

NÍVEIS PLASMÁTICOS DE α E γ -TOCOFEROL DE NOVILHOS
TRATADOS COM UMA ÚNICA DOSE DE DESTILADO DA
DESODORIZAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA (DDOS).

Parecer

Este exemplar corresponde a versão final da tese defendida por José Ricardo Zebende Bórher e aprovada pela
Tese apresentada à FEA-UNICAMP pelo Médico Veterinário José Ricardo Zebende Bórher para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, sob a orientação da Prof. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves.

Coccião Julfaolva
em 20.12.95

Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves

Campinas - 1995

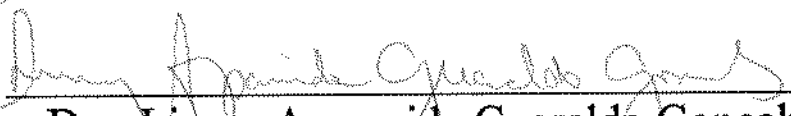
**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP**

B735n	Borher, José Ricardo Zebende Níveis plasmáticos de α e γ-tocoferol de novilhos tratados com uma única dose de destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS)/José Ricardo Zebende Borher. -- Campinas, SP: [s.n.], 1995. Orientador: Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves Dissertação (mestrado)-Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos. 1.Soja. 2.Desodorização. 3.Vitamina E. 4.Bovino. I.Gonçalves, Lireny Aparecida Guaraldo. II.Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.
--------------	---

UNIDADE <u>BC</u>	
N.º CHAMADA: <u>UNICAMP</u>	
<u>B644n</u>	
V. <u>1</u>	Ex. <u>1</u>
TOMBO BC/ <u>26721</u>	
PROC. <u>667/96</u>	
C ☐	D ☒
PREÇO <u>R\$ 11,50</u>	
DATA <u>7/2/96</u>	
N.º CPD. <u> </u>	

CM-00083614-1

BANCA EXAMINADORA



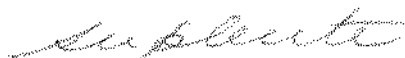
Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves



Dr. Pedro Eduardo de Felício



Dr. Olavo Rusig



Dr. Daniel Barrera-Arellano

Campinas 20 de dezembro de 1995.

As minhas filhas:

Mariana,
Lívia e
Luísa,

dedico

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves pela amizade apoio e orientação, imprescindíveis para a execução deste trabalho.

Aos demais membros da banca examinadora pelas correções e sugestões apresentadas a versão inicial deste trabalho, em especial ao Prof. Dr. Pedro Eduardo de Felício pela intermediação na obtenção dos animais para o experimento, pelo apoio e incentivo.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP em especial ao Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) pela qualidade dos conhecimentos adquiridos no decorrer deste curso.

A Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga pela utilização do espaço físico e dos animais bem como o apoio dos corpo técnico, em especial a Armando Vansan Filho, João Santana, Ismael Catice, Maria Cecília Martins Guimarães, Maria José Metzner do Nascimento, Ubiraem Mario Schalch e Fernando Schalch que foram de grande valia para a execução da fase inicial deste trabalho.

Ao Prof. Carlos Anjos pela amizade durante estes anos, aos funcionários do DTA em especial a Marlene e Marçal. A minha família e todos os amigos que de alguma forma participaram na minha formação pessoal e profissional o meu profundo agradecimento.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE TABELAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMO	IX
SUMMARY	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 VITAMINA E	4
2.1.1 ABSORÇÃO	7
2.1.1.1. CINÉTICA DA ABSORÇÃO	7
2.1.1.2. EFICIÊNCIA DA ABSORÇÃO	9
2.1.1.3. INIBIDORES DE ABSORÇÃO E CONSUMIDORES DE VITAMINA E	10
2.1.1.4. SÍTIO DE ABSORÇÃO	10
2.1.2. DISTRIBUIÇÃO	11
2.1.2.1. TRANSPORTE NA LINFA	11
2.1.2.2. TRANSPORTE E CONCENTRAÇÃO NO SANGUE	11
2.1.2.3. DISTRIBUIÇÃO NOS TECIDOS	12
2.1.3. VIAS DE EXCREÇÃO	13
2.1.4. PROBLEMAS COM A INGESTÃO ELEVADA	13
2.1.5 REQUERIMENTOS DE VITAMINA E	13
2.2. DETERMINAÇÃO DE TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS	14
2.3. OXIDAÇÃO DO α -TOCOFEROL "IN VIVO" E "IN VITRO"	15
2.4. INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS	16
2.5. FORMAÇÃO DE NITROSAMINAS	17
2.6. LIPÍDEOS	18
2.6.1. LIPÍDEOS NA ESTRUTURA MUSCULAR	18
2.6.2. COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO MÚSCULO	19
2.6.3. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS	22
2.6.3.1. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DE BOVINOS	22

2.7. COMPOSIÇÃO EM FOSFOLIPÍDEOS	24
2.8. OXIDAÇÃO.....	27
2.8.1. OXIDAÇÃO DE CARNES MECANICAMENTE SEPARADAS	27
2.8.2. OXIDAÇÃO DE CARNES COMINÚIDAS.....	28
2.8.3. EFEITOS DO COZIMENTO SOBRE A OXIDAÇÃO LIPÍDICA	28
2.8.4. MUDANÇAS NA COLORAÇÃO	29
2.9. INTERAÇÕES ENTRE LIPÍDEOS E PROTEÍNAS.....	30
2.10. SUPLEMENTAÇÃO DE TOCOFEROL NA DIETA COM OBJETIVOS TECNOLÓGICOS	30
2.11. FORNECIMENTO DE LIPÍDEOS NA DIETA ANIMAL	33
2.11.1. MUDANÇA NA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (Redução da Estabilidade Oxidativa).....	33
2.11.2. FORNECIMENTO DE LIPÍDEOS NA DIETA ANIMAL + TOCOFEROL.....	34
2.11.3 FORNECIMENTO DE LIPÍDEOS NA DIETA DE RUMINANTES	36
2.11.4. EFEITO DA INGESTÃO DE LIPÍDEOS E α -TOCOFEROL SOBRE O RÚMEN.....	36
2.12. PROCESSO FERMENTATIVO NO RÚMEN (Absorção de Ácidos Graxos Voláteis).	37
2.13. USO DO TOCOFEROL "IN VITRO".	38
2.13.1. EFEITO DO α -TOCOFEROL EM BANHOS SUPERFICIAIS, NA ESTABILIDADE DE CORTES DE CARNE ESTOCADOS.	39
2.13.2. INTERAÇÃO COM OUTROS ANTIOXIDANTES.....	40
2.14. VITAMINA E NA DIETA ANIMAL	41
2.15. DEFICIÊNCIAS.....	42
2.15.1. RETENÇÃO DE PLACENTA	43
2.15.2. MASTITE.....	44
2.15.3. REPRODUÇÃO E LACTAÇÃO.....	44
2.15.4. IMUNOLOGIA.....	44
2.15.5. DISTROFIA MUSCULAR NUTRICIONAL.....	45
2.16. DDOS COMO FONTE DE VITAMINA E.....	46
2.16.1. OBTENÇÃO DO DDOS.....	46
2.16.2. COMPOSIÇÃO DO DDOS.....	46
2.17. VALORES DE α -TOCOFEROL PLASMÁTICO EM RUMINANTES.....	47
2.17.1. AUMENTO DOS VALORES PLASMÁTICOS DE α -TOCOFEROL	47

3. MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1. MATERIAL	51
3.1.1. MATÉRIA PRIMA	51
3.1.2. REAGENTES E PADRÕES	52
3.1.3. EQUIPAMENTOS.....	52
3.2. MÉTODOS	53
3.2.1. DETERMINAÇÃO DE TOCOFERÓIS	53
3.2.1.1. FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DE TOCOFERÓIS.....	55
3.2.1.2. CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES DE TOCOFERÓIS.....	56
3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	56
3.3.1. DISTRIBUIÇÃO DOS INDIVÍDUOS	56
3.3.2. DETERMINAÇÃO DAS DOSES DE DDOS.....	57
3.3.3 COLETA DE SANGUE.....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1. CURVAS PADRÃO.....	60
4.2. CROMATOGRAMAS.....	62
4.3. VALORES OBTIDOS PARA ABSORÇÃO DE α -TOCOFEROL	67
4.4. VALORES OBTIDOS PARA ABSORÇÃO DE γ -TOCOFEROL	72
4.5. VALORES OBTIDOS PARA ABSORÇÃO DE VITAMINA E	77
5. CONCLUSÕES.....	85
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 : Classificação dos tocoferóis de acordo com a disposição de grupos metila	5
Tabela 2 : Biopotência dos constituintes individuais da família da vitamina E.....	6
Tabela 3 : Comparação do Método Colorimétrico, CG e CLAE para determinação de tocs	15
Tabela 4 : Alguns processos tecnológicos que influenciam a perda de vitamina E pelo alimento processado.....	17
Tabela 5 : Influência do conteúdo lipídico do músculo e do tipo de músculo sobre a quantidade de lipídeos neutros e fosfolipídeos intramusculares.	21
Tabela 6 : Composição de ácidos graxos de quatro músculos bovinos Longissimus-dorsi (LD), Psoas major (PM), Semimembranosus (SM) e Semitendinosus (ST)..	23
Tabela 7 : Teor de lipídeos e fosfolipídeos dos músculos das principais espécies de interesse zootécnico.....	25
Tabela 8 : Composição em ácidos graxos dos fosfolipídeos dos músculos glicolíticos das principais espécies de interesse zootécnico (em % de ácidos graxos presentes nos fosfolipídeos).....	26
Tabela 9 : Destino dos ácidos graxos voláteis para produção de energia nos ruminantes .	38
Tabela 10 : Notas do painel de teste de carne moída de suíno crua adicionada de α -tocoferol e estocada a 4° ou -20°C.....	39
Tabela 11 : Enfermidades consideradas como causadas por ou associadas a uma deficiência de selênio ou vitamina E, isoladamente, ou de ambas (incluindo as enfermidades "responsivas ao selênio").....	43
Tabela 12 : Valores médios de α -tocoferol ($\mu\text{g/dL}^2$ no soro) de bezerros de vacas de leite após administração de α -tocoferol em dose única semanal.	45
Tabela 13 : Componentes principais do DDOS.....	47

Tabela 14 : Porcentagem dos tocoferóis encontrados no DDOS.	51
Tabela 15 : Distribuição e peso dos animais em experimento e respectivas doses de DDOS, α -tocoferol, γ -tocoferol e vitamina E correspondente ao teor total de α e γ -tocoferóis aplicados.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 :** Fórmula estrutural básica dos tocoferóis e tocotrienóis (KASPAREK, 1980).5
- Figura 2 :** Esquema representativo da dinâmica de absorção e distribuição de uma droga pelo organismo (COHN, 1971).8
- Figura 3 :** Concentração ($\mu\text{g/mL}$) de tocoferol no plasma em bovino após administração de uma única dose (50mg/kg de peso vivo) de acetato de dl- α -tocoferol ou dl- α -tocoferol. média aritmética (—) e desvio padrão (---).49
- Figura 4 :** Fluxograma de extração de tocoferóis do DDOS e PLASMA para análise em CLAE.....55
- Figura 5 :** Curva Padrão de α -tocoferol, concentração variando de 2 a 12,37 $\mu\text{g/mL}$ e áreas obtidas de 125728 a 1060304 u.a. respectivamente.60
- Figura 6 :** Curva Padrão de γ -tocoferol, concentração variando de 1,03 a 10,15 $\mu\text{g/mL}$ e áreas obtidas de 112495 a 1195020 u.a. respectivamente.61
- Figura 7 :** Cromatograma de uma solução padrão contendo α e γ -tocoferol diluídos em n-hexano, obtido em cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Isocratic LC Pump 250, equipado com espectrofotômetro UV/visível Perkin-Elmer LC 290, absorbância a 292 nm. Em condições isocráticas, coluna Perkin-Elmer C18-SIL x 10 fase reversa 250 x 4,6 mm, fase móvel metanol/água 97:3.....63
- Figura 8 :** Cromatograma de uma amostra de DDOS mostrando os picos de α , γ e δ -tocoferol, obtido em cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Isocratic LC Pump 250, equipado com espectrofotômetro UV/visível Perkin-Elmer LC 290, absorbância a 292 nm. Em condições isocráticas, coluna Perkin-Elmer C18-SIL x 10 fase reversa 250 x 4,6 mm, fase móvel metanol/água 97:3.....64
- Figura 9 :** Cromatograma de uma amostra de plasma bovino, proveniente de um novilho, coletada no tempo 0 (zero) antes de receber suplementação com DDOS, obtido em cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Isocratic LC Pump 250, equipado com espectrofotômetro UV/visível Perkin-Elmer LC 290, absorbância a 292 nm. Em

condições isocráticas, coluna Perkin-Elmer C18-SIL x 10 fase reversa 250 x 4,6 mm, fase móvel metanol/água 97:3.....65

Figura 10 : Cromatograma de uma amostra de plasma bovino proveniente de um novilho que recebeu uma dose única oral de DDOS, contendo 45 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo e 195 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo, coletada após 38 horas, obtido em cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Isocratic LC Pump 250, equipado com espectrofotômetro UV/visível Perkin-Elmer LC 290, absorvância a 292 nm. Em condições isocráticas, coluna Perkin-Elmer C18-SIL x 10 fase reversa 250 x 4,6mm, fase móvel metanol/água 97:3.....66

Figura 11 : Curva de absorção plasmática de α -tocoferol obtida de novilhos nelore (n^{os} 99, 98 e 76) que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 15 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo a 22,35 UI de vitamina E/kg de peso vivo).....68

Figura 12 : Curva de absorção plasmática de α -tocoferol obtida de novilhos nelore (n^{os} 52 e 110) que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 30 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo a 44,70 UI de vitamina E/kg de peso vivo).....69

Figura 13 : Curva de absorção plasmática de α -tocoferol obtida de novilhos nelore (n^{os} 74 e 197) que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 45 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo a 76,05 UI de vitamina E/kg de peso vivo).....70

Figura 14 : Médias das curvas de absorção plasmática de α -tocoferol obtidas de novilhos nelore n^{os} 99, 98 e 76; 52 e 110 e 74 e 197 que receberam respectivamente uma dose única oral de DDOS contendo 15, 30 e 45 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo respectivamente a 22,35; 44,70 e 76,05 UI de vitamina E/kg de peso vivo).....71

Figura 15 : Curva de absorção plasmática de γ -tocoferol obtida de novilhos nelore n^{os} 99, 98 e 76 que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 65 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo a 19,5 UI de vitamina E/kg de peso vivo).....73

- Figura 16 :** Curva de absorção plasmática de γ -tocoferol obtida de novilhos nelore n^{os} 52 e 110 que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 130 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo a 39,0 UI de vitamina E/kg de peso vivo).....74
- Figura 17 :** Curva de absorção plasmática de γ -tocoferol obtida de novilhos nelore n^{os} 74 e 197 que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 195 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo a 58,5 UI de vitamina E/kg de peso vivo).....75
- Figura 18 :** Médias das curvas de absorção plasmática de γ -tocoferol obtidas de novilhos nelore n^{os} 99, 98 e 76; 52 e 110 e 74 e 197 que receberam respectivamente uma dose única oral de DDOS contendo 65, 130 e 195 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo respectivamente a 19,5; 39,0 e 58,5 UI de vitamina E/kg de peso vivo).....76
- Figura 19 :** Curva de absorção plasmática de vitamina E obtida de novilhos nelore n^{os} 99, 98 e 76 que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 41,85 UI de vitamina E/kg de peso vivo.....78
- Figura 20 :** Curva de absorção plasmática de vitamina E obtida de novilhos nelore n^{os} 52 e 110 que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 83,70 UI de vitamina E/kg de peso vivo.79
- Figura 21 :** Curva de absorção plasmática de vitamina E obtida de novilhos nelore n^{os} 74 e 197 que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 125,50 UI de vitamina E/kg de peso vivo.....80
- Figura 22 :** Médias das curvas de absorção plasmática de vitamina E obtidas de novilhos nelore n^{os} 99, 98 e 76; 52 e 110 e 74 e 197 que receberam respectivamente uma dose única oral de DDOS contendo 41,85; 83,70 e 125,50 UI vitamina E/kg de peso vivo.....81

RESUMO

O efeito do tratamento com uma única dose oral de Destilado da Desodorização do Óleo de Soja (DDOS) sobre as concentrações plasmáticas de α e γ -tocoferol, foram estudados em nove novilhos nelore (*Bos Indicus*) de aproximadamente 2 anos de idade.

O DDOS, contendo 1,95 % de α -tocoferol e 8,45 % de γ -tocoferol foi fornecido a três grupos, compostos por três animais, nas doses de 0,75, 1,50 e 2,25 g de DDOS/kg de peso vivo, com objetivo de promover um incremento na concentração plasmática de vitamina E. As três doses de DDOS corresponderam respectivamente a 15, 30 e 45 mg/kg de α -tocoferol mais 65, 130 e 190 mg/kg de γ -tocoferol equivalendo a um total de 41,85; 83,7 e 125,5 UI de vitamina E/kg.

Os níveis plasmáticos de α e γ -tocoferol foram obtidos de amostras de sangue coletadas no tempo zero e após 14, 23, 38 e 62 horas decorridas do tratamento. As amostras de sangue foram centrifugadas para a obtenção da fração plasmática que foi estocada sob congelamento a -20°C até o momento da análise.

As análises dos teores de α e γ -tocoferol do DDOS e do plasma foram precedidas de uma etapa de extração (n-hexano), filtração, evaporação do solvente por arraste de vapor (N₂) e concentração (n-hexano) sendo então realizadas por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) em coluna de C18, fase reversa, usando um detector de UV (absorbância a 292 nm), a fase móvel utilizada foi metanol água 97:3.

Os resultados obtidos demonstraram o aparecimento de níveis elevados de γ -tocoferol no plasma bovino, o que antes não ocorria, e um significativo aumento nos teores plasmáticos iniciais de α -tocoferol. Os aumentos foram detectados já nas primeiras 14 horas com absorção máxima compreendida entre 38 e 62 horas, dependendo da dose e do tocoferol considerado. A elevação do teor de vitamina E foi de até 4 vezes o teor inicial, o que demonstrou a elevada capacidade do DDOS como fonte de vitamina E para bovinos em dose única visando a elevação dos níveis plasmáticos de vitamina E e conseqüentemente aumento nos níveis teciduais. Estes resultados abrem uma nova perspectiva tecnológica, para melhoria da qualidade e incremento nutricional da carne bovina, que pode ser adotada na fase de pré-abate

SUMMARY

Effect of the treatment of steers with a single oral dose of soybean oil deodorizer distillate (SODD) on the α and γ tocopherol blood plasma concentrations, was studied.

SODD containing 1.95 % of α -tocopherol and 8.45 % of γ -tocopherol in doses of 0.75, 1.50 or 2.25g/kg live wt.. was used to treat nine 2 yr old Nelore (*Bos indicus*) steers to promote increases in the plasma concentration of vitamin E with a single oral treatment. The three SODD doses would correspond to 15, 30 and 45mg/kg of α -tocopherol, plus 65, 130 and 190mg/kg γ -tocopherol, being equivalent to 41.85, 83.7 and 125.5 UI of vitamin E/kg.

Plasma level increases were estimated from blood plasma samples collected at zero time, and after 14, 23, 38, 47 and 62 hours, which were centrifuged to separate the blood plasma fraction. Plasma samples were kept frozen at -20°C until analysed.

Tocopherol analyses of the SODD and plasma consisted of n-hexane extraction, filtration, evaporation and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) on a C18 column, using a UV detector and Absorbance readings at 292nm. Methanol:water 97:3 was the mobile phase used.

The results showed that a single oral treatment of steers with SODD produced significant increases in plasma α and γ tocopherol levels in the first 14 hours, with maximum absorption between 38 and 62 hours, as a function of dose and tocopherol in question. The vitamin E content increased four times, showing the high capacity of SODD as a source of vitamin E for bovines in a single oral dose with the objective of increasing vitamin E blood plasma concentrations and consequently the levels in the tissues, as well.

These results represent a new technological approach that can be used before slaughter to improve the quality and nutritional value of meat.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A oxidação de lipídeos em alimentos tem atraído a atenção dos pesquisadores, devido a evidências de efeitos adversos à saúde humana associados ao consumo de lipídeos oxidados (PEARSON *et al.*, 1983; SEVANIAN & PETERSON, 1986), particularmente os produtos da oxidação do colesterol (MONAHAN *et al.* 1992b). A conscientização quanto aos possíveis riscos à saúde decorrentes do consumo de produtos de oxidação lipídica, com ênfase aos óxidos de colesterol em carne, têm motivado o desenvolvimento de pesquisas relacionadas a este tema (MONAHAN *et al.*, 1993).

Os radicais livres mediadores de peroxidação lipídica têm sido implicados em vários processos patológicos, incluindo inflamação, artrite reumatóide, aterosclerose, mutagênese e carcinogênese. A influência do fornecimento na dieta sobre estes processos é imensamente especulativa, mas malonaldeído, que é um dos principais radicais formados, tem demonstrado ser carcinogênico em ratos e também mutagênico em experiências realizadas com salmonelas, porém a validade destes resultados tem sido questionada por alguns autores (MONAHAN *et al.* 1992b).

Doenças cardíacas coronarianas são, na atualidade, uma das maiores causas de morte nos Estados Unidos e na maioria dos países industrializados sendo consenso entre os pesquisadores de que há inter-relação entre a incidência de doenças cardíacas coronarianas e o nível de colesterol no soro humano (RHEE *et al.*, 1990).

Estudos desenvolvidos em animais fornecem evidências mais convincentes de implicação da dieta com óxidos de colesterol como iniciadores de lesões ateroscleróticas em vasos sanguíneos (TAYLOR *et al.*, 1979). Produtos da oxidação de colesterol tais como óxidos de colesterol, têm sido detectados em diversos alimentos processados, incluindo leite em pó (NOROOZ-ZADEH & APPELQVIST, 1988), queijo ralado (FINOCCHIARO *et al.*, 1984), manteiga (CSIKY, 1982), produtos que contêm ovo em pó (MORGAN & ARMSTRONG, 1987), carnes cruas, cozidas e processadas (DAWSON & GARTNER, 1983; HIGLEY *et al.*, 1986; PARK & ADDIS, 1987; PIE *et al.*, 1991). PIE *et al.* (1991) e ENGESETH & GRAY (1994), constataram que produtos da oxidação de colesterol aumentam significativamente no cozimento de carnes e durante a subsequente estocagem sob refrigeração. A elevação dos níveis destes no plasma humano

tem sido correlacionada com o aumento do fornecimento de colesterol oxidado na dieta (EMANUEL *et al.*, 1991).

Várias pesquisas realizadas com carne têm enfocado os aspectos organolépticos da oxidação lipídica ocorrida durante a estocagem refrigerada e em produtos congelados (GRAY & PEARSON, 1987).

A formação de metamioglobina e a oxidação lipídica são os problemas mais importantes na manutenção da estabilidade de cortes de carne bovina estocados em bandejas sob refrigeração (MITSUMOTO *et al.*, 1991b).

O grau de oxidação lipídica em produtos cárneos depende de inúmeros fatores, incluindo o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados do músculo (ALLEN & FOEGENDING, 1981; TICHIVANGANA & MORRISSEY, 1985), a presença de pró-oxidantes, como ferro heme e não heme (RHEE & ZIPRIN, 1987; JOHNS *et al.*, 1989), ferritina (DECKER & WELCH, 1990; KANNER & DOLL, 1991) e a presença de antioxidantes (CORT, 1974). Embora a identidade dos iniciadores de oxidação em sistemas biológicos seja ainda um pouco obscura, os radicais livres naturais da oxidação lipídica, uma vez formados, têm prolongada estabilidade (ASGHAR *et al.*, 1988), sendo um agravante no processo de oxidação lipídica, uma vez que estes passam a ser agentes oxidantes.

Acredita-se que os principais sítios de oxidação lipídica no músculo são as membranas fosfolipídicas (IGENE *et al.*, 1980; PIKUL *et al.* 1984). O elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados contidos nos fosfolipídeos é responsável pela susceptibilidade destes à oxidação. A oxidação do colesterol do músculo, dos quais 60 a 80% estão associados com as membranas subcelulares (HOELSCHER *et al.*, 1988), pode ser iniciada por radicais livres gerados durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados vizinhos. Esta localização dos fosfolipídeos entre duas camadas de membranas celulares produz um meio de controle da oxidação lipídica, pelo uso de antioxidantes, diretamente no provável sítio de iniciação. A vitamina E (α -tocoferol) tem funções de anular radicais livres em tecidos biológicos (MACHLIN, 1984). Paralelamente os tecidos animais respondem a dietas com vários níveis de α -tocoferol (JENSEN *et al.*, 1988). A suplementação das dietas de suínos com α -tocoferol tem elevado o conteúdo deste nas membranas subcelulares dos músculos de suínos (MONAHAN *et al.* 1990).

O presente trabalho tem por objetivo avaliar a absorção plasmática de α e γ -tocoferóis em novilhos após administração em dose única, por via oral, de três doses de DDOS (Destilado da Desodorização do Óleo de Soja). Este procedimento em princípio, aqui é sugerido para a aplicação na fase de pré-abate de bovinos como alternativa de melhoria da qualidade da carne "in natura" visando uma melhor conservação.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 VITAMINA E

A vitamina E foi originalmente isolada de óleo de gérmen de trigo em 1936 (STINNETT, 1983). Atualmente, o termo vitamina E é aplicado a um grupo de compostos naturais, relacionados estruturalmente com o esqueleto básico do 6-cromanol, mas que apresentam diferenças no número e na posição dos grupos metila do núcleo croman, com a cadeia lateral isoprenóide podendo ser totalmente saturada (tocoferóis), ou triinsaturada nas posições 3', 7' e 11' (tocotrienóis).

A vitamina E ocorre na natureza e é composta de oito isômeros de tocoferóis (tocs) e tocotrienóis (toc-3s), denominados alfa (α), beta (β), gama (γ) e delta (δ)-toc e -toc-3, sendo que a distribuição dos toc-3s é limitada a algumas plantas e suas sementes, em quantidades muito baixas se comparadas com os tocs. Até o momento a presença de toc-3s em tecidos animais não foi detectada (UEDA & IGARASHI, 1990).

A figura 1 apresenta a fórmula estrutural de tocoferóis e tocotrienóis e a tabela 1 apresenta a disposição dos grupos metila ligados ao anel aromático na estrutura dos tocoferóis.

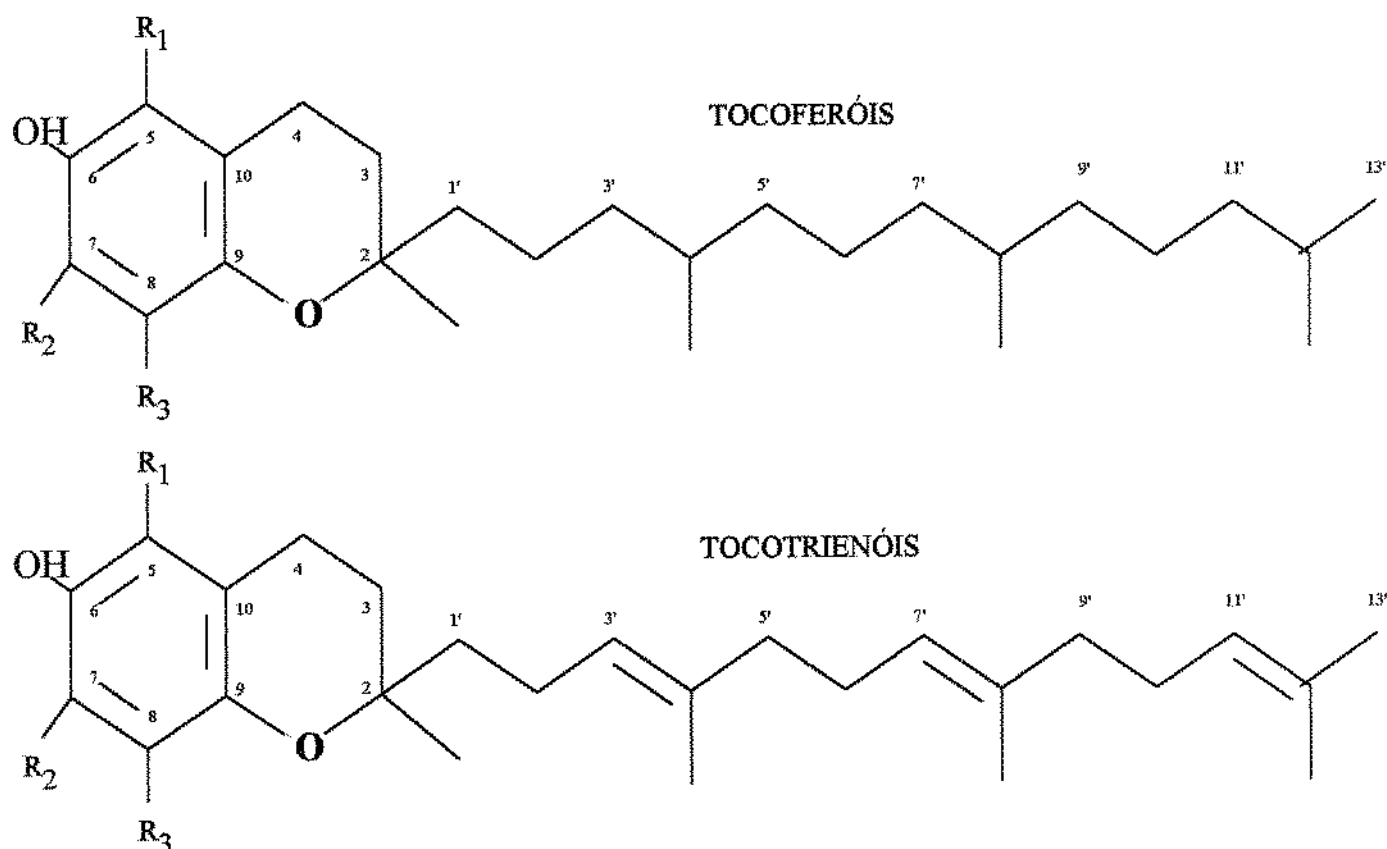


Figura 1 : Fórmula estrutural básica dos tocoferóis e tocotrienóis (KASPAREK, 1980).

Tabela 1 : Classificação dos tocoferóis de acordo com a disposição de grupos metila.

TOCOFEROL	NATUREZA DOS GRUPOS		
	R1	R2	R3
α -tocoferol (5,7,8 trimetiltocol)	CH3	CH3	CH3
β -tocoferol (5,8 dimetiltocol)	CH3	H	CH3
γ -tocoferol (7,8 dimetiltocol)	H	CH3	CH3
δ -tocoferol (8 metiltocol)	H	H	CH3

Fonte : KASPAREK (1980).

O α -tocoferol é o composto ativo identificado como vitamina E (STINNETT, 1983) mas outros tocoferóis apresentam também atividade de vitamina E como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 : Biopotência dos constituintes individuais da família da vitamina E.

COMPONENTES	ATIVIDADE VITAMÍNICA
d- α -tocoferol	1,49
d- β -tocoferol	0,75
d- γ -tocoferol	0,30
d- δ -tocoferol	0,15
d- α -tocotrienol	0,45
d- β -tocotrienol	nd
d- γ -tocotrienol	nd
d- δ -tocotrienol	nd

nd - Atividade não detectada

Fonte: CONTRERAS-GUZMÁN, (1980); MACHLIN, (1984).

Os tocoferóis ocorrem principalmente na forma não esterificada em produtos vegetais como castanhas, gramíneas, sementes, óleos e frutas. A variação do conteúdo de α -tocoferol nas gramíneas se dá conforme o período do ano e maturação. O crescimento, florescimento e produção de sementes em gramíneas reduz o conteúdo em tocoferóis das mesmas. Como o teor de vitamina E nos produtos de origem animal depende diretamente do fornecimento na dieta, o conteúdo de α -tocoferol em leite e manteiga é alto na produção de verão e baixo no inverno, principalmente em países com inverno mais rigoroso onde se utiliza alimento seco (feno) para o gado (BAUERNFEIND, 1980).

O papel bioquímico da vitamina E é considerado como o de um antioxidante, evitando lesão oxidativa de lipídeos sensíveis da membrana e diminuindo a formação de hidroperóxido. A vitamina E tem um papel central na proteção de membranas celulares da lipoperoxidação, especialmente membranas ricas em lipídeos insaturados,

como mitocôndrias, retículo endoplasmático e membranas plasmáticas.(BLOOD *et al.*, 1988).

Segundo BURGEOIS (1981) em níveis de 200 ppm, a ação antioxidante dos tocoferóis é a seguinte:

entre 80° e 120°C $\delta > \gamma > \alpha > \beta$

entre 20° e 60°C $\alpha > \gamma > \beta > \delta$

SHERWIN (1976) afirma que em óleos vegetais a ordem de atividade antioxidante para os diferentes tocoferóis é a seguinte $\delta > \gamma > \alpha$, mas esta ordem de potência antioxidativa em óleos vegetais pode ser influenciada significativamente pelas condições de temperatura e luminosidade.

Após cinco décadas de pesquisa sabe-se que a vitamina E é essencial para o funcionamento normal de células de plantas e tecidos animais (UEDA & IGARASHI, 1990). Não obstante tecidos animais e produtos alimentícios produzidos a partir de animais são geralmente muito pobres em vitamina E, pois os tocoferóis não são sintetizados por mamíferos (BAUERNFEIND, 1980).

2.1.1 ABSORÇÃO

2.1.1.1. CINÉTICA DA ABSORÇÃO

Na fase inicial do processo de absorção a molécula de vitamina E deve atravessar uma membrana celular (GALLO-TORRES, 1980a). As membranas celulares contêm grandes quantidades de fosfolípidos, colesterol e lípidos neutros em associação com proteínas e para que uma molécula possa atravessar uma membrana esta necessita primeiramente "dissolver-se" na membrana. A extensão que pode alcançar esta lipossolubilidade depende da solubilidade lipídica da molécula que é determinada pela presença de grupos lipofílicos (hidrofóbicos) ou não polares. Esta propriedade aumenta com

o aumento do comprimento da cadeia de acordo com os grupos alquilas presentes (COHN, 1971).



Quando a molécula contém elementos estruturais que permitem a ligação de hidrogênio com água as propriedades lipofílicas da molécula são reduzidas e a propriedade hidrofílica ou polar é aumentada. A polaridade é maior para moléculas ionizadas. A relação das propriedades de lipoficidade/hidroficidade ("solubilidade lipídica") da totalidade da molécula parece determinar se a molécula passará rapidamente através da membrana biológica por um processo passivo. Outros fatores que influenciam a polaridade de uma molécula são o pH do meio, tamanho e cadeia molecular (COHN, 1971). Um esquema simplificado da dinâmica da absorção e distribuição de uma droga no organismo pode ser visto na figura 2.

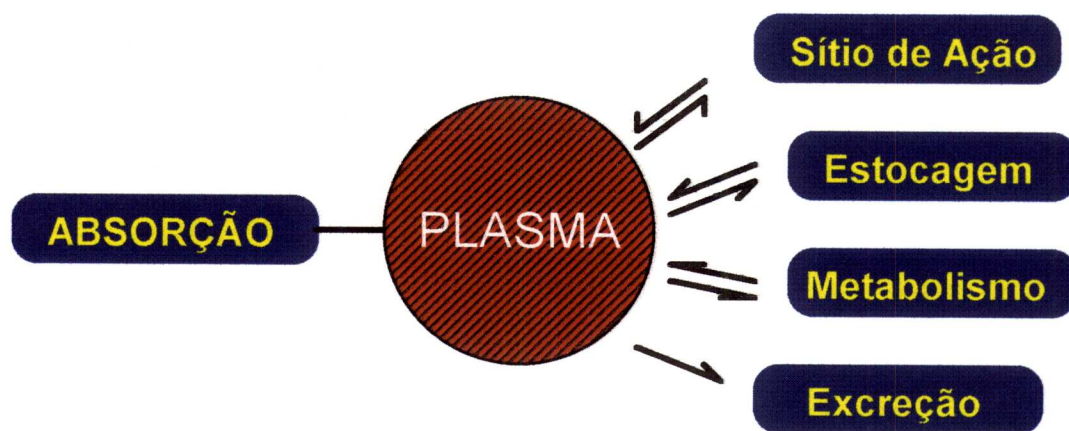


Figura 2 : Esquema representativo da dinâmica de absorção e distribuição de uma droga pelo organismo (COHN, 1971).

A movimentação aleatória de moléculas de uma região de alta para uma região de baixa concentração é denominada difusão e segundo COHN (1971) esta é a mais importante força de movimentação de drogas através da membrana. O grau de difusão fornece a capacidade total da difusão e depende da magnitude do gradiente de concentração através da membrana e da partição da molécula entre a membrana e a fase aquosa, a sua velocidade depende do coeficiente de difusão. O coeficiente de difusão é definido como o número de moles da droga que se difunde através da membrana numa unidade de área em uma unidade de tempo, quando o gradiente de concentração através da membrana é uniforme em relação às dimensões da área por unidade de tempo (ex: cm^2/seg). O coeficiente de difusão é difícil de ser avaliado devido a incerteza da estimativa da partição e do gradiente de concentração através da membrana.

2.1.1.2. EFICIÊNCIA DA ABSORÇÃO

Segundo GALLO-TORRES (1980a) existem poucos dados disponíveis para se avaliar a eficiência da absorção de vitamina E, que se dá em diferentes níveis de acordo com o tipo de tocoferol administrado. Embora o ganho de absorção varie com as condições experimentais, sabe-se que a absorção de α -tocoferol é limitada e que a eficiência de absorção de outros tocoferóis é baixa.

Como ocorre com todas as vitaminas lipossolúveis, a absorção de tocoferóis é dependente do sistema de transporte funcional de lipídeos no sítio de absorção intestinal. No entanto pouco se conhece a respeito deste metabolismo (STINNETT, 1983).

GALLO-TORRES (1980a) relata que a absorção depende ainda de fatores como dose administrada, inter-relação entre a velocidade de absorção e a velocidade do trânsito gastrointestinal bem como o tipo e a natureza do conteúdo intestinal e da presença de compostos que reagem com tocoferóis a nível intestinal e corpóreo. Outros fatores que também podem influenciar a absorção são: as variações individuais, peso, idade, hora da administração, presença de outros compostos que concorram pela absorção e pela ação da bile, fluxo sanguíneo e metabolismo tecidual (modificações sofridas dentro do tecido e metabolismo intermediário). Todos estes fatores podem interferir na concentração do α -tocoferol plasmático.

Estudos de balanço intestinal, medidas de distribuição no tecido e curvas de tolerância não são suficientes, por si só, para identificar os mecanismos de absorção da

vitamina E, por isso os níveis sanguíneos são muito utilizados como um critério de avaliação da absorção (GALLO-TORRES, 1980b).

A rápida remoção de α -tocoferol do plasma sanguíneo pelos tecidos corporais pode levar a baixas estimativas de absorção, pois a concentração de vitamina E no plasma, ou soro, é consequência do influxo ou afluxo desta dentro dos vários grupos de diferentes tecidos. A concentração de tocoferóis no tecido varia grandemente dependendo sobretudo do tempo decorrido após a administração de uma única dose oral (GALLO-TORRES, 1980b).

2.1.1.3. INIBIDORES DE ABSORÇÃO E CONSUMIDORES DE VITAMINA E

Segundo GALLO-TORRES (1980a) a existência de inibidores de absorção tem sido verificada em alfafa e certas leguminosas como feijão comum (feijão roxo) e ervilhas, produzindo uma redução do nível de tocoferol no plasma, quando incluídos na ração de carneiros adultos.

Os nitratos (presentes em vegetais) e os nitritos convertidos por microorganismos reduzem os estoques orgânicos de tocoferol agindo como consumidores de vitamina E (GALLO-TORRES, 1980a).

2.1.1.4. SÍTIO DE ABSORÇÃO

A região de maior absorção em ratos está compreendida entre o início e o terço medial do intestino delgado. Em ovelhas o jejuno é o maior sítio de absorção de vitamina E. A média de absorção para o segmento medial do intestino é maior que para os segmentos distal e proximal (GALLO-TORRES, 1980a).

Nos ruminantes, um fator muito importante na variação da velocidade e capacidade de absorção de vitamina E é o prolongado tempo de residência do conteúdo ruminal. O rúmen, além de reter os nutrientes dosifica a sua passagem para os outros compartimentos estomacais e, posteriormente, para o intestino, onde irá ocorrer absorção. Nesses animais ocorre hidrogenação no rúmen, pela ação de exoenzimas de microorganismos (HOOVER & MILLER, 1992). Os tocotrienóis quando hidrogenados formam tocoferóis.

2.1.2. DISTRIBUIÇÃO

Após a absorção, a vitamina E como qualquer outro componente lipossolúvel, necessita estar ligada a uma proteína carreadora para ser transportada pela corrente sanguínea e distribuída pelos diferentes tecidos do organismo. A capacidade deste sistema em realizar este transporte pode limitar a sua absorção. A velocidade e a capacidade da distribuição bem como a concentração no plasma e nos diferentes tecidos orgânicos, em um determinado momento, irá depender diretamente do grau de saturação destes, do nível de metabolização e eliminação pelo organismo (GALLO-TORRES, 1980a).

2.1.2.1. TRANSPORTE NA LINFIA

A vitamina E passa como tocoferol livre pela parede intestinal para a circulação sistêmica via sistema linfático. A transferência da célula intestinal para a linfa ocorre simultaneamente à transferência de lipídeos da dieta e a formação de partículas carreadoras de lipídeos que aparecem na linfa. A vitamina E circula na linfa como tocoferol vinculado às lipoproteínas não específicas e a VLDL (very low-density lipoproteins) e é distribuído de acordo com a composição em gordura de cada fração (GALLO-TORRES, 1980b).

Sabe-se que o tocoferol é distribuído através da molécula de VLDL com a maior parte alocada no centro (núcleo) de VLDL, enquanto colesterol livre é localizado mais na superfície de VLDL. O fato da vitamina ser distribuída através da lipoproteína sugere que todos os lipídeos são inicialmente protegidos pela atividade antioxidante do tocoferol durante o processo de transporte linfático (GALLO-TORRES, 1980b).

2.1.2.2. TRANSPORTE E CONCENTRAÇÃO NO SANGUE

Transporte de tocoferol no plasma é similar ao transporte linfático e é associado a lipoproteínas. Muitas pesquisas indicam que não há uma proteína carreadora específica para vitaminas no plasma e outros tecidos, no entanto este conceito tem sido recentemente questionado. Uma correlação muito estreita ($r = 0,925$) foi encontrada entre o teor total de α -tocopherol do soro e a porção carregada pelo LDL ("low-density lipoprotein"), o qual, sob condições seguras, transporta a maior parte da vitamina E no soro e uma baixa

correlação ($r = 0,527$) foi observada entre o α -tocoferol total e o conduzido por HDL (high-density lipoprotein). O fator mais importante de influência na concentração plasmática de vitamina E parece ser o conteúdo de lipídeos totais (triglicerídeos, colesterol e fosfolipídeos) bem como o teor de β -lipoproteína carreadora do plasma. Uma elevada correlação significativa foi encontrada entre o conteúdo de β -lipoproteína do soro e o conteúdo de tocoferol do plasma (GALLO-TORRES, 1980b).

Com exceção de moléculas pequenas a penetração de moléculas orgânicas em membranas celulares é favorecida pela elevada afinidade destas por lipídeos, em relação à água. Além disso, visto que a circulação sanguínea atravessa todos os tecidos, algum equilíbrio relativo pode ser esperado entre a concentração da droga no plasma sanguíneo e sua concentração nos tecidos. Isto pode ser justificado assumindo-se que a concentração no plasma é proporcional a sua concentração no sítio de ação (BUTLER, 1971).

GALLO-TORRES (1980b) relata que diversos estudos têm demonstrado que vitamina E aparece rapidamente no plasma e tecidos após administração oral de vitamina E. Os níveis plasmáticos dependem da interação de inúmeros fatores como: concentração de triglicerídeos, fosfolipídeos, colesterol e lipoproteínas carreadoras, nível de remoção para fora do plasma, e nível (grau) de retenção nos tecidos individualmente. A precisão do nível de detecção dos valores encontrados no plasma e outros tecidos também dependem da sensibilidade e especificamente do método analítico escolhido. Mudanças na concentração de tocoferol plasmático dependem ainda de inúmeros fatores como idade, gravidez, coleta de amostra em diferentes tempos após a alimentação e o status nutricional do indivíduo (ex: deficiência de proteína).

2.1.2.3. DISTRIBUIÇÃO NOS TECIDOS

O volume aparente de distribuição de uma droga é o volume em que o teor total da droga no corpo pode ser uniformemente distribuído observando-se a concentração plasmática. No entanto o volume aparente de distribuição, obtido através da observação da concentração plasmática, não é suficiente para afirmar que a droga é na verdade distribuída uniformemente nos compartimentos anatômicos com um volume equitativo ao mesmo volume de distribuição (BUTLER, 1971).

Na alimentação de novilhos, a suplementação com acetato de α -tocoferol fornecido com óleo de milho, aumentou a concentração de α -tocoferol na porção lombar do músculo *Longissimus dorsi* (nas frações mitocôndria, microssomo, citoplasma e tecido conectivo) no fígado e plasma.(ARNOLD *et al.*, 1993b).

2.1.3. VIAS DE EXCREÇÃO

O α -tocoferol além de estar presente no leite é excretado através da bile para a luz do intestino, desse modo a motilidade intestinal e a circulação entero-hepática são fatores que influenciam a excreção fecal de tocoferol (GALLO-TORRES, 1980b).

2.1.4. PROBLEMAS COM A INGESTÃO ELEVADA

Segundo HARRIS & EMBREE (citados por STINNETT, 1983) toxidez evidente, igual a que ocorre para as vitaminas A e D, não tem sido detectada em relação à ingestão excessiva de vitamina E, aparecendo somente algumas evidências de que o uso indiscriminado em crianças anêmicas pode reduzir a resposta à aplicação de ferro por via parenteral.

2.1.5 REQUERIMENTOS DE VITAMINA E

STINNETT (1983) relatou que o conjunto de sintomas possivelmente associados com hipovitaminose E têm sido pouco conclusivos, sendo difícil definir as necessidades de vitamina E na dieta que se fazem necessárias em diferentes condições. Não obstante aqui se resumem alguns itens sobre os quais existe alguma concordância:

- 1 - Não havendo abundância de ácidos graxos poliinsaturados na dieta por um longo período de tempo, relativamente pouca vitamina E é requerida, apesar de haver tendência dos tecidos em acumular ácidos graxos poliinsaturados e serem estes os primeiros a sofrer quebra durante período de deficiência de vitamina "E".

- 2 - O aumento da ingestão de ácidos graxos poliinsaturados por um longo período de tempo associado ao decréscimo da ingestão de vitamina E eleva o teor de lipofucsina (pigmento) presente nos tecidos. Este fato se correlaciona com o aparecimento de "distrofia muscular nutricional".
- 3 - Alguns sintomas clínicos da deficiência da ingestão de vitamina E podem ser corrigidos pela substituição do tocoferol por outros antioxidantes. A fragilidade do eritrócito na deficiência de vitamina E é provavelmente relacionada à atividade antioxidante da vitamina E. Como para vitamina D, fazer o estabelecimento dos níveis nutricionais de vitamina E é tarefa muito difícil. Diferenças na atividade entre os tocoferóis são provavelmente associadas à função e habilidade dos componentes celulares em distingui-los e eliminá-los em diferentes níveis.

Pode-se concluir que uma estimativa precisa dos requerimentos dietéticos de vitamina E para seres humanos ou animais sofre influência de inúmeros fatores, como os vistos anteriormente e outros, o que torna muito complexo definir quais valores devem ser adotados com precisão, e provavelmente devido à grande variação nas dietas de diferentes populações poder-se ia apenas recomendar uma ingestão mínima diária.

2.2. DETERMINAÇÃO DE TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS

De acordo com UEDA & IGARASHI (1990) inicialmente a determinação de tocs foi realizada colorimetricamente pelo método de EMMERIE & ENGEL. Neste método a separação de tocs era feita por cromatografia em camada delgada (CCD). No entanto, a CCD não consegue separar β e α -toc, o que o torna um método limitado. Após, utilizou-se cromatografia gás-líquido (CGL), mas fazia-se necessário pré tratamento da amostra em coluna cromatográfica de digitonina ou CCD para eliminar esteróis contaminantes. Esta técnica apresenta como inconveniente um longo tempo para eluição de todos os tocs e compostos interferentes. A separação de beta e α -toc não é possível por CG. Finalmente cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi introduzida para a determinação de tocs. No presente todos os tocs e toc-3s são separados através de cuidadosa seleção das condições de CLAE. A tabela 3 mostra a comparação destes três métodos.

Tabela 3 : Comparação do Método Colorimétrico, CG e CLAE para determinação de tocs.

	MÉTODOS		
	CCD e Colorimétrico	CG	CLAE
Sensibilidade	Inferior	Melhor	Excelente
Tempo de análise	Longo	Longo	Curto
Separação de Isômeros	Incompleta (difícil)	Impossível (β e γ -toc)	Completa
Pré-tratamento	Complicado	Complicado	Simple
Precisão quantitativa	Inferior	Melhor	Excelente

Fonte : UEDA & IGARASHI, 1990

Geralmente a concentração de vitamina E em alimentos é muito baixa e sua determinação apresenta algumas dificuldades como pré tratamento, extração, remoção de substâncias interferentes e seleção de um bom padrão interno (UEDA & IGARASHI, 1990).

2.3. OXIDAÇÃO DO α -TOCOFEROL "IN VIVO" E "IN VITRO"

O α -tocoferol não só reage com íons metálicos susceptíveis de se reduzir, mas também com radicais livres em geral, o que explica a variedade de efeitos apresentados na literatura científica, tanto nos sistemas "in vitro" como nos sistemas "in vivo". A ação antioxidante do tocoferol se dá através da quebra do radical livre interrompendo a reação em cadeia (WHANG et al, 1986).

Da estrutura do tocol, o α -tocoferol é o menos resistente à oxidação, sendo esta a forma predominante de tocoferóis em tecidos humanos. A eficiência do α -

tocoferol é tão grande que mesmo em concentrações de 10^{-5}M pode interceptar radicais O_2 nos tecidos, resultantes de reações enzimáticas, protegendo a integridade dos sistemas biológicos.(BAUERNFEIND, 1980).

Os tocoferóis estão sujeitos à destruição pelo oxigênio formando quinonas, dímeros e trímeros. Oxidação é acelerada por exposição à luz, calor, bases e presença de traços de minerais como ferro (Fe^{3+}) e cobre (Cu^{2+}) (BAUERNFEIND, 1980).

2.4. INFLUÊNCIA DO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS

Durante o manuseio e processamento, alimentos são normalmente expostos a uma ou mais condições capazes de reduzir o seu teor em vitamina E. Alimentos processados e refinados apresentam um teor de vitamina E muito variável e geralmente detecta-se menores níveis de vitamina E no produto processado do que no mesmo alimento fresco e integral, pois vários processos tecnológicos (tabela 4) induzem a uma perda ou degradação desta. Mesmo a estocagem sob refrigeração reduz o teor de tocoferóis com o decorrer do tempo (BAUERNFEIND, 1980).

Tabela 4 : Alguns processos tecnológicos que influenciam a perda de vitamina E pelo alimento processado

PROCESSOS
- Secagem - Tratamento com ácido orgânico - Moagem - Expansão, aeração, fragmentação - Irradiação - Fumigação - Refinação, branqueamento, neutralização, desodorização e hidrogenação - Aquecimento, cozimento (calor úmido ou seco) - Desidratação, esterilização e congelamento

Fonte :BAUERNFEIND (1980).

2.5. FORMAÇÃO DE NITROSAMINAS

Segundo MERGENS *et al.* (1978) a alimentação com α -tocoferol previne a indução de hepatotoxicidade por amina-nitrito podendo ser detectado pela dosagem da transaminase glutâmica pirúvica sérica. Isto foi observado em ratos que receberam nitrito de sódio + aminopirina oralmente, os quais reagem rapidamente no meio ácido do estômago para formar dimetilnitrosamina. Estes testes realizados "in vivo" têm demonstrado que α -tocoferol é efetivo em inibir a formação de nitrosaminas

O α -tocoferol (vitamina E) é um agente bloqueador da formação de nitrosaminas e em sistemas não aquosos a reação de α -tocoferol com agentes nitrosantes parece ser muito rápida (MERGENS, 1978).

No processo de produção do bacon o uso máximo legalmente permitido de ascorbato de sódio na salmoura de cura é o suficiente para prover cerca de 550 ppm no produto final, o que serve para reduzir marcadamente, mas não eliminar a formação de N-nitrosopirrolidina na fritura. Tem sido postulado que contrastando com carnes cominuadas, prolina, a principal substância formadora de nitrosaminas no bacon, é derivada de fibras colágenas localizadas na camada de gordura espessa. Esta não é permeada pela solução aquosa de ascorbato de sódio, sendo desejável a adição, ao sal de cura do bacon, de um agente bloqueador da formação de nitrosaminas que seja lipofílico (MERGENS, 1978).

De acordo com MERGENS *et al.* (1978) adicionando-se 500 ppm de dl- α -tocoferol ao bacon processado cru (que corresponde a um rendimento de cerca de 425 ppm) obtem-se numa porção de 3g de bacon frito (considerando-se uma recuperação de 35% do tocoferol adicionado ao bacon e 28% do peso em bacon frito em relação ao bacon cru) 1,59mg de α -tocoferol o equivalente a 1,75 UI de vitamina E. Uma tira de bacon quando frita por aquecimento produz aproximadamente 6g de porção comestível. Uma pessoa servindo-se em média de três tiras representaria um consumo de 9,5mg de α -tocoferol (equivalente a 10,5 UI de vitamina E) somando-se mais a ingestão do óleo residual corresponderia a aproximadamente 69% da ingestão diária de vitamina E recomendada pelo RDA (Recommended Daily Allowance) que para pessoas com mais de 4 anos é de 30 UI/dia.

2.6. LIPÍDEOS

2.6.1. LIPÍDEOS NA ESTRUTURA MUSCULAR

As porções de fosfolipídeos e colesterol do músculo são essenciais porque participam da estrutura e das funções das células musculares e suas organelas. Os lipídeos neutros não são tão essenciais mas fornecem ácidos graxos para o metabolismo energético no músculo vivo e contribuem para as características da carne. Ao contrário da maior parte dos fosfolipídeos e colesterol, que estão associados às membranas, os lipídeos

neutros estão presentes na célula muscular ou nos adipócitos ligados ao tecido conectivo do perimísio do músculo (MOODY & CASSENS, 1968). Estes adipócitos intramusculares são maiores e mais numerosos na gordura que é visível num corte transversal de um músculo e são denominados "marbling" (marmorizado ou gordura entremeada) (ALLEN & FOEGENDING, 1981).

A carne vermelha ou escura tem metabolismo principalmente aeróbico comparado com carne branca. Isto está associado não somente à alta concentração de mioglobina, mas também à alta concentração de lipídeos. As duas maiores consequências para o consumidor destes diferentes teores de lipídeos de carne clara e escura são as diferenças de sabor e conteúdo calórico (ALLEN & FOEGENDING, 1981).

2.6.2. COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO MÚSCULO

Lipídeos do músculo variam em quantidade e composição de acordo com o animal produtor da carne, se ave, peixe ou mamífero. A porção lipídica destes alimentos influencia numerosos processos e produtos. Esta influência inclui sabor, estabilidade da cor, textura, suculência, estabilidade da proteína, vida de prateleira durante estocagem sob congelamento, características de emulsão e conteúdo calórico (ALLEN & FOEGENDING, 1981).

O conteúdo e a composição dos lipídeos do músculo diferem no mesmo animal dependendo sobretudo da função do músculo (ALLEN & FOEGENDING, 1981).

Segundo GANDEMER (1990) os músculos são constituídos por um conjunto de fibras musculares organizadas em feixes, delimitados por tecido conjuntivo, apresentando proporções relativas de fibras glicolíticas e oxidativas que definem seu tipo metabólico; com efeito sob critérios fisiológicos e bioquímicos os músculos são distinguidos em três tipos de fibra:

- 1- Fibras de metabolismo energético glicolítico e de contração rápida (ou α W).
- 2- Fibras de metabolismo energético oxidativo e de contração lenta (ou β R).

3- Fibras de metabolismo energético intermediário e de contração rápida (ou αR).

O músculo branco tem maior teor de fibras αW , o músculo vermelho tem maior teor de fibras αR e βR . As fibras βR são de diâmetro menores e contêm muito mais organelas celulares (em particular as mitocôndrias) que as fibras glicolíticas (αW). Por isso um músculo oxidativo rico em fibras βR possui mais membranas celulares que os músculos ricos em fibras αW .

Os dados da tabela 5 ilustram que dentro de cada espécie, a carne clara contém menos lipídeos totais que a carne vermelha. Esta diferença reflete-se na porcentagem de lipídeos totais (lipídeos neutros + fosfolipídeos) sendo que um músculo magro apresenta uma porcentagem de fosfolipídeos maior em relação ao mesmo músculo mais gordo (ALLEN & FOEGENDING, 1981).

HORNSTEIN *et al.* (1961) concluíram que os fosfolipídeos não contribuem para o agradável sabor de carne e que a possibilidade de existirem em excesso em carne magra é que deve contribuir para o empobrecimento do sabor. Além disso muitos dos sabores estranhos e desagradáveis causados pela oxidação podem estar associados aos fosfolipídeos.

Tabela 5 : Influência do conteúdo lipídico do músculo e do tipo de músculo sobre a quantidade de lipídeos neutros e fosfolipídeos intramusculares.

ESPÉCIE	COMPOSIÇÃO			
	MÚSCULO OU TIPO	LIPÍDEOS		FOSFOLÍ- PÍDEOS (%)
		LIPÍDEOS(%) ^a	NEUTROS(%)	
FRANGO	Branco	1,0	52	48
	Escuro	2,5	79	21
PERU	Branco	1,0	29	71
	Escuro	3,5	74	26
PEIXE	Branco	1,5	76	24
	Escuro	6,2	93	07
BOVINO ^b	L.D.*	2,6	78	22
		7.7	92	08
		12.7	95	05
SUÍNO ^c	L.D.	4,6	79	21
	P.M.	3,1	63	37
OVINO ^d	L.D.	5,7	83	10
	S.T.	3,8	79	17

^a Porcentagem bruta da composição do músculo

^b Os valores correspondem a animais com 360, 420 e 480 dias de idade respectivamente, para aumento do conteúdo lipídico.

^c valores obtidos por multiplicação do teor de fósforo dos lipídeos por 25 e calculando a porcentagem de lipídeos neutros por diferença.

^d Como o conteúdo de glicolipídeos também foi reportado, os valores na tabela não atingem 100%.

LD Músculo Longissimus dorsi [Contra-filé (bovinos), Lombo (suínos)].

PM Músculo Psoas major (filé).

S T Músculo Semitendinosus.

Fonte : ALLEN & FOEGEDING (1981)

Comparativamente aos corpos graxos vegetais a carne contém uma elevada quantidade de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa localizados principalmente dentro das membranas lipídicas (GANDEMER, 1990).

2.6.3. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS

Somando-se as variações de conteúdo de lipídeos entre músculos e espécies diferentes, a composição de ácidos graxos do músculo tem algumas diferenças distintas entre espécies. Estas diferenças representam uma das mais importantes variáveis na determinação do processamento, palatabilidade e algumas características de diferentes carnes. Deve-se salientar que em todas as espécies não ruminantes a dieta de ácidos graxos é muito importante na determinação da composição de ácidos graxos do tecido. Para espécies ruminantes é possível produzir leite e carne com gorduras poliinsaturadas por alimentação com óleos vegetais protegidos (encapsulados) (ALLEN & FOEGENDING, 1981).

Existem estudos recentes na tentativa de reduzir o teor de ácidos graxos saturados e elevar o teor de ácidos monoinsaturados em porcos através de modificações na dieta animal (RHEE *et al.*, 1990).

2.6.3.1. COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DE BOVINOS

Segundo McDONALD & SCOTT, citados por ALLEN & FOEGENDING (1981) ácidos graxos em tecidos de ruminantes são os mais saturados porque estes são extensivamente hidrogenados por microorganismos no rúmen.

Num mesmo animal (bovino) lipídeos totais e composição em ácidos graxos são similares para músculos de diferentes localizações (RHEE *et al.*, 1988). Dados da tabela 6 refletem a composição de ácidos graxos de quatro músculos bovinos, demonstrando pouca variação na composição de um mesmo animal e apenas uma pequena diferença quanto ao teor de ácido esteárico e total de monoinsaturados para alguns músculos.

Tabela 6 : Composição de ácidos graxos de quatro músculos bovinos Longissimus-dorsi (LD), Psoas major (PM), Semimembranosus (SM) e Semitendinosus (ST).

ÁCIDOS GRAXOS (%) ^c	MÚSCULOS			
	LD	PM	SM	ST
14:0	2,3 (± 0,4) ^a	2,0 (± 0,4) ^a	2,1 (± 0,4) ^a	2,2 (± 0,5) ^a
16:0	27,7 (± 0,3) ^a	25,3 (± 3,1) ^a	27,3 (± 0,4) ^a	27,7 (± 2,9) ^a
16:1	2,0 (± 0,8) ^a	1,8 (± 0,5) ^a	2,4 (± 0,7) ^a	2,5 (± 0,8) ^a
18:0	17,4 (± 2,2) ^b	20,4 (± 0,4) ^a	16,4 (± 3,3) ^b	15,9 (± 2,3) ^b
18:1	32,8 (± 5,5) ^a	32,4 (± 0,4) ^a	33,5 (± 4,9) ^a	34,9 (± 4,2) ^a
18:2	10,5 (± 2,5) ^a	12,9 (± 3,3) ^a	11,6 (± 2,6) ^a	10,6 (± 3,4) ^a
18:3	1,8 (± 1,4) ^a	0,6 (± 0,9) ^a	1,1 (± 1,5) ^a	1,0 (± 1,5) ^a
20:1	2,7 (± 4,4) ^a	1,4 (± 1,9) ^a	1,7 (± 2,8) ^a	1,9 (± 2,9) ^a
20:4	2,5 (± 1,3) ^a	3,2 (± 0,9) ^a	3,4 (± 1,1) ^a	3,1 (± 1,4) ^a
Total Saturados	47,4 (± 4,8) ^a	47,7 (± 5,9) ^a	45,8 (± 6,1) ^a	45,8 (± 4,3) ^a
Total insaturados	52,3 (± 4,6) ^a	52,3 (± 5,9) ^a	53,6 (± 5,6) ^a	54,0 (± 4,5) ^a
Total Monoinsat.	37,5 (± 2,4) ^{ab}	35,6 (± 3,9) ^b	37,6 (± 3,0) ^{ab}	39,3 (± 3,0) ^a
Total Poliinsat.	14,8 (± 4,1) ^a	16,7 (± 4,7) ^a	16,0 (± 4,2) ^a	14,7 (± 4,5) ^a
Total de lipídeos (%) ^d	3,62 (± 1,23) ^a	4,29 (± 1,29) ^a	3,47 (± 1,18) ^a	4,00 (± 1,64) ^a

^{a,b} Valores médios seguidos de letras iguais não diferem significativamente (p>0,05).

^c % (g/100g ácidos graxos totais).

^d g/100g músculo

Fonte : RHEE *et al.*, (1988a)

2.7. COMPOSIÇÃO EM FOSFOLIPÍDEOS

Segundo GANDEMER (1990) os fosfolipídeos do músculo representam de 0,5 a 1,0g/100g de músculo independente do seu teor em lipídeos totais. Seu teor depende principalmente do seu tipo metabólico que é definido pela proporção relativa das fibras glicolíticas e oxidativas que o constituem.

Os fosfolipídeos do músculo são muito ricos em ácidos graxos poliinsaturados variando de 33 a 44% dos quais 20 a 60%, dependendo da espécie animal, são de cadeia longa. Estes são principalmente o ácido araquidônico (20:4 N-6) e os de 22 átomos de carbono com 22:4 N-6, 22:5 N-6, 22:5 N-3, 22:6 N-3. Além de possuírem bom valor nutricional estes ácidos graxos são muito sensíveis à oxidação (GANDEMER, 1990).

Fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina são os dois principais fosfolipídeos do músculo e representam respectivamente de 45 a 72% e de 20 a 36% dos fosfolipídeos totais, de acordo com o músculo e a espécie considerada (GANDEMER, 1990), como pode ser visto na tabela 7.

Tabela 7 :- Teor de lipídeos e fosfolipídeos dos músculos das principais espécies de interesse zootécnico.

TIPO	AVE		COELHO		SUÍNO		BOVINO	
	GLICOL.	OXIDAT.	GLICOL.	OXIDAT.	GLICOL.	OXIDAT.	GLICOL.	OXIDAT.
METABÓLICO	(P)	(C)	(LD)	(SM)	(LD)	(M)	(LD)	(M)
LIPÍDIOS								
TOTAIS (g/100g)	1.0	5.5	1.0	3.6	1.5	1.8	2.4	2.6
FOSFOLIPÍDEOS								
(g/100/g)	0.5	0.8	0.5	0.8	0.5	0.9	0.6	1.0
Cardiolipídeos ¹	4.9	7.1	4.1	6.6	2.6	7.1	6.2	9.3
Fosfatidil-etanolamina ¹	25.7	35.5	17.7	30.5	19.5	30.5	27.1	26.7
Fosfatidil-inositol ¹	5.3	4.9	4.9	14.7	9.0	5.7	4.6	4.4
Fosfatidil-inositol ¹	1.4	0.9	0.3	0.2	0.8	0.6	1.0	1.6
Fosfatidil-colina ¹	62.9	50.2	71.9	47.0	64.8	55.4	60.3	57.7
Esfingomielina ¹	2.2	1.5	1.2	1.0	0.9	0.6	0.8	0.3

P Músculo peitoral
LD Longíssimo dorsal
SM Semi membranoso

C Músculo da coxa
M Masseter
¹ % em fosfolipídeos totais

Fonte : GANDEMER (1990).

As diferenças nas proporções relativas de Fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cardiolipídeos observadas entre os músculos glicolíticos e oxidativos estão diretamente ligados à quantidade de mitocôndrias que contêm (GANDEMER, 1990).

Dados demonstrados na tabela 8 refletem a extensão e a natureza das diferenças na composição em ácidos graxos dos fosfolipídeos para diferentes espécies, sendo importante salientar a elevada proporção de ácidos graxos insaturados presentes nos fosfolipídeos para todas as quatro espécies mencionadas.

Tabela 8 - Composição em ácidos graxos dos fosfolipídeos dos músculos glicolíticos das principais espécies de interesse zootécnico (em % de ácidos graxos presentes nos fosfolipídeos).

ÁCIDO GRAXO	ESPÉCIE ANIMAL			
	AVE (P)	COELHO (LD)	SUÍNO (LD)	BOVINO (LD)
SATURADOS	39,9	35,5	34,7	32,9
MONOINSAT. (s)	23,1	19,2	21,0	34,3
POLIINSAT. (p)	37,1	44,8	44,2	32,8
N-6	33,4	40,3	40,3	24,3
18:2	14,4	27,0	29,9	14,1
20:4	14,5	8,9	8,8	7,6
22:4 e 22:5	3,0	2,9	---	0,5
N-3	3,7	4,5	3,0	8,3
18:3	0,1	1,0	1,0	1,9
20:5	---	0,7	0,7	2,3
22:5 e 22:6	3,6	2,8	1,3	4,1
N-6/N-3	9,0	9,0	13,4	2,9
P/S	0,9	1,3	1,1	1,0

P = Músculo Peitoral ; LD = Longissimo Dorsal

Fonte : GANDEMER (1990).

2.8. OXIDAÇÃO

Segundo GANDEMER (1990) a alteração da fração lipídica constitui um objeto de preocupação constante das indústrias de carne. A consequência mais conhecida desta alteração é sem dúvida nenhuma a degradação organoléptica do produto que pode conduzir à rejeição do alimento pelo consumidor gerando como consequência repercussões econômicas diretas que são facilmente avaliadas. Por outro lado as consequências das alterações dos lipídeos sobre a qualidade nutricional ou tecnológica das matérias primas e dos produtos acabados são muito mais difíceis de serem medidas.

Como matéria prima principal do processo de oxidação a estrutura do ácido graxo está diretamente ligada à sua capacidade de sofrer oxidação. A susceptibilidade à oxidação aumenta com o aumento do número de duplas ligações nos ácidos graxos e quanto mais insaturados os ácidos graxos, geralmente mais lábeis e críticos para o desenvolvimento de sabores estranhos e desagradáveis (REINECCIUS, 1979).

No processo de oxidação da carne, a oxidação de ácidos graxos insaturados é a maior causa de deterioração do sabor e aroma ("flavor") (RHEE, 1988a). Ácidos graxos insaturados e colesterol sofrem auto-oxidação por mecanismo de radicais livres envolvendo a retirada do hidrogênio lábil da molécula de lipídeo seguido pela adição do oxigênio molecular resultante de um radical lipídico. O radical lipídico-peróxido formado sofre uma série de reações levando à formação de inúmeros produtos de oxidação, e dinamizando o processo de oxidação agindo como um pró-oxidante. (PEARSON *et al.*, 1983).

2.8.1. OXIDAÇÃO DE CARNES MECANICAMENTE SEPARADAS

Devido à própria natureza do processo de produção de carnes mecanicamente separadas esta matéria prima é muito susceptível à oxidação, sendo portanto um excelente modelo para estudo da oxidação de lipídeos (GANDEMER, 1990). O processamento tecnológico favorece o desenvolvimento da oxidação, em carnes mecanicamente separadas, pois a incorporação de ar dentro da massa do produto e o rompimento das células musculares aumentam o contato entre lipídeos, ar e metais pró-oxidantes (GANDEMER, 1990), e ainda com o sistema enzimático de peroxidação lipídica

(RHEE, 1988a). Destes lipídeos os fosfolipídeos são o substrato privilegiado da oxidação em carnes mecanicamente separadas de frango durante o congelamento (GANDEMER, 1990).

2.8.2. OXIDAÇÃO DE CARNES COMINUÍDAS

As carnes cominuídas como as carnes mecanicamente separadas também são expostas, devido ao processo tecnológico, a uma série de condições que favorecem de forma muito intensa o processo de oxidação lipídica e de pigmentos (BHATTACHARYA *et al.*, 1988).

RHEE, (1988a) detectou que atividade do sistema enzimático microsomal de peroxidação lipídica foi mais alta e teor de pigmento heme total mais baixo para carne moída proveniente de músculo semi-tendinoso em relação a outros músculos bovinos (longíssimo-dorsal, semi-membranoso e psoas maior. Valores de ácido tiobarbitúrico (TBA) da carne moída estocada a 4°C por três ou seis dias foram positivamente correlacionados com atividade do sistema microsomal de peroxidação lipídica, conteúdo total de pigmento heme e a porcentagem total de ácidos graxos poliinsaturados e negativamente correlacionados com a quantidade de ferro não heme, porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados totais bem como com a porcentagem de ácidos graxos saturados (RHEE, 1988a). Assim conclui-se que para carne moída, os parâmetros correlacionados positivamente são os fatores mais importantes a serem considerados para se obter um sistema de controle da oxidação para este produto.

2.8.3. EFEITOS DO COZIMENTO SOBRE A OXIDAÇÃO LIPÍDICA

Muitos esforços têm sido direcionados no sentido de elucidar os mecanismos de oxidação lipídica em carne cozida. No entanto sabe-se que os tratamentos térmicos produzem uma destruição parcial dos fosfolipídeos principalmente por oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (GANDEMER, 1990).

LOVE & PEARSON (1974) demonstraram que ferro não heme é pró oxidante de lipídeos de músculo e metamioglobina tem uma atividade mínima. Tem sido

proposto ainda, que ferro não heme, especialmente ferro liberado de pigmentos heme após aquecimento, seria o primeiro catalisador da oxidação lipídica em carne cozida (RHEE, 1988a).

Os efeitos do cozimento são maiores em suínos e aves do que em carne bovina. Esta diferença pode ser atribuída à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados. A carne escura de galinha tem maior nível de oxidação lipídica após cozimento do que a carne clara. Cortes de carne que são cozidos e não são consumidos imediatamente conservados refrigerados ou congelados desenvolvem sabor de requentado quando reaquecidos para consumo, com exceção de carnes curadas. Esta condição envolve oxidação de fosfolípidos intramusculares e é retardada por antioxidantes em carnes frescas e nitrito em carnes curadas. Carnes frescas não cozidas são muito mais estáveis à oxidação (ALLEN & FOEGENDING, 1981).

2.8.4. MUDANÇAS NA COLORAÇÃO

Um dos conceitos mais comuns associados com lípidos do músculo além da estabilidade à oxidação são os efeitos associados sobre a cor da carne, flavor e funcionalidade das proteínas do músculo. Por exemplo, a oxidação lipídica acelera a oxidação do ferro ferroso na mioglobina e produz metamioglobina, o pigmento pardo-amarronzado que causa a perda do visual atrativo da carne (HUTCHINS *et al.*, 1967; GREENE, 1969; GREENE *et al.*, 1971). LIN & HULTIN (1977) demonstraram que a fração microsomal preparada de músculo da coxa de galinha tem a participação de um sistema enzimático para a oxidação da mioglobina a metamioglobina. Inversamente a hemoproteína e componentes ferro não heme da carne são catalisadores de peroxidação lipídica em modelos de sistemas cárneo (RHEE, 1978).

FAUSTMAN & CASSENS (1991) reportaram que músculos "Longissimus lumborum" e "gluteus medius" de novilhos holandeses têm menor estabilidade da cor do que os mesmos músculos de novilhos mestiços. A cor vermelho-cereja brilhante é importante na venda de cortes frescos de carnes. A indesejável cor marrom que se desenvolve durante o armazenamento de cortes em bandeja é devida à oxidação da deoximioglobina para metamioglobina.

ARNOLD *et al.* (1992) propuseram que a suplementação da dieta com vitamina E levaria a um acúmulo desta no músculo e que este antioxidante iria reduzir a oxidação da deoximioglobina a metamioglobina.

2.9. INTERAÇÕES ENTRE LIPÍDEOS E PROTEÍNAS

A interação de lipídeos com proteínas e outros constituintes do músculo tem numerosas implicações com respeito ao conteúdo de nutrientes e características da carne. Tem sido extensivamente demonstrado que durante a estocagem de peixe, os níveis de ácidos graxos livres no músculo aumenta (DENG, 1978). Isto causa uma desnaturação da proteína e efeitos adversos na textura e capacidade de retenção de água (LOVE & ELERIAN, 1974; ANDERSON & RAVESI, 1969). Este aumento nos níveis de ácidos graxos livres tem sido atribuído à fosfolípase A (AUDLEY *et al.*, 1978) e à lipase lisossomal (GEROMEL & MONTGOMERY, 1980). BOSUND & GANROT (1969) observaram que a lipólise ocorre mais rapidamente em carne escura comparada com músculo claro. GEROMEL & MONTGOMERY (1980) reportaram que congelamento lento e flutuações de temperatura aumentam a liberação de lipase ácida dos lisossomos, o que leva à expectativa de aumento dos níveis de ácidos graxos livres.

Num meio complexo que é a célula muscular, os produtos de oxidação dos lipídeos são muito reativos em contato com outros constituintes celulares, em particular as proteínas. Estas reações numerosas e complexas são a causa da polimerização ou de cisão das proteínas e da destruição de aminoácidos que afetam ao mesmo tempo a qualidade nutricional e as propriedades funcionais das proteínas (GANDEMER, 1990).

2.10. SUPLEMENTAÇÃO DE TOCOFEROL NA DIETA COM OBJETIVOS TECNOLÓGICOS

A vida de prateleira da carne fresca pode ser prolongada pela limitação da extensão da descoloração, da oxidação lipídica e contaminação microbiológica (OKAYAMA *et al.*, 1987).

A descoloração da carne e a oxidação lipídica podem ser influenciadas pela presença de antioxidantes nos tecidos (MITSUMOTO *et al.*, 1991b). Os tocoferóis presentes nas gorduras são classificados como antioxidantes naturais (CORT, 1974), e a melhor forma de distribuí-los equitativamente pelos tecidos é incorporá-los à dieta do animal antes do abate (ARNOLD *et al.*, 1993b).

Suplementação oral de vitamina E tem sido efetiva em reduzir oxidação lipídica em carne de aves (WEBB, *et al.*, 1972; MARUSICH *et al.*, 1975; SHELDON, *et al.*, 1984), suínos (TSAI *et al.*, 1978; e BUCKLEY *et al.*, 1989) e bovinos (ARNOLD *et al.*, 1992; ARNOLD, *et al.*, 1993a).

TSAI *et al.* (1978) suplementaram a dieta de suínos com 200ppm de acetato de α -tocoferol, a partir de animais com 9-20kg até o peso de abate com 91kg. Obteve-se aproximadamente 7.7, 5.0 e 4.3 μ g de α -tocoferol por grama de tecido (gordura renal, gordura subcutânea e músculo tríceps respectivamente) e observou-se aumento linear entre o conteúdo de α -tocoferol no tecido lipídico e a estabilidade oxidativa concluindo que uma ligeira melhora na qualidade das gorduras pode ser obtida utilizando-se este método. No entanto a adoção de uma suplementação, na prática, deve ser avaliada tendo em vista o custo e os resultados de literatura. Os mesmos autores recomendam que 100 ppm de acetato de dl- α -tocoferol na suplementação de rações de suínos em crescimento é um ótimo nível para prover uma estabilidade oxidativa da musculatura.

MARUSICH *et al.* (1975) reportaram que existe uma boa correlação entre o conteúdo de α -tocoferol e valores de TBA para peito de frango assado e peru. No entanto níveis de vitamina E requeridos por dietas de perus devem ser aproximadamente cinco vezes maiores que os níveis requeridos para dietas de frangos para surtirem efeitos ótimos nos valores de TBA do músculo. Isto sugere que o nível de antioxidante originário da dieta pode ser uma importante variável que afeta o nível de oxidação lipídica durante cozimento e estocagem.

MITSUMOTO *et al.* (1991b), estudaram o efeito da suplementação na dieta de vitamina E e do banho superficial com vitamina C sobre a estabilidade da cor e oxidação lipídica em músculo longissimus dorsi de novilhos holandeses e mestiços durante 16 dias de estocagem em bandeja a 4°C. Concluiu-se que a suplementação na dieta com vitamina E retarda a formação de metamioglobina na carne e rapidamente suprime a

oxidação lipídica comparada com o controle. Músculo longissimus de gado holandês demonstra formação elevada de metamioglobina em relação ao mesmo músculo de gado mestiço. Banho superficial com vitamina C foi efetivo em manter a estabilidade da cor e lipídica nas mesmas condições, para todos os casos.

AGBOOLA *et al.* (1988) alimentaram 30 bezerros machos holandeses de 46kg de peso vivo (inicial) com dietas de leite por 16 semanas e durante as duas ultimas semanas suplementaram um grupo selecionado randomicamente (I) com P (fosfato monossódico) 18g/bezerro/dia mais Vitamina E (acetato de dl- α -tocoferol) 100 UI/bezerro por dia. O grupo controle (II) não recebeu nenhuma suplementação. Os animais foram abatidos com cerca de 172kg. Os dados avaliados incluíam composição do músculo semimembranoso em P, Mg, Ca, Mn, Fe, Zn, Na, K, Cu, mioglobina e hemoglobina e ainda qualidade sensorial. A concentração de Fe foi de 7,95 e 9,14 para (I) e (II) respectivamente. Outros minerais significativamente afetados pelo tratamento foram Ca (30,3 e 27,4 $\mu\text{g/g}$ para (I) e (II) respectivamente), K (2254,0 e 2213,0 $\mu\text{g/g}$) e Cu (0,24 e 0,30 $\mu\text{g/g}$). O nível de pigmento total foi 2,71 e 3,30 mg/g no músculo para (I) e (II) respectivamente e avaliação sensorial indicou que (I) foi mais claro e, conseqüentemente, mais desejável. Segundo os autores os resultados obtidos indicam que suplementação com P e vitamina E na alimentação de bezerros duas semanas antes do abate regula o teor de Fe do tecido e a síntese de mioglobina, produzindo uma carne clara externamente.

A vitamina E inibiu a oxidação na superfície e no centro de bifes embalados por 19 dias, oriundos de animais suplementados com acetato de α -tocoferol fornecido com óleo de milho na alimentação. A oxidação lipídica ocorreu somente em bifes oriundos de bois alimentados com dietas não suplementadas com vitamina E e armazenados por igual período (ARNOLD *et al.*, 1993b).

ARNOLD *et al.* (1992) examinaram os efeitos da suplementação de vitamina E (acetato de α -tocoferol) na alimentação de um lote de novilhos holandeses e mestiços sobre a performance, características da carcaça e estabilidade da cor da carne, concluindo que: a suplementação com vitamina E não afetou a performance pela alimentação ou as características das carcaças do gado alimentado com altas concentrações na dieta. O maior efeito desta alimentação foi o de aumentar a estabilidade da cor de bifes frescos provenientes destes animais, mantidos em bandeja e em armazenamento simulando as condições de varejo. A estabilidade da cor durante armazenagem em bandeja de bifes de

músculo longissimus lumborum (contra-filé) de gado suplementado com 300 UI/d para 266 dias, 1.140 UI/d para 67 dias ou 1.200 UI/d para 38 dias foi estendido para 2,5 a 4,8 dias. Bifes de gluteus medius (alcatra) tiveram uma extensão da cor em bandejas de 1,6 a 3,8 dias. O acúmulo de produtos de oxidação lipídica, associados com vida em bandeja de longissimus lumborum foi suprimido para o músculo pela suplementação de vitamina E. É importante salientar que a análise sensorial com provadores treinados não identificou diferença entre contra-filé para controle e para suplementados com vitamina E. A suplementação do gado com vitamina E reduziu as perdas econômicas associadas com a descoloração dos bifes durante a estocagem em bandeja. A oxidação lipídica também decresceu devido à suplementação com vitamina E. A concentração de α -tocoferol nos tecidos foi menor em animais que receberam suplementação por 38 dias em relação aos que a receberam por 67 dias. A carga microbiana da carne moída não foi afetada pela suplementação de vitamina E. A primeira vantagem da suplementação de vitamina E foi não alterar a alimentação do gado de forma a não ser um fator estressante.

ARNOLD *et al.* (1993b) determinaram que a suplementação na dieta de novilhos com Vitamina E por um período mínimo de 44 dias com 1300 UI/dia é recomendada para se obter bifes com extensão da estabilidade lipídica e da cor.

2.11. FORNECIMENTO DE LIPÍDEOS NA DIETA ANIMAL

2.11.1. MUDANÇA NA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (Redução da Estabilidade Oxidativa)

O fornecimento de elevados níveis (10 a 20%) de óleo de canola (64% de ácido oléico e 28% de ácidos graxos poliinsaturados) na dieta de suínos aumenta substancialmente a porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados nos lipídeos neutros (St. JOHN *et al.*, 1987) e nos lipídeos totais (RHEE *et al.*, 1988a). No entanto a dieta rica em óleo de canola tende a aumentar a susceptibilidade do tecido muscular à oxidação lipídica (RHEE *et al.*, 1988a), muito provavelmente devido ao alto nível de ácidos graxos poliinsaturados contidos neste óleo (RHEE *et al.*, 1990).

RHEE *et al.* (1988b) produziram dietas de suínos contendo 0 ou 12% de óleo de açafrão com alto teor de ácido oléico (>85% ácido oléico; <10% ácidos graxos

poliinsaturados; <10% ácidos graxos saturados) e constataram que a dieta contendo 12% de óleo de açafrão eleva o nível de ácidos graxos monoinsaturados em relação aos ácidos graxos saturados nos lipídeos totais em tecido muscular de suínos quase tanto quanto 20% da dieta de óleo de canola (RHEE *et al.*, 1988a).

2.11.2. FORNECIMENTO DE LIPÍDEOS NA DIETA ANIMAL + TOCOFEROL

MONAHAN *et al.* (1992b) estudaram o efeito de uma dieta com elevado teor de produtos oxidados (óleo de milho oxidado) para investigar a efetividade da dieta rica em α -tocoferol (acetato de α -tocoferol), em controlar a oxidação do colesterol e lipídeos em carne de porco crua e cozida. A oxidação foi significativamente influenciada pela dieta suplementada com α -tocoferol, mas não por óleo de milho oxidado. O nível de formação de produtos de oxidação de lipídeos e colesterol foi baixo em amostras cruas, comparadas com amostras cozidas. Após 2 dias de estocagem sob refrigeração, o total do colesterol oxidado representou 2,7% do total de colesterol contido em carne de porco proveniente de animais que receberam na dieta níveis basais de acetato de α -tocoferol (10mg/kg de dieta) e 1,6% do colesterol total de carne de porco proveniente de animais que receberam dieta suplementada com 200mg/kg de dieta. A correlação entre produtos de oxidação de lipídeos e níveis de colesterol foi positiva em carne suína cozida ($r = 0,88$, $P < 0,01$). Os autores concluíram que o aumento do conteúdo de α -tocoferol no músculo, fornecido pela dieta, pode reduzir a formação de colesterol oxidado na carne.

HOUBEN & KROL (1985) utilizaram gordura de lombo suíno com significativo aumento dos níveis de ácidos graxos polienóicos (acima de 15,0%) estocada por mais de 9 meses a -20 °C, em câmara escura, acondicionada sob vácuo em embalagem tipo "suprovac" e em sacos de polietileno (0,02mm), obtidas de animais engordados com dietas contendo grande quantidade de espigas de milho misturadas (ensilado de milho, feito da semente mais o sabugo), suplementada com 100 ppm de acetato de dl- α -tocoferol. A suplementação com 100 ppm de acetato de dl- α -tocoferol resultou em um nível de 16mg/kg na gordura de lombo contra um nível de 2mg/kg no controle. Não houve vantagens significativas na embalagem a vácuo sobre a embalagem com material mais permeável ao oxigênio (sacos de polietileno) em relação a oxidação lipídica. Gorduras de lombo produzidas de animais suplementados apresentaram maior estabilidade a oxidação do que amostras de animais não suplementados, isto foi evidenciado pelo teste de Rancimat, medida

de TBA e determinação de Peróxidos. Os autores ressaltam ainda que a suplementação apresenta-se importante somente no caso das amostras serem estocadas por um longo período de tempo e/ou na presença de luz.

MONAHAN *et al.* (1993) estudaram o efeito da inclusão de lipídeos oxidados ou α -tocoferol na dieta de suínos sobre a produção de radicais livres nas frações das membranas de músculo suíno usando técnicas de "electron spin resonance" (ESR) e o efeito destas dietas sobre a oxidação lipídica de carne de suíno picada durante estocagem sob refrigeração, constatando uma redução na produção de radicais livres induzida por FeCl_2 nos microsossomos musculares. A suplementação da dieta com α -tocoferol levou à supressão da produção de radicais livres que têm o potencial de iniciar a oxidação lipídica e de facilitar a propagação da oxidação lipídica uma vez iniciada.

2.11.3 FORNECIMENTO DE LIPÍDEOS NA DIETA DE RUMINANTES

Segundo FERLAY & DOREAU (1992) a adição de lipídeos à dieta geralmente implica em decréscimo na degradação ruminal, especialmente para fibra. Vários fatores responsáveis pela variação na digestão ruminal tem sido citados na literatura:

- 1 - A natureza do ácido graxo - ácidos graxos poliinsaturados impedem o desenvolvimento bacteriano mais do que saturados ou monoinsaturados.
- 2 - A porcentagem de lipídeos adicionados, dependendo do tipo de gordura e da sua proteção.
- 3 - A natureza da dieta basal - distúrbios digestivos ruminais são maiores com dietas baseadas em silagem de milho do que com dietas baseadas em feno.
- 4 - O efeito negativo "espécie-dependente" de alto suplemento de lipídeos - digestão ruminal é mais prejudicada em carneiros do que em gado de leite.

A consequência negativa da suplementação lipídica sobre a digestão ruminal é reduzida com a continuidade da suplementação. A completa compreensão deste fenômeno requer conhecimento do comportamento de ácidos graxos voláteis livres (localização, adsorção e transito), no rúmen (FERLAY & DOREAU, 1992).

2.11.4. EFEITO DA INGESTÃO DE LIPÍDEOS E α -TOCOFEROL SOBRE O RÚMEN

FERLAY & DOREAU (1992) relatam que poucos experimentos têm medido diretamente as consequências do modelo de administração de ácidos graxos sobre a digestão ruminal e que geralmente o fornecimento simultâneo de diferentes nutrientes acentua a digestão ruminal, mas não no caso de lipídeos, pois estes têm efeito depressor na digestão de celulose.

ARNOLD *et al.* (1992) propuseram a hipótese de que a suplementação da dieta com vitamina E pode produzir proteção ao epitélio ruminal contra ação ulcerativa do seu conteúdo proveniente de dieta com elevado teor de concentrados, pois uma das funções primárias da vitamina E é a manutenção e proteção das membranas biológicas de danos por oxidação.

HINO *et al.* (1993) avaliaram os efeitos do β -caroteno e α -tocoferol sobre as bactérias do rúmen na utilização de ácidos graxos de cadeia longa e celulose. Monitorou-se a adição de óleo de açafrão ao meio de crescimento ruminal, num teor acima de 200mg/L observando-se depressão no crescimento bacteriano. No entanto quando 10mg/L de β -caroteno foi adicionado de 50 ou 100mg/L de óleo de açafrão, o crescimento bacteriano foi significativamente aumentado. Quando mais de 200mg/L de óleo de açafrão estava presente, β -caroteno manteve capacidade normal de crescimento do meio. O α -tocoferol foi mais efetivo que β -caroteno embora tenha inibido o meio a altas concentrações, mas a combinação de β -caroteno e α -tocoferol (5mg/L cada) exerceu efeito sinérgico, estimulando o crescimento bacteriano, identificado pelo aumento da produção de células bacterianas, indicando que β -caroteno e α -tocoferol elevaram a utilização de ácidos graxos por ruminantes. β -caroteno + α -tocoferol também estimularam a digestão de celulose na presença de 100mg/L de óleo de açafrão, evidenciado através do aumento das bactérias celulolíticas no meio de crescimento.

2.12. PROCESSO FERMENTATIVO NO RÚMEN (Absorção de Ácidos Graxos Voláteis).

Em condições normais o processo fermentativo que ocorre no rúmen gera a produção de ácidos graxos voláteis principalmente ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, que são passivamente absorvidos pela parede do rúmen. Na parede ruminal são metabolizados a acetato propionato e butirato, e desta forma encontrados no sangue, sendo transportados para o fígado onde são utilizados para a produção de energia (tabela 9) (HOOVER & MILLER, 1992). No ruminante os ácidos graxos voláteis são a principal matéria prima da síntese de glicose que é armazenada no músculo sob a forma de glicogênio, sendo este de suma importância no processo de transformação do músculo em carne.

Tabela 9 : Destino dos ácidos graxos voláteis para produção de energia nos ruminantes

AGV	PARTICIPAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ENERGIA
Ác. acético	Ciclo de Krebs (produção de energia)
Ác. propiônico	Gliconeogênese (produção de glicose)
Ác. butírico	Transformação em corpos cetônicos (produção de energia)

Fonte : BERGMAN (1984); CHURCH (1974).

2.13. USO DO TOCOFEROL "IN VITRO".

WHANG *et al.* (1986) estudaram a atividade do α -tocoferol em carne moída de suíno crua estocada a 4°C, e cozida e estocada a diferentes temperaturas. A carne de suíno foi triturada após o estabelecimento do rigor mortis e sofreu adição de diferentes concentrações de α -tocoferol (0, 100 e 200 ppm). Monitorou-se os níveis de ácido tiobarbitúrico (TBA) por seis dias consecutivos e paralelamente realizou-se análise sensorial. Valores de TBA apresentaram variação nos diversos tratamentos, o que não foi identificado pela avaliação sensorial, embora até o 12º dia as porções tratadas com α -tocoferol tenham atingido altos valores de TBA. Detectou-se que o tratamento com α -tocoferol exerceu seu efeito e que a diferença do número de TBA entre 100 e 200ppm de tocoferol não foi significativa ($P > 0.05$). O número de TBA para carne crua para todos os tratamentos sofreu pouca variação durante três meses de estocagem a -20°C, pois foi muito baixa a taxa de oxidação durante a estocagem congelada. A ação antioxidante do tratamento com α -tocoferol não foi detectada através das alterações do sabor e aroma pela equipe de provadores treinados, como pode ser visto na tabela 10.

Tabela 10 : Notas do painel de teste de carne moída de suíno crua adicionada de α -tocoferol e estocada a 4° ou -20°C.

TRATAMENTO	CONCENTRAÇÃO DE α -TOCOFEROL (ppm)		
	0	100	200
07 Dias a 04°C	1,22	1,03	0,78
60 Dias a -20°C	0,44	0,45	0,57

Valores 0,00 = Sem "flavor" rançoso
 5,00 = "Flavor" de ranço muito intenso

Fonte : WHANG *et al.* (1986)

MITSUMOTO *et al.* (1993) avaliaram os efeitos da suplementação da dieta de novilhos holandeses com 1500 UI de vitamina E por animal por 232 ou 252 dias em comparação com adição "*post-mortem*" de vitamina E sobre a estabilidade lipídica e do pigmento em carne moída bovina. A suplementação da dieta com vitamina E retardou o aumento da formação de metamioglobina e diminuiu a oxidação lipídica em carne moída após nove dias de armazenamento em bandeja. A adição "*post-mortem*" de vitamina E foi ligeiramente menos efetiva em retardar a oxidação de pigmentos e lipídeos, comparado com controle. Os autores concluíram que a vitamina E endógena produz uma estabilidade do pigmento e dos lipídeos muito mais intensa que a vitamina E exógena.

2.13.1. EFEITO DO α -TOCOFEROL EM BANHOS SUPERFÍCIAIS, NA ESTABILIDADE DE CORTES DE CARNE ESTOCADOS.

OKAYAMA *et al.* (1987) trataram bifes de carne bovina por imersão em soluções de (1) 70% de Álcool Etílico, (2) 70% Álcool Etílico contendo 3% de Ácido L-ascórbico, (3) 70% Álcool Etílico contendo 0,08% de Dl- α -tocoferol e (4) 70% Álcool Etílico contendo 3% de Ácido L-ascórbico mais 0,08% de Dl- α -tocoferol, mergulhados por 20 segundos e escorridos por 10 segundos. Após 3, 6, 9 e 13 dias de estocagem a 4°C em sacos de PVC selados hermeticamente com volume para 400ml, avaliou-se a porcentagem de

metamioglobina formada na superfície de cada bife (músculo L. dorsi). O principal efeito dos tratamentos foi provavelmente por ação antimicrobiana do álcool, que prolongou a "lag fase" possibilitando um atraso no início do crescimento microbiano. Logo não se observou alterações significativas nos diferentes tratamentos, demonstrando que o α -tocoferol não demonstra ser um antioxidante eficiente para emprego em banhos superficiais para controle da formação de metamioglobina.

2.13.2. INTERAÇÃO COM OUTROS ANTIOXIDANTES

TAPPEL *et al.* (1961) estudaram a inibição pelo α -tocoferol da peroxidação lipídica catalisada por compostos hematínicos e demonstraram que o sinergismo com ascorbato acentuou grandemente a atividade antioxidativa do tocoferol nos tecidos animais.

GREENE *et al.*, (1971) relataram que o ácido ascórbico em conjunto com propil galato (PG) ou butilato de hidroxianisol (BHA) efetivamente retardam a formação de metahemoglobina e a oxidação lipídica em carne bovina. GOVIDARAJAN *et al.* (1977) concluíram que o ácido ascórbico não teve efeito no início quando a oxidação da mioglobina é lenta, mas prolongou o intervalo de tempo que antecede a fase de oxidação rápida em bifes. SHIVAS *et al.* (1984) estudaram os efeitos do ácido ascórbico na carne moída bovina acondicionada em bandeja plástica, observando que a vida de prateleira foi estendida por até 5 dias quando ácido ascórbico foi adicionado.

OKAYAMA *et al.* (1987) relatam que ácido ascórbico notadamente retarda a rancidez em presença de hemoglobina ou nitrosohemoglobina e pequenas quantidades de tocoferol nos lipídeos.

BENEDICT *et al.* (1975) avaliaram o efeito dos antioxidantes de lipídeos, adicionados à carne moída bovina e suína, sobre a estabilidade destas durante estocagem a -1,1°C por 10 dias. Concluíram que o ácido ascórbico foi incapaz de prevenir a oxidação de grupamentos heme e de lipídeos e além disso apresentou uma ação pró-oxidante, enquanto α -tocoferol demonstrou um ligeiro efeito, sobre o decréscimo dos níveis de oxidação de lipídeos e grupamentos heme em comparação com o grupo não tratado.

MITSUMOTO, *et al.* (1991a) estudaram o efeito da vitamina E, vitamina C e da combinação vitamina E + C sobre a estabilidade lipídica e do pigmento em carne moída crua (músculo *L. dorsi*) de seis novilhos mestiços conservada durante 7 dias em bandejas mantidas a 4°C. A oxidação dos pigmentos e lipídica foi maior nos controles. O tratamento com vitamina E mostrou moderada oxidação lipídica e do pigmento, e o tratamento com vitamina C mostrou baixa oxidação lipídica e do pigmento. O tratamento com vitamina E + C resultou em baixa oxidação lipídica e do pigmento. Corroborando com outros autores em relação à superioridade protetora da vitamina E em sinergismo com a vitamina C

2.14. VITAMINA E NA DIETA ANIMAL

A vitamina E como nutriente é determinada pelos níveis de tocoferol plasmático, que é bem correlacionado com o nível de lipídeos totais no plasma (em circunstâncias normais). Isto indica que o requerimento de vitamina E na dieta aumenta com o aumento da ingestão de gorduras poliinsaturadas (STINNETT, 1983).

O selênio participa no organismo na formação de "glutathione peroxidase" (SeGSH-Px, glutathione, hydrogen-peroxide oxidoreductase, EC1.11.1.9), (HARRISON & CONRAD, 1984b). Existe uma inter-relação importante entre o selênio, vitamina E e aminoácidos contendo enxofre na prevenção de algumas enfermidades nutricionais causadas por sua deficiência. Se a vitamina E evita a formação de hidroperóxidos de ácido graxo, e os aminoácidos de enxofre e o selênio (como precursores de "glutathione peroxidase") estão envolvidos na destruição de peróxidos, estes nutrientes produziram um resultado bioquímico semelhante, isto é, a diminuição da concentração de peróxidos ou de produtos induzidos por peróxido nos tecidos (BLOOD *et al.*, 1988).

Segundo HIDIROGLOU *et al.* (1989) há pouca informação na literatura científica sobre a biodisponibilidade das várias formas de vitamina E em ruminantes, cujo sistema digestivo e metabolismo apresentam diferenças em relação às outras espécies animais. Entretanto, a vitamina E parece ser muito necessária durante o rápido crescimento de animais. A ingestão insuficiente por bezerros irá produzir níveis inadequados de deposição nas membranas celulares recém formadas, acarretando em redução da capacidade

de prevenir alterações peroxidativas iniciadas por radicais livres junto a estas membranas (REDDY *et al.*, 1985).

2.15. DEFICIÊNCIAS

Atualmente é evidente que diversas patologias de animais pecuários são causadas por ou estão associadas a uma deficiência de selênio ou de vitamina E, isoladamente ou em conjunto. Esta deficiência em geral associa-se com fatores predisponentes importantes, tais como ácidos graxos insaturados dietéticos, exercício não habitual e crescimento rápido em animais jovens. Estas doenças também são conhecidas como enfermidades responsivas a selênio-vitamina E porque com algumas exceções, podem ser evitadas por suplementação adequada da dieta com ambos os nutrientes (BLOOD *et al.*, 1988). A tabela 11 apresenta um resumo destas enfermidades.

Existem evidências que confirmam as hipóteses que os animais requerem na sua dieta antioxidantes para minimizar a destruição de radicais livres das membranas pela atividade de enzimas endógenas.(MACCAY & KING, 1980).

Segundo HARRISON & CONRAD (1984b) a suplementação com selênio (Se) e vitamina E em regiões deficientes em selênio reduzem incidência de doenças responsivas ao selênio como miopatia nutricional e retenção de placenta.

De acordo com HIDIROGLOU *et al.* (1989) a administração de uma dose maciça de vitamina E é um método usual na profilaxia da deficiência de vitamina E. OVERMAN *et al.* (citados por HIDIROGLOU *et al.*, 1989) reportaram que em humanos uma única dose oral maciça de vit E é efetiva para aumentar o teor de tocoferol livre no plasma significativamente após 6 horas.

Tabela 11 - Enfermidades consideradas como causadas por ou associadas a uma deficiência de selênio ou vitamina E, isoladamente, ou de ambas (incluindo as enfermidades "responsivas ao selênio").

ANIMAL	DOENÇA
BOVINOS	Distrofia muscular nutricional (enzoótica) Membranas fetais retidas
EQÜINOS	Distrofia muscular nutricional
SUÍNOS	Doença do coração em amora Hepatose dietética Diátese exudativa Hipersensibilidade ao ferro Distrofia muscular nutricional Anemia
OVINOS	Distrofia muscular nutricional (enzoótica) Definhamento Ineficiência reprodutiva Anormalidades da medula óssea

Fonte : BLOOD *et al.*, 1988.

2.15.1. RETENÇÃO DE PLACENTA

EGER *et al.*, (1985) aplicaram três semanas pré-parto baixas doses de selênio e vitamina E a 186 primíparas e 428 múltiparas da raça holandesa, com objetivo de observar a influência dos mesmos na incidência de retenção de placenta em vacas leiteiras, obtendo um efeito pouco consistente. Concluiu-se que o selênio sozinho não foi tão efetivo como em combinação com vitamina E, não se podendo descartar, no entanto, a possibilidade de que a existência de baixos níveis de vitamina E não possa também ser responsável por retenção de placenta.

2.15.2. MASTITE

SMITH *et al.*, (1984) estudaram o efeito da deficiência de selênio e vitamina E em 80 vacas, com relação à incidência clínica de mastite e seus sintomas, e obtiveram uma redução de 37% na incidência de mastites clínicas com a suplementação de vitamina E.

2.15.3. REPRODUÇÃO E LACTAÇÃO

Existe muito interesse quanto ao nível de selênio e vitamina E para a saúde reprodutiva e produtividade leiteira de vacas de leite (HARRISON & CONRAD, 1984b). HARRISON *et al.* (1984a) obtiveram os seguintes resultados trabalhando com vacas leiteiras que receberam injeção de selênio e vitamina E por via oral, divididas em quatro grupos : 1 - selênio e vitamina E, 2 - vitamina E, 3 - selênio, 4 - controle. A retenção de placenta foi de 17,5% nos grupos 2,3 e 4 e 0% no grupo 1 e a incidência de metrite foi de 60% para vacas injetadas com selênio e de 84% para as que não receberam selênio.

NORTON & McCARTHY (1986) observaram em ovelhas, nos primeiros 18 dias de lactação, uma baixa concentração plasmática de tocoferol, o que pode indicar uma transferência de tocoferol para o leite . Este fato sugere a necessidade de suplementação extra de vitamina E neste período da lactação.

2.15.4. IMUNOLOGIA

Suplementação com vitamina E tem demonstrado elevar a imunocompetência de bezerras (REDDY *et al.*, 1985). Segundo TENGERTY (1980) suplementação nas doses farmacológicas normais eleva a produção de anticorpos humorais especialmente IgG. A vitamina E por ser um agente protetor de membranas biológicas reduziria o nível de má formação das células de defesa por ação de radicais livres. A deficiência de vitamina E compromete o sistema de defesa do organismo.

Para avaliar o efeito da suplementação de vitamina E em relação ao status imunológico, ganho de peso e a incidência de síndrome responsiva PEHRSON *et al.* (1991) utilizaram trinta e oito bezerros inicialmente com três a sete semanas de idade, sendo um grupo suplementado nos primeiros dois meses com 200mg/dia de α -tocoferol, 400mg/dia nos seguintes dois meses e 600 mg/dia no restante do período, em contraste com o grupo controle que recebeu 50, 100 e 150mg/dia para os mesmos intervalos respectivamente. Avaliaram a resistência às doenças para ambos os grupos sob as mesmas condições, não se detectando nenhuma diferença em relação ao status imunológico para ambos os grupos.

2.15.5. Distrofia Muscular Nutricional

A doença mais reconhecida atribuída à deficiência de vitamina E em bezerros (REDDY *et al.*, 1985) e em carneiros (NORTON & McCARTHY, 1986) é a Distrofia Muscular Nutricional.

REDDY *et al.* (1985) estudaram os efeitos da suplementação de dl- α -tocoferol sobre a performance e o metabolismo de bezerros de vacas de leite com 3 meses de idade em condições normais de manejo através de administrações em dose única (doses 1400mg, 2800mg), com intervalos semanais, e observaram um incremento considerável através das semanas de experimento no nível de α -tocoferol do soro. Os seguintes valores médios encontrados podem ser vistos na tabela 12.

Tabela 12 - Valores médios de α -tocoferol ($\mu\text{g/dL}^2$ no soro) de bezerros de vacas de leite após administração de α -tocoferol em dose única semanal.

VALORES ENCONTRADOS NO SORO	DOSE ADMINISTRADA			
	0mg	1400mg (oral)	2800mg(oral)	1400UI (injeção)
α -TOCOFEROL	51,7	155,2	171,6	339,8

Fonte : REDDY *et al.*, 1985.

2.16. DDOS COMO FONTE DE VITAMINA E

2.16.1. OBTENÇÃO DO DDOS

A desodorização é a última etapa no refino do óleo de soja e consiste essencialmente em um processo de destilação por arraste de vapor, a alta temperatura e sob vácuo elevado, visando a melhoria da qualidade organoléptica dos óleos e estabilidade à oxidação. Ao eliminar de maneira muito intensa os ácidos graxos livres e as substâncias voláteis odorizantes e destruindo os peróxidos, ao mesmo tempo observa-se no óleo desodorizado uma eliminação parcial dos tocoferóis, esteróis e ésteres esterólicos (FAUR, 1989).

2.16.2. COMPOSIÇÃO DO DDOS

O Destilado do Desodorizado do Óleo de Soja (DDOS) é um subproduto do processo de desodorização do óleo de soja sendo rico em tocoferóis, de onde se retira vitamina E, através de processos de extração e concentração. Ocorre que estes processos elevam o custo da vitamina E obtida, o que de certa forma, dentro da realidade nacional, limita a sua utilização para a alimentação animal. Como forma alternativa de fornecimento de vitamina E, pode-se utilizar o DDOS "in natura". Na tabela 13 verifica-se a composição média de DDOS.

Tabela 13 : Componentes principais do DDOS

COMPOSTOS	PORCENTAGEM
TOCOFEROIS TOTAIS	2,00 - 9,00
α - TOCOFEROL	1,04
β - TOCOFEROL	0,18
γ - TOCOFEROL	5,03
δ - TOCOFEROL	2,04
TRIGLICERÍDEOS	2,00 - 5,00
ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS	60,00 - 70,00
ÁCIDOS GRAXOS LIVRES	36,00
ÁCIDOS GRAXOS ESTERIFICADOS	24,00
HIDROCARBONETOS	3,50
ESTERÓIS	26,00
PLASTOQUINONAS	< 3,00
ÁLCOOIS ALIFÁTICOS	< 3,00
TERPENÓIDES	< 3,00

Fonte: AUGUSTO (1988).

2.17. VALORES DE α -TOCOFEROL PLASMÁTICO EM RUMINANTES

Os valores plasmáticos normais de α -tocoferol encontrados na literatura para bovinos oscilam entre 2,5 a 4,5 $\mu\text{g/mL}$ (HIDIROGLOU *et al.*, 1989). Segundo REDDY *et al* (1985) uma concentração no soro menor que 2,0 $\mu\text{g/mL}$ é considerada diagnóstico de deficiência de vitamina E em ovinos e bovinos.

2.17.1. AUMENTO DOS VALORES PLASMÁTICOS DE α -TOCOFEROL

A determinação da relação entre a dose empregada e a concentração nos diferentes tecidos, para a escolha da dose ideal de DDOS a ser empregada depende de algumas variáveis que são difíceis de serem obtidas como por exemplo a constante de

absorção e a biodisponibilidade (que é o resultado da inter-relação entre a eliminação natural, absorção, metabolização na parede intestinal, volume da circulação porta-hepática, metabolização no fígado, quantidade disponível, volume de distribuição e "clearance" renal ou extrarenal).

HIDIROGLOU *et al.* (1989) mediram a resposta do plasma sanguíneo ao α -tocoferol em ovinos e bovinos supridos com formas químicas diferentes de tocoferol, mas em igual quantidade fornecidos em uma única megadose (100mg/kg de peso vivo para ovinos e 50mg/kg de peso vivo para bovinos), detectando uma pronunciada elevação na curva de absorção no intervalo correspondente a 48 horas, seguida de uma queda brusca. Esta elevação é designada como uma curva de tolerância. A curva de tolerância reflete a absorção intestinal de vitamina E sendo o pico o momento de máxima absorção.

A figura 3 mostra a curva de absorção plasmática obtida por HIDIROGLOU *et al.* (1989) de quatro novilhas mestiças de leite (pesando cerca de 250 kg); A duas novilhas foi administrado oralmente uma dose de 50 mg/kg de peso vivo de dl- α -tocoferol e às outras duas a mesma dose de dl- α -tocoferol acetato.

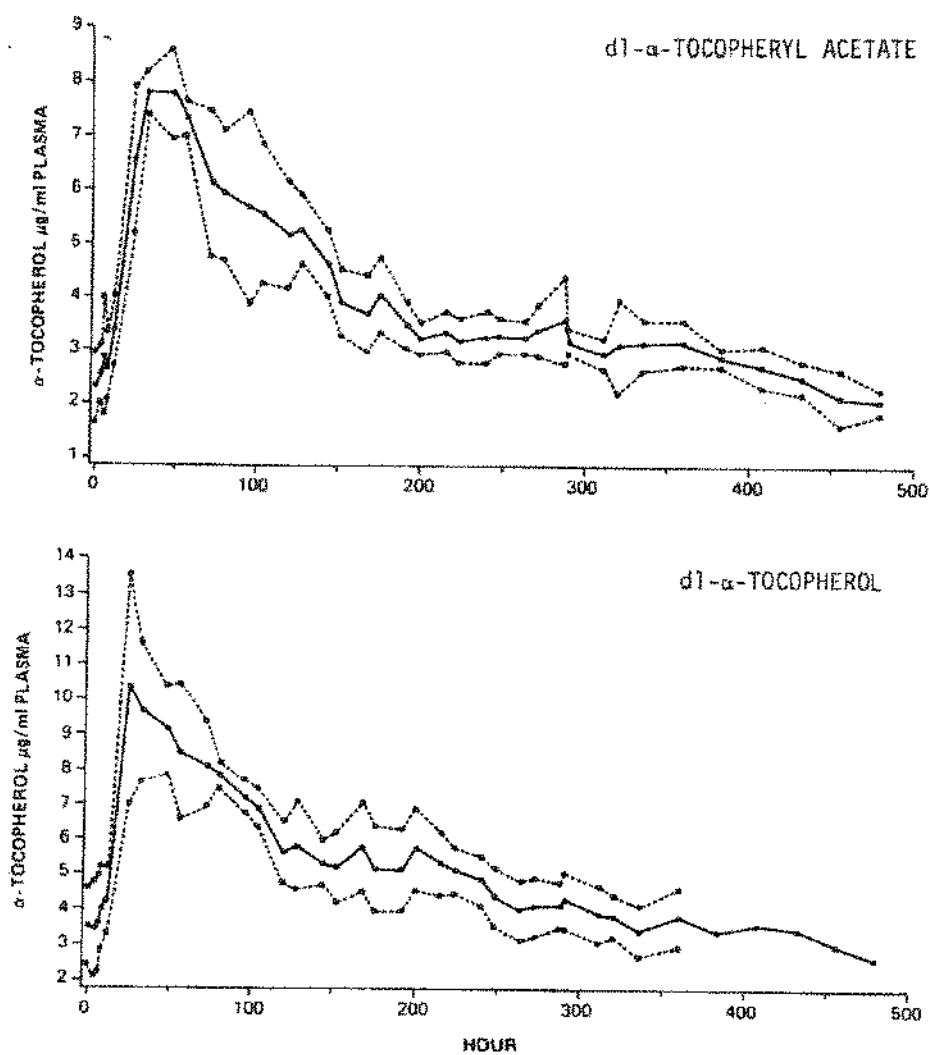


Figura 3 : Concentração ($\mu\text{g/mL}$) de tocoferol no plasma em bovino após administração de uma única dose (50mg/kg de peso vivo) de acetato de dl- α -tocoferol ou dl- α -tocoferol. média aritmética (—) e desvio padrão (----).

Fonte : HIDIROGLOU *et al.*, (1989).

Para o planejamento, execução e posterior avaliação deste experimento fez-se necessário a consideração de importantes parâmetros no tocante à fisiologia digestiva peculiar dos ruminantes, uma vez que seu sistema digestivo possui estômago compartimentalizado, uma flora microbiana ativa, muito rica e sensível e apresenta um tempo de residência do bolo alimentar a nível estomacal elevado, bem como outras variáveis que fazem com que as relações fármaco-fisiológicas de uma administração por via oral sejam muito diferentes de outras espécies animais.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. MATÉRIA PRIMA

Utilizou-se para realização deste trabalho nove bovinos machos castrados (novilhos), adultos, da raça Nelore (*Bos indicus*), que se encontravam sob regime de pasto (*Brachiaria decumbens*), recebendo suplementação mineral (sal mineral comercial), no campus da Universidade de São Paulo localizado no município de Pirassununga Estado de São Paulo.

O DDOS, fornecido pela CEVAL Alimentos S/A localizada em Uberlândia, MG, foi obtido através de "striping" de nitrogênio. Seu teor em tocoferóis pode ser visto na tabela 14.

Tabela 14 : Porcentagem dos tocoferóis encontrados no DDOS.

TOCOFEROL	% no DDOS
α -Tocoferol	1,95
γ -Tocoferol	8,45
$\beta + \delta$ -Tocoferol	4,10
Total	14,50

3.1.2. REAGENTES E PADRÕES

Os reagentes utilizados foram de grau PA, sendo de grau cromatográfico aqueles empregados na técnica de cromatografia líquida.

Os Padrões utilizados foram produzidos pela Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA : "d- α -tocopherol" 400mg/g em óleo de soja, "(+)- γ -tocopherol" 5mg e "(+)- δ -tocopherol" aproximadamente 90% de pureza.

"Pyrogallol" Fluka Chemika 98% para CLAE.

3.1.3. EQUIPAMENTOS

Além dos equipamentos de uso comum em laboratório químico foram também utilizados:

- Filtros descartáveis para CLAE
- Coluna para CLAE C18-SIL x 10 fase reversa, Perkin-Elmer, 250 x 4,6mm
- Cromatógrafo para CLAE Perkin-Elmer, modelo Isocratic LC Pump 250, equipado com espectrofotômetro UV/visível Perkin-Elmer LC 290.
- Tubos de centrifuga de rosca, de teflon, com volume de 15mL.
- Banho de aquecimento marca MGW Lauda, modelo M3.
- Agitador Pneumático para tubos marca Phoenix, modelo AT56.
- Integrador Hewlett Packard, modelo HP3395.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. DETERMINAÇÃO DE TOCOFERÓIS

O teor de tocoferol total do DDOS foi determinado pelo método colorimétrico, por redução do íon cúprico de acordo com CONTRERAS-GUZMAN & STRONG (1982).

A análise da composição em diferentes tocoferóis do DDOS e teor de α e γ -tocopherol no plasma bovino obtido antes e após a ingestão de DDOS foi realizada no Laboratório de Óleos e Gorduras da Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, segundo UEDA & IGARASHI, (1990) por CLAE em coluna C18/fase reversa, detector de ultra violeta, absorvância medida a 292nm. A fase móvel empregada foi metanol/água 97:03 fluxo de 1mL/min sob condições isocráticas.

As curvas padrão foram elaboradas individualmente, uma curva para cada padrão, diluídas à faixa de concentração de 2-12 μ g/mL para α -tocopherol e de 1-10 μ g/mL para γ -tocopherol. Os padrões foram pesados e diluídos imediatamente em n-hexano, e após diluídos até a concentração estipulada para cada ponto, e então injetados na coluna.

Somente ocorreu absorção plasmática de α e γ -tocopherol. Por isso realizou-se teste de recuperação para α e γ -tocopherol adicionando-se a uma mesma amostra de plasma bovino, com 3,2 μ g/mL de α -tocopherol e 0,0 μ g/mL de γ -tocopherol, três concentrações α e γ -tocopherol correspondendo a um acréscimo de 2, 4 e 6 μ g/mL de plasma de ambos, α e γ -tocopherol. A recuperação obtida correspondeu a 102% para α -tocopherol e 97% para γ -tocopherol. Estes dados foram utilizados para elaboração de um índice de correção dos valores de α e γ -tocopherol encontrados no plasma bovino. Os índices utilizados foram 0,98 para α e 1,03 para γ -tocopherol.

O teste de recuperação consistiu em: colocar em um tubo de ensaio, 1mL da diluição do padrão em n-hexano, evaporar o solvente sob fluxo de nitrogênio e adicionar 1mL de plasma, que foi então homogeneizado e submetido ao processo de extração para análise em CLAE.

As amostras de plasma foram analisadas em triplicata, obtendo-se para cada coleta de um mesmo animal três medidas, destas obteve-se um valor médio que foi utilizado para avaliação dos tratamentos. As amostras foram extraídas seguindo o fluxograma da figura 4.

Deve-se observar que, para haver reprodutibilidade e precisão nos resultados obtidos nas análises o controle da temperatura do ambiente onde se encontra o cromatografo líquido de alta eficiência bem como a fase móvel utilizada deve ser rigoroso não devendo haver a mínima flutuação de temperatura, uma vez que não se utilizou padronização interna. Para plasma bovino utilizou-se 0,4 mL de amostra, esta era levemente homogeneizada e pipetada em tubo de teflon para processar-se a extração e concentração e posteriormente injeção em CLAE.

3.2.1.1. FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DE TOCOFERÓIS

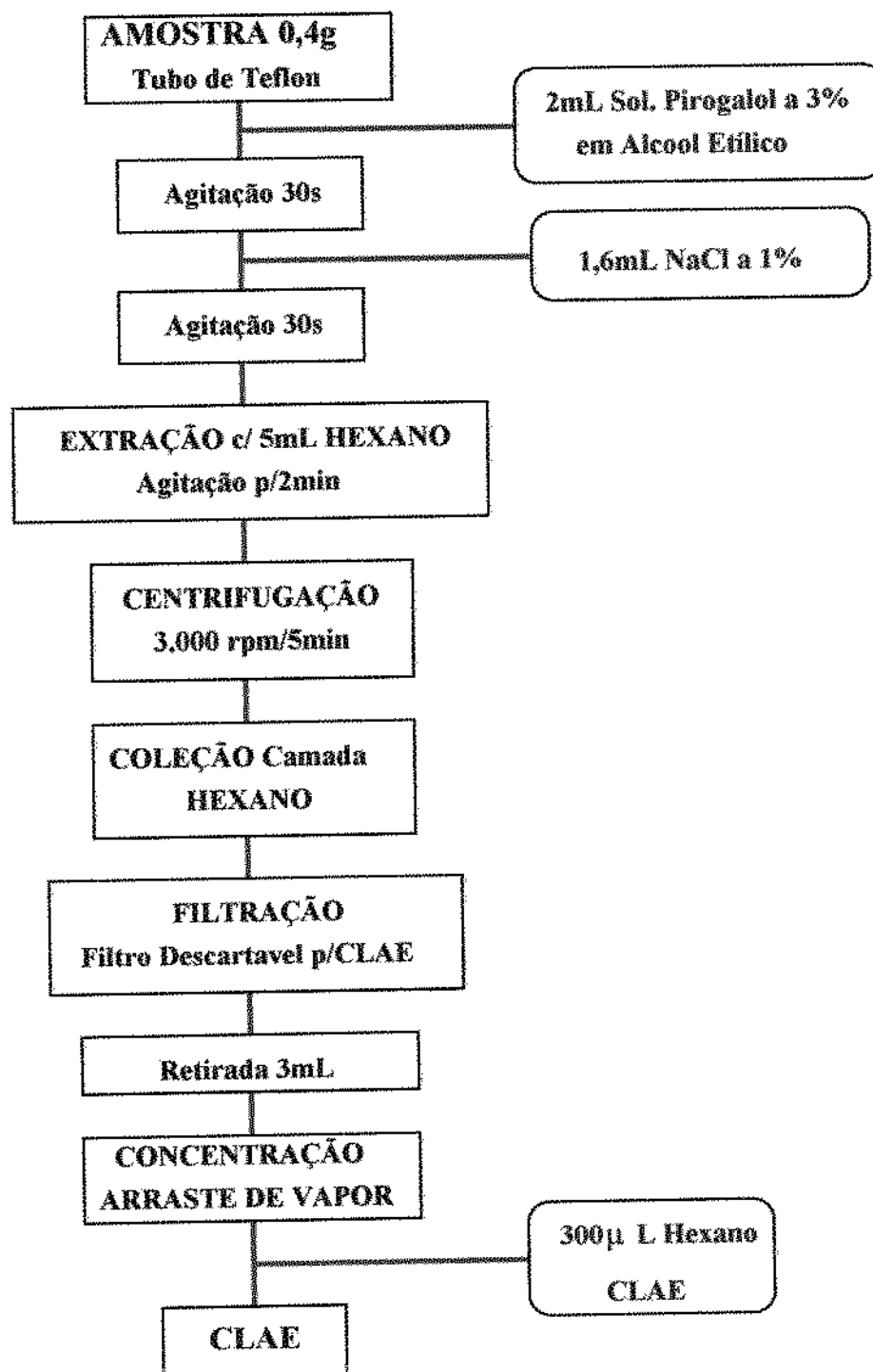


Figura 4 : Fluxograma de extração de tocoferóis do **DDOS** e **PLASMA** para análise em **CLAE**

3.2.1.2. CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES DE TOCOFERÓIS

Para cálculo da concentração de tocoferóis da amostra tomou-se a área obtida (y) e substituiu-se na equação da reta para encontrar o valor (x) que corresponde a uma concentração em 0,8mL de amostra/mL de hexano (0,4mL de amostra são extraídos com 5mL de hexano obtendo-se uma concentração do material extraído em 5mL correspondendo a 0,08mL de amostra por mL de hexano, este então é concentrado 10 vezes antes da injeção no CLAE). O valor obtido é, então, multiplicado por 1,25 para se obter a concentração do tocoferol para 1mL de amostra e em seguida multiplicado pelo índice obtido pelo teste de recuperação de acordo com o tocoferol em questão (0,98 para α -tocopherol e 1,02 para o γ -tocopherol). Para o DDOS fez-se necessário uma diluição no extrato obtido em hexano de 30x para adequar a área obtida às curvas padrões, por isso multiplicou-se o resultado final obtido por 30.

3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O experimento com os novilhos foi realizado no mês de setembro de 1994 no Campus da Universidade de São Paulo (USP) localizado no Município de Pirassununga. Os bovinos estavam magros devido a pouca oferta de alimento pois ocorria uma seca prolongada.

3.3.1. DISTRIBUIÇÃO DOS INDIVÍDUOS

Nove novilhos foram pesados e ordenados em ordem decrescente de peso, sendo então divididos em grupos de três novilhos por proximidade de peso. A partir destes grupos iniciais formou-se os grupos definitivos selecionando-se de cada grupo inicial, aleatoriamente, um indivíduo. Desse modo, em cada grupo definitivo teve-se um novilho mais pesado, um intermediário e um mais leve (tabela 15). Cada grupo definitivo recebeu, então, por meio de uma sonda gástrica uma dose única de DDOS.

Durante a execução do experimento dois novilhos vieram a óbito por insuficiência respiratória, nos 082 e 097, devido a ter ocorrido falsa via quando da administração do DDOS por meio de sonda oro-esofágica. A necropsia destes animais

detectou grande presença de DDOS nos pulmões, produzindo bolhas de gordura que obstruíram a passagem de ar e a troca de gases nos alvéolos. Este fato serviu para alertar para a necessidade de se usar uma forma diferente de aplicação em novos trabalhos, provavelmente aplicação intra-ruminal.

3.3.2. DETERMINAÇÃO DAS DOSES DE DDOS.

As doses empregadas foram estipuladas tendo como limite a dose utilizada por HIDIROGLOU et al. (1989) que empregou, 50mg/kg de peso vivo de dl- α -tocoferol ou de acetato de dl- α -tocoferol em dose única oral, dose esta que foi considerada pelos autores como "megadose". Por não se esperar, inicialmente, que houvesse absorção significativa de outros tocoferóis que não o α -tocoferol, as doses de DDOS foram estipuladas exclusivamente com base no teor de α -tocoferol. Posteriormente devido a acentuada presença de γ -tocoferol no plasma, avaliou-se a teor de γ -tocoferol presente em cada dose. As doses de DDOS (com 1,95 % de α -tocoferol e 8,45 % de γ -tocoferol) empregadas foram de 15, 30 e 45 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo e 65, 130 e 190mg/kg de γ -tocoferol/kg de peso vivo respectivamente para cada grupo. A identificação dos novilhos, peso e doses de DDOS aplicadas podem ser vistos na tabela 15.

Tabela 15 : Distribuição e peso dos animais em experimento e respectivas doses de DDOS, α -tocoferol, γ -tocoferol e vitamina E correspondente ao teor total de α e γ -tocoferóis aplicados.

Novilhos	Peso Vivo (kg)	DDOS (g)	DDOS (g/kg)	α -Tocoferol (mg/kg)	γ -Tocoferol (mg/kg)	Vitamina E (UI/kg)*
099	374	280	0,75	15	65	41,85
098	400	300	0,75	15	65	41,85
076	415	311	0,75	15	65	41,85
082	369	553	1,50	30	130	83,70
052	392	588	1,50	30	130	83,70
110	407	610	1,50	30	130	83,70
097	334	751	2,25	45	195	125,50
197	389	875	2,25	45	195	125,50
074	402	904	2,25	45	195	125,50

* Calculado com base na tabela 02, considerando-se somente a ingestão de α e γ -tocoferol.

3.3.3 COLETA DE SANGUE

Após a dosificação oral coletou-se, por punção da veia jugular, duas amostras de sangue de cada animal em tubos "vacutainer" heparinizados, esterilizados, que foram levemente homogeneizados e em seguida centrifugados por 10 minutos a 5000 rpm, para separação do plasma que foi coletado logo em seguida com pipeta de 5mL e acondicionado em vidros âmbar numerados, hermeticamente fechados e submetidos à congelamento a -20°C. Repetiu-se então o mesmo procedimento de coleta de amostras nas 14, 23, 38, 47 e 62 horas seguintes.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CURVAS PADRÃO

As figuras 5 e 6 apresentam, respectivamente, as curvas padrões de α e γ -tocoferol obtidas no presente trabalho.

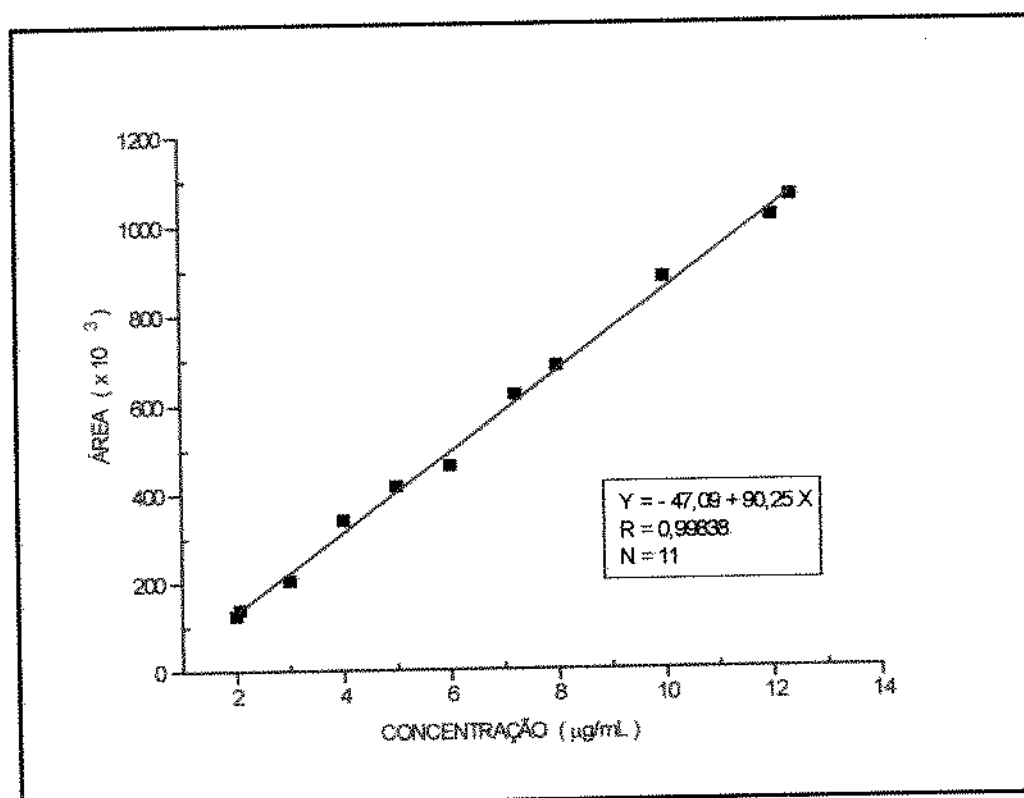


Figura 5 : Curva Padrão de α -tocoferol, concentração variando de 2 a 12,37 $\mu\text{g/mL}$ e áreas obtidas de 125728 a 1060304 u.a. respectivamente.

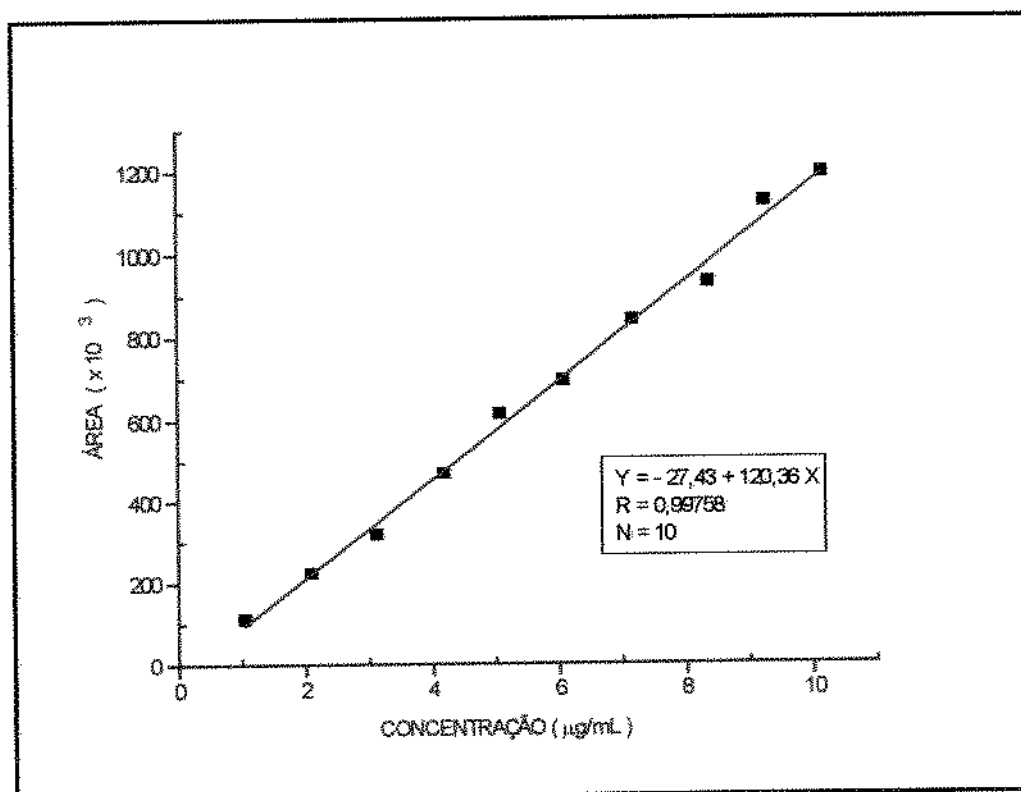


Figura 6 : Curva Padrão de γ -tocoferol, concentração variando de 1,03 a 10,15 $\mu\text{g/mL}$ e áreas obtidas de 112495 a 1195020 u.a. respectivamente.

4.2. CROMATOGRAMAS

Os cromatogramas resultantes das análises realizadas por CLAE podem ser observados a seguir. A figura 7 apresenta o cromatograma de uma solução padrão contendo α e γ -tocoferol diluídos em n-hexano.

A figura 8 apresenta o cromatograma do DDOS utilizado no presente trabalho, pode-se observar os picos de α , γ e δ -tocoferol, os teores destes foram expressos na tabela (14), o teor de $\delta + \beta$ -tocoferol foi estimado com base na diferença entre a soma dos outros tocoferóis em relação ao teor de tocoferol total determinado pelo método de Redução do Íon Cúprico. Para análise do DDOS fez-se necessário uma diluição de 1:30, antes da injeção na coluna, para que se pudesse obter picos com área dentro da faixa de variação das curvas padrões, pois este continha uma elevada concentração de tocoferóis.

As figuras 9 e 10 correspondem respectivamente aos cromatogramas de duas amostras de plasma bovino provenientes do mesmo animal suplementado com uma dose de DDOS equivalente a 45mg/kg de peso vivo de α -tocoferol e 195mg/kg de peso vivo de γ -tocoferol, coletadas no tempo 0 (zero) e 38 horas após administração oral.

No Cromatograma apresentado na figura 9 não se observa a presença de γ -tocoferol no plasma, caso ocorra, esta não é passível de ser detectada na concentração utilizada. Este animal não havia recebido, antes da coleta, nenhuma suplementação de qualquer fonte de tocoferol.

No cromatograma apresentado na figura 10 pode-se observar um incremento no pico correspondente ao α -tocoferol, em relação a figura 9, e a presença de um pico com tempo de eluição menor correspondente ao γ -tocoferol, demonstrando uma acentuada presença deste, o que não ocorria anteriormente.

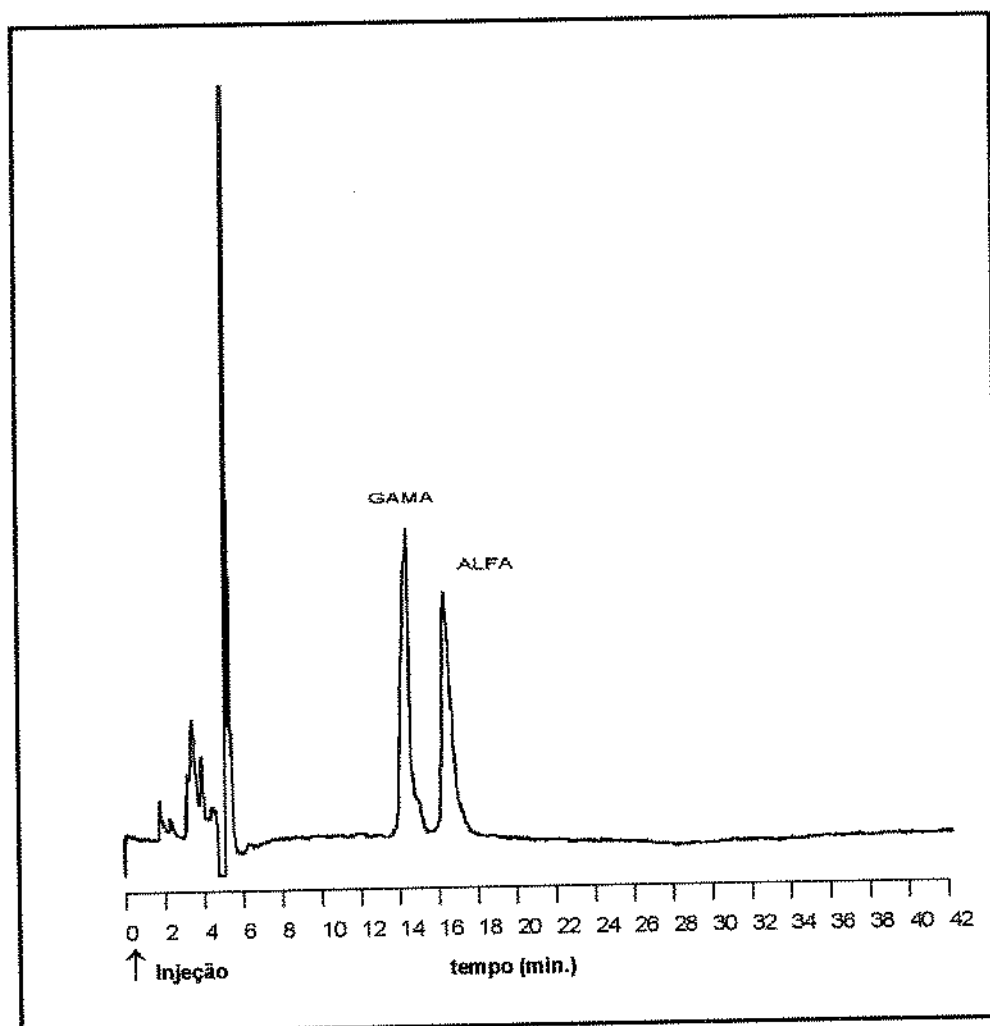


Figura 7 : cromatograma de uma solução padrão contendo α e γ -tocoferol diluídos em n-hexano, obtido em cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Isocratic LC Pump 250, equipado com espectrofotômetro UV/visível Perkin-Elmer LC 290, absorbância a 292 nm. Em condições isocráticas, coluna Perkin-Elmer C18-SIL x 10 fase reversa 250 x 4,6 mm, fase móvel metanol/água 97:3.

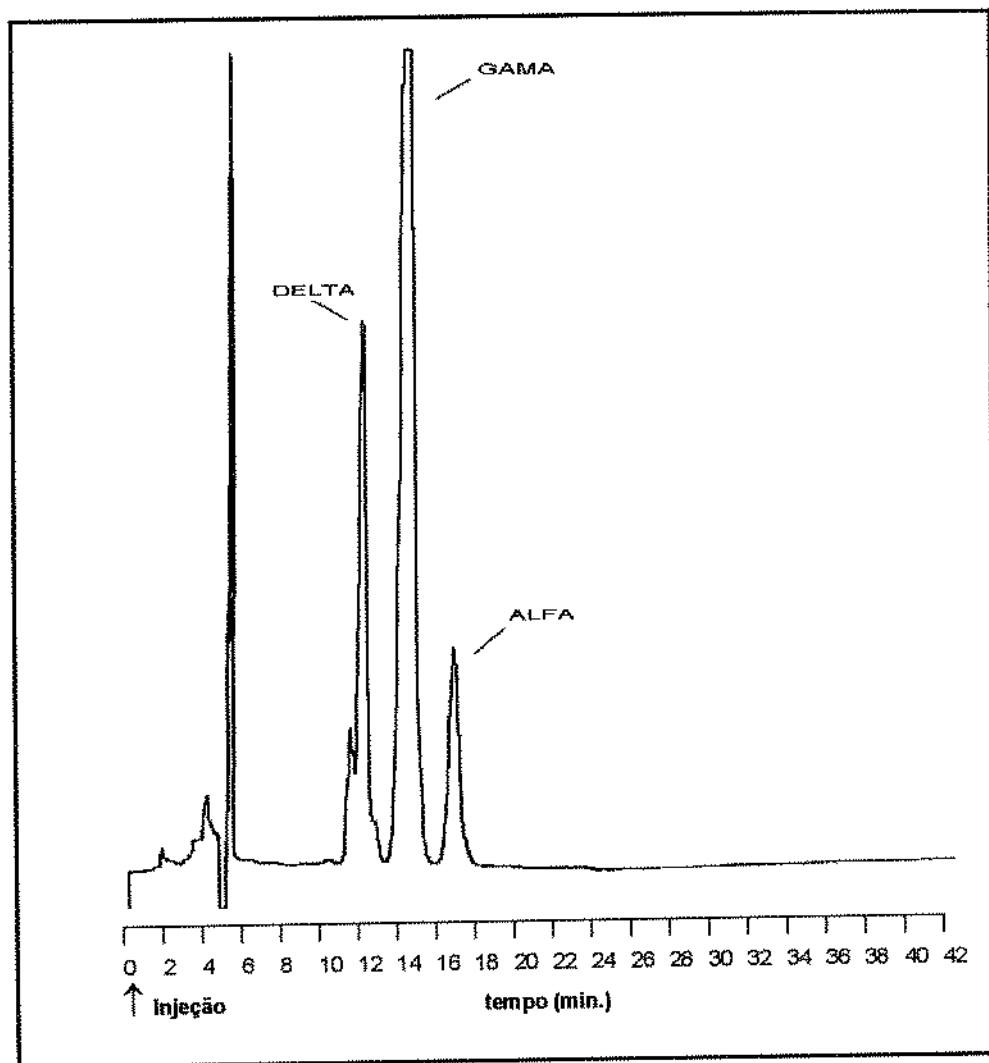


Figura 8 : Cromatograma de uma amostra de DDOS mostrando os picos de α , γ e δ -tocoferol, obtido em cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Isocratic LC Pump 250, equipado com espectrofotômetro UV/visível Perkin-Elmer LC 290, absorbância a 292 nm. Em condições isocráticas, coluna Perkin-Elmer C18-SIL x 10 fase reversa 250 x 4,6 mm, fase móvel metanol/água 97:3.

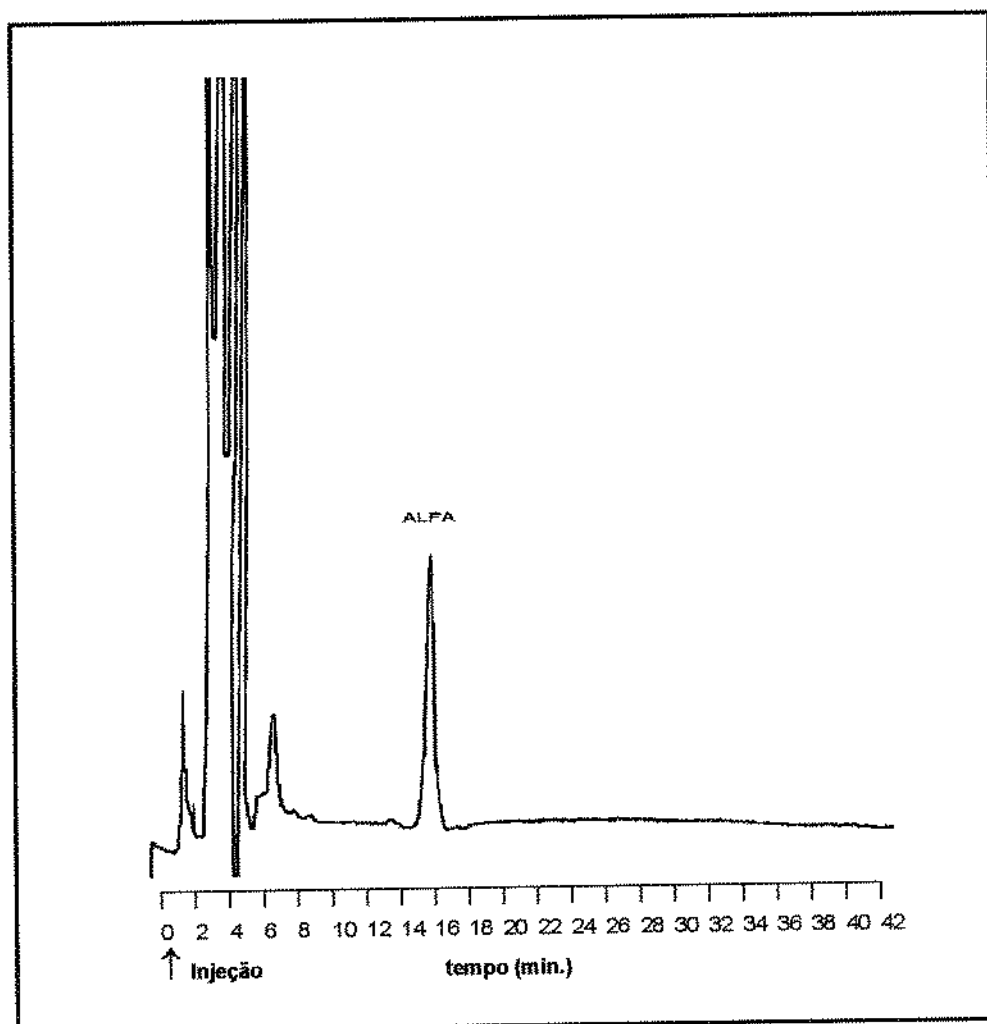


Figura 9 : Cromatograma de uma amostra de plasma bovino, proveniente de um novilho, coletada no tempo 0 (zero) antes de receber suplementação com DDOS, obtido em cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Isocratic LC Pump 250, equipado com espectrofotômetro UV/visível Perkin-Elmer LC 290, absorvância a 292 nm. Em condições isocráticas, coluna Perkin-Elmer C18-SIL x 10 fase reversa 250 x 4,6 mm, fase móvel metanol/água 97:3.

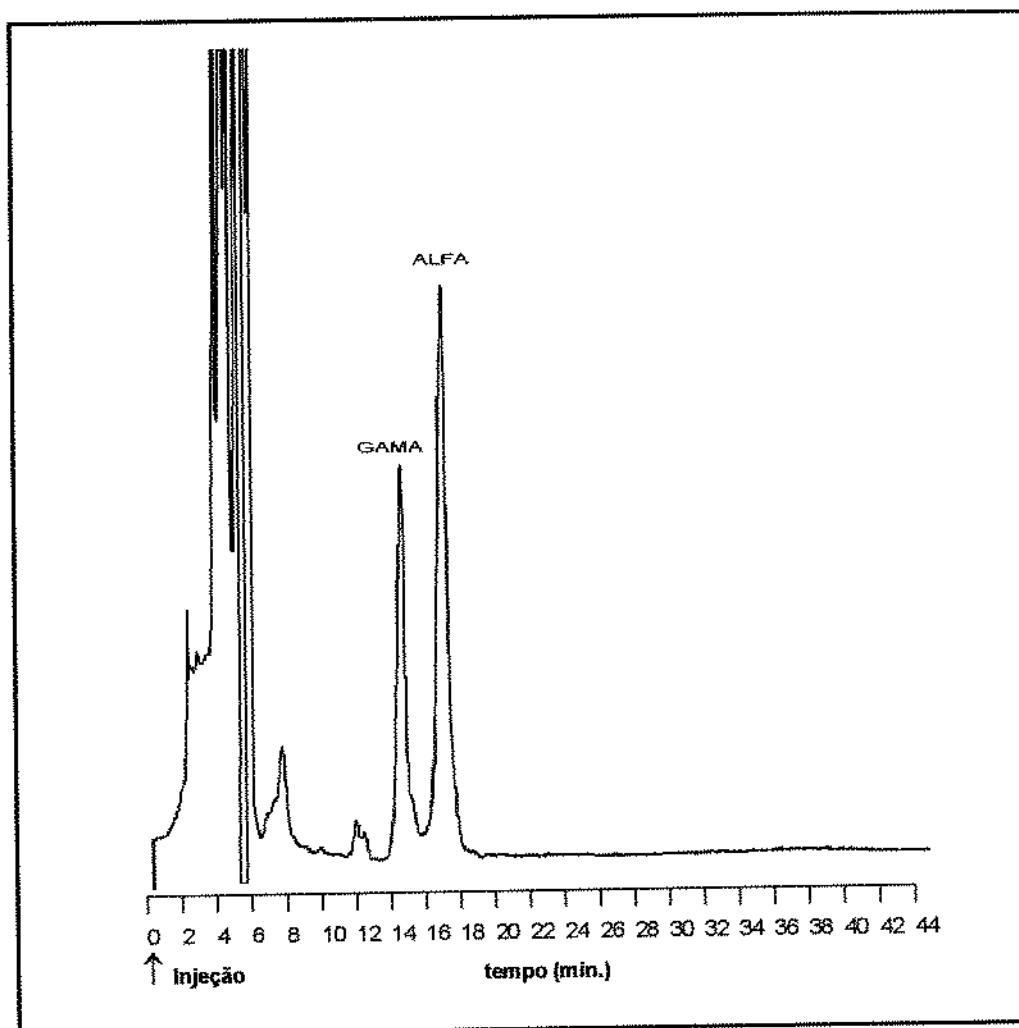


Figura 10 : Cromatograma de uma amostra de plasma bovino proveniente de um novilho que recebeu uma dose única oral de DDOS, contendo 45 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo e 195 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo, coletada após 38 horas, obtido em cromatógrafo Perkin-Elmer modelo Isocratic LC Pump 250, equipado com espectrofotômetro UV/visível Perkin-Elmer LC 290, absorvância a 292 nm. Em condições isocráticas, coluna Perkin-Elmer C18-SIL x 10 fase reversa 250 x 4,6mm, fase móvel metanol/água 97:3.

4.3. VALORES OBTIDOS PARA ABSORÇÃO DE α -TOCOFEROL

As curvas de absorção plasmática de α -tocoferol obtidas no presente trabalho podem ser vistas a seguir nas figuras 11, 12, 13 e 14. Estas relacionam exclusivamente a variação da concentração plasmática de α -tocoferol em relação ao tempo. Pode-se observar a elevação dos níveis plasmáticos de α -tocoferol em consequência do fornecimento das três diferentes doses de DDOS empregadas. A figura 11 apresenta a curva de absorção referente aos novilhos de nº 99, 98 e 76 que receberam a menor dose de DDOS, contendo 15 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo. A figura 12 apresenta a curva de absorção dos novilhos de nº 52 e 110 do grupo de dose intermediária que recebeu uma dose de DDOS contendo 30 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo e a figura 13 dos novilhos de nº 74 e 197 pertencentes ao grupo que recebeu a maior dose de DDOS contendo 45mg de α -tocoferol/kg de peso vivo. A figura 14 apresenta o gráfico dos valores médios de absorção de α -tocoferol de todos os tratamentos.

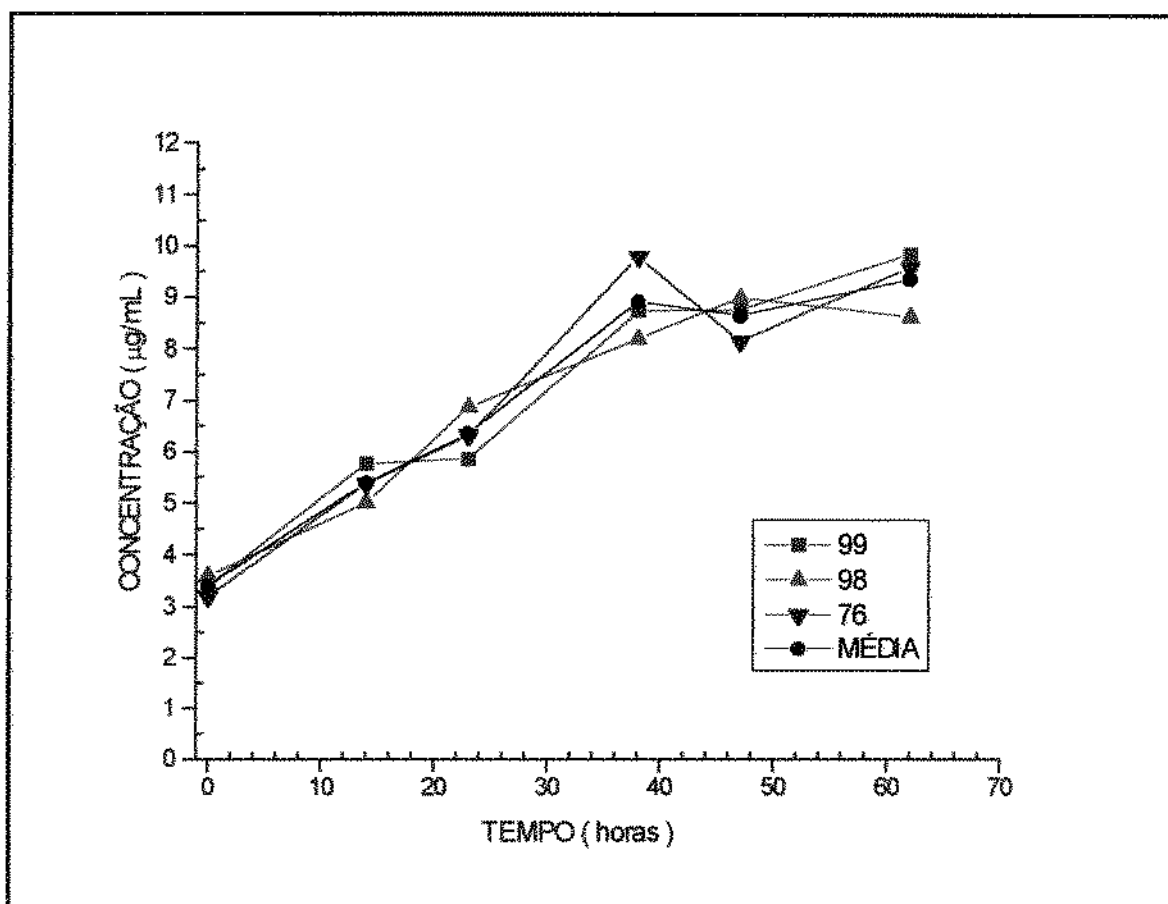


Figura 11 : Curva de absorção plasmática de α -tocoferol obtida de novilhos nelore (nos 99, 98 e 76) que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 15 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo a 22,35 UI de vitamina E/kg de peso vivo).

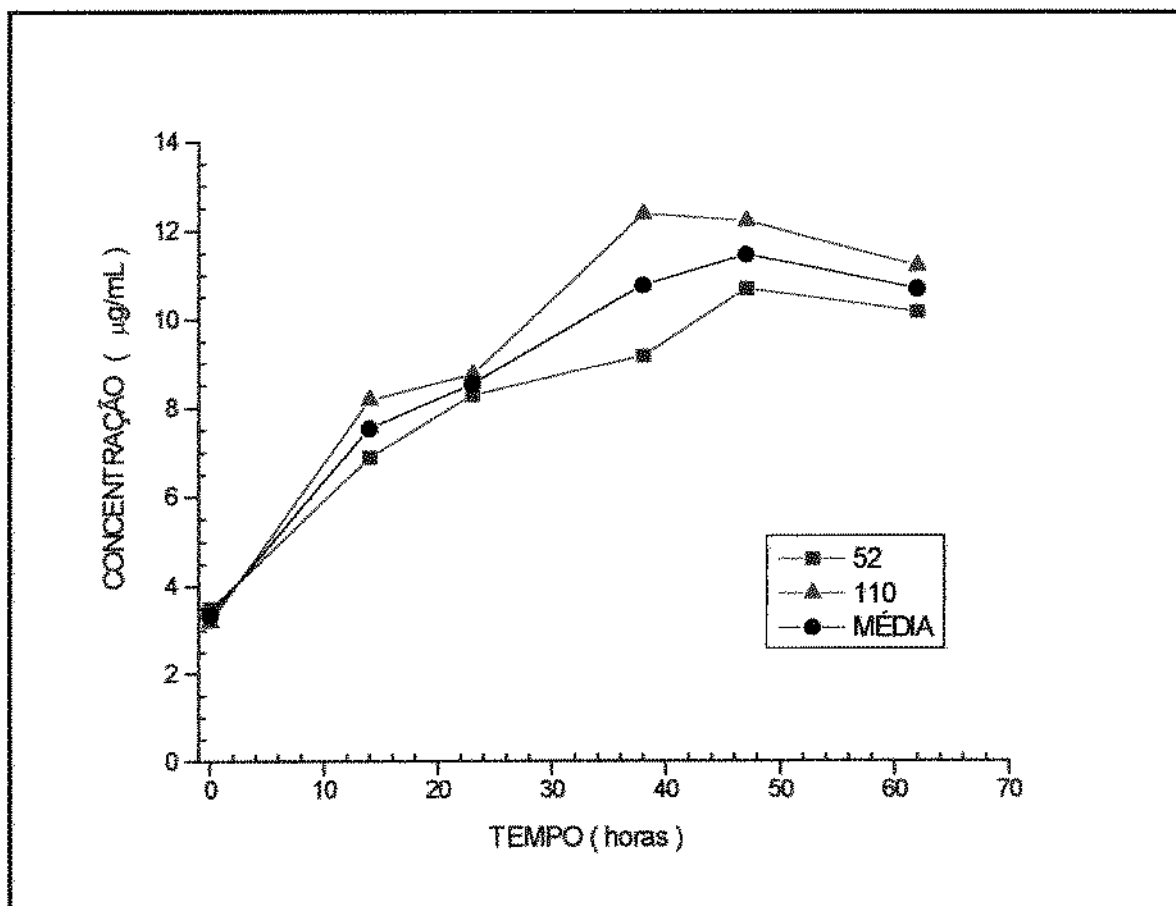


Figura 12 : Curva de absorção plasmática de α -tocoferol obtida de novilhos nelore (nos 52 e 110) que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 30 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo a 44,70 UI de vitamina E/kg de peso vivo).

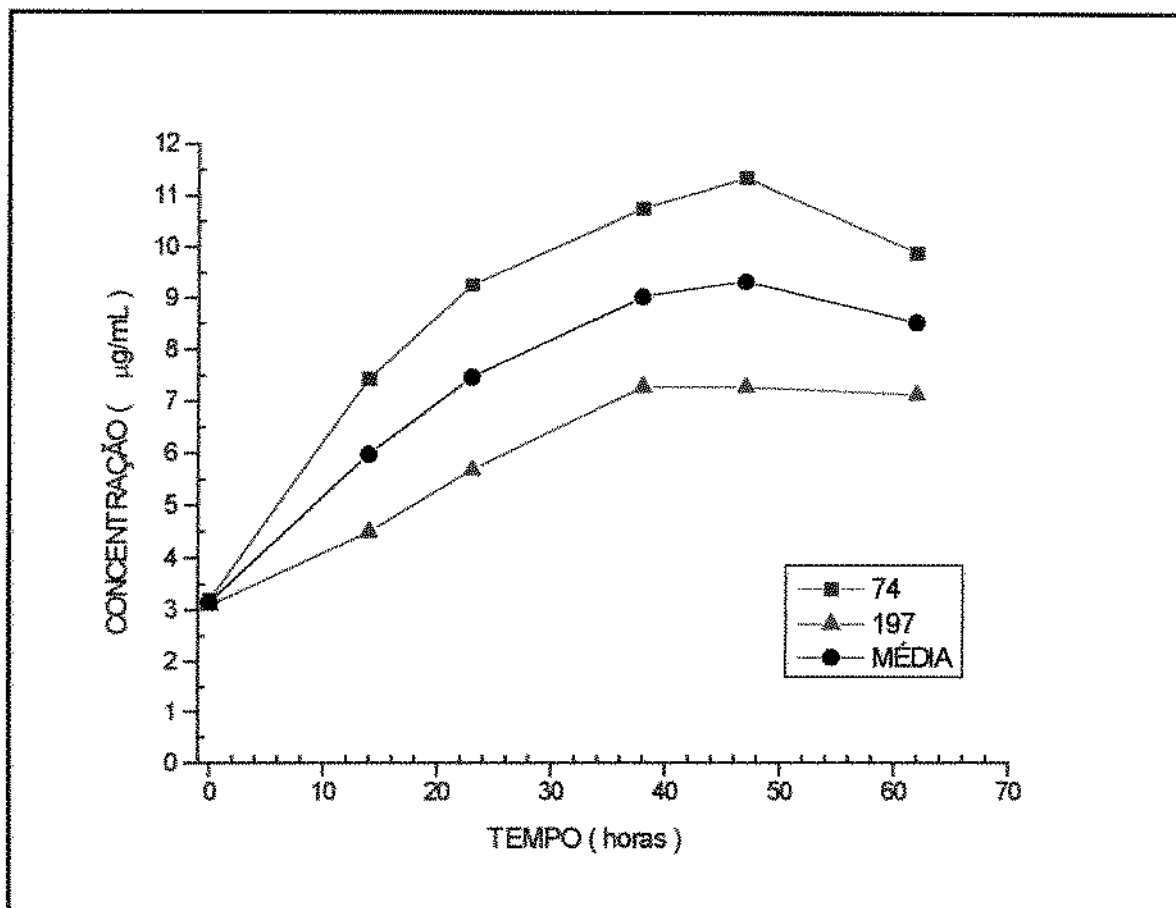


Figura 13 : Curva de absorção plasmática de α -tocoferol obtida de novilhos nelore (nos 74 e 197) que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 45 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo a 76,05 UI de vitamina E/kg de peso vivo).

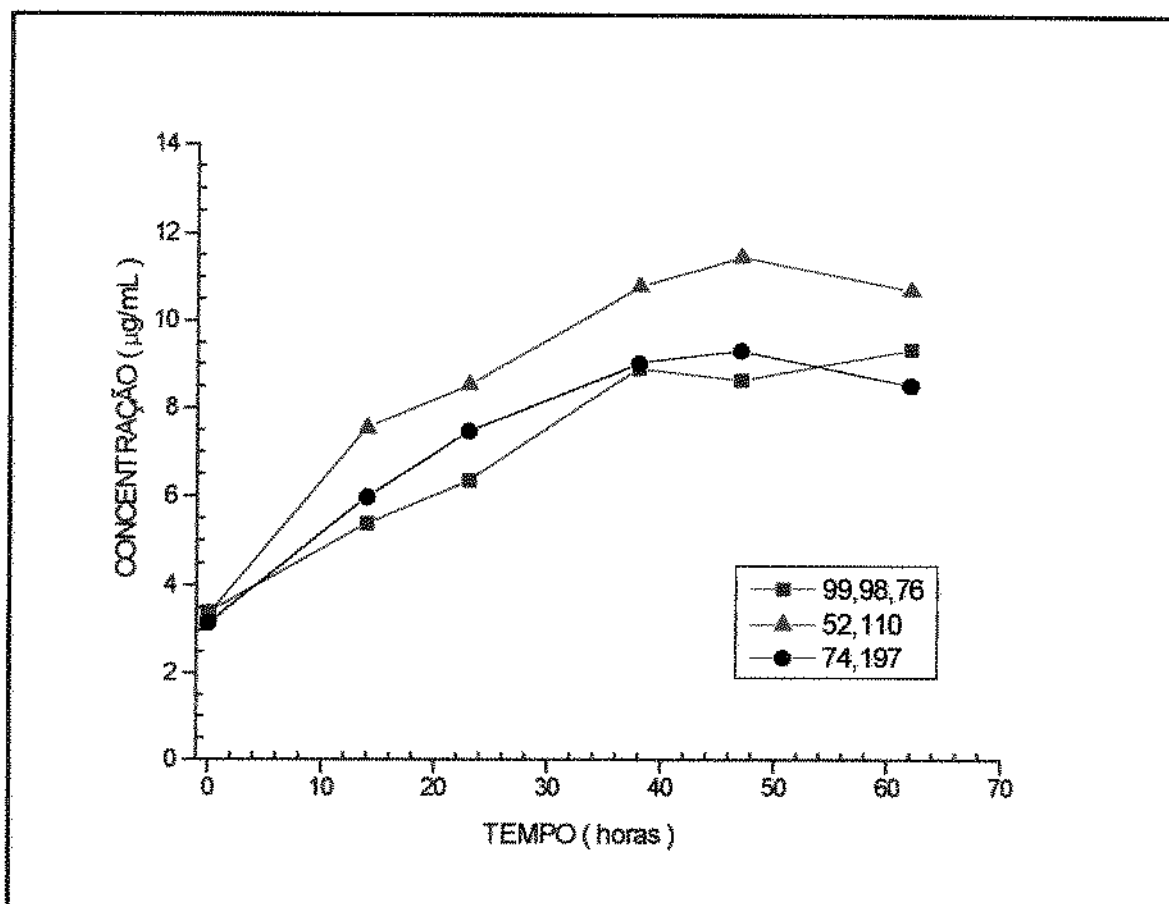


Figura 14 : Médias das curvas de absorção plasmática de α -tocoferol obtidas de novilhos nelore nºs 99, 98 e 76; 52 e 110 e 74 e 197 que receberam respectivamente uma dose única oral de DDOS contendo 15, 30 e 45 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo respectivamente a 22,35; 44,70 e 76,05 UI de vitamina E/kg de peso vivo).

4.4. VALORES OBTIDOS PARA ABSORÇÃO DE γ -TOCOFEROL

As curvas de absorção plasmática de γ -tocoferol obtidas no presente trabalho podem ser vistas a seguir nas figuras 15, 16, 17 e 18. Estas relacionam exclusivamente à incorporação de γ -tocoferol no plasma em relação ao tempo. Pode-se observar a elevação dos níveis plasmáticos de γ -tocoferol em consequência do fornecimento das três diferentes doses de DDOS empregadas. A figura 15 apresenta a curva de absorção referente aos novilhos de nº 99, 98 e 76 que receberam a menor dose de DDOS contendo 65 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo. A figura 16 apresenta a curva de absorção dos novilhos de nº 52 e 110 do grupo de dose intermediária que recebeu uma dose de DDOS contendo 130 mg/kg de peso vivo e a figura 17 dos novilhos de nº 74 e 197 pertencentes ao grupo que recebeu a maior dose de DDOS contendo 195 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo. A figura 18 apresenta o gráfico dos valores médios de absorção de γ -tocoferol de todos os tratamentos.

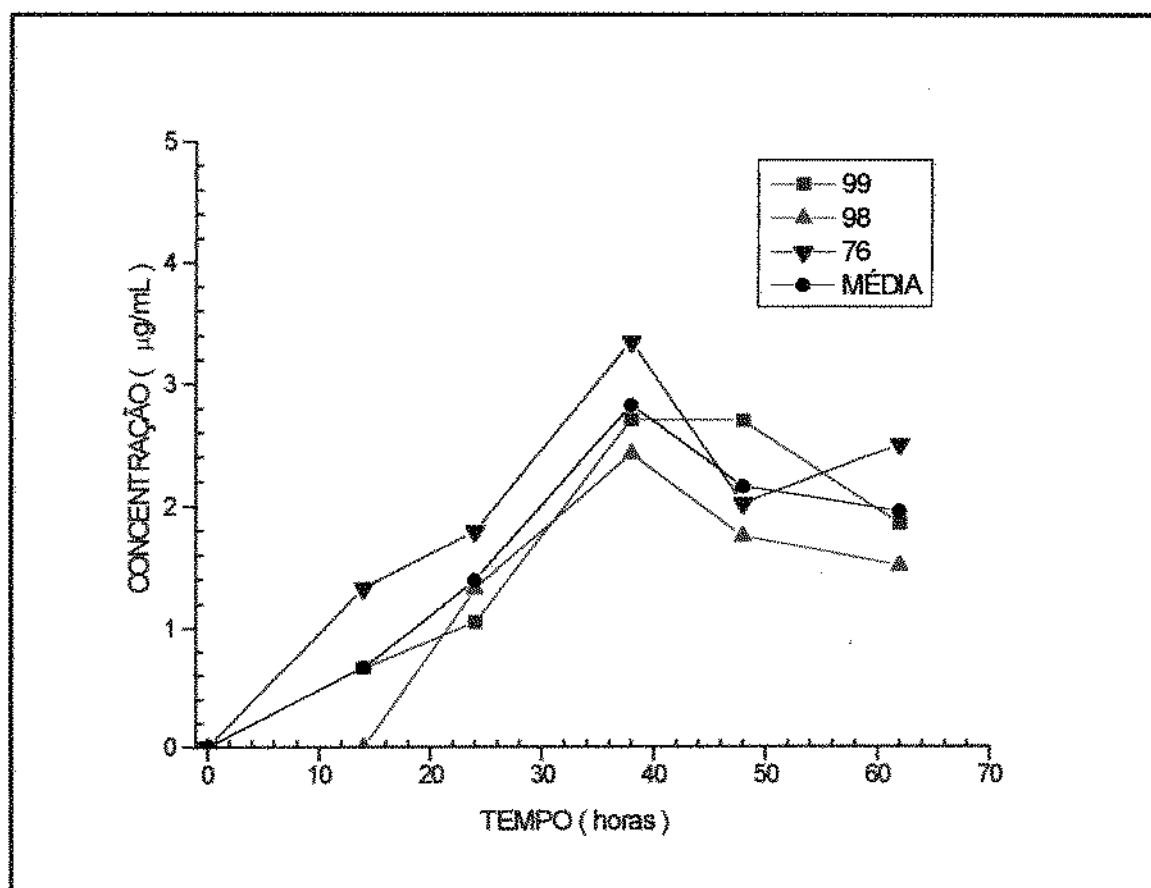


Figura 15 : Curva de absorção plasmática de γ -tocoferol obtida de novilhos nelore n^{os} 99, 98 e 76 que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 65 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo a 19,5 UI de vitamina E/kg de peso vivo).

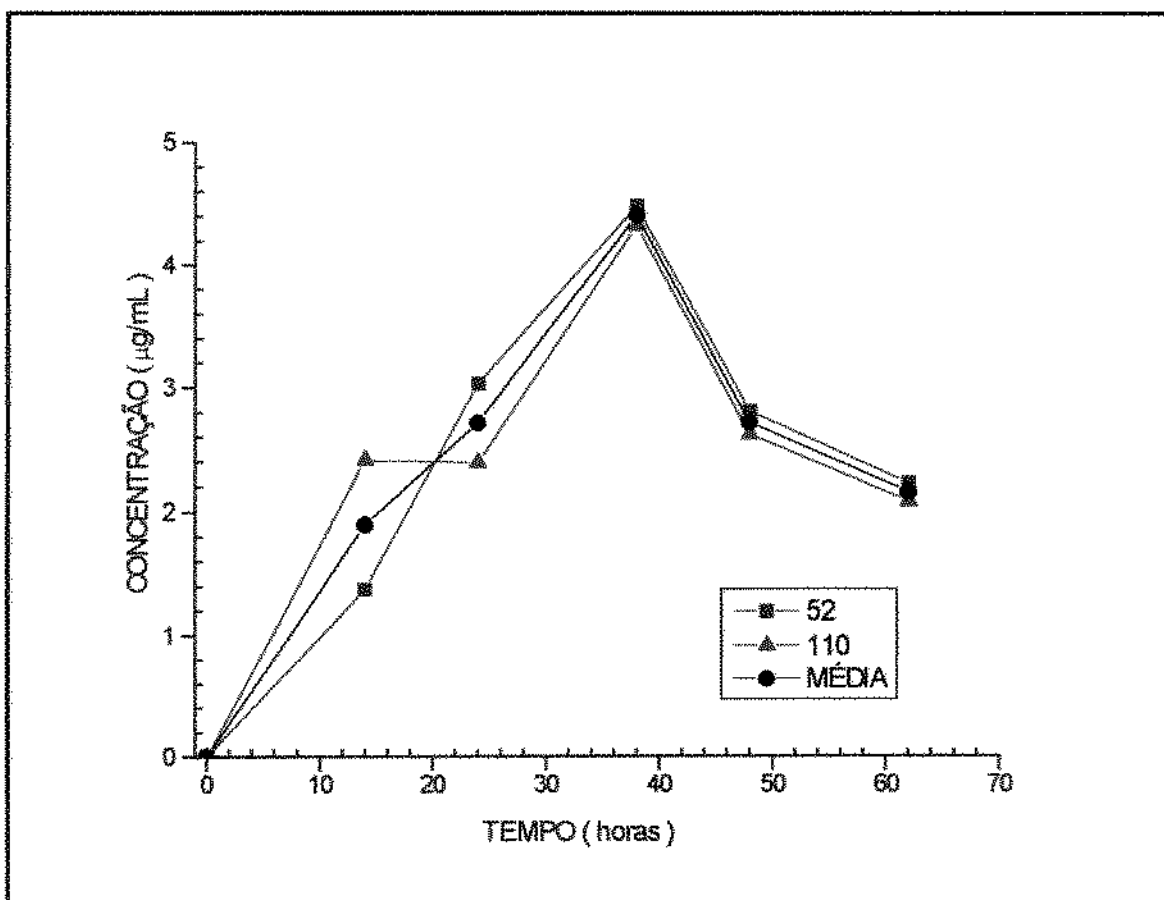


Figura 16 : Curva de absorção plasmática de γ -tocoferol obtida de novilhos nelore nos 52 e 110 que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 130 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo a 39,0 UI de vitamina E/kg de peso vivo).

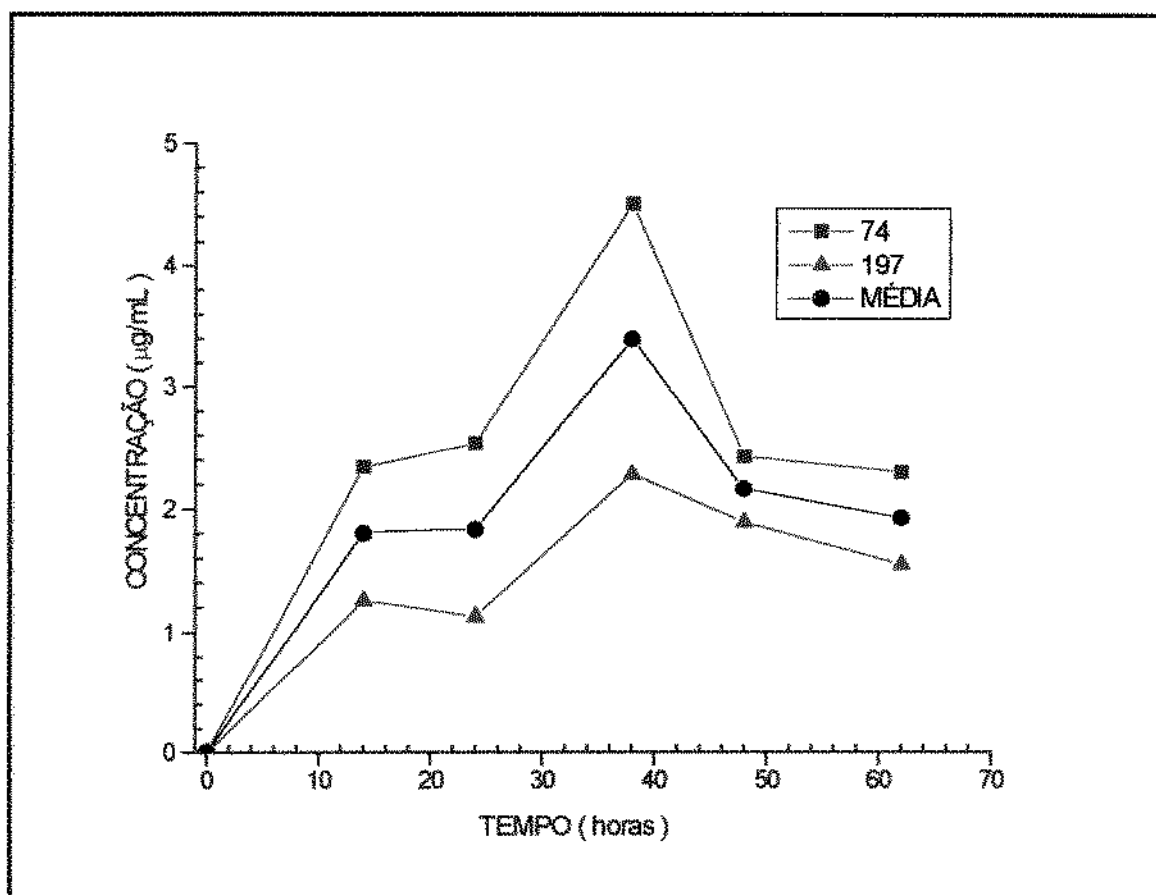


Figura 17 : Curva de absorção plasmática de γ -tocoferol obtida de novilhos nelore n^{os} 74 e 197 que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 195 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo a 58,5 UI de vitamina E/kg de peso vivo).

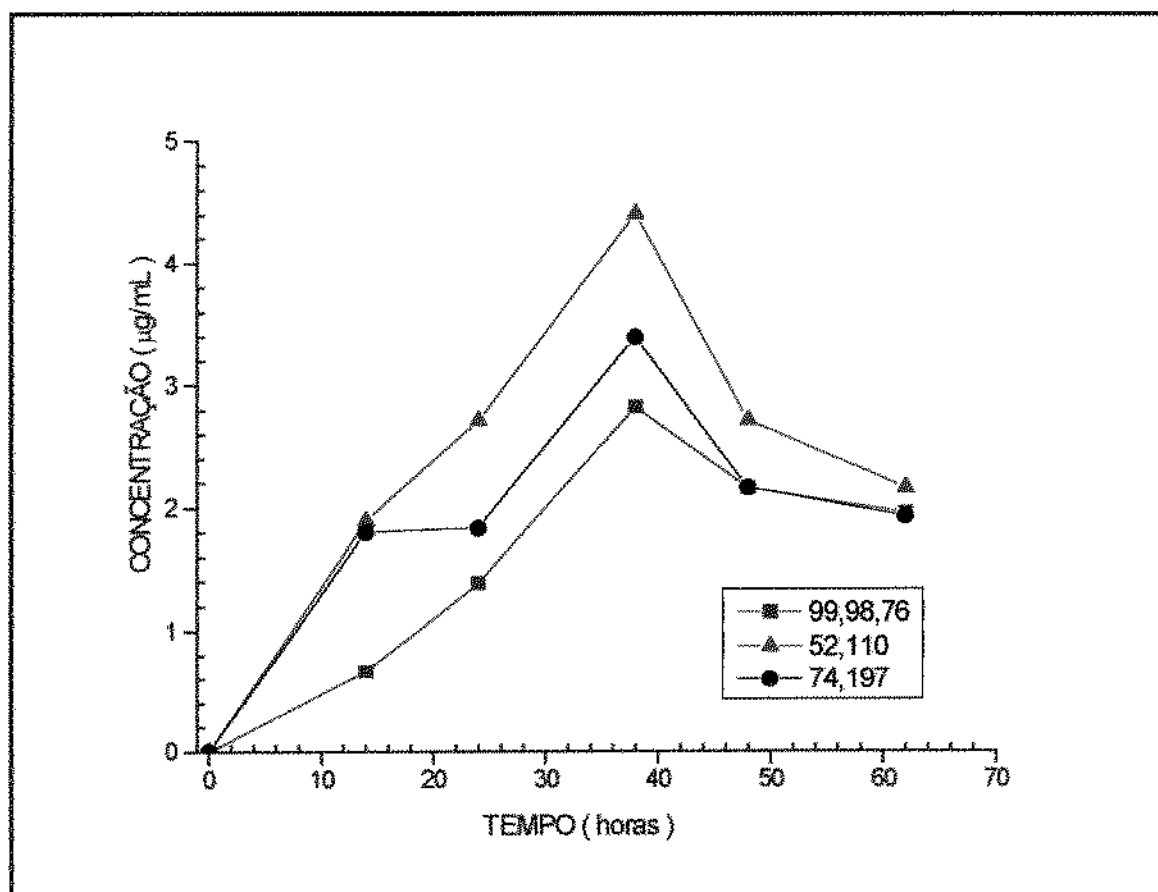


Figura 18 : Médias das curvas de absorção plasmática de γ -tocoferol obtidas de novilhos nelore nos 99, 98 e 76; 52 e 110 e 74 e 197 que receberam respectivamente uma dose única oral de DDOS contendo 65, 130 e 195 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo (correspondendo respectivamente a 19,5; 39,0 e 58,5 UI de vitamina E/kg de peso vivo).

4.5. VALORES OBTIDOS PARA ABSORÇÃO DE VITAMINA E

As curvas de absorção plasmática de vitamina E obtidas no presente trabalho podem ser vistas a seguir nas figuras 19, 20, 21 e 22. Estas relacionam a variação da concentração plasmática de vitamina E em relação ao tempo. Pode-se observar a elevação dos níveis plasmáticos de vitamina E em consequência do fornecimento das três diferentes doses de DDOS empregadas. A figura 19 apresenta a curva de absorção referente aos novilhos de nº 99, 98 e 76 que receberam a menor dose de DDOS, contendo 41,85 UI de vitamina E/kg de peso vivo. A figura 20 apresenta a curva de absorção dos novilhos de nº 52 e 110 do grupo de dose intermediária que recebeu uma dose de DDOS contendo 83,7 UI de vitamina E/kg de peso vivo e a figura 21 dos novilhos de nº 74 e 197 pertencentes ao grupo que recebeu a maior dose de DDOS contendo 125,5 UI de vitamina E/kg de peso vivo. A figura 22 apresenta o gráfico dos valores médios de absorção de todos os tratamentos. Os dados obtidos foram calculados com base nos valores discriminados na tabela 2, relativos a biopotência dos constituintes individuais da família da vitamina E.

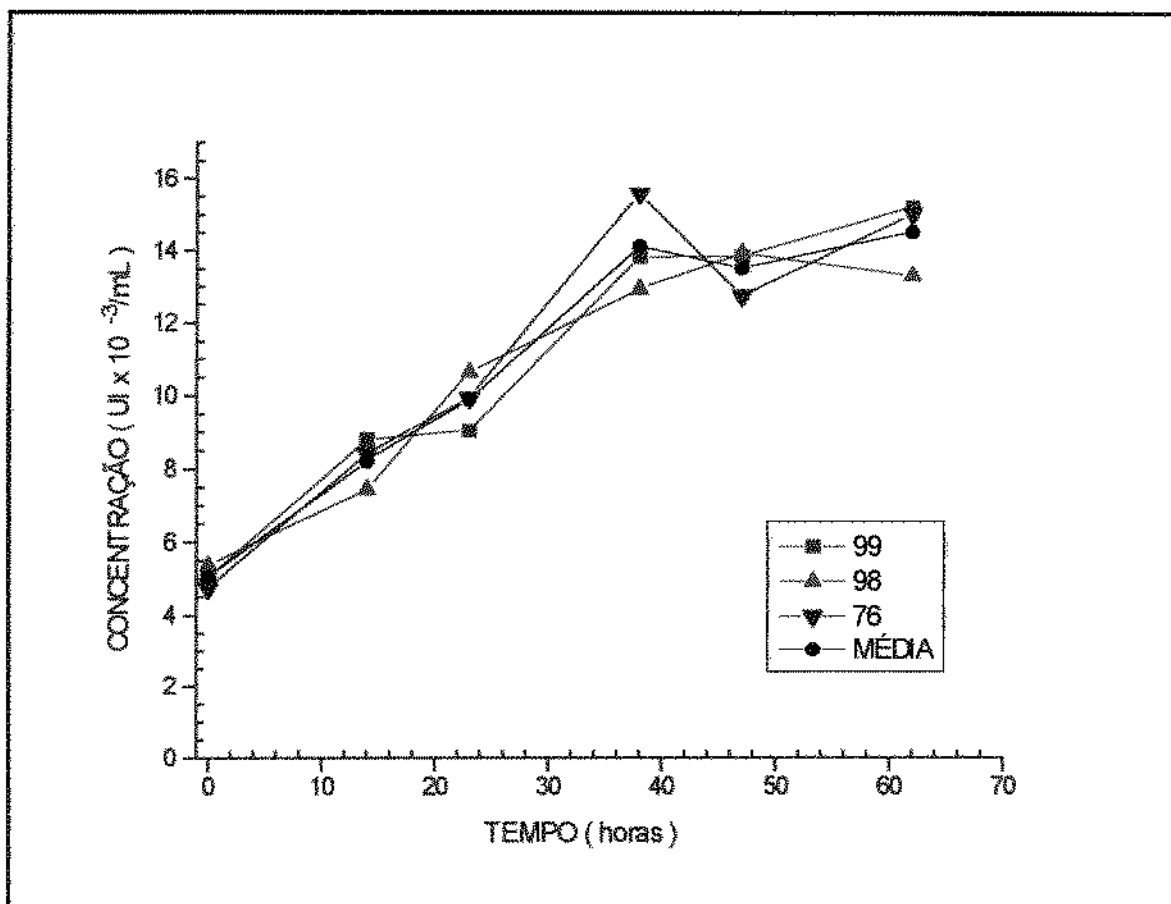


Figura 19 : Curva de absorção plasmática de vitamina E obtida de novilhos nelore n^{os} 99, 98 e 76 que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 41,85 UI de vitamina E/kg de peso vivo.

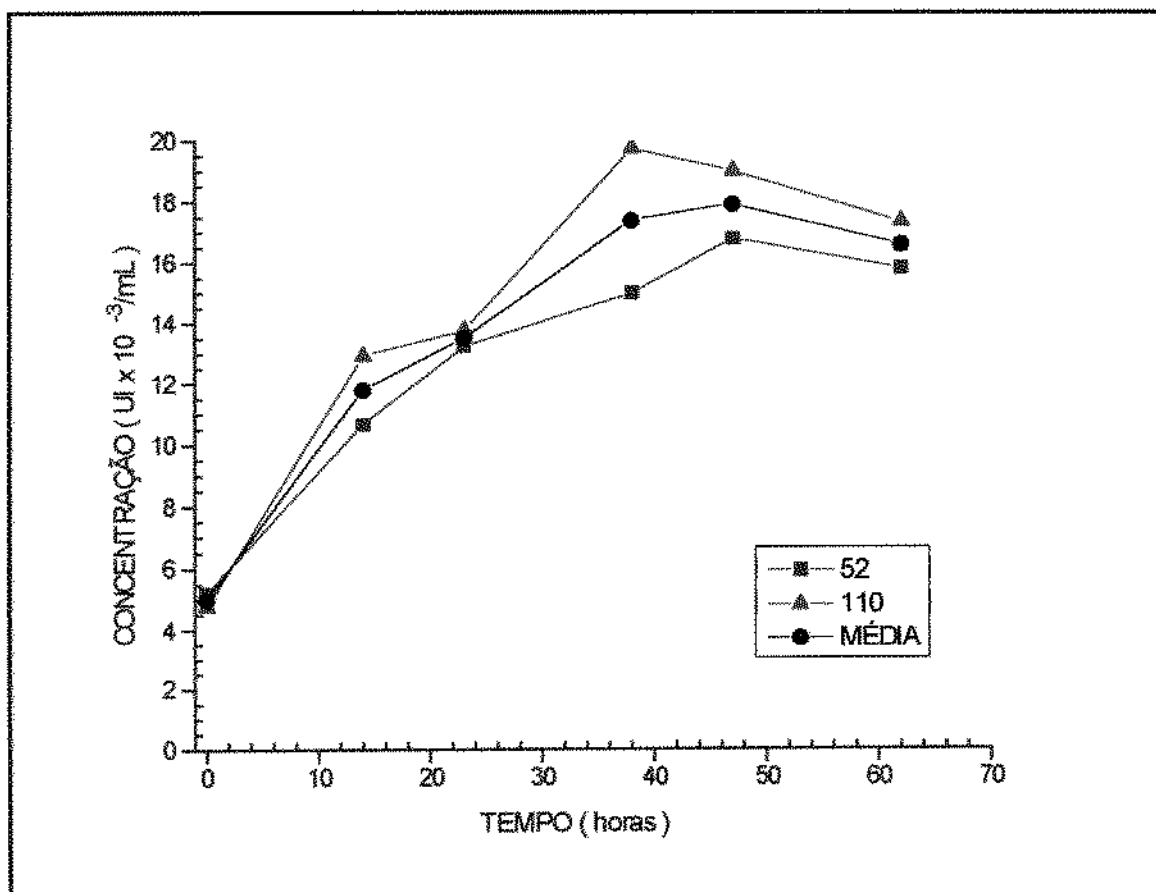


Figura 20 : Curva de absorção plasmática de vitamina E obtida de novinhos nelore n^{os} 52 e 110 que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 83,70 UI de vitamina E/kg de peso vivo.

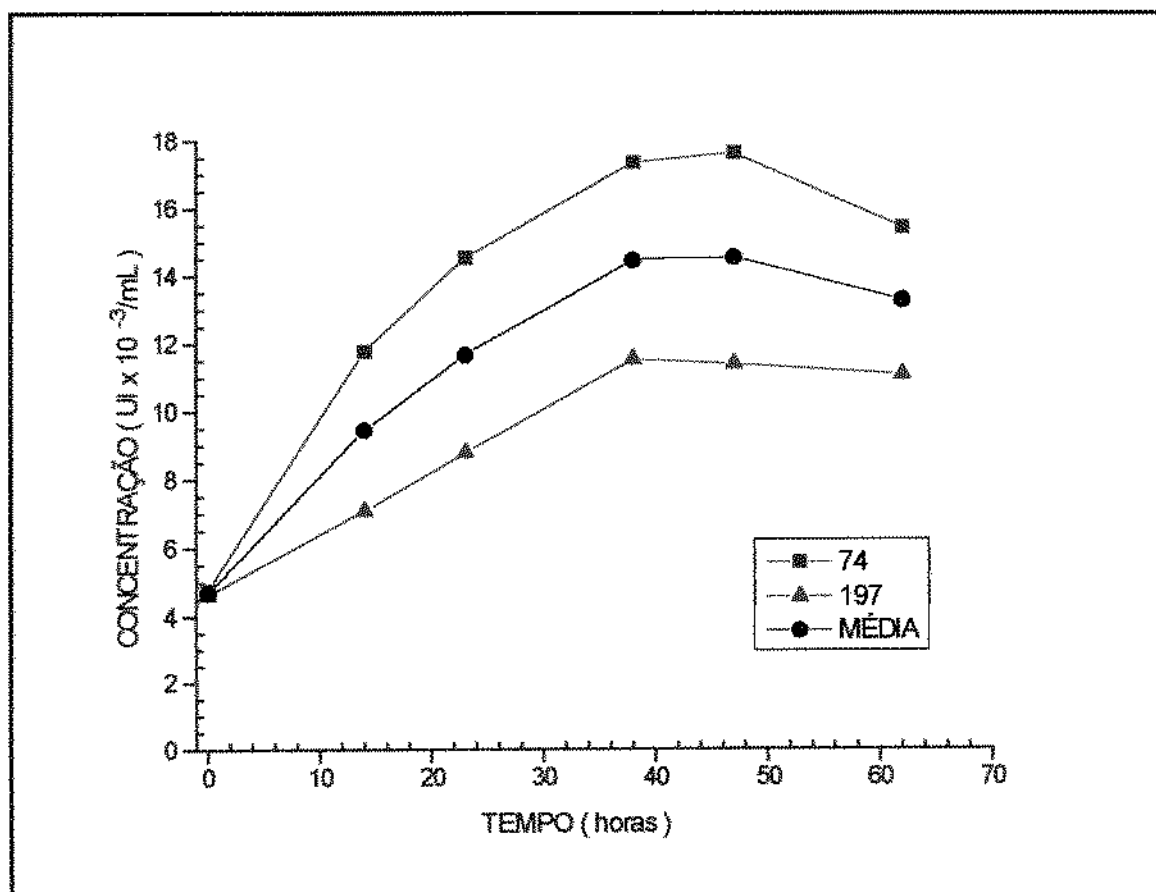


Figura 21 : Curva de absorção plasmática de vitamina E obtida de novilhos nelore n^{os} 74 e 197 que receberam uma dose única oral de DDOS contendo 125,50 UI de vitamina E/kg de peso vivo.

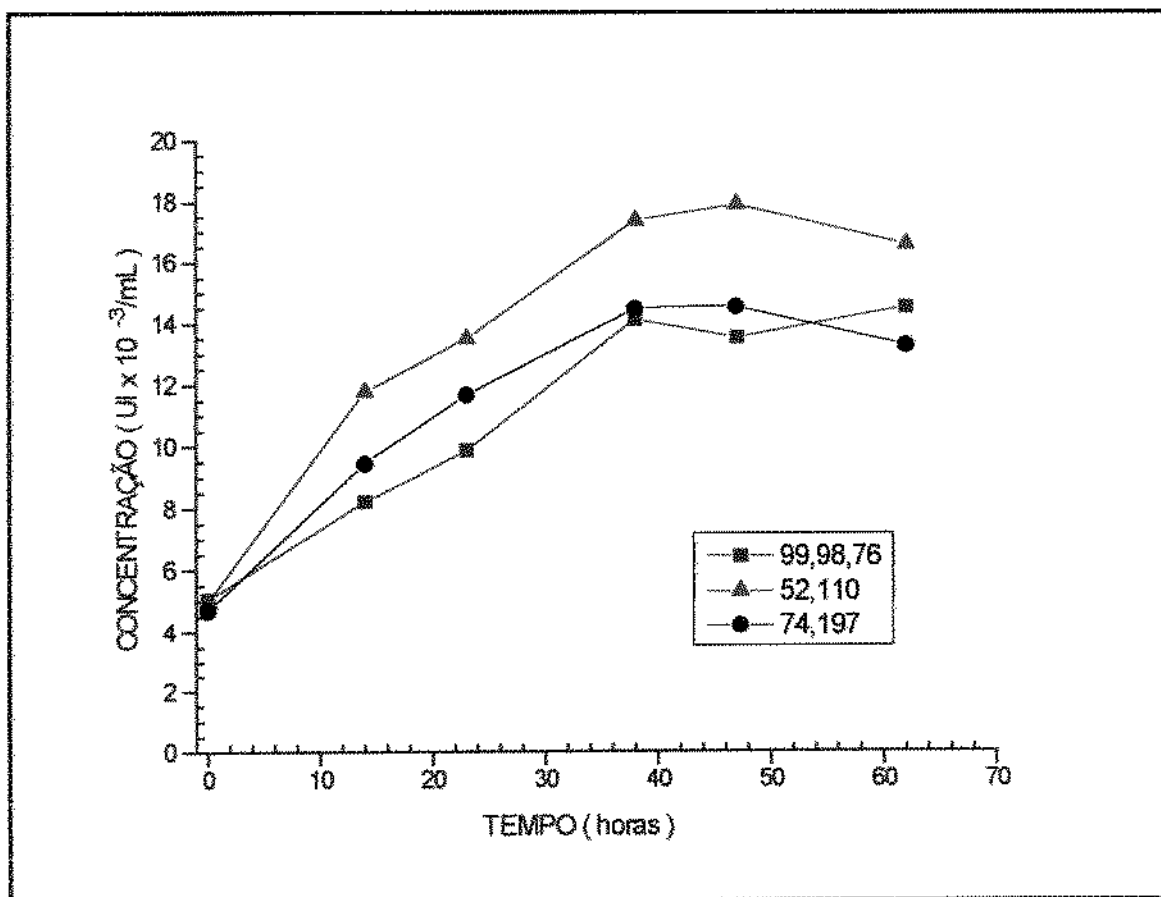


Figura 22 : Médias das curvas de absorção plasmática de vitamina E obtidas de novilhos nelore nos 99, 98 e 76; 52 e 110 e 74 e 197 que receberam respectivamente uma dose única oral de DDOS contendo 41,85; 83,70 e 125,50 UI vitamina E/kg de peso vivo.

A observação dos resultados encontrados em todas as três doses empregadas, sobre os níveis plasmáticos de α -tocoferol demonstra, para todas as doses, uma sensível elevação a partir dos níveis iniciais. No decorrer do tempo, esta elevação mostrou acompanhar as curvas de absorção, para um igual período, desenvolvidas por HIDIROGLOU et al. (1989) que utilizou acetato de dl- α -tocoferol e dl- α -tocoferol em uma dose única oral de 50mg/kg de peso vivo para ambas as formas, atingindo um valor médio do ponto máximo de absorção plasmática para os animais em experimento de aproximadamente 10 μ g/mL, compreendido na faixa de aproximadamente 7,5 a 13,5 μ g/mL para o período de aproximadamente 30 horas.

No presente trabalho para as três doses testadas atingiram-se níveis máximos de α -tocoferol correspondentes a 11,36 μ g/mL para o período de 47 horas para a dose de 45 mg/kg de peso vivo, 12,39 μ g/mL para o período de 38 horas para a dose de 30mg/kg de peso vivo e 9,85 μ g/mL para o período de 62 horas para a dose de 15mg/kg de peso vivo. Logo, para as três doses testadas a faixa de máxima concentração plasmática de vitamina E esteve compreendida entre 38 e 62 horas.

Atingiu-se níveis médios máximos para o período de 47 horas de 9,81 μ g/mL trabalhando-se com três doses (15, 30 e 45mg/kg de peso vivo), o que demonstra a princípio, uma similaridade do comportamento do DDOS em relação às formas isoladas de tocoferol utilizadas por HIDIROGLOU et al. (1989) comparando-se com a média de todos os tratamentos.

Outro fator de grande interesse foi a elevada absorção de γ -tocoferol no plasma em consequência do tratamento com DDOS. A princípio não se esperava que esta fosse significativa, com base nas informações da literatura consultada, que não indicava a presença de γ -tocoferol no plasma de nenhuma espécie animal e por análise do plasma de novilhos não tratados, não se pôde observar a presença deste componente. Após o tratamento observou-se o aparecimento de γ -tocoferol no plasma já a partir de 12 horas, atingindo para todos os tratamentos a concentração máxima no período de 38 horas, sofrendo uma queda após este período. Comparando-se visualmente os gráficos de absorção de α e γ -tocoferol pode-se observar que a curva de absorção de γ -tocoferol decai enquanto a de α -tocoferol se mantém, ou para algumas doses aumenta, o que poderia indicar que a medida que a oferta de α -tocoferol a nível intestinal aumenta, a absorção de γ -tocoferol é reduzida. Talvez isto se deva à preferência do organismo pela absorção de α -tocoferol ou mesmo pelo aumento da

oferta de α -tocoferol a nível intestinal, o que acentuaria a competição no sítio de absorção. A grande desproporção no DDOS entre α e γ -tocoferol (aproximadamente 1:4,3 respectivamente) também pode ter sido um fator de influência pois esta é mais significativa nas primeiras horas quando a oferta de ambas as formas a nível intestinal ainda não seria suficiente para saturar a capacidade de absorção e transporte, e para promover um antagonismo competitivo entre ambas as formas pelo sítio de absorção.

Outro ponto relevante é a ocorrência de muita variação dentro dos tratamentos devido, provavelmente, à grande variabilidade individual em relação ao comportamento do sistema digestivo do ruminante, que retém o alimento a nível de rúmen dosando sua passagem para o intestino, onde ocorre a absorção de vitamina E.

Os resultados obtidos através do presente trabalho representaram um acréscimo no teor de vitamina E plasmático o que pode representar uma elevação destes teores a nível tecidual. Se analisarmos que, como proposto por GALLO-TORRES (1980b) ocorre uma rápida remoção de α -tocoferol do plasma sanguíneo pelos tecidos corporais, e que a concentração de tocoferóis no tecido varia grandemente dependendo sobretudo do tempo decorrido após a administração de uma única dose oral, pode-se deduzir que o máximo de absorção plasmática corresponderia ao máximo de absorção nos tecidos, uma vez que a concentração de vitamina E no plasma, ou soro, é consequência do influxo ou afluxo desta dentro dos vários grupos de diferentes tecidos. Esta suposição vai de acordo com BUTLER (1971) que afirma que a circulação sanguínea atravessa todos os tecidos, logo algum equilíbrio relativo pode ser esperado entre a concentração de uma droga no plasma sanguíneo e sua concentração nos tecidos.

Poderia-se então afirmar que se abatêssemos um animal no momento em que a concentração plasmática de vitamina E estivesse atingindo o seu ponto máximo, estaríamos obtendo, também, o máximo de concentração desta nos tecidos. Logo, através de uma única megadose de vitamina E poder-se-ia atingir altos níveis de vitamina E na carne, sem que esta necessitasse ser fornecida com periodicidade na dieta pré-abate, que é o único sistema, quando do fornecimento de vitamina E por via oral, utilizado por diversos autores da literatura consultada como por exemplo AGBOOLA et al. (1988); ARNOLD et al. (1992, 1993ab); BUCKLEY et al. (1989); FAUSTMAN et al. (1989a, 1989b); MARUSICH et al. (1975); MITSUMOTO et al. (1991b, 1993); MONAHAN et al. (1990a, 1990b, 1992ab, 1993); SHELDON (1984); SKLAN et al. (1983); TSAI et al. (1978).

A alternativa que certamente poderá ser preconizada é o emprego pré-abate do DDOS em dose única oral para promover uma elevação nos teores de vitamina E dos diversos tecidos animais, visto que os resultados obtidos são muito promissores neste sentido. Ocorre no entanto que devido a diversificada composição do DDOS preconiza-se ainda, alguma cautela para seu emprego de forma rotineira devendo-se realizar outros estudos mais abrangentes antes de se adotar esta tecnologia. Não obstante este procedimento facilitaria o sistema de fornecimento de vitamina E ao animal, a um preço mais acessível e de forma mais prática, podendo ser realizado à nível de abatedouro com apenas uma aplicação em vez de periodicamente na dieta. Para este fim poder-se-á utilizar um aplicador sob pressão, com um dosador e uma agulha, para deposição do DDOS diretamente no rúmen, aproximadamente 38 horas antes do abate.

O emprego desta tecnologia com certeza trará ganhos econômicos consideráveis, podendo a carne proveniente destes animais ser vendida por um preço diferenciado pelo seu teor elevado em vitamina E e pela sua melhor qualidade em relação à cor, estabilidade oxidativa, teor de radicais livres e colesterol oxidado. Um outro fator seria a extensão do tempo de exposição desta carne em condições de varejo, o que pode reduzir perdas econômicas por armazenagem. Obter-se-ia também, uma matéria prima para a indústria cárnea com elevados teores de vitamina E o que produziria produtos cárneos de melhor qualidade e com uma melhor distribuição de antioxidante e conseqüentemente maior estabilidade e resistência às condições de processamento.

Em relação às doses utilizadas os resultados indicam uma tendência a se adotar uma dose intermediária contendo aproximadamente 30 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo. Pode-se afirmar, teoricamente, a nível de tecido que com esta dose e com um tempo de aproximadamente 38 horas se obteria a distribuição mais equitativa e os teores mais elevados sendo este o melhor momento para o abate.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo conclui-se que o Destilado da Desodorização do Óleo de Soja (DDOS) mostrou-se eficiente em elevar os níveis plasmáticos de tocoferol em novilhos nelore quando utilizado em dose única oral.

Para o α -tocoferol o DDOS apresentou-se eficiente em elevar as concentrações plasmáticas iniciais, incrementadas num limite máximo de até 3 vezes para a dose de DDOS contendo 15 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo, de 3,8 vezes para a dose contendo 30 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo e de 3,5 vezes para a dose contendo 45 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo.

O DDOS apresentou-se com capacidade de produzir níveis plasmáticos de γ -tocoferol, que em condições normais não ocorrem, produzindo uma concentração máxima de 3,35 $\mu\text{g/mL}$ para a dose de 65 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo, de 4,49 $\mu\text{g/mL}$ para a dose de 130 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo e de 4,51 $\mu\text{g/mL}$ para a dose de 195 mg de γ -tocoferol/kg de peso vivo. Observou-se que quando a oferta de γ -tocoferol é elevada a absorção desta forma de tocoferol ocorre mas esta se reduz à medida que a presença de α -tocoferol no plasma aumenta. Este fato pode demonstrar um certo antagonismo de competição entre as duas formas de tocoferol pelo sítio de absorção intestinal, o que pode indicar uma preferência pela absorção do α -tocoferol em relação ao γ -tocoferol.

O acréscimo de vitamina E mostrou ser significativo para todas as doses empregadas correspondendo a uma elevação nos valores iniciais de até um máximo de 4 vezes o teor de vitamina E inicial em um animal isoladamente. Valores máximos médios para cada tratamento de aproximadamente 3 vezes o teor inicial para dose de 41,85 UI/kg de peso vivo; 3,5 vezes para a dose de 83,70 UI/kg de peso vivo e de 3 vezes para dose de 125,50 UI/kg de peso vivo.

O tempo ideal necessário para se obter a concentração plasmática máxima de vitamina E ocorreu a partir de 38 horas após injeção, sendo este o limite mínimo para a efetividade do tratamento.

Com os resultados obtidos no presente trabalho abre-se uma perspectiva para o uso do DDOS, por via oral em dose única, contendo aproximadamente 30 mg de α -tocoferol/kg de peso vivo, para bovinos, num período de no mínimo 38 horas antes do abate como fonte de tocoferóis, visando os benefícios da vitamina E na conservação e na qualidade nutricional da carne bovina.

Embora o número de animais utilizados não tenha sido muito elevado e não se tenha chegado ao abate destes animais para verificação das concentrações teciduais de vitamina E e a correlação destes níveis com os teores plasmáticos encontrados, este trabalho é um marco inicial para a aplicação de uma nova tecnologia até agora não proposta, que consiste no uso do DDOS como fonte de vitamina E em bovinos pré-abate com objetivos tecnológicos e pela aplicação deste tratamento com vitamina E em apenas uma única megadose oral, objetivando elevar os teores desta nos diferentes tecidos animais para proporcionar uma melhor conservação da carne e produtos cárneos produzidos a partir destes animais.

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGBOOLA, H. A.; CAHILL, V. R.; CONRAD, H. R.; OCKERMAN, H. W.; PARRETT, N. A. & PLIMPTON, R. F. The effects of a high monosodium phosphate and alpha tocopherol supplemented milk replacer diet on veal muscle color and composition. *J. Anim. Sci.*, **66**(7):1676-1685, 1988.
2. ALLEN, C. E. & FOEGEDING, E. A. Some lipid characteristics and interactions in muscle foods-review. *Food Technol.*, **35**(5):253-257, 1981.
3. ARNOLD, R. N.; SCHELLER, K. K.; ARP, S. C.; WILLIAMS, S. N.; BUEGE, D. R. & SCHAEFER, D. M. Effect of long or short-term feeding of alpha-tocopheryl acetate to holstein and crossbred beef steers on performance, carcass characteristics, and beef color stability. *J. Anim. Sci.*, **70**(10):3055-3065, 1992.
4. ARNOLD, R. N.; SCHELLER, K. K.; ARP, S. C.; WILLIAMS, S. N.; SCHAEFER, D. M. Dietary alpha-tocopheryl acetate enhances beef quality in Holstein and beef breed steers. *J. Food Sci.*, **58**(1):28-33, 1993a.
5. ARNOLD, R. N.; ARP, S. C.; SCHELLER, K. K.; WILLIAMS, S. N.; SCHAEFER, D. M. Tissue equilibration and subcellular distribution of vitamin E relative to myoglobin and lipid oxidation in displayed beef. *J. Anim. Sci.*, **71**(1):105-118, 1993b.
6. ASGHAR, A.; GRAY, J. I.; BUCKLEY, D. J.; PEARSON, A. M. & BOOREN, A. M. Perspectives on warmed-over flavor. *Food Technol.*, **42**(6):102-108, 1988.
7. AUDLEY, M. A.; SHETTY, K. J. & KINSELLA, J. E. Isolation and properties of phospholipase A from pollock muscle. *J. Food Sci.*, **43**(6):1771-1775, 1978.
8. AUGUSTO, M. M. M. Obtenção e caracterização de um concentrado de tocoferóis (vitamina E) a partir do destilado da desodorização do óleo de soja. Campinas. FEA, UNICAMP, 1982. Dissertação (mestrado).

9. BAUERFEIND, J. Tocopherols in foods in: MACHLIN, L. J., ed. Vitamin E - A Comprehensive Treatise, New York, Marcel Dekker, 1980. p.99-167. (Basic and Clinical Nutrition, v.1).
10. BENEDICT, R. C.; STRANGE, E. D. & SWIFT, C. E. Effect of lipid antioxidants on stability of meat during storage. *J. Agric. Food Chem.*, **23**:167, 1975.
11. BERGMAN, E. N. Alterações do metabolismo de glicídios e lipídeos In: SWENSON, M. J., ed. Dukes - Fisiologia dos Animais Domésticos, Rio de Janeiro, Guanabara, 1988. p365.
12. BHATTACHARYA, M.; HANNA, M. A. & MANDIGO, R. W. Lipid oxidation in ground beef patties as affected by time-temperature and product packaging parameters. *J. Food Sci.*, **53**(3):714-717, 1988.
13. BLOOD, D. C.; HENDERSON, J. A. & RADOSTITS, O. M. Clínica Veterinária, 5ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1988. p. 878-890.
14. BOSUND, I. & GANROT, B. Lipid hydrolysis in frozen baltic herring. *J. Food Sci.*, **34**(1):13-18, 1969.
15. BUCKLEY, J. & CONNOLLY, J. F. Influence of alpha-tocopherol (vitamine E) on storage stability of raw pork and bacon. *J. Food Prot.*, **43**:265, 1980.
16. BUCKLEY, D. J.; GRAY, J. I.; ASGHAR, A.; PRICE, J. F.; CRACKEL, R. L.; BOOREN, A. M.; PEARSON, A. M. & MILLER, E.R. Effects of dietary antioxidants and oxidized oil on membranal lipid stability and pork product quality. *J. Food Sci.*, **54**:1193-1197, 1989.
17. BURGEAIS, C. F. Propriétés Antioxygènes des tocophérols et du palmitate d'ascorbyle dans les matières grasses. *Revue Française des Corps Gras.*, **28**(9):353-356, 1981.

18. BUTLER, T. C. The distribution of drugs in: LA DU, B. N.; MANDEL, H. G. & WAY, E. L. Fundamentals of drug metabolism and drug disposition, Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1971. pp. 44-75.
19. CHURCH, D. C. Fisiologia Digestiva y Nutrición de los Ruminantes, Zaragoza, Acribia, 1974. p. 260-274. (v.1).
20. COHN, V. H. Physical Properties of drugs, distribution and excretion - Transmembrane movement of drug molecules in: LA DU, B. N.; MANDEL, H. G. & WAY, E. L. Fundamentals of drug metabolism and drug disposition, Baltimore, The Williams & Wilkins Company, 1971 pp 3-21.
21. CONTRERAS-GUZMÁN, E. S. Determinação de tocoferóis e tocotrienóis em extratos lipídicos por redução de íons cúpricos, Campinas, 1980. 207p. Tese (doutorado) - FEA. UNICAMP.
22. CONTRERAS-GUZMÁN, E. S & STRONG III, F. C. Determination of tocopherols (vitamin E) by reduction of cupric ion. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**(5):1215-1221, 1982.
23. CORT, W. M. Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate and ascorbic acid and their mode of action. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**(7):321, 1974.
24. CSIKY, I Trace enrichment and separation of cholesterol oxidation products by adsorption high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **241**:383-389, 1982.
25. DAWSON, L. E. & GARTNER, R. Lipid oxidation in mechanically deboned poultry. *Food Technol.*, **37**(7):112-116, 1983.
26. DECKER, E. A. & WELCH, B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agric. Food Chem.*, **38**:674-677, 1990.

27. EGER, S.; DRORI, D.; KADOORI, I.; MILLER, N. & SCHINDLER, H. Effects of selenium and vitamin E on incidence of retained placenta. *J. Dairy Sci.*, **68**:2119-2122, 1985.
28. EMANUEL, H. A.; HASSEL, C. A.; ADDIS, P. B.; BERGMAN, S. D. & ZAVORAL, J. H. Plasma cholesterol oxidation products (oxysterols) in humans fed a meal rich in oxysterols. *J. Food Sci.*, **56**:843-847, 1991.
29. ENGESETH, N. J. & GRAY, J. I. Cholesterol oxidation in muscle tissue. *Meat Science*, **36**:309-320, 1994.
30. FERLAY, A. & DOREAU, M. Influence of method of administration of rapessed oil in dairy cows. 1. Digestion of nonlipid components. *J. Dairy Sci.*, **75**:3020-3027, 1992.
31. FAUR, L. Influence des traitements de raffinage et de transformation sur la qualité et la stabilité des corps gras. *Revue Française des Corps Gras.*, **7/8**:293-300, 1989.
32. FAUSTMAN, C., & CASSENS, R. G. The effects of cattle breed and muscle type on discoloration and various biochemical parameters in fresh beef. *J. Anim. Sci.*, **69**:184, 1991.
33. FAUSTMAN, C.; CASSENS, R. G.; SCHAEFER, D. M.; BUEGE, D.R. & SCHELLER, K. K. Vitamin E supplementation of Holstein steer diets improves sirloin steak color. *J. Food. Sci.*, **54**:485, 1989a.
34. FAUSTMAN, C.; CASSENS, R. G.; SCHAEFER, D. M.; BUEGE, D. R.; WILLIAMS, S. N. & SCHELLER, K. K. Improvement of pigment and lipid stability in Holstein steer beef by dietary supplementation with vitamin E. *J. Food Sci.*, **54**:858, 1989b.
35. FINOCCHIARO, E. T.; LEE, K. & RICHARDSON, T. Identification and quantification of cholesterol oxides in grated cheese and bleached butter oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**:877-883, 1984.

36. GALLO-TORRES, H. E. Biochemistry - Absorption in: MACHLIN, L. J., ed. Vitamin E - A Comprehensive Treatise, New York, Marcel Dekker, 1980a. p.170-192. (Basic and Clinical Nutrition, v.1).
37. GALLO-TORRES, H. E. Biochemistry - Blood Transport and Metabolism in: MACHLIN, L. J., ed. Vitamin E - A Comprehensive Treatise, New York, Marcel Dekker, 1980b. p.193-267. (Basic and Clinical Nutrition, v.1).
38. GANDEMER, G. Les phospholipides du muscle: composition et altération au cours des traitements technologiques. *Revue Française des Corps Gras*, 3/4:75-81, 1990.
39. GEROMEL, E. J. & MONTGOMERY, M. W. Lipase release from lysosomes of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) muscle subjected to low temperatures. *J. Food Sci.*, 45(3):412-415,419, 1980.
40. GOVINDARAJAN, S., HULTIN, H. O. and KOTULA, A. W. Myoglobin oxidation in ground beef. Mechanistic studies. *J. Food Sci.*, 42(3):571-577, 582, 1977.
41. GRAY, J. I. & PEARSON, A. M. Rancidity and warmed-over flavor. *Adv. Meat Res.*, 3:221-269, 1987.
42. GREENE, B. E. Lipid oxidation and pigment changes in raw meat. *J. Food Sci.*, 34:110- , 1969.
43. GREENE, B. E.; HSIN, I. M. & ZIPSER, M. W. Retardation of oxidative color changes in raw ground beef. *J. Food Sci.*, 36(6):940-942, 1971.
44. HARRISON, J. H.; HANCOCK, D. D. & CONRAD, H. R. Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 67:123-132, 1984a.
45. HARRISON, J. H. & CONRAD, H. R. Selenium content and glutathione peroxidase activity in tissues of the dairy cow after short-term feeding. *J. Dairy Sci.*, 67:2464-2470, 1984b.

46. HIDIROGLOU, N.; LAFLAMME, L. F.; & McDOWELL, L. R. Blood plasma and tissue concentrations of vitamin E in beef cattle as influenced by supplementation of various tocopherol compounds. *J. Anim. Sci.*, **66**:3227-3234, 1988.
47. HIDIROGLOU, N.; McDOWELL, L. R. & BALBUENA, O. Plasma tocopherol in sheep and cattle after ingesting free or acetylated tocopherol. *J. Dairy Sci.*, **72**:1793-1799, 1989.
48. HIGLEY, N. A.; TAYLOR, S. L.; HERIAN, A. M. & LEE, K. Cholesterol oxides in processed meats. *Meat Science.*, **16**:175-188, 1986.
49. HILL, G. M.; STUART, R. L. UTLEY, P. R. & REAGAN, J. O. Vitamin E effects on finishing steer performance. *J. Anim. Sci.*, **68**(1):557, 1989.
50. HINO, T.; ANDOH, N. & OHGI, H. Effects of β -carotene e α -tocopherol on rumen bacteria in utilization of long-chain fatty acids and cellulose. *J. Dairy Sci.*, **76**:600-605, 1993.
51. HOELSCHER, L. M.; SAVELL, J. W.; SMITH, S. B. & CROSS, H. R. Subcellular distribution of cholesterol within muscle and adipose tissue of beef loin steaks. *J. Food Sci.*, **53**:718-722, 1988.
52. HOOD, D.E. & RIORDAN, E. B. Discolouration in prepackaged beef: Measurement by reflectante spectrophotometry and shopper discrimination. *J. Food Technol.*, **8**:333, 1973.
53. HOOVER, W. H. & MILLER, T. K. Rumen digestive physiology and microbial ecology, West Virginia University, 1992. 36p. (Bulletin 708T).
54. HORNSTEIN, I.; CROWE, P. F. & HEIMBERG, M. J. Fatty acid composition of meat tissue lipids *J. Food Sci.*, **26**(6):581-586, 1961.

55. HOUBEN, J. H. & KROL, B. Effect of frozen storage and protective packaging on lipid oxidation in pork backfat with slightly increased levels of polyenoic fatty acids. *Meat Science*, **13**:193 - 203, 1985.
56. HUTCHINS, B. K.; LIU, T. H. & WATTS, B. M. Effect of additives and refrigeration on reducing activity, metmyoglobin and malonaldehyde in raw ground beef. *J. Food Sci.*, **32**(2):214-217, 1967.
57. IGENE, J. O.; PEARSON, A. M.; DUGAN, L. R., Jr, & PRICE, J. F. Role of triglycerides and phospholipids in development of rancidity in model meat systems during frozen storage. *Food Chem.*, **5**:263-276, 1980.
58. JENSEN, M.; HAKKARAINEN, J.; LINDHOLM, A. & JONSSON, L. Vitamin E requirement of growing swine. *J. Anim. Sci.*, **66**:3101-3111, 1988.
59. JOHNS, A. M.; BIRKINSHAW, L. H. & LEDWARD, D. A. Catalysts of lipid oxidation in meat products. *Meat Science*, **25**:209-220, 1989.
60. KANNER, J. & DOLL, L. Ferritin in turkey muscle tissue: A source of catalytic iron ions for lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem.*, **39**:247-249, 1991.
61. KASPAREK, S. Chemistry of tocopherols and tocotrienols in: MACHLIN, L. J., ed. Vitamin E - A Comprehensive Treatise, New York, Marcel Dekker, 1980. p.99-167. (Basic and Clinical Nutrition, v.1).
62. LIN, T. S. & HULTIN, H. O. Oxidation of myoglobin in vitro mediated by lipid oxidation in microsomal fractions of muscle. *J. Food Sci.*, **42**(1):136-140, 1977.
63. LOVE, J. D. & PEARSON, A. M. Metmyoglobin and nonheme iron as prooxidants in cooked meat. *J. Agr. Food Chem.*, **22**:1032- , 1974.
64. MACHLIN, L. J. Vitamin E. in: MACHLIN, L. J., ed. Handbook of Vitamins. Nutritional, Biochemical and Clinical Aspects, New York, Marcel Dekker, 1984. p. 99-145.

65. MARUSICH, W. L.; RITTER, E. de; OGRINZ, E. F.; KEATING, J.; MITROVIC, M.; BUNNELL, R. H. Effect of supplemental vitamin E in control of rancidity in poultry meat. *Poultry Science*, **54**(3):831-844, 1975.
66. McCAY, P. B. & KING, M. M. Biochemistry - Biochemical Function, (section 1, Vitamin E: its role as a biologic free radical scavenger and its relationship to the microsomal mixed-function oxidase system) in: MACHLIN, L. J., ed. Vitamin E - A Comprehensive Treatise, New York, Marcel Dekker, 1980. p.289-317. (Basic and Clinical Nutrition, v.1).
67. MERGENS , W. J.; KEATING, J. F.; OSADCA, M.; ARAUJO, M.; RITTER, E. & NEWMARK, H. L. Stability of tocopherol in bacon, *Food Technol.*, **32**(11):40,42,44,52, 1978.
68. MITSUMOTO M.; FAUSTMAN C.; CASSENS R. G.; ARNOLD R. N.; SCHAEFER D. M.; SCHELLER K. K. Vitamins E and C improve pigment and lipid stability in ground beef. *J. Food Sci.*; **56**(1):194-197, 1991a.
69. MITSUMOTO, M.; CASSENS, R. G.; SCHAEFER, D. M.; ARNOLD, R. N.; SCHELLER, K. K. Improvement of color and lipid stability in beef longissimus with dietary vitamin E and vitamin C dip treatment. *J. Food Sci.*, **56**(6):1489-1492, 1991b.
70. MITSUMOTO, M.; ARNOLD, R. N.; SCHAEFER, D. M.; CASSENS, R. G. Dietary versus postmortem supplementation of vitamin E on pigment and lipid stability in ground beef. *J. Anim. Sci.*, **71**(7):1812-1816, 1993.
71. MONAHAN, F. J.; BUCKLEY, D. J.; MORRISSEY, P. A.; LYNCH, P. B. & GRAY, J. I. Effect of dietary alpha-tocopherol levels in porcine tissue and on susceptibility to lipid peroxidation. *Food Sci. Nutr.*, **42**:203-12, 1990a.
72. MONAHAN, F. J.; BUCKLEY, D. J.; GRAY, J. I.; MORRISSEY, P. A.; ASGHAR, A.; HANRAHAN, T. J. & LYNCH, P. B. Effect of dietary vitamin E on the stability of raw and cooked pork. *Meat Sci.*, **27**:99-108, 1990b.

73. MONAHAN, F. J.; BUCKLEY, D. J.; MORRISSEY, P. A.; LYNCH, P. B. & GRAY, J. I. Influence of dietary fat and alpha-tocopherol supplementation on lipid oxidation in pork. *Meat Sci.*, **31**:229-241, 1992a.
74. MONAHAN, F. J.; GRAY, J. I.; BOOREN, A. M.; MILLER, E. R.; BUCKLEY, D. J.; MORRISSEY, P. A. & GOMAA, E. A. Influence of dietary treatment on lipid and cholesterol oxidation in pork. *J. Agric. Food Chem.*, **40**:1310-1315, 1992b.
75. MONAHAN, F. J.; GRAY, J. I.; ASGHAR, A.; HAUG, A.; SHI, B. & BUCKLEY, D. J. Effect of dietary lipid and vitamin E supplementation on free radical production and lipid oxidation in porcine muscle microsomal fractions. *Food Chem.*, **46**:1-6, 1993.
76. MOODY, W. G. & CASSENS, R. G. A quantitative and morphological study of bovine longissimus fat cells. *J. Food Sci.*, **33**(1):47-52, 1968.
77. MORGAN, J. N. & ARMSTRONG, D. J. Formation of cholesterol-5,6-epoxides during spray drying of egg yolk. *J. Food Sci.*, **52**:1224-1227, 1987.
78. NORTON, S. A. & MCCARTHY, F. D.. Use of injectable and selenium-vitamin E emulsion in ewes and suckling lambs to prevent nutritional muscular dystrophy. *J. Anim. Sci.*, **62**:497-508, 1986.
79. NOUROOZ-ZADEH, J. & APPELQVIST, L. A. Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: Milk powder products. *J. Food Sci.*, **53**:74-87, 1988.
80. OKAYAMA, T.; IMAI, T. & YAMANOUE, M. Effect of ascorbic acid and alpha-tocopherol on storage stability of beef steaks. *Meat Sci.*, **21**:267 - 273, 1987.
81. PARK, S. W. & ADDIS, P. B. Cholesterol oxidation products in some muscle foods. *J. Food Sci.*, **52**:1500-1503, 1987.

82. PEARSON, A. M.; GRAY, J. I.; WOLZAK, A. M. & HORENSTEIN, N. A. Safety implications of oxidized lipids in muscle foods. *Food Technol.*, **37**(7):121-129, 1983.
83. PEHRSON, B.; HAKKARAINEN, J.; TORNQUIST, M.; EDFORS, K. & FOSSUM, C. Effect of vitamin E supplementation on weight gain, immune competence, and disease incidence in barley-fed beef cattle. *J. Dairy Sci.*, **74**:1054-1059, 1991.
84. PIE, J. E.; SPAHIS, K. & SEILLAN, C. Cholesterol oxidation in meat products during cooking and frozen storage. *J. Agric. Food Chem.*, **39**:250-254, 1991.
85. PIKUL, J.; LESZCZYNSKI, D. E.; BECHTEL, P. J. & KUMMEROW, F. A. Effects of frozen storage and cooking on lipid oxidation in chicken meat. *J. Food Sci.*, **49**:838-843, 1984.
86. REDDY, P. G.; MORRILL, J. L.; FREY, R. A.; MORRILL, M. B.; MINOCHA, H. C.; GALITZER, S. J. & DAYTON, A. D. Effects of supplemental vitamin E on the performance and metabolic profiles of dairy calves. *J. Dairy Sci.* **68**:2259-2266, 1985.
87. REINECCIUS, G. A. Off flavors in meat and fish - A review. *J. Food Sci.*, **44**(1):12-21, 24, 1979.
88. RHEE, K. S. Factors affecting oxygen uptake in model systems used for investigating lipid peroxidation in meat. *J. Food Sci.*, **43**:6-9, 1978.
89. RHEE, K. S. & ZIPRIN, Y. A. Lipid oxidation in retail beef, pork and chicken muscles as affected by concentrations of heme pigments and nonheme iron and microsomal enzymic lipid peroxidation activity. *J. Food Biochem.*, **11**:1-15, 1987.
90. RHEE, K. S.; ZIPRIN, Y. A.; ORDONEZ, G. & BOHAC, C. E. Fatty acid profiles and lipid oxidation in beef steer muscles from different anatomical locations. *Meat Sci.*, **23**:293-301, 1988a.

91. RHEE, K. S.; DAVIDSON, T. L.; KNABE, D. A.; CROSS, H.R.; ZIPRIN, Y. A. & RHEE, K. C. Effect of dietary high-oleic sunflower oil on pork carcass traits and fatty acid profiles of raw tissues. *Meat Sci.*, 24:249-260, 1988b.
92. RHEE, K. S.; DAVIDSON, T. L.; CROSS, H.R. & ZIPRIN, Y. A. Characteristics of pork products from swine fed a high monounsaturated fat diet: part 1 - Whole muscle products. *Meat Sci.*, 27:329-341, 1990.
93. SEVANIAN, A. & PETERSON, A. R. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem Toxic.* 24,1103-1110, 1986.
94. SHELDON, B. W. Effect of dietary tocopherol on the oxidative stability of turkey meat. *Poultry Science*; 63(4):673-681, 1984.
95. SHIVAS, S. D., KROPF, D. H., HUNT, M. C., KASTNER, C. L., KENDALL, J. L. A. & DAYTON, A. D. Effects of ascorbic acid on display life of ground beef. *J. Food Prot.* 47:11-15, 19, 1984.
96. SHERWIN, E. R. Antioxidants for vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53(6):430-436, 1976.
97. SKLAN, D.; TENNE, Z.; BUDOWSKI, P. The effect of dietary fat and tocopherol on lipolysis and oxidation in turkey meat stored at different temperatures. *Poultry Sci.*; 62(10):2017-2021, 1983.
98. SMITH, K. L.; HARRISON, J. H.; HANCOCK, D. D.; TODHUNTER, D. A. & CONRAD, H. R. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J. Dairy Sci.*, 67:1293-1300, 1984.
99. STINNETT, J. D. Nutrition and the Immune Response, Boca Raton - Florida, CRC Press, 1983. p. 63-64.

100. St. JOHN, L. C.; YOUNG, C. R.; KNABE, D. A.; THOMPSON, L. D.; SCHELLING, G. T.; GRUNDY, S. M. & SMITH, S. B. Fatty acid profiles and sensory and carcass traits of tissues from steers and swine fed an elevated monounsaturated fat diet. *J. Anim. Sci.*, **64**(5):1441-1447, 1987.
101. TAPPEL, A. L.; BROWN, W. D.; ZALKIN, H. & MAIER, V. P. Unsaturated lipid peroxidation catalyzed by hematin compounds and its inhibition by vitamin E. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **38**:5-9, 1961.
102. TAYLOR, C. B.; PENG, S. K.; WERTHENSSSEN, N. T.; THAM, P. & LEE, K. T. Spontaneously occurring angiotoxic derivatives of cholesterol. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**:40-57, 1979.
103. TENGGERDY, R. P. Effect of vitamin E on immune responses in: MACHLIN, L. J., ed. Vitamin E - A Comprehensive Treatise, New York, Marcel Dekker, 1980. p.429-444. (Basic and Clinical Nutrition, v.1).
104. TICHIVANGANA, J. Z. & MORRISSEY, P. A. Metmyoglobin and inorganic metals as prooxidants in raw and cooked muscle systems. *Meat Sci.*, **15**:107-116, 1985.
105. TSAI, T. C., WELLINGTON, G. H. & POND, W. G. Improvement in the oxidative stability of pork by dietary supplementation of swine rations. *J. Food Sci.*, **43**(1):193-196, 1978.
106. UEDA, T. & IGARASHI, O. Determination of vitamin E in biological specimens and foods by HPLC - pretreatment of samples and extration of tocoferols. *J. of Micronutrient Analysis*. **7**:79-96, 1990.
107. WEBB R. W.; MARION W. W.; HAYSE P. L. Effect of tocopherol supplementation on the quality of precooked and mechanically deboned turkey meat. *J. Food Sci.*, **37**(6):853-856, 1972.
108. WHANG, K. ABERLE, E. D. JUDGE, M. D. & PENG, I. C. Antioxidative activity of alpha-tocopherol in cooked and uncooked ground pork. *Meat Sci.*, **17**:235-249, 1986.