos que auxiliaram, amparam nos momentos difíceis, comemoraram nos felizes, enfim, todos que são AMIGOS

A meu grande companheiro, meu cachorro Saikã, sem dúvida, o melhor amigo do homem

Agradeço a todos, que de uma forma ou outra, ajudaram a moldar meu caráter, opiniões e tudo que, podem ter certeza meus amigos, soube aproveitar muito bem

A razão de minha existência, Flávia, minha esposa

Não cito mais nomes, pois creio que esqueceria vários, então o que deixo a vocês é um grande quebra-costelas

Têm coisas que tem seu valor

Avaliado em quilates, em cifras e fins

E outras não têm o apreço

Nem pagam o preço que valem pra mim

Tenho amigos que o tempo

Por ser indelével, jamais separou

E ao mesmo tempo revejo

As marcas de ausência que ele me deixou...

CANSANDO O CAVALO

Por estas voltas de campo andei cansando o cavalo

Tocando o gado por diante mandando a vida pra frente

Sabendo que o sul pra gente é bem maior do que tantos

Tamanho os olhos dos outros querendo o verde dos campos

Andei rodando esporas, sovando tantas badanas

Trazendo junto dos tentos minha querência em rodilha

Olhando a alma dos campos renascer junto as flechilhas

Mesmo que o verde mais lindo fique pra lá da coxilha

Por estas léguas manda cavalo

Mas vai tranqueando por diante

Que o mango vem de regalo

Mas ando sempre no tranco que minha prosa agüenta

Pois meu gateado sustenta as coisas quanto ele quer

Se tem o mundo por conta, coiceia a chirca e se some

Trocando a lida de ponta perdendo a doma dos homens

Pra quem olhasse depois, duas estampas pacholas

Levando o verde nos olhos e a querência a bater cola

Nem se daria por conta, que o sustento vem da gente

E só bebe a melhor água, quem descobrir a vertente

Só quando a lida me deixa descubro o mundo que eu vejo

Um pouco além da coxilha tão as coisas que eu desejo

Pra dizer bem a verdade, são bem iguais as daqui

Mas sempre canso o cavalo, só pra dizer que eu vi.

Gujo Teixeira

Por mais longe que o homem vá, jamais fugirá de si.

Jaime Caetano Braun

Estou contente com Deus

Pedro Abello Lemos

RESUMO

MEIRELLES, R.L. **Efeitos da suplementação de antioxidantes naturais em tecidos bovinos da raça Brangus**. 2009. 75p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

Vinte e oito bovinos machos inteiros da raça Brangus foram utilizados para se determinar os efeitos da estabilidade oxidativa no músculo e no fígado, comparando a utilização de fonte orgânica e inorgânica de selênio e extrato de alecrim, com base na análise da concentração de selênio no fígado e no soro, na análise da atividade da enzima glutathione peroxidase, da enzima superóxido dismutase e da catalase no fígado, e na análise de TBARS (substâncias reativas ao ácido 2-tio-barbitúrico) no músculo. Os tratamentos foram: 1) Controle - sem suplementação de selênio ou de extrato de alecrim; 2) Se IN - 2 mg de selênio/kg de matéria seca na forma de selenito de sódio; 3) Se - 2 mg de selênio/kg de matéria seca, na forma de selênio-metionina; e 4) Alecrim - 1400 mg de extrato de alecrim/kg de matéria seca. O ganho de peso foi maior com a suplementação de selênio inorgânico ($P<0,05$) em relação ao tratamento controle, mas não apresentou diferença em relação aos outros tratamentos. A eficiência alimentar foi maior em todos os tratamentos quando comparados ao controle ($P<0,05$). A ingestão de matéria seca não foi alterada pelos tratamentos ($P>0,05$). A concentração de selênio no fígado foi maior no tratamento selênio inorgânico ($P<0,05$) do que no tratamento controle, entretanto os tratamentos alecrim e selênio orgânico não apresentaram diferença entre si ($P>0,05$). A concentração de selênio no soro foi maior nos tratamentos selênio orgânico e inorgânico em relação ao controle por todo o período ($P<0,05$). O perfil de ácidos graxos na carne não foi alterado pelos tratamentos ($P>0,05$). A atividade da glutathione peroxidase foi maior no tratamento selênio inorgânico em relação ao controle ($P<0,05$). A atividade da superóxido dismutase foi menor no tratamento alecrim ($P<0,05$). Tanto a atividade da enzima catalase quanto a análise de TBARS não apresentaram diferença entre os tratamentos ($P>0,05$).

Palavras-chave: antioxidantes, minerais, TBARS

ABSTRACT

MEIRELLES, R.L. **Supplementation effects of natural antioxidants on Brangus bovine tissues**. 2009. 75p. Thesis (Ph.D.) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

Twenty eight Brangus males were used to determine the oxidative stability of muscle and liver in order to compare organic and inorganic selenium source and rosemary extract based on the analysis of selenium concentration in the liver and in the serum, on the analysis of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the liver and also based on TBARS analysis (substances related to 2-thiobarbituric acid) in the muscle. Treatments were: 1) Control – without selenium or rosemary extract; 2) Se IN – 2 mg selenium/kg dry matter, as sodium selenite; 3) Se – 2 mg selenium/kg dry matter, as selenium-methionine and 4) Rosemary – 1400 mg rosemary extract/kg dry matter. Weight gain was greater when inorganic selenium was used ($P<0.05$) in comparison with control, however there was no difference regarding the other treatments. Feed efficiency was higher than control for all treatments ($P<0.05$). Dry matter intake was not affected by treatments ($P<0.05$). Selenium concentration in the liver was greater for inorganic selenium ($P<0.05$) than for control, in spite of that rosemary and organic selenium did not differ between themselves ($P<0.05$). Selenium concentration in the serum was higher for organic and inorganic selenium treatments than for control during all the period ($P<0.05$). Fatty acid profile in the meat was not affected by the treatments ($P<0.05$). Glutathione peroxidase activity was greater for inorganic selenium treatment when compared to control ($P<0.05$). Superoxide dismutase activity was lower for the rosemary treatment ($P<0.05$). Neither catalase activity nor TBARS analysis differ among treatments ($P<0.05$).

Keywords: antioxidants, minerals, TBARS

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Rota Clássica da Oxidação.....	23
Figura 2. Bovinos Brangus empregados no experimento.....	37
Figura 3. Colheita de sangue.....	40
Figura 4. Bovinos Brangus no Matadouro-Escola.....	41
Figura 5. Serragem das Carcaças ao meio.....	41
Figura 6. Amostras de Fígado.....	42
Figura 7. Ganho de peso diário (GPD) e desvios padrões, kg por dia, de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante confinamento experimental.....	46
Figura 8. Ingestão de matéria seca (IMS) e desvios padrões, kg por dia, de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante confinamento experimental.....	47
Figura 9. Eficiência alimentar (EA) e desvios padrões, kg por dia, de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante confinamento experimental.....	47
Figura 10. Concentração de selênio e desvios padrões, em mg por kg de fígado (em base seca) de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante confinamento experimental.....	49
Figura 11. Concentração de selênio no soro, em mg por kg, de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante confinamento experimental.....	50
Figura 12. Extrato etéreo e desvios padrões, em % da matéria original, no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante confinamento experimental.....	51
Figura 13. Atividade da enzima glutationala peroxidase e desvios padrões, em mmol por minuto por mg de proteína do fígado, de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante confinamento experimental.....	55
Figura 14. Atividade da enzima superóxido dismutase e desvios padrões, em μ mol por minuto por mg de proteína do fígado, de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante confinamento experimental.....	55

Figura 15. Atividade da enzima catalase e desvios padrões, em μmol por minuto por mg de proteína do fígado, de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante confinamento experimental.....55

Figura 16. TBARS no dia 0 em miligramas de malonaldeído/Kg de músculo *Longissimus dorsi* de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante confinamento experimental.....57

Figura 17. TBARS no dia 14 em miligramas de malonaldeído/Kg de músculo *Longissimus dorsi* de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante confinamento experimental.....57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Composição percentual da dieta basal, em base seca.....	20
TABELA 2. Composição bromatológica da dieta basal, em base seca.....	20
TABELA 3. Perfil de ácidos graxos no músculo <i>Longissimus dorsi</i> de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante confinamento experimental.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AGV – ácidos graxos voláteis

BHA – butil hidroxianisol

BHT – butil hidroxitolueno

CAT – catalase

EROS – Espécies reativas de oxigênio

FDN – fibra em detergente neutro

GSH-PX – glutathione peroxidase

H⁺ – íon hidrogênio

HCO₃⁻ – bicarbonato

K⁺ – potássio

LD – músculo *Longissimus dorsi*

MOR – metabólitos oxigenados reativos

MS – matéria seca

NaCl – cloreto de sódio

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

PB – proteína bruta

S⁼ – enxofre

Se – selênio

Se IN – selênio inorgânico

SO₄ – sulfato

SOD – superóxido dismutase

TBARS – substâncias reativas ao ácido 2-tio-barbitúrico

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Estresse Oxidativo e Sistemas Antioxidantes.....	17
2.2. Mecanismos Antioxidantes.....	20
2.3. Peroxidação Lipídica.....	21
2.4. Antioxidantes.....	24
2.4.1. Selênio orgânico e Selênio inorgânico.....	25
2.4.2. Alecrim.....	32
3. HIPÓTESE.....	36
4. OBJETIVOS.....	36
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5.1. Local.....	37
5.2. Procedimento Experimental.....	38
5.3. Procedimento Laboratorial.....	42
5.4. Delineamento Experimental.....	44
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
6.1. Desempenho.....	46

6.2. Concentração de selênio no fígado e no soro.....	49
6.3. Extrato etéreo da carne.....	51
6.4. Perfil de ácidos graxos na carne.....	52
6.5. Enzimas antioxidantes.....	54
6.6. Estabilidade lipídica na carne.....	57
7. CONCLUSÕES.....	59
8. REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

Para um país como o Brasil, com grandes vantagens naturais e forte tradição exportadora de alimentos, o grande mercado interno e o crescente mercado externo representam uma extraordinária oportunidade. Por outro lado, a globalização dos mercados cada vez mais disputados, os consumidores aumentando suas exigências quanto à qualidade e com crescentes preocupações com a saúde e ecologia, as mudanças de estilo de vida e o baixo poder aquisitivo dos consumidores nacionais, representam ameaças para um setor um tanto desarticulado e desorganizado nas bases da produção, da indústria e do varejo, como é hoje a cadeia da carne bovina. Nunca é demais destacar que sem uma quantidade suficiente de consumidores satisfeitos não há negócio sustentável nem ganhos satisfatórios. E, sendo os consumidores a razão de qualquer empreendimento, toda e qualquer estratégia de produção pecuária, seja em nível de nutrição, manejo ou genética, deve ser direcionada pelas exigências básicas de mercado: qualidade, custo baixo e oferta permanente e ágil do produto final, sendo a carne.

O foco no consumidor ganha importância no processo de globalização da economia, puxado pelas empresas inseridas nos mercados competitivos com estratégias globais. As garantias de qualidade intrínseca aos produtos ou de serviços ou de segurança sanitária são exigidas cada vez mais pelo consumidor e buscadas pelos participantes das cadeias produtivas. Transformações vêm ocorrendo na coordenação das cadeias produtivas para garantir a qualidade do produto final, que depende de cada etapa deste processo. Em toda a cadeia estão acontecendo iniciativas que visam modernizar cada segmento do setor. A modernização da cadeia

da carne bovina vem se processando de maneira desigual, porém há sinais de uma tendência de transformação desta situação. No entanto, seus efeitos agregados ainda não são mensuráveis, visto que o processo de modernização vem se processando de maneira desarticulada em cada ponto da cadeia.

O uso de técnicas eficientes de manejo, como o pastejo rotacionado e confinamento na entressafra, tem se difundido entre os criadores, solidificando uma visão de que o pasto deve ser tratado como uma lavoura e não explorado de forma extrativista. Os cruzamentos industriais, principalmente da raça nelore com raças européias, têm sido usados como maneira de melhorar a qualidade genética do rebanho na busca de melhorias no ganho de peso, maior rendimento de carcaça e precocidade de abate. No segmento da comercialização, cresce a importância dos supermercados como canal de vendas, porém, como este setor se moderniza rapidamente, seguindo novas exigências e formando novos hábitos de consumo, as relações entre os frigoríficos e supermercados tendem a seguir o padrão da indústria de alimentos em geral, exigindo novas formas de apresentação, qualificação e garantia da carne ofertada. Existente entre segmentos da cadeia que se modernizaram e aqueles que continuam atrasados, pecuaristas, frigoríficos e governo começam a discutir formas de qualificar e certificar a carne bovina, o que poderia ser uma solução de incentivo dos produtores que investem em qualidade, premiando-os por um produto de melhor qualidade. A qualidade da carne é definida por suas propriedades físico-químicas e é traduzida em maciez, sabor, cor, odor e suculência. Estas propriedades são determinadas pelos fatores inerentes ao indivíduo (genética, idade, sexo), à fazenda de origem (manejo alimentar, manejo geral), transporte, manejo pré-abate, abate e métodos de processamento da carcaça, duração e temperatura de estocagem e a

forma de cozinhar. Para ter qualidade, uma carne deve atender aos aspectos: visual (influindo na decisão de compra pelo consumidor), organoléptico (satisfação em comer a carne), nutricional (oferecer o que o corpo humano precisa ou deseja) e de segurança (ter sido higiênica e sanitariamente obtida). A necessidade de se produzir de forma eficiente e competitiva exige desse setor o estabelecimento de um novo conceito, ou seja, produção de carne de qualidade e não mais boi gordo.

Devido à tendência atual pela procura cada vez maior de produtos naturais pelos consumidores, causada pela crescente preocupação com a saúde, e a escassez de estudos envolvendo compostos naturais e oxidação dos alimentos, torna-se necessário o estudo do uso de condimentos, ervas aromáticas e outros compostos tidos como antioxidantes naturais em substituição aos convencionais BHA e BHT amplamente utilizados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estresse Oxidativo e Sistemas Antioxidantes

Durante o metabolismo celular a redução do oxigênio na fosforilação oxidativa é parcial (1-3%) com conseqüente formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como O_2^- e H_2O_2 . Esses compostos têm a capacidade de provocar danos irreversíveis à célula. O estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio existente entre a formação e a transformação de EROS em produtos menos nocivos (CADENAS & DAVIS, 2000).

As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas em uma série de processos degenerativos, devido à característica de serem ou oxidarem moléculas. Radical livre é toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados. Na natureza, existem duas importantes substâncias que podem gerar radicais livres: o oxigênio, no seu estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico ($NO^\cdot$). Por absorção de energia, o oxigênio pode gerar diversas espécies reativas, dentre as quais está o H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) que atravessa facilmente as membranas celulares, e recebendo mais um elétron, origina o radical hidroxila ($HO^\cdot$). Esta ($HO^\cdot$) é uma das espécies radicalares mais reativas, pois precisa de apenas mais um elétron para se estabilizar, e a conseqüência disto é a oxidação dos fosfolipídeos de membranas celulares e intracelulares, do DNA e das proteínas (ROVER Jr. *et al.*, 2001).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção das espécies reativas de oxigênio no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a

ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas, podendo resultar em morte celular (GUTTERIDGE, 1993). Frente a um estresse oxidativo, em princípio ocorre uma adaptação por aumento de resposta antioxidante, um dano de tecidos e posteriormente uma morte celular por necrose ou apoptose.

Os mecanismos antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático é o primeiro a agir, ele é formado por várias enzimas destacando-se a SOD, CAT e a GSH-PX. A defesa não enzimática pode ser dividida em antioxidantes hidrofílicos como glutatona, vitamina C, indóis, catecóis e também os lipofílicos com bioflavonas, vitamina A e E (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

A peroxidação de lipídeos pode ser definida como sendo uma cascata de eventos bioquímicos, resultantes da ação de radicais livres sobre os lipídeos de membrana celulares, gerando principalmente radicais alcoxila e peroxila (CURI *et al.*, 2002). O processo é dividido em três fases: a iniciação, a de 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 combina 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. Na decomposição dos hidroperóxidos são gerados radicais peroxila e alcoxila, onde íons metálicos como o selênio 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 compostos formados nessa fase são voláteis e comprometem as características sensoriais dos alimentos. Os aldeídos são o principal grupo formado nessa fase, eles podem ainda ser oxidados dando origem a outros hidrocarbonetos, outros aldeídos e ácidos.

Os lipídeos em produtos cárneos oxidam-se facilmente, ocasionando o desenvolvimento de odor e sabor desagradáveis, comumente conhecidos como “warmed-over-flavor” (CURI *et al.*, 2002). A oxidação lipídica pode ser afetada pela dieta pela presença de antioxidantes ou de pró-oxidantes (BUCKLEY citado por REY *et al.*, 2004). 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 acompanhar a evolução da peroxidação, o número de TBARS tem sido utilizado como valor empírico, ele tem sido correlacionado com outros métodos para determinação de lipídeos. O malonaldeído é um produto secundário, formado durante a oxidação de ácidos graxos polinsaturados e reage com o TBARS formando um complexo com absorvância máxima a 530-532nm. O TBARS é considerado como adequado para a determinação da oxidação em produtos cárneos (KOWALE *et al.*, 1996).

Os lipídeos em produtos cárneos oxidam-se facilmente, ocasionando o desenvolvimento de odor e sabor desagradáveis. Os lipídeos são suscetíveis ao ataque de radicais livres e sua oxidação pode ser muito prejudicial devido a sua continuidade

como uma reação em cadeia. Os lipídeos contendo PUFA (ácidos graxos poliinsaturados) são particularmente propensos ao ataque de radicais livres (PAPAS, 1999) e à deterioração oxidativa, sendo utilizados na determinação da eficácia de antioxidantes naturais (WANASUNDARA e SHAHIDI, 1998). Na ausência de antioxidantes apropriados, os PUFA formam radicais livres e podem ter um efeito próoxidante significativo levando à depleção da vitamina E e aumento dos produtos de oxidação (MEYDANI, 1996).

A oxidação lipídica, sendo um fenômeno espontâneo e inevitável, com uma implicação direta no valor comercial seja dos compostos graxos, seja de todos os produtos que a partir deles são formulados (SILVA *et al.*, 1999), conduz a mudanças que ocorrem durante o processamento, distribuição e preparação final dos alimentos. A oxidação de lipídeos inicia também outras mudanças nos alimentos que afetam a qualidade nutricional, segurança, cor, sabor e textura (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992). Este aspecto é de grande importância, não somente sob o enfoque econômico, através de perdas devido à diminuição da vida-de-prateleira, mas também pela possibilidade dos radicais livres formados reagirem ou interagirem com outros constituintes dos alimentos, provocando uma queda na qualidade nutricional dos mesmos e podendo ser danosos a saúde humana (NAWAR, 1996).

2.2. Mecanismos Antioxidantes

O sistema de defesa antioxidante do organismo compreende uma gama variada de substâncias que atuam em diferentes níveis: o sistema primário constitui-se em uma primeira linha de defesa formada por substâncias que impedem a geração de espécies

reativas ou através da retirada das mesmas de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar. Nesse grupo encontram-se: a) enzimas antioxidantes; b) quelantes e proteínas como a transferrina e a ceruloplasmina que transportam, respectivamente, ferro e cobre, impedindo que esses metais sejam liberados e catalisem a formação de espécies oxidantes e c) substâncias não-enzimáticas como o ascorbato, albumina e carotenóides que seqüestram radicais superóxido e hidroxila, ou suprimem oxigênio singlete. O sistema de defesa secundário é formado por compostos que atuam bloqueando a etapa de propagação da cadeia radicalar (*chain breaking*), seqüestrando radicais intermediários (ex. peroxila ou alcoxila). Esses antioxidantes geralmente são compostos fenólicos ou aminas aromáticas, entre eles estão o α -tocoferol, flavonóides e vários antioxidantes sintéticos (ABDALA, 1993). Os produtos mais freqüentemente medidos são hidroperóxidos e dienos conjugados, para a oxidação primária, e substâncias voláteis (TBARS) para a secundária (MOURE *et al.*, 2001). Portanto, a atividade antioxidante pode e deve ser determinada por diferentes testes para avaliação do estágio da oxidação. A maioria dos métodos químicos se baseia na capacidade de seqüestrar radicais livres, mas também a capacidade de quelação é responsável pela atividade antioxidante em sistemas lipídicos (CHEN, 1999).

2.3. Peroxidação Lipídica

Os lípidos são suscetíveis ao ataque por radicais livres e a sua oxidação pode ser muito prejudicial devido a sua continuidade como uma reação em cadeia. Portanto, os lípidos contendo PUFA são particularmente propensos ao ataque de radicais livres (PAPAS, 1999) e à deterioração oxidativa, sendo utilizados na determinação da eficácia de antioxidantes naturais (WANASUNDARA e SHAHIDI, 1998). Na ausência de

antioxidantes apropriados, os PUFA formam radicais livres e podem ter um efeito próoxidante significativo levando à depleção da vitamina E e aumento dos produtos de oxidação (MEYDANI, 1996). Por conseguinte, é um requisito necessário ter uma ingestão aumentada de antioxidantes para acompanhar um consumo elevado de ácidos graxos poliinsaturados para obter as ações benéficas dos mesmos (WISEMAN, 1996). Os lípidos desempenham um papel importante na qualidade de certos produtos alimentares, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis (sabor, odor, cor, textura). Além destas, conferem valor nutritivo aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, de ácidos graxos essenciais e de vitaminas lipossolúveis.

Portanto, o desenvolvimento de rancidez em óleos comestíveis é um problema sério em alguns setores da indústria de alimentos devido ao acréscimo no uso de óleos poliinsaturados vegetais e de peixe, a interrupção do uso de antioxidantes sintéticos e a fortificação de alimentos a base de cereais contendo ferro (FRANKEL, 1996). A oxidação lipídica, sendo um fenômeno espontâneo e inevitável, com uma implicação direta no valor comercial seja dos compostos graxos, seja de todos os produtos que a partir deles são formulados (SILVA *et al.*, 1999), conduz à mudanças que ocorrem durante o processamento, distribuição e preparação final dos alimentos. A oxidação de lípidos inicia também outras mudanças nos alimentos que afetam sua qualidade nutricional, segurança, cor, flavor e textura (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992). Este aspecto é de grande importância, não somente sob o enfoque econômico, através de perdas devido à diminuição da vida-de-prateleira, mas também pela possibilidade dos radicais livres formados reagirem ou interagirem com outros constituintes dos alimentos provocando uma queda na qualidade nutricional dos mesmos (NAWAR, 1996). A

autoxidação de lípidos poliinsaturados de alimentos envolve uma reação em cadeia de radicais livres, que é freqüentemente iniciada pela exposição dos lípidos à luz, calor, radiação ionizante, íons metálicos ou catálise metalo-protéica. A enzima lipoxigenase pode também iniciar a oxidação. A rota clássica de autoxidação (Figura 1) inclui reações de iniciação (produção de radicais livres dos lípidos), propagação e terminação (produção de produtos não radicalares), Reações 1-4, (SHAHIDI *et al.*, 1992).

Figura 1 – Rota Clássica da Oxidação

Os radicais livres são moléculas que contêm um elétron não pareado, são espécies instáveis e reagem com diversos compostos. Os radicais livres de importância biológica inclui óxido nítrico, dióxigênio, superóxido e radicais hidropéroxido dos lípidos (THOMAS, 2000). Os radicais livres e outras espécies reativas do oxigênio (ROS) no organismo são derivados provenientes do processo metabólico normal ou de fontes externas (KARAKAYA *et al.*, 2001). Portanto, essas ROS possuem um papel importante nos danos tissulares em humanos. A reação de ROS com biomoléculas tais como lípidos de membranas, proteínas e ácido desoxiribonucleico (DNA), pode provocar mudanças irreversíveis nas suas estruturas (IULIANO *et al.*, 1997). Assim, a

peroxidação lipídica das membranas tem sido associada com muitas alterações de tecidos e doenças (CHIAPAUD *et al.*, 1952).

2.4. Antioxidantes

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).

O uso de antioxidantes sintéticos tem sido freqüente devido ao seu baixo custo, alta estabilidade e eficácia. Porém, durante as duas últimas décadas, tanto consumidores quanto a legislação têm levantado suspeitas a seu respeito, mesmo comprovando-se cientificamente sua segurança. Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se dirigido no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitiriam substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos. Os estudos estão centralizados nos compostos fenólicos de origem vegetal, pois eles agem como aceptores de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia provocada por estes, além de atuarem também nos processos oxidativos catalizados por metais, tanto *in vitro*, como *in vivo* (HO, 1992).

O interesse na pesquisa por novos antioxidantes naturais tem aumentado nos últimos anos, levando às indústrias de alimentos, de cosméticos e farmacêuticas a terem maior atenção em novas fontes de antioxidantes naturais. Os compostos naturais têm

sido isolados de diferentes partes de plantas tais como sementes, frutas, folhas e raízes, bem como muitos estudos têm sido conduzidos na determinação da sua ação antioxidante (MANCINI FILHO *et al.*, 1998).

O reino vegetal é rico em compostos fenólicos, os quais são encontrados em especiarias e folhas de plantas aromáticas de regiões quentes e secas (ECONOMOU *et al.*, 1991). Muitos autores relataram que os extratos de várias sementes oleaginosas possuem propriedade antioxidante, a qual, em alguns casos exercem melhor efeito antioxidante que o observado pelos antioxidantes sintéticos nas mesmas concentrações (AMAROWICZ *et al.*, 1993). Para WANASUNDARA *et al.*, (1997), muitos são os componentes naturalmente presentes nos alimentos que apresentam esta atividade, incluindo flavonóides, precursores de lignanos, ácidos fenólicos, terpenos, tocoferóis e fosfolipídeos.

LAGOURI e BOSKOU, (1996) trabalharam com a especiaria orégano (*Origanum vulgare* L.) para detectar a presença de antioxidantes e sua atividade. Já, com o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), FRANKEL *et al.*, (1996), estudaram a sua propriedade antioxidante e OFFORD *et al.*, (1997), determinaram sua atividade antioxidante em sistemas lipídicos e não lipídicos.

2.4.1.Selênio orgânico e Selênio inorgânico

Segundo McDOWELL (1992) o papel do selênio na nutrição animal foi descoberto quando se observou que a suplementação evitava necrose hepática em ratos. Após essa constatação, também foram relatadas prevenções de distrofia muscular quando bovinos e ovinos foram suplementados com selênio. Sua absorção em ruminantes se dá

principalmente no duodeno, enquanto que em suínos ocorre no íleo, ceco e cólon. Em ruminantes, os problemas com selênio são mais tipicamente expressos próximos ao parto, com maior incidência de mastite e retenção de placenta na fêmea, e doença do músculo branco nos recém-nascidos (TRINDER *et al.*, 1973; LUCCI *et al.*, 1984b; TOLEDO, 1984; ZANETTI *et al.*, 1984; LUCCI *et al.*, 1987).

Focos de deficiência de Se têm sido identificados em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil (MORAES *et al.*, 1999), tornando indispensável a suplementação aos animais. Entretanto, a fonte de Se a ser suplementada apresenta diferenças se esta for orgânica ou inorgânica. Essas diferenças estão relacionadas ao diferente metabolismo inicial das duas formas do elemento.

O Se é um elemento que tem uma margem muito estreita entre os níveis de exigência e toxidez. Teores na dieta menores que 0,1 mg/kg de MS são considerados deficientes para bovinos, e acima de 2 mg/kg de MS podem ser tóxicos (NRC 2000), sendo que recentemente o NRC (2005) aumentou esse nível para 5 mg/kg de MS. Contudo, em ruminantes, a atividade microbiana do rúmen influencia a forma com que o Se chega ao intestino delgado para absorção, diminuindo o risco de intoxicação (FISHER *et al.*, 1980; MAUS *et al.*, 1980). Além disso, o Se na forma orgânica existe como análogo de aminoácidos sulfurados, principalmente selênio-metionina e selenocisteína e quanto ao selênio inorgânico, a absorção em ruminantes é inferior a não-ruminantes, pois o selenito pode ser reduzido a compostos insolúveis no rúmen.

O selênio é um semi-metal que pode existir em vários estados de oxidação, o que lhe permite formar uma série de compostos (NRC, 1983). Nas plantas, o Se parece não exercer nenhuma função fisiológica (TERRY *et al.*, 2000), e é incorporado aleatoriamente no tecido vegetal em ambas as formas: orgânica e inorgânica. As

principais formas de Se inorgânico são os sais de Se, ou seja, selenato e selenito. Por sua vez, a forma orgânica mais comum do Se na planta é a selênio-metionina ou selênio-cisteína. Na estrutura molecular dos aminoácidos, o Se ocupa o mesmo lugar que o enxofre. Algumas plantas apresentam mais de 50% do Se na forma orgânica. Em milho, trigo e soja crescendo em solos ricos em Se, a selênio-metionina pode representar mais de 80% do Se total presente no tecido vegetal (YANG *et al.*, 1997; GUO & WU, 1998).

Os suplementos minerais também possuem Se tanto na forma inorgânica como orgânica. A forma inorgânica mais comum utilizada em misturas minerais é o selenito de sódio. As formas orgânicas, por sua vez, estão disponíveis como leveduras enriquecidas, que crescem sobre um substrato contendo pouco enxofre e muito Se. Dessa forma, o Se encontrado é basicamente a selênio-metionina, porém com diversas outras formas ainda desconhecidas (UDEN *et al.*, 2004).

Na fermentação ruminal e absorção de selênio, o selenito e selenato podem ser reduzidos a Se elementar pelos microrganismos ruminais como um meio de detoxificação (KIM *et al.*, 1997). Os microrganismos podem também incorporar Se na proteína microbiana (HIDIROGLOU & LESSARD, 1976; KIM *et al.*, 1997). Desse modo, o Se na ração, presente na forma inorgânica, pode ser absorvido no intestino delgado na forma orgânica. A composição da dieta pode influenciar a forma de Se que chega ao intestino delgado. A relação volumoso/concentrado, por exemplo, parece ter influência por afetar a composição da população microbiana ruminal (KOENIG *et al.*, 1997; GIERUS *et al.*, 2002). Contudo, tem sido pouco documentado, como as formas de Se que chegam ao intestino delgado são afetadas pela forma e pela quantidade de Se suplementada, assim como pelo ambiente ruminal.

A absorção intestinal de Se em ruminantes é semelhante à de monogástricos. A absorção de selenito se dá por difusão e, portanto, proporcional à quantidade presente no lúmen intestinal. A absorção de selenato e selênio-metionina ocorre por transporte ativo, com o selenato sendo absorvido de modo semelhante ao sulfato e a selênio-metionina de forma análoga à metionina (VENDELAND *et al.*, 1994). Pouco do Se elementar é absorvido no intestino devido a sua baixa solubilidade e, portanto, passa a ser excretado nessa forma pelas fezes. Após a absorção intestinal, a selênio-metionina e a selênio-cisteína podem ser metabolizadas pelos animais como aminoácidos (EKHOLM *et al.*, 1991). Isso ocorre especialmente com a selênio-metionina, que, de forma similar à metionina, pode ser incorporada a proteínas pelo mesmo códon AUG, pois o RNAt não diferencia a metionina da selênio-metionina. Em consequência, 40-50% do Se corporal podem ser selênio-metionina inserida em proteínas do tecido muscular, denominadas selenoproteínas não-funcionais (DANIELS, 1996).

No metabolismo pós-absortivo das formas inorgânicas, o selenito é captado pelos eritrócitos, reduzido imediatamente a seleneto, acoplado à albumina e transferido ao plasma, para então ser transportado ao fígado. O selenato, por sua vez, é incorporado diretamente pelos hepatócitos, utilizando o mesmo sistema de transporte dos fosfatos da corrente sanguínea (DANIELS, 1996; SUZUKI, 2005). O metabolismo pós-absortivo de Se envolve dois compartimentos (JANGHORBANI *et al.*, 1990; SUZUKI, 2005). Um compartimento contém as formas orgânicas de Se, representado principalmente pela selênio-metionina e pela selênio-cisteína; e o outro, as formas inorgânicas. Para que o Se seja incorporado especificamente em selenoproteínas funcionais, como a glutathione peroxidase, é necessário que as formas orgânicas e inorgânicas sejam reduzidas a seleneto, e este, por sua vez, metabolizado a selênio-cisteína. A selênio-cisteína da

dieta, por sua vez, não é incorporada diretamente em selenoproteínas funcionais, necessitando ser inicialmente reduzida a seleneto. As formas inorgânicas são mais rapidamente transformadas em seleneto que as orgânicas. Selênio-metionina e selênio-cisteína podem ser oxidadas a selenito ou selenato. A selênio-metionina só é utilizada como fonte de Se pelo organismo após a degradação das proteínas em que ela foi incorporada, desde que estas proteínas sejam recicladas no interior das células. Formas orgânicas de Se incorporadas em proteínas não-funcionais, como em proteínas da lã, pêlos, cascos ou leite, são irreversivelmente perdidas. A selênio-metionina pode ser transformada a selênio-cisteína pela mesma rota que a metionina é convertida a cisteína.

O selênio é distribuído extensamente por todo organismo, com grandes concentrações encontradas no fígado e nos rins, e menores no coração, músculo esquelético e tecido adiposo (ULLREY, 1987; STOWE e HERDT, 1992). De maneira geral, a maioria do selênio absorvido é acumulada no fígado, que depois transfere uma grande porção para o soro. O soro age como o principal pool de selênio no organismo, sendo que mudanças no selênio sérico tendem a ocorrer em poucos dias após mudanças na ingestão, fazendo da análise do soro um sensível indicador da ingestão de selênio recente pelo animal (HERDT, 2000). Entretanto, a concentração de selênio no sangue é um indicador em longo prazo da ingestão de selênio pelo animal. Isto porque reflete o selênio no soro mais o selênio nas células vermelhas, onde está presente na forma de GSH-Px (STOWE e HERDT, 1992). Como a GSH-Px é incorporada às células vermelhas no momento da eritropoiese, apenas depois do tempo de vida média das células vermelhas, a concentração de selênio no sangue e a atividade da GSH-Px se alteram significativamente (DUNCAN e PRASSE, 1986). A concentração de selênio no

fígado também fornece uma indicação acurada da ingestão e status de selênio nos animais domésticos (ULLREY, 1987; VALK e HORSTRA, 2000).

No organismo animal, o selênio é incorporado a várias enzimas, das quais a mais importante é a glutathiona peroxidase, possuidora de quatro átomos de selênio (ROTRUCK *et al.*, 1973). A glutathiona peroxidase é uma metaloenzima que forma parte do sistema glutathiona, assinalada como principal sistema antioxidante no organismo (WITTEWER, 1998). Essa enzima, juntamente com a superóxido dismutase e a catalase protegem as células dos problemas causados pelos radicais livres (FLOHE citado por NUERNBERG *et al.*, 1998). Sua principal função é inativar derivados MOR, sendo responsável pela proteção da membrana das células que funcionam na presença de oxigênio. A presença de selênio na estrutura da enzima permite que exista uma alta relação entre sangue e tecido com a atividade da GSH – Px. A deficiência de selênio induz a uma baixa atividade de GSH – Px, deixando a célula exposta à ação nociva dos derivados MOR, o que produz alterações na estrutura de lipídeos, proteínas, polissacarídeos, DNA e outras macromoléculas celulares (MILLER *et al.*, 1993). Sua atividade está relacionada com níveis de selênio nos tecidos em ovinos, bovinos e outros ruminantes (BENGOUIMI *et al.*, 1998). Omaye e Tappel (1974) encontraram uma relação semilogarítmica entre a atividade desta enzima em diversos tecidos de frangos e a quantidade de selênio da dieta.

A glutathiona peroxidase parece ocupar um papel central nas reações de oxidação e redução na célula, protegendo a membrana celular de danos por meio da inibição e destruição de peróxidos, levando a uma redução na quantidade de vitamina E necessária para manter a integridade das membranas (COMBS e COMBS, 1986). As ações bioquímicas do selênio e da vitamina E são de complementação no mecanismo

de defesa normal do corpo. A vitamina E aumenta retenção de selênio e previne a auto-oxidação de lipídeos no interior das membranas celulares, evitando a formação de peróxidos, contudo, somente a glutathione peroxidase pode destruir os peróxidos já formados. A ação das enzimas glutathione peroxidase e glutathione reductase está relacionada com redução e oxidação da glutathione. A glutathione reductase age na regeneração de GSH a partir da GSSG, essa enzima é dependente da disponibilidade de NADPH, oriundo da via das pentoses (MURRAY *et al.*, 1998). Segundo SEN (1997), a diminuição da emissão de NADPH poderia resultar no aumento de GSSG e diminuição de GSH.

Desde que foi descoberto que microrganismos ruminais alteram as formas de selênio (WHANGER *et al.*, 1968), foi de grande interesse determinar quais seriam as diferenças entre o metabolismo de fontes orgânicas e inorgânicas em ruminantes e não ruminantes. Embora algum selênio seja incorporado às proteínas corporais, maior quantidade de selênio é reduzida a formas insolúveis no rúmen quando administrado como selenito de sódio, do que como selênio-metionina, o que pode influenciar a absorção de selênio destas duas fontes (van RYSSSEN *et al.*, 1989).

Diversos autores descreveram os processos metabólicos pelos quais passam as diferentes formas usadas na suplementação do selênio. Segundo COMBS e COMBS (1986), o selênio inorgânico é passivamente absorvido pelo intestino, enquanto que selenoproteínas encontradas em plantas e no selênio-levedura são ativamente absorvidos via mecanismos específicos de transporte de aminoácidos. Uma vez absorvido, o selênio inorgânico é reduzido para a forma selenide, passa para a proteína do plasma e é transportado para o fígado para tornar-se parte do *pool* de selênio para a formação da selenocisteína. Em contraste, a selênio-metionina viaja no sangue por

mecanismos de transporte de aminoácidos e pode tanto ser transportada para o fígado para a incorporação em selenoproteínas ou diretamente para incorporação em proteínas de outros tecidos. Mais recentemente, num artigo sobre biodisponibilidade de selênio, FAIRWEATHER-TAIT (1997) citou trabalhos com ratos onde foi demonstrado que selênio-metionina é absorvida por transporte ativo compartilhado com a metionina, o selenito é absorvido por simples difusão, o selenato por um mecanismo envolvendo sódio compartilhado por sulfato e, finalmente, a selenocisteína, que pode compartilhar um mecanismo de transporte ativo com aminoácidos básicos. Segundo BEILSTEIN e WHANGER, (1986 e 1986a), a selênio-metionina é preferencialmente incorporada à proteína, particularmente ao músculo, junto à metionina. Em animais que foram injetados com (^{75}Se)–selenito, a maioria do ^{75}Se foi recuperado como (^{75}Se)-cisteína, enquanto que nos animais injetados com selênio-metionina, o selênio foi encontrado nesta forma e somente vagarosamente convertido a selenocisteína, o componente ativo da GSH-Px. O selenito é mais prontamente metabolizado para um precursor imediato da selenocisteína do que são as formas orgânicas consumidas oralmente, incluindo a selenocisteína (SUNDE e HOEKSTRA, 1980).

2.4.2. Alecrim

Um dos principais problemas na conservação dos alimentos lipídicos é o desencadeamento do processo oxidativo, que resulta na produção de odores e sabores desagradáveis ao alimento, além de proporcionar uma diminuição do valor nutritivo, pois os ácidos graxos essenciais são os primeiros a serem oxidados. Estudos científicos têm demonstrado que a propriedade antioxidante de especiarias e vegetais

se deve, principalmente, a seus compostos fenólicos, onde se destacam os flavonóides, ácidos fenólicos e tocoferol (FRANKEL *et al.*, 1996; CUVELIER *et al.*, 2000).

Os antioxidantes podem ser de origem sintética ou natural. O uso de antioxidantes sintéticos é restrito em vários países, devido aos seus possíveis efeitos indesejáveis na saúde humana. Como resultado disso, há um grande interesse na obtenção e utilização de antioxidantes de fontes naturais porque eles são presumidamente seguros, desde que ocorram em plantas (HRAS *et al.*, 2000).

Sendo assim, o uso de especiarias e ervas como antioxidantes no processamento de alimentos é uma alternativa promissora para o uso de antioxidantes sintéticos (MADSEN *et al.*, 1998).

Apesar da documentação científica sobre os efeitos antioxidantes de muitas especiarias, somente o alecrim ou mais precisamente, o extrato de alecrim é utilizado comercialmente (MADSEN & BERTELSEN, 1995). O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é originário da zona mediterrânea, e cultivado em quase todos os países de clima temperado de Portugal à Austrália. A planta possui porte subarborescente lenhoso, ereto e pouco ramificado de até 1,5 m de altura. Folhas são lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. Flores azulado-claras, pequenas e de aromas forte e muito agradável (LORENZI, H.; MATOS, F., 2006). Apesar de silvestre, normalmente é cultivado em função do uso alimentar e ornamental. Alguns estudos (CHIPAULT *et al.*, 1952) demonstraram que o alecrim é um potente antioxidante natural. A atividade antioxidante dos extratos de alecrim (tanto os clássicos como os obtidos por dióxido de carbono supercrítico) foi evidenciada sobre diferentes modelos e com diversos produtos alimentícios (lipídios, carnes). Esta atividade se deve em parte aos ácidos carnósico e rosmarínico, mas sobre tudo aos Ø-

difenóis diterpênicos, cuja eficácia é superior a dos antioxidantes sintéticos utilizados na atualidade. (ARUOMA *et al.* 1996). Os extratos de antioxidantes comerciais (molecular ou destilado a vácuo) de alecrim estão disponíveis como um pó fino. Dependendo da quantidade de atividade dos antioxidantes, eles são recomendados para o uso nas concentrações entre 200 e 1000 ppm do produto processado (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992).

WONG *et al.*, (1995) avaliaram o efeito dos antioxidantes tocoferol, sálvia e alecrim na estocagem de um homogeneizado de carne bovina. Foi observado um crescente aumento nos valores de TBARS durante 5 dias. Os três antioxidantes foram considerados como eficazes, apesar dos valores de TBARS terem indicado que o tocoferol é mais eficaz que o alecrim e a sálvia. Quando misturados em partes iguais, não foi verificada melhoria na atividade antioxidante.

ASAI *et al.*, (1999), trabalhando com ratos descreveram que o uso do extrato de alecrim como suplementação dietética é possível, e garante a manutenção da atividade antioxidativa *in vivo* para estes animais. O efeito de *R. officinalis* adicionado em dietas para aves também garante uma melhoria na eficiência nutricional pelo aumento da digestibilidade do alimento. KRAUSE & TERNES (2000), testaram a biodisponibilidade de substâncias antioxidativas provenientes do extrato de alecrim em ovos, revelando a possibilidade de transmissão dos fenóis diterpenos pelo organismo sem que ocorra degradação destes compostos. CINTRA *et al.*, (1999), avaliaram o efeito antioxidante de especiarias como a salsa (*Petroselinum sativum Hoffm*), cebolinha verde (*Allium shoenoprasum L.*), orégano (*Origanum vulgare L.*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*). As avaliações dos extratos alcoólicos e aquosos demonstraram que todas as especiarias apresentam capacidade antioxidante, destacando-se os extratos de orégano e alecrim.

SANT'ANA (1999) estudou a ação antioxidante de alecrim em filés de peixes da espécie pacu (*Piaractus mesopotamicus Holmberg*), com o objetivo de verificar a ação antioxidante de uma oleoresina comercial de alecrim adicionada à ração de peixes. Os resultados demonstraram que o extrato de alecrim protegeu os filés contra a oxidação, sendo a composição em ácidos graxos dos filés uma função da fonte lipídica que também influenciou nesta proteção.

GÓMEZ (2003), trabalhando com poedeiras, verificou que a atividade antioxidante de extratos de alecrim e orégano aumentou a estabilidade dos ovos enriquecidos com PUFA α - 3, mostrando a capacidade deste em transpor e se depositar nos tecidos sem perder suas propriedades.

3. HIPÓTESE

A ação antioxidante do extrato de alecrim e do selênio na forma orgânica e inorgânica pode aumentar a duração da estabilidade oxidativa no músculo e no fígado de bovinos da raça Brangus.

4. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da estabilidade oxidativa no músculo e no fígado de bovinos da raça Brangus recebendo alta proporção de concentrado, comparando a utilização de fonte orgânica de selênio (selênio-metionina), fonte inorgânica (selenito de sódio) e extrato de alecrim, com base na análise da concentração de selênio no fígado e soro, da atividade da enzima glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase no fígado e na análise de TBARS no músculo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local

O experimento foi conduzido nas dependências da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, no Campus de Pirassununga-SP, por um período de 131 dias, entre os meses de dezembro de 2005 a abril de 2006. Foram usados 28 bovinos Brangus machos inteiros (Figura 2), com peso inicial médio de 395 ± 15 kg. Os animais foram alocados na área de confinamento experimental da Prefeitura do campus (PCAPS) e da FZEA-USP, sendo utilizadas 28 baias com cocho e bebedouro automático.

Figura 2. Bovinos Brangus empregados no experimento.

5.2 Procedimento Experimental

Inicialmente os animais foram adaptados à dieta e ao confinamento experimental por um período de 30 dias. Durante este período, o consumo foi ajustado para que houvesse pouca sobra. Durante todo período experimental os animais receberam água *ad libitum*. Ressaltando que a ração utilizada no experimento foi preparada periodicamente, de acordo com a capacidade do misturador da Fábrica de Ração da Prefeitura do Campus de Pirassununga/USP, sendo que os animais de todos os tratamentos receberam ração da mesma amostragem. O sal mineral usado na composição da dieta basal foi formulado exclusivamente para o experimento, sem a adição de fonte de selênio. Com exceção do tratamento no qual não havia suplementação de selênio, as fontes de selênio testadas foram pesadas em balança de precisão para fornecerem o nível suplementar desejado a cada dia experimental, com base na pesagem individual dos animais. Como a quantidade pesada era pequena, as fontes foram misturadas ao fubá de milho imediatamente após a pesagem, ainda no laboratório, para evitar perdas até a utilização. Diariamente, esta mistura era adicionada e homogeneizada ao restante da ração daquele dia para cada animal experimental.

Os animais receberam dieta contendo alta proporção de concentrado (75%), sendo a fonte de volumoso a silagem de milho era fornecida uma vez ao dia, pela manhã. Para o cálculo das exigências nutricionais foi utilizado o programa Cornell Net Carbohydrate and Protein System-CNCPS.

Após o período de adaptação ocorreu o experimento propriamente dito, que teve duração de 101 dias.

A Tabela 1 apresenta a composição percentual da dieta basal usada no experimento e a Tabela 2 mostra a composição bromatológica da mesma.

TABELA 1. Composição percentual da dieta basal, em base seca.

Ingredientes	%
Silagem de milho	25,000
Milho grão	64,200
Soja extrusada	7,875
Uréia	0,967
Bicarbonato de sódio	0,300
Sal Branco	0,285
Cálcario	0,600
Monensina sódica	0,022
Sal mineral	0,750

TABELA 2. Composição bromatológica da dieta basal, em base seca.

Ingredientes	
Proteína Bruta	12,90 %
Extrato etéreo	4,21 %
FDN	18,34 %
FDA	16,05 %
Selênio	0,06 mg/kg

Os 28 bovinos foram divididos em 4 grupos, conforme os tratamentos descritos abaixo, totalizando 7 animais por tratamento:

Tratamento 1: Dieta basal sem a suplementação de selênio ou de extrato de alecrim.

Tratamento 2: Dieta basal com a suplementação de 2 mg de selênio/kg de matéria seca na forma de selenito de sódio.

Tratamento 3: Dieta basal com a suplementação de 2 mg de selênio/kg de matéria seca na forma de selênio metionina.

Tratamento 4: Dieta basal com suplementação de 1400 mg de extrato de alecrim/kg de matéria seca.

Foram feitas 4 colheitas de sangue para análises do selênio no soro. As colheitas foram feitas nos dias 0, 28, 56, 84 de experimento, sendo também nestes dias realizadas as pesagens dos animais, após jejum de 16 horas (Figura 3).

Figura 3. Colheita de sangue.

Os animais foram abatidos no Matadouro-Escola da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga após o período de jejum de 16 horas, conforme procedimento rotineiro (Figura 4). Os animais foram insensibilizados através de concussão cerebral e abatidos por sangria na veia jugular em posição vertical, seguida de esfolagem, evisceração, inspeção, serragem das carcaças ao meio (Figura 5), toalete e pesagem da carcaça quente.

Figura 4. Animais no Matadouro-Escola.

Figura 5. Serragem das carcaças ao meio.

Para a determinação do extrato etéreo, perfil de ácidos graxos e TBARS, foram retiradas 6 amostras do músculo *L. dorsi* de cada animal, de aproximadamente 2,5 cm

de largura cada. Sendo que 2 amostras destinadas as análises de TBARS, foram embaladas e acondicionadas em geladeira.

Foram obtidas amostras do lóbulo direito do fígado (Figura 6) de cada animal para análises de glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase e selênio.

Figura 6. Amostras de Fígado.

5.3 Procedimento Laboratorial

As determinações de matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo, matéria mineral, FDA e FDN das rações obedeceram às recomendações da AOAC (1996) em suas respectivas normas (930.15; 942.05; 988.05; 954.02 e 973.18). As análises de selênio foram realizadas após a digestão úmida nítrico-perclórico e leitura fluorimétrica (OLSON *et al.*, 1975).

A fração de extrato etéreo no músculo foi determinada em extrator Soxhlet com o solvente clorofórmio, após prévia liofilização das amostras. Foram utilizados 2 gramas de amostra, os quais foram previamente homogeneizados AOAC (1996).

A composição de ácidos graxos do músculo LD foi realizada através de cromatografia gasosa de alta resolução e realizada no laboratório de Fisiologia Celular do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas – USP, segundo a metodologia de Perez *et al.*, (2002)

Para as análises dos tecidos colhidos, fígado e músculo, estes foram descongelados e tiveram um fragmento separado, retirado sempre da mesma região, lavado em água destilada deionizada, seco em papel absorvente descartável e pesado em balança de precisão.

Utilizou-se tampão fosfato de sódio (10 mmol.L^{-1} , pH 7,4) como meio de extração da glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase no fígado. As amostras de fígado foram trituradas em homogeneizador tipo "potter" de alta velocidade durante 2 minutos na proporção de um grama para 10 mL de tampão de extração gelado ($4,0^{\circ}\text{C}$). Após homogeneização, centrifugaram-se as amostras a 8000 r.p.m. durante 10 minutos sob refrigeração. O sobrenadante foi retirado, cuidadosamente com uma pipeta Pasteur, transferido para tubos sob gelo e foi utilizado para determinar a atividade máxima das enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase.

A atividade máxima da glutathione peroxidase foi determinada espectrofotometricamente com base no decréscimo da concentração de NADPH em 340 nm. O meio de reação foi constituído de tampão fosfato de potássio (100 mmol.L^{-1} , pH 7,0) contendo EDTA (3 mmol.L^{-1}), glutathione redutase (1 UI), NADPH ($0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$), GSH (2 mmol.L^{-1}), azida de sódio (1 mmol.L^{-1}) e cumene hidroperóxido (0,02%). A reação foi iniciada pela adição de cumene hidroperóxido e acompanhada por 3 min. a 37°C , segundo a metodologia de PAGLIA e VALENTINE (1967).

A atividade máxima da superóxido dismutase no fígado foi determinada de acordo com a taxa de redução *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) pelo ânion superóxido a 25°C acompanhada por 3 minutos espectrofotometricamente a 550 nm. O sistema xantina-xantina oxidase é utilizado como fonte de ânion superóxido. A SOD presente na amostra compete pelo ânion superóxido, inibindo a taxa de redução do NBT. O meio de ensaio conteve tampão fosfato de sódio e potássio (53 mM, pH 7,8), NBT (0,1 mM), xantina (0,05 mM) e EDTA(0,1 mM), segundo a metodologia de BEAUCHAMP e FRIDOVICH (1971).

A atividade máxima da catalase foi determinada de acordo com a taxa de redução do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em H₂O e O₂ segundo a metodologia de BEERS e SIZER (1952).

A extensão da estabilidade lipídica da carne foi avaliada através do teste TBARS segundo TARLADGIS *et al.* (1960). Na desossa (24 horas após o abate), foram colhidas duas amostras do músculo *L. dorsi*, embaladas e congeladas em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenadas em freezer a -80°C. Foram consideradas T0 as amostras do dia da desossa e T1 as armazenadas por 14 dias após a desossa. As análises de T0 iniciaram um dia após a colheita, devido ao tempo utilizado para o abate e as colheitas.

5.4 Delineamento Experimental

O delineamento estatístico foi do tipo inteiramente casualizado, com 7 repetições por tratamento. Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, 1988), através de contrastes ortogonais pelo PROC GLM. Para os

dados de selênio no soro foi utilizado o PROC MIXED. Foi adotado um nível de 5% de significância para todos os dados analisados.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Desempenho

Os valores referentes ao ganho de peso diário, ingestão de matéria seca e eficiência alimentar durante o confinamento experimental estão apresentados nas Figuras 7, 8 e 9, respectivamente.

Figura 7. Média do ganho de peso diário (GPD) e desvios padrões, kg por dia, de bovinos da raça Brangus recebendo dieta controle, alecrim, selênio orgânico, e selênio inorgânico durante período experimental.

Figura 8. Média da Ingestão de matéria seca (IMS) e desvios padrões, kg por dia, de bovinos da raça Brangus recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante período experimental.

Figura 9. Média da Eficiência alimentar (EA) e desvios padrões, kg por dia, de bovinos recebendo dieta controle, alecrim, selênio orgânico, e selênio inorgânico durante período experimental.

O tratamento com 2 mg/kg de selênio, suplementado na forma de selenito de sódio, apresentou maior ganho de peso diário ($P < 0,05$) do que o tratamento controle, mas não apresentou diferença significativa em relação aos outros tratamentos. Não

houve efeito significativo ($P>0,05$) para ingestão de matéria seca entre os tratamentos estudados em relação ao controle. Para a eficiência alimentar, o tratamento alecrim e o tratamento selênio, suplementado tanto com selenito de sódio como com selênio metionina, foram superiores ($P<0,05$) ao controle.

A explicação para a melhor eficiência alimentar encontrada para todos os animais suplementados com selênio orgânico, selênio inorgânico e extrato de alecrim em relação ao controle pode ser atribuída à ingestão desse mineral abaixo do preconizado pelo NRC (2000) nesse tratamento. Não foi observado nenhum sinal clínico de deficiência de selênio, mas talvez essa ingestão abaixo dos níveis recomendados, pelo período de 101 dias, possa ter acarretado um desempenho inferiorizado dos animais não suplementados.

Lawler *et al.* (2004) suplementaram selênio com diferentes fontes para novilhos, com doses acima das preconizadas pelo NRC e não encontraram alteração no ganho de peso ou eficiência alimentar, entretanto, o tratamento controle desse estudo se apresentava dentro das recomendações de selênio preconizadas pelo NRC (2000).

6.2 Concentração de selênio no fígado e no soro

A Figura 10 apresenta a concentração de selênio em miligramas por kg de fígado (em base seca), e a Figura 11 apresenta a concentração de selênio no soro, em miligramas por litro.

Figura 10. Concentração de selênio e desvios padrões, em mg por kg de fígado (em base seca) de bovinos recebendo dieta controle, suplementados com selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante período experimental.

Figura 11. Concentração de selênio no soro, em mg por L, de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante período experimental.

O tratamento selênio inorgânico apresentou maior concentração de selênio ($P < 0,05$) no fígado que o tratamento controle, entretanto os tratamentos alecrim e selênio orgânico não apresentaram diferenças entre si ($P > 0,05$).

Para os níveis de selênio no soro, pode-se observar maior concentração do tratamento selênio inorgânico em relação ao tratamento controle nos períodos de 28, 56 e 84 dias de experimento, o mesmo ocorrendo com o tratamento selênio orgânico. Comparando os tratamentos selênio inorgânico com selênio orgânico observamos que não houve diferença significativa, de selênio no soro, em nenhum dos dias observados.

A concentração de selênio no fígado dos bovinos aumentou com a suplementação de selênio na dieta, na forma de selenito de sódio. O selênio é distribuído por todo organismo, sendo que a maior parte do selênio absorvido, do selenito de sódio é acumulada no fígado. Segundo Valk e Horstra (2000), a concentração de selênio no fígado fornece uma indicação acurada da ingestão recente de selênio, o que explica os resultados.

O tratamento selênio orgânico apresentou menor concentração de selênio no fígado quando comparado com o tratamento selênio inorgânico ($P < 0,05$). A possível explicação para esse resultado seria um aumento de selênio acumulado no músculo no tratamento selênio orgânico.

6.3 Extrato etéreo da carne

A Figura 12 apresenta a concentração de extrato etéreo, em gramas por 100 gramas de carne, na matéria original.

Figura 12. Extrato etéreo e desvios padrões, em % da matéria original, no músculo *Longissimus dorsi* de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante o período experimental.

Não foram encontradas diferenças em função dos tratamentos ($P > 0,05$) para a concentração de extrato etéreo no músculo *Longissimus dorsi*. Lawler *et al.* (2004) suplementaram selênio em novilhos e não encontraram alteração na concentração de

extrato etéreo da carne, assim como os resultados encontrados no presente experimento.

6.4 Perfil de ácidos graxos na carne

A Tabela 3 apresenta as proporções molares dos ácidos graxos no músculo LD de bovinos, nos diferentes tratamentos.

TABELA 3. Perfil de ácidos graxos no músculo *Longissimus dorsi* de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e extrato de alecrim durante o período experimental.

	Período experimental		Tratamentos		Contrastes ortogonais					
	C	Se	Se IN	A	A	B	C	D	E	F
Ácidos graxos										
Láurico	10,48±3,04	13,47± 4,59	13,64±5,35	12,61± 5,41	0,25	0,23	0,41	0,94	0,75	0,70
EPA	0,16± 0,43	0,25±0,63	0,31±0,77	0,58±0,69	0,79	0,67	0,24	0,87	0,38	0,46
Linolênico	7,39±6,36	7,71± 7,07	6,79± 3,55	8,32± 5,68	0,92	0,85	0,77	0,65	0,85	0,65
DHA	1,23±1,25	0,87±1,44	0,66±0,87	0,85±2,10	0,66	0,49	0,64	0,80	0,90	0,81
Mirístico	1,69±0,72	1,42±0,48	1,39±0,68	1,38±0,70	0,47	0,43	0,39	0,94	0,89	0,88
Palmitoléico	6,68±1,38	6,25±1,51	6,10±1,45	6,53±2,37	0,66	0,55	0,88	0,87	0,75	0,66
Linoléico	10,31 ^a ±3,35	8,58 ^{ab} ±2,1	8,48 ^{ab} ± 2,59	6,80 ^b ±1,97	0,24	0,22	0,32	0,95	0,25	0,27
Palmítico	8,83 ^a ±2,61	6,74 ^{ab} ± 1,93	7,00 ^{ab} ± 2,88	6,05 ^b ±2,41	0,14	0,20	0,25	0,85	0,64	0,51
Oléico	34,47± 3,14	32,75± 2,20	36,56± 7,96	37,30± 3,40	0,51	0,43	0,29	0,17	0,10	0,78
Esteárico	18,71± 7,88	21,94± 6,20	19,02 ± 5,37	19,54±5,25	0,92	0,37	0,81	0,43	0,52	0,88
Saturados	39,72±7,88	43,57± 6,03	41,07±7,46	39,59± 9,09	0,37	0,75	0,97	0,58	0,38	0,97
Insaturados	60,27± 7,88	56,42± 6,03	58,92± 7,46	60,41± 9,09	0,37	0,75	0,97	0,58	0,38	0,97

C = Dieta controle. Se IN= selênio inorgânico. Se= selênio orgânico e A= extrato de alecrim.

A=C X Se IN C=C X Se E=Se IN X A

B=C X A D=Se IN X Se F=Se X A

Médias seguidas de letras diferentes nas linhas diferem entre si (P<0,05)

Não houve diferença significativa para proporção de ácidos saturados e insaturados com os diferentes tratamentos. Os resultados mostraram que a suplementação de selênio orgânico, selênio inorgânico ou alecrim não alteraram o perfil de ácidos graxos na carne, na sua composição de ácidos graxos saturados ou insaturados. A composição de ácidos graxos na carne é resultado da lipogênese no tecido adiposo e também dos lipídeos da dieta e posterior biohidrogenação ruminal (BERCHIELLI *et al.*, 2006), dessa forma, apesar do alecrim apresentar efeito antimicrobiano (CONSTANTINI *et al.*, 1992), não deve ter ocorrido alteração na biohidrogenação ruminal, o que pode explicar os resultados obtidos.

6.5 Enzimas antioxidantes

A Figura 13 apresenta a atividade da enzima glutathiona peroxidase, a Figura 14, a atividade da superóxido dismutase e a Figura 15 a atividade da enzima catalase frente aos diferentes tratamentos propostos.

Figura 13. Média da Atividade da enzima glutathiona peroxidase e desvios padrões, em mmol por minuto por mg de proteína do fígado, de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante o período experimental.

Figura 14. Atividade da enzima superóxido dismutase e desvios padrões, em μmol por minuto por mg de proteína do fígado, de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante o período experimental.

Figura 15. Atividade da enzima catalase e desvios padrões, em μmol por minuto por mg de proteína do fígado, de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante o período experimental.

Pode-se observar que o tratamento selênio inorgânico apresentou maior atividade de glutathione peroxidase ($P < 0,05$) que o tratamento controle. Com relação à

superóxido dismutase, pode-se observar que o tratamento alecrim apresentou menor atividade da enzima ($P < 0,05$) que os outros tratamentos. No caso da catalase, não houve diferença significativa entre os tratamentos selênio, selênio orgânico e alecrim com relação ao controle, porém o tratamento alecrim foi o único que apresentou diferença significativa com relação ao tratamento selênio inorgânico.

A glutathione peroxidase é uma enzima que contém quatro átomos de selênio, apresentando a sua biossíntese induzida por selênio (BENGOUIMI *et al.*, 1998). Daun e Akesson (2004) encontraram correlação significativa entre a atividade da GSH-Px e o conteúdo de selênio em diferentes órgãos de bovinos. A atividade da GSH-Px está relacionada com níveis de selênio no fígado de ovinos (SWORD Jr. *et al.*, 1984) e bovinos (BENGOUIMI *et al.*, 1998). Isso explica os resultados obtidos no presente estudo, ou seja, maior atividade dessa enzima nos os tratamentos com maior consumo e maior acúmulo de selênio no fígado.

Dessa forma, a suplementação selênio inorgânico, nos níveis estudados, aumenta a atividade da enzima glutathione peroxidase, podendo alterar o metabolismo da glutathione.

No caso da superóxido dismutase, o fato do tratamento alecrim ter apresentado menor atividade da enzima, pode ter ocorrido em função de sua ação antioxidante, diminuindo o substrato enzimático.

6.6 Estabilidade lipídica da carne

As Figuras 16 e 17 representam a quantidade de TBARS em miligramas de malonaldeído/Kg de músculo. Nos dias 0 (T0), ou seja, na desossa e no 14° dia (T1), após ser embalada a vácuo.

Figura 16 TBARS no dia 0 em miligramas de malonaldeído/Kg de músculo *Longissimus dorsi* de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico alecrim durante o período experimental.

Figura 17. TBARS no dia 14 em miligramas de malonaldeído/Kg de músculo *Longissimus dorsi* de bovinos recebendo dieta controle, selênio orgânico, selênio inorgânico e alecrim durante o período experimental.

Não houve diferença ($P>0,05$) na estabilidade lipídica do músculo *Longissimus dorsi* em função dos tratamentos em ambos os tempos. É válido lembrar que as amostras foram acondicionadas em embalagens a vácuo e, portanto, privadas de oxigênio. Talvez a função antioxidante pudesse ser diferente caso as amostras estivessem em um ambiente menos controlado. O'GRADY *et al.*, (2000) não encontraram diferenças na estabilidade lipídica (TBARS) do músculo *Longissimus dorsi* de bovinos da raça Angus suplementados com selênio orgânico e nas mesmas condições de armazenamento e conservação deste experimento. O extrato de alecrim não foi eficiente na diminuição do TBARS, no período e condição de estocagem estudados. WONG *et al.*, (1995) em estudo desenvolvido com carne bovina havia considerado o extrato de alecrim como eficaz, apesar dos valores de TBARS terem indicado que o tocoferol era mais eficiente no controle da oxidação lipídica.

7. CONCLUSÕES

Dentro das condições estudadas neste experimento não foi possível confirmar a hipótese levantada, de que ação antioxidante do extrato de alecrim e do selênio na forma orgânica e inorgânica pudesse aumentar a estabilidade oxidativa no músculo e no fígado de bovinos da raça Brangus, apesar de se ter verificado que a suplementação de selênio inorgânico alterou a atividade da GSH-Px e o metabolismo da glutathiona.

O mesmo resultado não ocorreu com a suplementação de selênio na forma de selênio metionina, possivelmente por um maior acúmulo no músculo e por não alterar a atividade da GSH-Px.

Devido ao fato da dose de extrato de alecrim ter sido baseada na literatura, e ainda assim não ter demonstrado efeito antioxidante em bovinos, acredita-se que outros estudos, com doses maiores de extrato de alecrim se fazem necessários para uma possível demonstração de seus efeitos antioxidantes

8. REFERÊNCIAS

ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. ARS Curandi, São Paulo, p.141-164, 1993.

AMAROWICZ, R.; WANASUNDARA, U.; WANASUNDARA, J.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of ethanolic extracts of flaxseed in a β -carotene-linoleate model system. **J. Food Lipids**, Trumbull, v.1, p.111-117, 1993.

ARUOMA, O. I.; SPENCER, J. P. E.; ROSSI, R.; AESCHBACH, R.; KHAN, A.; MAHMOOD, N.; MUNOZ, A.; MURCIA, A.; BUTLER, J.; HALLIWELI, B. An Evaluation of the Antioxidant and Antiviral Action of Extracts of Rosemary and Provençal Herbs, **Food Chemical Toxicol**, 34, 449-456. 1996.

ASAI, A.; NAKAGAWA, K.; MIYAZAWA, T. Antioxidative effects of turmeric, rosemary and capsicum extracts on membrane phospholipid peroxidation and liver lipid metabolism in mice. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, 63 (12): 2118-2122, 1999.

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 15 ed. Arlington: **AOAC**, 1990. 128 p.

AURELI, P.; CONSTANTINI, A. and Zolea, S. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* v. 55. p. 344-348, 1992.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH. I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamid gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-287, 1971.

BEERS, R. F.; SIZER, J. W.; A spectrophotometric method of measuring the breakdown on hydrogen peroxide by catalase. **J. Biol. Chem.**, v.195, p.133-140, 1952.

BEILSTEIN, M. A.; EWHANGER, P. D. 1986a Chemical forms of selenium in rat tissues after administration of selenite or selenomethionine. **J. Nut.**, v.116, p.1711.

BENGOUMI M.; ESSAMADI A. K.; TRESSOL J. C.; CHACORNAC J. P.; FAYE B. Comparative effects of selenium supplementation on the plasma selenium concentration and erythrocyte glutathione peroxidase activity in cattle and camels. **Animal Science**. v.6, p.461-466 ,1998.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: **FUNEP**, 2006. v. 1. 583 p.

CADENAS E.; DAVIES K. J., A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and vaging. **Free radical biology and medicine**. v.29 p.222-230 , 2000.

CHEN, X.P.; CROSS, R.F.; CLARK, A.G.; BAKER, W.L. Mikrochim. Acta. 1999. P130-225.

CHIPAULT, J. R.; MINUZO, G. R.; HAWKINS, J. M. and LUNDERG, W. O. **Food Res.** v.17, p.46-55, 1952.

CINTRA, R. M. G. C. Efeito antioxidante de especiarias avaliação da salsa (*Petroselinum sativum* Hoffm), cebolinha verde (*Allium shoenoprasum* L.) **Tese** (Doutorado): Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP – São Paulo. 152p., 1999.

COMBS, G. F.; COMBS, S. B. 1986. The role of selenium in nutrition. **Academic Press Inc**, Orlando, 532p.

CRISTALDI, L., A. et al. Tolerance of inorganic selenium in wether sheep. **Small Ruminant Research**, v.56, p.205- 213, 2005.

CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCÓPIO, J. Entendendo a Gordura – **Os Ácidos Graxos**. 1.ed, Ed. Manole, Barueri, 2002.

CUVELIER, M.E.; BONDETY, V.; BERSET, C. Behavior of phenolic antioxidants in a portioned medium: Structure-activity relation-ship. **Journal American Oil Chemical Society**, v.77, p.819-823, 2000.

DANIELS, L.A. Selenium metabolism and bioavailability. **Biological Trace Element Research**, v.54, p.185-199, 1996.

DAUN, C.; AKESSON, B. Glutathione peroxidase activity, and content of total and soluble selenium in five bovine and porcine organs used in meat production. **Meat Science**, v.66, p.801-807, 2004.

DUNCAN, J.R.; PRASSE, K. W. Veterinary Laboratory Medicine, ed. 2, Ame. IA, **Iowa State University Press**, p.6, 1986.

ECONOMOU, K. D.; OREOPOLOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. Antioxidant activity of some plant extracts of the family labiateae. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champaign, v.69, n.2, p.109-113, 1991.

EKHOLM, P. Transport of feed selenium to different tissues of bulls. **British Journal of Nutrition**, v.66, p.49-55, 1991.

ESTERBAUER, H.; GEBICKI, J., PUHL, H.; JÜRGENS, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Rad Biol Med** 13, 1992.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. 1997 Bioavailability assay for determination of availability of selenium for restoring blood plasma glutathione peroxidase activity in selenium-depleted chicks. **J. Nutr.** v.51, suppl.1, p.20-23.

FERREIRA, A. L.; A, MATSUBARA, L. S. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Méd. Brasil** , v.47, p.61-68, 1997.

FISHER, L.J. The effect of added dietary selenium on the selenium content of milk, urine and feces. Canadian **Journal of Animal Science**, v.60, p.79-86, 1980.

FRANKEL, E. N.; HUANG, S. W.; AESCHBACH, R.; PRIOR, E. Antioxidant activity of a rosemary extracts and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid in bulk oil and oil-in-water emulsion. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.44, p.131-135, 1996.

FRANKEL, E.N.; HUANG,S.W.; AESCHBACH,R. et al. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.131-135, 1996.

GIERUS, M. Selenium supplementation and selenium status of dairy cows fed diets based on grass, grass silage or maize silage. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.86, p.74-82, 2002.

GÓMEZ, M. E. D. B. Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta. I. Estabilidade oxidativa. **Tese** (Doutorado): Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. 149 p.2003.

GUO, X.; WU, L. Distribution of free seleno-amino acids in plant tissue of *Melilotus indica* L. grown in selenium-laden soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.39, p.207- 214, 1998.

GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. **Free Radicals Research Community**, v. 19, p.598-620, 1993.

HERDT, T.H.; RUMBEIHA, W.; BRASELTON, W. E. The use of blood analyses to evaluate mineral status in livestock. **Vet. Clin North Am Food Anim Pract**, v.16, p. 423-444, 2000.

HIDIROGLOU, M.; LESSARD, J.R. The effect of selenium or vitamin E supplementation on volatile fatty acid content of rumen liquor in sheep fed a purified diet. **International Journal for Vitamin and Nutritional Research**, v.46, p.458-463, 1976.

HO, C. T. Phenolic compounds in food-an overview. In: HO, C. T., LEE, C. Y., HUANG, M. T. Phenolic compounds in food their effects on health. Washington: **American Chemical Society**, 1992. p.2-7. (ACS Symposium Series, n.506).

HRAS, A. R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistics effects of rosemary extract with α – tocopherol, ascorbyl and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 71, n.2, p.229-233, 2000.

JANGHORBANI, M. et al. The selenite-exchangeable metabolic pool in humans: a new concept for the assessment of selenium status. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.51, p.670-677, 1990.

KARAKAYA, S. *et al.* A. antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. **J. Food Sci. Nutr.** v.52, p. 501-508, 2001.

KIM, H. *et al.* Studies on the effects of selenium on rumen microbial fermentation in vitro. **Biological Trace Element Research**, v.56, p.203-213, 1997.

KOENIG, K.M. *et al.* Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep. **Journal of Animal Science**, v.75, p.817-827, 1997.

KOWALE B. N.; RAO V. K.; BABU N. P. Lipid oxidation and cholesterol oxidation in mutton during cooking and storage. **Meat science** v.43. p.195-202, 1996.

KRAUSE, E. L.; TERNES, W. Bioavailability of the antioxidative Rosmarinus officinalis compound carnosic acid in eggs. **European Food Research and Technology**, 210 (3): 161-164, 2000.

LAGOURI, V.; BOSKOU, D. Nutrient antioxidants in oregano. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, London, v.47, p.493-497, 1996.

LAWLER, T. L. *et al.* Effect of supranutritional and organically bond selenium on performance carcass characteristics, and selenium distribution in fishing beff steers. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p.1488-1493, 2004.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas/ Francisco José de Abreu Matos/ Primeira Edição/ Instituto Plantarum/Nova Odessa/ 512 pp. 2006.

LUCCI, C.S.; MOXON, A.L.; ZANETTI, M.A.; FUKUSHIMA, R.S.; SCHALCH, E.; PETTINATI, R.L. Selênio em bovinos leiteiros do estado de São Paulo. I. Níveis de selênio em soros sanguíneos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade de São Paulo, v.21, n.1, p.65-70, 1984b.

LUCCI, C.S.; SCHALCH, E.; ZANETTI, M.A.; PETTINATI, R.L.; OSTRONOFFI, S. Selênio em bovinos de leite em Itirapina. estado de São Paulo. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.22, n.6, p.653-656, 1987.

LYNCH, M.; P. KERRY, J. P.; BUCKLEY, D. J.; FAUSTMAN, C.; MORRISEY, P. A. Effect of dietary vitamin E supplementation on the colour and lipid stability of fresh, frozen and vacuum-packaged beef. **Meat Science**, v.52, p.95-99, 1999.

MADSEN, H. L.; SORENSEN, B.; SKIBSTED, L. H.; BERTELSEN, G. The antioxidative activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in dressing stored exposed to light or in darkness. **Food Chemistry**, v.63, m.2, p.173-180, 1998.

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends of Food Science and Technology**, v.6, n.8, p.271-7, 1995.

MANCINI-FILHO, J., VAN-KOIJ, A., MANCINI, D.A.P., COZZOLINO, F.F., TORRES, R.P. Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*, Breyne) extracts. *Boll. Chim Farmac.*, Milano, v.137, n.11, p.443-447, 1998.

MAUS, R.W. et al. Relationship of dietary selenium in plasma and milk from dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.532-537, 1980.

McDOWELL, L. R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**. Academic Press. New York. 1992.

MEYDANI, S. N. Effect of (n-3) polyunsaturated fatty acids on cytokine production and their biologic function. **Nutrition**, New York, v.12, p.S8-S14, 1996.

MILLER, J.K. et al. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*, v.76, p.2812-2823, 1993.

MORAES, S.S. et al. Microelement deficiencies and imbalances in cattle and sheep in some regions of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.19, n.1, p.19-33, 1999.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, M.J.; PARAJO, J.C. Natural antioxidants from residual resources. *Food Chemistry- Review*. n.72. p.145-171, 2001.

MURRAY, R. K.; GRANNER D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. Harper:

Bioquímica. 8.ed - São Paulo :Atheneu ,1998.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Lauderdale, v.29, n.4, p.273-300, 1990.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL 2000. **Nutrient requirements of cattle**. National Academy Press, Washington.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL Selenium in Nutrition National Academy Press., Washington, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Selenium in Nutrition National Academy Press., Washington, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1983. Selenium in Nutrition. National Academy Press, Washington. 174p.

NAWAAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p.225-319. Food science and technology.

NURNBERG, K.; WEGNER, J.; ENDER, K. Factors influencing fat composition in muscle and adipose tissue of farm animals. **Liv. Produc. Sci.**, v.56, p.145-156, 1998.

OFFORD, E. A.; GUILLOT, F.; M, AESCHABACH, R.; LÖLIGER, J.; PFEIFER, A. M. A. Antioxidant and biological properties of rosemary components: implications for food and health. In: SHAHIDI, F., ed. Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications. Champaign: **AOCS**, Press, 1997. p.88-96.

OLSON, O. E.; PALMER, I. S.; CARY, E. E. Modification of the official fluorimetric method for selenium in plants. **J. assoc. Off. Agric. Chem.**, v.58, n.1, p.117-121. 1975.

OMAYE, S. T. and TAPPEL. 1974 Effect of dietary selenium on glutathione peroxidase in the chick. **J. Nutr.**, v.104, p.747.

O'GRADY MN, MONAHAN F.J.; BURKE R.M.; ALLEN P. The effect of oxygen level and exogenous α -tocopherol on the oxidative stability of minced beef in modified atmosphere packs. *Meat Sci.* 2000; 55(1): 39-45.

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

PAPAS, A.M. 1999. Diet and antioxidant status. *Food Chemistry Toxicol*, 37: 999-1007.

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**, v.43, n. 1 p.69-83. 2004.

ROTRUCK, J. T.; POPE, A. L.; GANTHER, H. E.; SWANSON, A. B.; HAFEMAN, D. G.; HOEKSTRA, W. G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, v.179, p.588-590, 1973.

ROVER Jr, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema Antioxidante Envolvendo o Ciclo Metabólico da Glutathione Associado a Métodos Eletroanalíticos na **Avaliação do Estresse Oxidativo**. *Quim. Nova*, v.24, n.1, p.112-119, 2001.

SANT'ANA, L. S. Ação antioxidante de extratos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em filés de peixes da espécie pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.2, n.1, p.27-31, 1999.

SAS Institute Inc., SAS Stat Guide, Release 6.03 Edition. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1988. 1028p.

SEN, C. K. Nutritional biochemistry of cellular glutathione. *Nutritional Biochemistry*. 8:660-672, 1997.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J. P. D. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Lauderdale, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Quim. Nova**, São Paulo, v.22, n.1, p.94-103, 1999.

STOWE, H. D.; HERDT, T. H. Clinical assessment of selenium status of livestock.

Journal of Animal Science., v.70, p.3928-3933, 1992.

SUNDE, R. A.; AND W. G. HOEKSTRA. Incorporation of selenium from selenite and selenocystine into glutathione peroxidase in the isolated perfused rat liver. **Biochem.**

Biophys. Res. Commun., v.93, p.1181-1188, 1980.

SUZUKI, K.T. Metabolomics of selenium: Se metabolites based on speciation studies.

Journal of Health Science, v.51, p.107-114, 2005.

SWORD Jr.; J. T. et al. Effect of calcium phosphates and zinc in salt-mineral mixtures on ad libitum salt-mix intake and on zinc and selenium status of sheep. **Journal of**

Animal Science, v.59, p.1594-1600, 1984.

TARLADGIS, B. G.; WATTS, B. M.; YOUNATHAN, M. T.; DUGAN, L. A. Distillation

method for the quantitative determination of malomaldehyde in rancid foods. **Journal of**

American Oils Chemist's Society. Champaign, v.37, n.1, p.44-48, 1960.

TERRY, N. et al. Selenium in higher plants. Annual Review of Plant Physiology and

Plant Molecular Biology, v.51, p.401-432, 2000.

TOLEDO, L.R.A. Distribution of supplemental selenium in serum, hair, colostrum and

fetus of dairy cows. Ph.D. **thesis**. Purdue University, 1984.

THOMAS, G. Medicinal chemistry: an introduction. Chichester, New York: Wiley and Sons, 2000. p.23-48.

TRINDER. N.; WOODHOUSE. C.D.; RENTON. C.P. 1973 The relationship between the intake of selenium and vitamin E on the incidence of retained placental in dairy cows. **Vet. Rec.** v.93. p.641-645. 1973.

UDEN, P.C. et al. Selective detection and identification of Se containing compounds—review and recent developments. **Journal of Chromatography A**, v.1050, p.85–93, 2004.

ULLREY, D. E. Biochemical and physiological indicators of selenium status in animals. **Journal of Animal Science**, v. 65, p.1712-1726, 1987.

VALK, E. E.; HORSTRA, G. Relationship between vitamin E requirement and polyunsaturated fatty acid intake in man: a review. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.**, v.70, p. 30-41, 2000.

Van RYSSSEN, J. B. J.; DEAGEN, J. T.; BEILSTEIN, M. A.; WHANGER, P. D. Comparative metabolism of organic and inorganic selenium by sheep. **J. Agric. Food Chem.**, v.37, p.1358-1363, 1989.

VENDELAND, S.C. et al. Uptake of selenite, selenomethionine and selenate by brush border membrane vesicles isolated from rat small intestine. **Biometals**, v.7, p.305-312, 1994.

WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; SHAHIDI, F.; SHUKLA, V. K. S. Endogenous antioxidants from oilseeds and edible oils. **Food Rev. Int.**, v.13, n.2, p.225-292, 1997.

WANASUNDARA, U. N., SHAHIDI, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chem.**, Kidlington, v.63, n.3, p.335-342, 1998.

WHANGER, P. D.; WESWIG, P. H.; MUTH, O. H. Metabolism of ⁷⁵Se-selenite and ⁷⁵Se-selenomethionine by rumen microorganisms. **Fed. Proc.**, v.27, p.418, 1968.

WISEMAN H, HALLIWELL B. DAMAGE to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role of inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 1996; vol. 313. p.17-29.

WONG, J. W.; HASHIMOTO, K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidants activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model meat system. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Washington, v.43, n.10, p.2707-2712, Oct., 1995.

YANG, X. et al. Determination of the selenomethionine content in grain and human blood. *Wei Sheng Yen Chiku*, Beijing, v.26, p.113-116, 1997.

ZANETTI, M. A.; LUCCI, C.S.; MEIRELLES, G.J.R. Selênio em bovinos leiteiros do estado de São Paulo. V. Suplementação de selênio para vacas em fase final de gestação. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade de São Paulo, v.21, p.141-145, 1984.