

**URI - CAMPUS ERECHIM**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE  
EM CARNE DE FRANGO**

**RENATA BEZERRA ROTTA**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

**ERECHIM, RS - BRASIL**

**MAIO DE 2007**

# **ESTUDO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE EM CARNE DE FRANGO**

Renata Bezerra Rotta

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

---

Prof. Alexandre José Cichoski, D.Sc.  
Orientador

---

Gerson Scheuermann, Ph.D.

---

Prof. Marco Di Luccio, D.Sc.

---

Prof. Tatiana Emanuelli, D.Sc.

Erechim, 28 de maio de 2007

*Dedico*

*Ao meu esposo Maurício,  
pelo apoio e compreensão incondicionais,  
por todos os gestos de amor, pela paciência  
e por cada palavra de incentivo e conforto.  
Obrigada por você estar a cada dia ao meu lado,  
obrigada por você existir na minha vida.  
“Quando não estás aqui, sinto falta de mim mesma”...*

*Aos meus queridos pais Sérgio e Devanir,  
que sempre acreditaram em mim  
e fizeram o possível para me ver feliz.  
Sem vocês eu nada seria,  
vocês são a luz que ilumina e guia minha vida.*

*Aos meus sogros Lucindo e Juleide,  
agradeço pela presença e apoio diários,  
pelo carinho, pelas caronas e pela preocupação...  
Sou feliz por fazer parte desta família.*

*Ofereço*

*À Maria Clara, que em breve virá para tornar  
nossas vidas ainda mais felizes e completas.*

*Minha filha amada, que você tenha sempre idealismo no coração  
e os dois pés no chão da realidade, que viva para seus sonhos e objetivos,  
e que a conquista deles lhe dê o gosto doce da vitória.*

*Que você sempre possa fazer as coisas com amor e dedicação,  
porque acredito que este seja o caminho para a verdadeira felicidade.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Alexandre José Cichoski, pela valorosa orientação, pelo apoio e disponibilidade, mas principalmente pela confiança, amizade, dedicação e exemplo de caráter e profissionalismo.

A todos os professores do Departamento de Engenharia de Alimentos, em especial à Prof. Helen Treichel, Prof. Alice Valduga, Prof. Marco Di Luccio, Prof. Fernanda Corazza e Prof. Marcos Corazza, pelo apoio e ensinamentos durante o curso e pela amizade e companheirismo demonstrados.

À Professora Tatiana Emanuelli, e à aluna de iniciação científica Lídia Einsfeld, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, pela ótima recepção e pelos valorosos ensinamentos.

Aos alunos de graduação Renata Ril, Roberto Verlindo, Alencar Grolli, Carla Francischetto, Rafael Barriquelo e Larissa Vanzo, meu agradecimento por todas as horas de dedicação que possibilitaram o sucesso dos experimentos.

Aos pesquisadores Gerson Scheuermann, Anildo Cunha, Paulo Rosa e demais pessoas envolvidas na criação das aves na Embrapa Unidade Aves e Suínos de Concórdia-SC, que possibilitaram a realização dos experimentos. Agradeço pela excelente recepção e disponibilidade na parceria.

Aos meus colegas do Mestrado, principalmente os da “turma especial”, Marilúcia, Gabriela, Luiz Paulo, Joncimar, Iloir, Elisandra e Jarbas, obrigada pela amizade e auxílio. Sentirei saudades de todas as conversas jogadas fora, das descobertas e dos planos que fizemos, dos tantos risos e momentos que compartilhamos. Saudades até dos momentos de lágrimas, de angústia, enfim, do companheirismo vivido.

A todos os funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos, em especial à Central de Materiais, por estarem sempre dispostos a ajudar. Igualmente ao Departamento de Farmácia, pelos constantes empréstimos.

À direção do Hospital São Sebastião de Espumoso-RS, que possibilitou a concretização deste objetivo, aceitando com paciência a negociação de meus horários, folgas e plantões durante estes 27 meses de curso.

E finalmente, agradeço a Deus, por ter-me dado forças para enfrentar os obstáculos dia após dia, e por ter iluminado a minha mente e enchido meu coração de esperança nas horas mais difíceis.

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

## ESTUDO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE EM CARNE DE FRANGO

Renata Bezerra Rotta

Maio/2007

Orientador: Alexandre José Cichoski

A selenoenzima glutaciona peroxidase (GSH-Px) faz parte do sistema antioxidante celular, exercendo um papel essencial na proteção dos tecidos através da eliminação de hidroperóxidos e outras espécies reativas formadas normalmente durante o metabolismo. Na carne, a oxidação lipídica é responsável pela diminuição de sua qualidade, desta forma, a inclusão de antioxidantes na dieta de animais representa um método efetivo para aumentar a estabilidade oxidativa do músculo. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência da suplementação de diferentes fontes e níveis de selênio na alimentação de frangos de corte sobre a atividade da enzima glutaciona peroxidase na carne de sobrecoxa fresca, submetida ao processamento térmico e ao congelamento, e sobre o nível de oxidação lipídica destas amostras, através da determinação dos valores de TBARS. As aves foram divididas em cinco tratamentos, conforme o tipo de suplementação dietética: sem suplementação de selênio (T1), selênio inorgânico a 0,15 mg/kg (T2), selênio inorgânico a 0,35 mg/kg (T3), selênio orgânico a 0,15 mg/kg (T4) e selênio orgânico a 0,35 mg/kg (T5). Entre as amostras de carne crua de sobrecoxa de frango, foi possível concluir que as atividades obtidas não foram significativamente diferentes entre os cinco diferentes tratamentos. Com o congelamento destas amostras,

verificou-se que as atividades de todos os tratamentos diminuíram chegando a valores estatisticamente iguais entre si. O cozimento da carne de sobrecoxa de frango proporcionou uma diminuição significativa na atividade da enzima glutatona nos tratamentos T2, T4 E T5. Com o efeito do congelamento sobre a carne cozida, somente o tratamento T1 teve sua atividade significativamente reduzida. Quanto aos níveis de oxidação lipídica das amostras, pode-se verificar na carne crua que o maior valor de TBARS foi encontrado no tratamento T5, seguido dos tratamentos T1, T3 e T4 (que não diferiram entre si) e por último, o tratamento T2, que apresentou o menor valor. Com o cozimento, obtiveram-se valores de TBARS significativamente maiores para todos os tratamentos; o mesmo foi observado após o congelamento da carne cozida. Também foram testadas novas condições de análise com o objetivo de otimizar as determinações de GSH-Px; pode-se concluir que concentrações de peróxido de hidrogênio superiores a 0,72 mM ocasionaram inibição da enzima glutatona peroxidase; a temperatura de reação que proporcionou maiores valores de atividade foi a de 22°C; a utilização do substrato terc-butil hidroperóxido em lugar do peróxido de hidrogênio ocasionou uma diminuição das taxas de reação e o uso do mercaptoetanol na etapa de extração enzimática não ocasionou a obtenção de melhores resultados.

Palavras-chave: glutatona peroxidase, carne de frango, influência da temperatura, estabilidade oxidativa

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering

## STUDY OF GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY IN CHICKEN MEAT

Renata Bezerra Rotta

May/2007

Advisor: Alexandre José Cichoski

Glutathione peroxidase (GSH-Px) is a selenium-dependent enzyme that plays an essential role in the cellular protection against the action of hydroperoxides and other reactive species formed normally during the metabolism. In meat, the lipid oxidation is responsible for the reduction of the quality, thus the inclusion of antioxidants in the animal's diet represents an effective method to increase the oxidative stability of the muscle. The purpose of the present study was to evaluate the influence of different sources and levels of selenium added on chicken's diet on the glutathione peroxidase activity in the fresh, cooked and stored meat; also on the levels of lipid peroxidation of these samples. The chickens were divided in five treatments, as the type of diet: without supplementation of selenium (T1), inorganic selenium 0,15 mg/kg (T2), inorganic selenium 0,35 mg/kg (T3), organic selenium 0,15 mg/kg (T4) and organic selenium 0,35 mg/kg (T5). Between the fresh samples, the activities of GSH-Px weren't significantly different in the five treatments. After freezing, all the treatments presented reduction of activity, with values equal between itself. The cooking of chicken meat caused a reduction in the GSH-Px's activity in treatments T2, T4 and T5. With the freezing of the cooked meat, only T1 had your activity

significantly reduced. In relation of the levels of lipid oxidation, the higher value of TBARS in the fresh meat it was found in T5. With the cooking, all the treatments presented increase in TBARS values; the same was observed after freezing of cooked meat. Also it was tested new reaction conditions with the purpose of optimize the enzyme determinations. It follows that hydrogen peroxide in concentrations above 0,72 mM produced inhibition of glutathione peroxidase; the reaction temperature of 22°C provided higher values of activity; the substrate tert-butyl hydroperoxide provided a reduction of the reaction rates and the use of mercaptoethanol in the buffer didn't promote the best extraction of enzyme.

Key-words: glutathione peroxidase, chicken meat, influence of temperature, oxidative stability

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1	PROCESSOS OXIDATIVOS NA CARNE.....	4
2.1.1.	Oxidação de Proteínas.....	5
2.1.2.	Oxidação de Lipídios.....	6
2.1.2.1.	Etapas da Peroxidação Lipídica.....	7
2.1.2.1.1.	Iniciação ou Indução .....	8
2.1.2.1.2.	Propagação .....	9
2.1.2.1.3.	Terminação .....	10
2.1.2.2.	Fatores que afetam a Oxidação Lipídica.....	10
2.1.2.2.1.	Espécie Animal.....	10
2.1.2.2.2.	Tipo de Músculo .....	10
2.1.2.2.3.	Manipulação e Cozimento.....	10
2.1.2.3.	Controle da Oxidação Lipídica através da Suplementação de Antioxidantes .....	11
2.1.2.4.	Influência da Oxidação Lipídica sobre a Qualidade da Carne .....	11
2.1.2.4.1.	Flavor.....	12
2.1.2.4.2.	Textura .....	13
2.1.2.4.3.	Cor.....	14
2.2	CONGELAMENTO DA CARNE .....	14
2.3	USO DO MINERAL SELÊNIO NA DIETA ANIMAL .....	16
2.4	ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE .....	18
2.4.1.	Denominação, Correlação com Selênio e Localização .....	18
2.4.2.	Presença no Tecido Muscular.....	21
2.4.3.	Princípio de Análise da Atividade.....	21
2.4.4.	Interações entre Enzima e Substratos .....	22
2.4.5.	Inibidores da Reação .....	24

2.4.6. Extração Enzimática.....	25
2.4.7. Efeito do pH sobre a Atividade Enzimática.....	26
2.4.8. Efeito da Temperatura sobre a Atividade Enzimática.....	26
2.4.9. Efeito dos Eletrólitos sobre a Enzima .....	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS .....	28
3.1.1. Criação das Aves .....	28
3.1.2. Composição das Dietas .....	30
3.1.3. Abate das Aves .....	32
3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GLUTATIONA PEROXIDASE.....	33
3.2.1. Amostras e Condições de Análise .....	34
3.2.2. Obtenção do Extrato Enzimático.....	34
3.2.3. Método de Determinação da Atividade .....	35
3.2.4. Expressão dos Resultados.....	36
3.3 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA .....	37
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
4.1 PRIMEIRA ETAPA .....	39
4.1.1. Influência das Fontes e Níveis de Selênio sobre a Atividade da Enzima Glutaciona Peroxidase.....	39
4.1.2. Estabilidade da Enzima Glutaciona Peroxidase frente ao Armazenamento a Baixa Temperatura.....	43
4.1.3. Estabilidade da Enzima Glutaciona Peroxidase frente ao Cozimento .....	45
4.1.4. Nível de Oxidação Lipídica em função do Cozimento e Armazenamento a Baixa Temperatura.....	48
4.2 SEGUNDA ETAPA.....	53
4.2.1. Efeito da Concentração de Peróxido de Hidrogênio sobre a Atividade da Enzima Glutaciona Peroxidase .....	53

4.2.2. Efeito da Temperatura e do Tempo de Incubação do Meio de Reação sobre a Atividade da Enzima Glutathione Peroxidase .....	55
4.2.3. Variação de Substratos: Peróxido de Hidrogênio X Terc-butil Hidroperóxido .....	57
4.2.4. Efeito do Tampão empregado na Extração Enzimática.....	58
<b>5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>60</b>
5.1 CONCLUSÕES .....	60
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	61
<b>6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICE A – DADOS SOBRE O DESEMPENHO DOS FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE SELÊNIO .....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Molécula da mioglobina.....	6
Figura 2. Estrutura do aminoácido cisteína .....	25
Figura 3. Visão geral do Aviário Experimental.....	29
Figura 4. Box número 19 no Aviário Experimental .....	29
Figura 5. Lavagem das carcaças das aves e separação das partes no Abatedouro Experimental .....	33
Figura 6. Interconversão de glutathiona nas suas formas reduzida e oxidada pela ação das enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona redutase (GR) .....	33
Figura 7. Reação entre TBA e MDA com a formação do produto pigmentado que absorve a 531 nm. Fonte: Fernández <i>et al.</i> (1997) .....	38
Figura 8. Atividades da GSH-Px (U/g) verificadas na carne crua três horas após o abate e na carne armazenada durante 90 dias a $-18^{\circ}\text{C}$ nos cinco tratamentos empregados na criação das aves.....	43
Figura 9. Atividades da GSH-Px (U/g) verificadas na carne crua três horas após o abate, logo após o cozimento a $66^{\circ}\text{C}$ e na carne cozida armazenada durante 90 dias a $-18^{\circ}\text{C}$ nos cinco tratamentos empregados na criação das aves .....	46

Figura 10. Valores de TBARS (mg de malonaldeído/ kg de tecido) encontrados na carne crua três horas após o abate, recém cozida a 66°C e armazenada durante 90 dias a -18°C nos cinco tratamentos empregados na criação das aves .....50

Figura 11. Variação da taxa de reação ( $\text{Abs. min}^{-1}$ ) da enzima glutathiona peroxidase observada com as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio .....54

Figura 12. Valores de absorvância do NADPH em 340 nm no decorrer do tempo de reação verificados nos diferentes modos de pré-incubação do meio de reação .....56

Figura 13. Valores de absorvância do NADPH em 340 nm no decorrer do tempo de reação verificados com os substratos: terc-butil hidroperóxido 15 mM e peróxido de hidrogênio 0,72 mM.....58

Figura 14. Valores de absorvância do NADPH em 340 nm no decorrer do tempo de reação verificados com três tipos de tampão de extração: solução tampão 1 (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 + EDTA 1 mM + mercaptoetanol 1 mM), solução tampão 2 (tris-HCl 50 mM pH 7,6 + EDTA 1 mM + mercaptoetanol 5 mM) e solução tampão 3 (tris HCl 50 mM pH 7,6).....59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Substratos e seus respectivos Km em relação à enzima glutathiona peroxidase. Fonte: Brenda (2007).....	24
Tabela 2. Distribuição das aves no Aviário Experimental.....	28
Tabela 3. Suplementação de selênio empregada nos tratamentos na criação das aves.....	30
Tabela 4. Composição percentual das dietas nas três fases de desenvolvimento das aves.....	31
Tabela 5. Percentagem de selênio inorgânico e orgânico utilizado nas dietas das aves.....	32
Tabela 6. Atividades da GSH-Px (U/g) verificadas na carne crua três horas após o abate e na carne armazenada durante 90 dias a $-18^{\circ}\text{C}$ nos cinco tratamentos empregados na criação das aves.....	40
Tabela 7. Atividades da GSH-Px (U/g) verificadas na carne crua três horas após o abate, logo após o cozimento a $66^{\circ}\text{C}$ e na carne cozida armazenada durante 90 dias a $-18^{\circ}\text{C}$ nos cinco tratamentos empregados na criação das aves.....	45
Tabela 8. Valores de TBARS (mg de malonaldeído/ kg de tecido) encontrados na carne crua três horas após o abate, recém cozida a $66^{\circ}\text{C}$ e armazenada durante 90 dias a $-18^{\circ}\text{C}$ nos cinco tratamentos empregados na criação das aves .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGPI	ácidos graxos poliinsaturados
GR	glutaciona redutase
GSH	glutaciona, forma reduzida
GSH-Px	glutaciona peroxidase
GSSG	glutaciona, forma oxidada
MDA	malonaldeído
NADP <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NRC	<i>National Research Council</i>
TBA	ácido 2-tiobarbitúrico
Tris-HCl	trizma cloridrato

# 1 INTRODUÇÃO

O elemento químico selênio foi descoberto em 1817, pelo químico sueco Jons Jakob Berzelius, sendo considerado inicialmente cancerígeno e altamente tóxico para a saúde humana (Cozzolino, 2005). Somente em 1957, Schwarz e Foltz observaram sua essencialidade metabólica em animais, sendo que até agora cerca de 30 selenoproteínas foram identificadas em tecidos de mamíferos, embora a função precisa da maioria delas ainda não seja conhecida (Arthur e Beckett, 1994). Como integrante destas selenoproteínas, o selênio participa de importantes funções fisiológicas e processos bioquímicos, incluindo a defesa antioxidante, o metabolismo dos hormônios tireoideanos e a integridade funcional dos espermatozoides (Brown e Arthur, 2001).

A selenoenzima mais conhecida, glutathiona peroxidase ou GSH-Px (Rotruck *et al.*, 1973), faz parte do sistema antioxidante presente em todas as células que utilizam o metabolismo oxidativo, exercendo um papel essencial na proteção destas através da eliminação de hidroperóxidos e outras espécies reativas formadas normalmente durante o metabolismo (Behne e Kyriakopoulos, 2001).

Em aves, as principais consequências da ingestão insuficiente de selênio incluem miodistrofia nutricional, diátese exudativa e desordens hepáticas e pancreáticas, sendo também verificada diminuição da performance do animal, atraso no desenvolvimento do sistema imune dos frangos jovens e diminuição na produção de ovos (Leng *et al.*, 2003).

Paralelamente, sabe-se que na carne, a oxidação dos ácidos graxos insaturados dos fosfolipídios das membranas musculares é responsável pela diminuição de sua qualidade, afetando negativamente atributos como cor, textura, aroma e sabor. Assim, a inclusão de antioxidantes na dieta de animais destinados à produção de carne é um método efetivo para aumentar a estabilidade oxidativa do músculo. Alguns compostos administrados não são propriamente antioxidantes, e sim nutrientes essenciais para o funcionamento de sistemas antioxidantes endógenos, como é o caso do selênio (Carreras, 2004a).

Apesar das vantagens do uso de selênio como agente antioxidante *in vivo*, o conhecimento de seu nível de eficiência em relação ao retardamento da oxidação que ocorre na carne submetida a tratamento térmico é restrito. Sabe-se que a aceleração da oxidação lipídica na carne provocada pela ação da temperatura deve-se em parte pela inativação das enzimas antioxidantes, dentre elas, glutathione peroxidase (Mei *et al.*, 1994).

Em 1967, Paglia e Valentine desenvolveram um método de análise no qual a atividade da enzima glutathione peroxidase era medida através de um procedimento espectrofotométrico indireto, cujo princípio é utilizado até os dias atuais. Assim, a atividade desta enzima tem sido determinada em diversos tipos de amostra, tais como carnes bovina (Mei *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996; O'Grady *et al.*, 2001), suína (Mei *et al.*, 1994; Mahan e Parrett, 1996; Hernández *et al.*, 2002) e de frango (Arai *et al.*, 1994; Moreira *et al.*, 2001; Surai e Dvorska, 2002; Carreras *et al.*, 2004, Hoac *et al.*, 2006); também em leite bovino (Chen *et al.*, 2000; Lindmark-Mansson *et al.*, 2001) e plasma sanguíneo (Bügel *et al.*, 2004).

Apesar dos diversos experimentos e publicações referentes à determinação da atividade da enzima glutathione peroxidase, falta ainda uma elucidação maior sobre a técnica e os mecanismos de reação propriamente ditos, pelo fato de este ser um método de análise complexo e dependente de muitos fatores. Existem também muitas divergências entre diferentes autores em relação à metodologia utilizada nas análises e aos valores encontrados para o mesmo tipo de amostra. Além disso, são vários os fatores que influenciam a atividade da enzima glutathione peroxidase na carne, que vão desde o tipo de suplementação de selênio na dieta animal até condições de processamento do tecido muscular após o abate, como cozimento e armazenamento em baixas temperaturas.

Com base nestas informações, elaborou-se este trabalho de pesquisa cuja finalidade principal foi avaliar a influência da suplementação de diferentes fontes e níveis de selênio na alimentação de frangos de corte sobre a atividade da enzima glutathione peroxidase na carne de sobrecoxa submetida ao processamento térmico e ao congelamento, e também sobre o nível de oxidação lipídica destas amostras. Em uma segunda etapa, foram variadas algumas condições de pré-

análise e da reação catalisada pela glutathione peroxidase, com o objetivo de otimizar as determinações da atividade desta enzima.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Processos Oxidativos na Carne**

Na estrutura dos átomos e das moléculas, os elétrons associam-se normalmente em pares. Define-se radicais livres ou espécies reativas como espécies independentes que contêm um ou mais elétrons não pareados. Essa característica confere ao átomo ou molécula grande instabilidade e reatividade, pela tendência em acoplar o elétron não pareado com um outro que esteja presente em estruturas próximas à sua. O oxigênio é o principal fornecedor de radicais livres (Leite e Sarni, 2003).

Os lipídios, proteínas e ácidos nucleicos constituem os principais substratos para atuação das espécies reativas (Carreras, 2004a). A peroxidação lipídica é a consequência mais estudada do estresse oxidativo, sendo que a formação do radical peroxil danifica diretamente as membranas celulares, ocasionando alterações em sua fluidez, permeabilidade e função metabólica (Leite e Sarni, 2003).

A carne é bastante susceptível às reações de oxidação lipídica, especialmente quando exposta a condições como trituração, onde oxigênio é incorporado ao músculo, e cozimento, onde ferro é liberado das heme-proteínas. A combinação de catalisadores da oxidação lipídica, sistemas de membranas altamente insaturadas e períodos de alta oxigenação propiciam as reações oxidativas no músculo esquelético, que inicialmente ocorrem ao nível de membrana (Chan e Decker, 1994).

Para prevenir ou retardar as reações oxidativas, o tecido muscular conta com diversos sistemas antioxidantes endógenos, entre eles enzimas como glutathione peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Estes sistemas antioxidantes previnem a formação de radicais livres a partir de peróxidos preexistentes, e como estão naturalmente presentes no músculo esquelético, são capazes de inibir a oxidação lipídica tanto em tecidos vivos como na carne pós-abate (Chan e Decker, 1994).

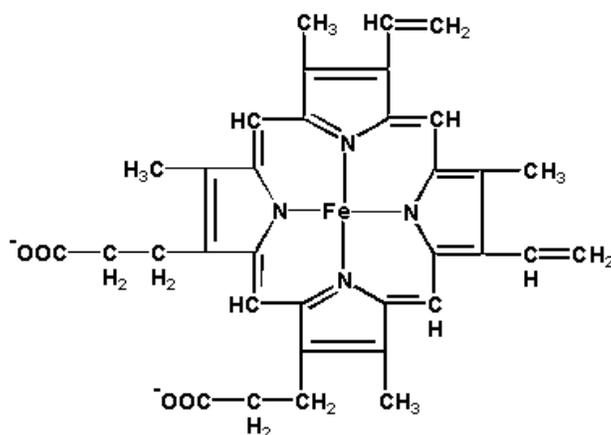
A concentração e atividade de muitos destes antioxidantes endógenos pode ser influenciada pela dieta, e desta forma pode-se aumentar a estabilidade oxidativa da carne sem que a adição de antioxidantes sintéticos seja necessária (Maraschiello *et al.*, 1999).

### **2.1.1. Oxidação de Proteínas**

O termo “oxidação protéica” refere-se à modificação de uma proteína induzida de forma direta por espécies reativas ou indiretamente através da reação com produtos secundários do estresse oxidativo. Embora as proteínas também sejam substratos para a ação dos radicais livres, seu efeito sobre elas é menos intenso do que se verifica nos lipídios, devido ao fato das reações serem mais lentas. Alguns dos agentes responsáveis pela oxidação protéica são o peróxido de hidrogênio, metais de transição como ferro e cobre, luz ultravioleta, ozônio e produtos da oxidação lipídica (Shacter, 2000).

Devido ao dano oxidativo, as proteínas podem sofrer modificações em aminoácidos específicos, mudanças conformacionais, fragmentação da cadeia peptídica ou alteração da carga elétrica. Estas alterações podem provocar diversas conseqüências funcionais, tais como aumento da susceptibilidade à proteólise e inativação enzimática (Shacter, 2000).

As principais conseqüências da oxidação protéica sobre a qualidade da carne e produtos cárneos verificam-se sobre a coloração, sendo que esta se deve fundamentalmente ao estado da proteína muscular mioglobina (Figura 1), principal responsável pela cor vermelha do músculo e tendo como função o armazenamento do oxigênio necessário ao metabolismo aeróbico. A mioglobina é uma proteína conjugada constituída por uma parte protéica (globina) e um grupo prostético de natureza não-peptídica (grupo heme).



**Figura 1.** Molécula da mioglobina.

A molécula de mioglobina dá à carne fresca uma coloração vermelho púrpura. Em contato com o ar, esta molécula se oxigena dando lugar a oximioglobina, de cor vermelho brilhante. Quando a mioglobina se oxida, forma-se a forma férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ), denominada metamioglobina, responsável pela coloração marrom da carne (Chan *et al.*, 1997)

A oxidação da oximioglobina e a oxidação lipídica ocorrem de maneira simultânea, e cada um destes processos parece ser capaz de agravar o outro. Já foi demonstrado que produtos secundários da oxidação lipídica promovem a oxidação da oximioglobina, assim como heme-pigmentos, especialmente metamioglobina, são catalisadores da peroxidação lipídica na carne cozida (Chan *et al.*, 1997).

### 2.1.2. Oxidação de Lipídios

Uma das mais importantes causas da deterioração de produtos cárneos é a oxidação lipídica, a qual afeta ácidos graxos, principalmente os poliinsaturados (Fernández *et al.*, 1997). Este processo de degradação auto-oxidativa gera produtos que alteram a qualidade e as características organolépticas da carne, diminuindo a aceitação do produto por parte do consumidor. Além disso, existe a possibilidade de um efeito tóxico causado pela ingestão contínua e prolongada dos produtos rancificados (Bobbio e Bobbio, 2001). O processo de oxidação se

inicia na ligação carbono-hidrogênio adjacente à dupla ligação da cadeia de carbono, podendo ser catalisado por um grande número de fatores, especialmente fatores ambientais (umidade, calor, luz, oxigênio), presença de certos metais, enzimas e pigmentos (Racan Ricci, 2004).

A carne de frango se caracteriza por possuir uma concentração relativamente elevada de ácidos graxos insaturados, que a torna mais susceptível à rancidez oxidativa em comparação a outros tipos de carne, sendo superada somente pela carne de peixe (Byrne *et al.*, 2002), principalmente durante os processos de armazenamento e cozimento (Carreras, 2004a). A rancidez oxidativa normalmente não ocorre com ácidos graxos saturados, porque neste caso a formação de um radical livre é energeticamente desfavorável; já a presença de duplas ligações na cadeia carbônica do ácido graxo baixa a energia necessária para a ruptura homolítica das ligações carbono-hidrogênio (Bobbio e Bobbio, 2001).

O grau de oxidação lipídica da carne e de produtos cárneos é determinado habitualmente por métodos químicos, sendo o teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) o mais utilizado e considerado um bom indicador da rancidez. A formação do malonaldeído (MDA) ocorre através da decomposição de hidroperóxidos, produtos primários da oxidação lipídica. Alguns dos fatores que determinam a extensão na formação deste aldeído através de ácidos graxos poliinsaturados são: o grau de insaturação (Dahle *et al.*, 1962), a presença de metais, o pH, a temperatura e a duração e condições do aquecimento (Fernández *et al.*, 1997). Existem, além do MDA, outras substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico, sendo estas chamadas genericamente de TBARS (Carreras, 2004a).

#### **2.1.2.1. Etapas da Peroxidação Lipídica**

A modificação dos ácidos graxos é principalmente realizada através de um mecanismo de autocatálise envolvendo radicais livres, denominado auto-oxidação (Fernández *et al.*, 1997). Esta reação em cadeia ocorre em três etapas, com características organolépticas distintas. Na primeira fase, formam-se os primeiros radicais livres, e ainda não se percebe cheiro ou sabor de ranço; na segunda fase, há um aumento na quantidade de peróxidos e seus produtos de decomposição, e

o cheiro e sabor que tendem a aumentar rapidamente; a última fase caracteriza-se por cheiro e sabor fortes, alterações da cor e da viscosidade dos lipídios e também por sua decomposição (Bobbio e Bobbio, 2001).

#### **2.1.2.1.1. Iniciação ou Indução**

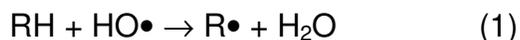
Para a formação dos primeiros peróxidos é necessária a participação de um radical suficientemente reativo, capaz de subtrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno do ácido graxo (Morrissey *et al.*, 1998). Dentre os radicais iniciadores, podemos citar:

**Oxigênio Singlete ( $^1\text{O}_2$ )** - o oxigênio atmosférico ( $^3\text{O}_2$ ), no estado tripleto, necessita ser ativado para que possa reagir, no estado singlete, com moléculas orgânicas, como os ácidos graxos insaturados (Bobbio e Bobbio, 2001).

**Radical Superóxido ( $\text{O}_2^-$ )** - a redução, por adição de um elétron, do oxigênio molecular, gera o radical superóxido. No tecido muscular este radical pode ser gerado pelos sistemas de transferência de elétrons de membrana, através da auto-oxidação da oximioglobina a metamioglobina, pela ativação de leucócitos ou ainda através da oxidação de compostos redutores, como o ácido ascórbico (Carreras, 2004a). Este radical não tem um potencial redox suficiente para iniciar a oxidação lipídica, mas pode ser transformado em outras espécies oxidantes mais potentes, tais como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical peridroxila ( $\text{HOO}^-$ ) e peroxinitrito (Spiteller *apud* Carreras, 2004a).

**Peróxido de Hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )** – a redução de um elétron do radical superóxido gera o peróxido de hidrogênio, que apesar de não reagir diretamente com ácidos graxos, possui a capacidade de atravessar membranas biológicas, além de originar radicais livres muito reativos (Halliwell e Gutteridge, 1984).

**Radical Hidroxila (HO•)** – a maior parte é produzida pela cisão do peróxido de hidrogênio catalisada por metais, denominada reação de Fenton. O radical hidroxila também pode ser gerado a partir da reação entre o peróxido de hidrogênio e o radical superóxido, conhecida como reação de Haber-Weiss ou pela reação entre metais e peróxidos orgânicos, lipídicos ou protéicos. Este radical é altamente reativo, capaz de iniciar a oxidação de lipídios e outras moléculas biológicas (Carreras, 2004a). A Equação 1 mostra o primeiro passo da reação de oxidação lipídica de um ácido graxo insaturado (RH), iniciada pelo radical hidroxila, dando origem a um radical lipídico (R•).



**Heme-Proteínas** – além de serem eficientes catalisadores da reação de Fenton e da reação de Haber-Weiss, a mioglobina e a hemoglobina podem ser ativadas por  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerando um radical oxoferril intermediário de vida curta, capaz de iniciar a peroxidação (Chan *et al.*, 1997).

#### 2.1.2.1.2. Propagação

O radical lipídico (R•) formado durante a etapa de iniciação reage rapidamente com o oxigênio molecular gerando um radical peroxila (ROO•), como mostra a Equação 2.



Este radical pode oxidar outros ácidos graxos, dando lugar a hidroperóxidos (ROOH) (Equação 3) e propagando assim a reação em cadeia, que se processa rapidamente, pois menos energia é requerida (Morrissey *et al.*, 1998).



### **2.1.2.1.3. Terminação**

A terminação da reação em cadeia da peroxidação se dá normalmente pela combinação de radicais peroxila, dando lugar a produtos não-radicalares (Carreras, 2004a).

### **2.1.2.2. Fatores que afetam a Oxidação Lipídica**

**2.1.2.2.1. Espécie Animal** - o potencial oxidativo lipídico de amostras de carne crua é muito influenciado pelo conteúdo de pigmentos heme; assim, a carne crua bovina tem maior tendência a sofrer oxidação do que a de frango, por exemplo. Mas na carne cozida, esta situação se inverte, e a carne de frango passa a ocupar o primeiro lugar quanto à susceptibilidade à oxidação. Isto se explica, em parte, pelo maior conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) destas carnes. Durante o cozimento é produzida a desnaturação das hemeproteínas que participam como catalisadores da oxidação, e por sua vez ocorre a liberação dos AGPI dos fosfolipídios de membrana, que são os principais substratos de oxidação (Gray *et al.*, 1996). Por outro lado, também tem sido descritas diferenças na atividade do sistema endógeno de enzimas antioxidantes em função da espécie animal (Mei *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996b).

**2.1.2.2.2. Tipo de Músculo** - dentro de uma mesma espécie animal, o conteúdo lipídico, a atividade das enzimas antioxidantes os níveis de antioxidantes endógenos não enzimáticos como a vitamina E, variam em função do tipo de músculo (Devore *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1996a).

**2.1.2.2.3. Manipulação e Cozimento** - a manipulação física da carne produz rupturas em sua estrutura muscular e expõe os lipídios a um ambiente pró-oxidante, promovendo o contato entre os substratos da oxidação, favorecendo a reação (Gray *et al.*, 1996).

Já o cozimento provoca uma ruptura na estrutura do tecido muscular, causando a desnaturação de proteínas com conseqüente perda na atividade enzimática de algumas delas, além de liberar ferro que atua como catalisador da

oxidação. O tratamento térmico afeta a atividade das enzimas antioxidantes (Mei *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996b), oxigênio é liberado da oximioglobina, gerando peróxido de hidrogênio e assim ocorre a ruptura de hidroperóxidos gerando radicais livres que propagam a peroxidação (Kanner, 1994).

### **2.1.2.3. Controle da Oxidação Lipídica através da Suplementação de Antioxidantes**

O tecido muscular *postmortem* difere do tecido vivo porque não pode se auto-reparar e por isso a estabilidade oxidativa do músculo esquelético dependerá da composição, concentração e reatividade dos substratos de oxidação, de seus catalisadores e dos antioxidantes (Carreras *et al.*, 2004a).

O músculo vivo possui valores de pH na faixa de 6,9 a 7,3 (Enfalt *et al. apud* Anadón, 2002), mas devido à glicólise *postmortem* e o conseqüente acúmulo de ácido láctico, o pH diminui, afetando várias propriedades da carne, incluindo a cor, capacidade de retenção de água e a solubilidade de proteínas (Anadón, 2002).

As enzimas glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) são classificadas como antioxidantes preventivos, e constituem um importante sistema de defesa enzimático contra o ataque de radicais livres a membranas celulares e intracelulares (Rover *et al.*, 2001).

A inclusão de antioxidantes na dieta de animais destinados à produção de carne é um método efetivo para aumentar a estabilidade oxidativa do músculo. Alguns compostos administrados não são propriamente antioxidantes, e sim nutrientes essenciais para o funcionamento de sistemas antioxidantes endógenos. Um exemplo são os minerais cobre, manganês, zinco e selênio, cofatores de sistemas enzimáticos antioxidantes (Papas, 1999).

### **2.1.2.4. Influência da Oxidação Lipídica sobre a Qualidade da Carne**

O processo de rancidez oxidativa inicia-se logo após o abate do animal, intensificando-se até o ponto em que a carne torna-se inaceitável para consumo. Durante o processo de conversão de músculo em carne ocorrem várias mudanças bioquímicas que fazem parte do metabolismo *postmortem*, sendo assim

promovidas condições para que o processo oxidativo se instale (Gray *et al.*, 1996; Morrissey *et al.*, 1998). Imediatamente após o abate ainda existe uma certa atividade metabólica, mas devido à falta de circulação sanguínea, os produtos da quebra do glicogênio se acumulam nos tecidos na forma de ácido láctico, ocorrendo uma diminuição gradual do pH a níveis levemente ácidos. Além disso, o sistema de defesa antioxidante torna-se enfraquecido devido à deficiência de vitaminas, e é pouco provável que este sistema normalmente disponível no animal vivo ainda funcione (Racanicci, 2004).

O termo “qualidade da carne” diz respeito a um amplo conjunto de características apresentadas por esta, incluindo desde suas propriedades físicas, químicas, morfológicas, bioquímicas e microbiológicas até aspectos sensoriais (flavor, textura e cor desejáveis), tecnológicos (processamento e armazenagem) e nutricionais (composição lipídica e protéica adequada, ausência de compostos alergênicos ou tóxicos) (Anádon, 2002; Carreras, 2004a). O aspecto, a textura, a suculência, a maciez, o odor e o flavor são algumas das características perceptíveis que mais influenciam a opinião dos consumidores a respeito da qualidade da carne, influenciando na decisão de compra (Gray *et al.*, 1996).

#### **2.1.2.4.1. Flavor**

O *flavor* é um dos atributos sensoriais mais destacados na carne, podendo ser definido pelo conjunto complexo de propriedades olfativas e gustativas que se percebem durante a degustação. O desenvolvimento do *flavor* na carne é influenciado por fatores *antemorten* (espécie, sexo, idade, composição da dieta animal) e por fatores *postmorten* (processamento, cozimento, armazenamento), sendo estes últimos os mais destacados na maioria dos casos (Carreras, 2004a).

Apesar de que o principal fator limitante na vida de prateleira da carne fresca seja a carga microbiana, a oxidação lipídica dos ácidos graxos insaturados dos fosfolípidios das membranas musculares é uma das principais causas da deterioração da qualidade da carne e no desenvolvimento de *off-flavors*, termo utilizado para descrever sensações olfato-gustativas não características, geralmente associadas à deterioração da carne (Gray *et al.*, 1996).

É durante o cozimento da carne que são gerados os compostos responsáveis pelo seu *flavor* característico. São produzidos dessa forma compostos não voláteis (peptídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares e nucleotídeos) e compostos voláteis (alcanos, aldeídos, cetonas, álcoois, ésteres e ácidos), derivados principalmente da reação de Maillard e da peroxidação lipídica, sendo que estes últimos, gerados pela decomposição de hidroperóxidos, são os grandes responsáveis pelo desenvolvimento de odor e flavor indesejáveis (Mottram, 1998).

O termo *warmed over flavor* (WOF) foi introduzido por Tims e Watts no ano de 1958 para descrever o desenvolvimento de um flavor oxidado nas carnes reaquecidas após cozimento e refrigeração, que se verifica mesmo em períodos curtos. O desenvolvimento de WOF é atribuído principalmente à auto-oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados na carne. Vários estudos têm investigado sobre o desenvolvimento de WOF, e estes levam em conta o método, a temperatura e o tempo de cozimento (Byrne *et al.*, 2002). O cozimento de carnes em temperaturas de 70 a 80°C leva a um rompimento das membranas musculares, facilitando a interação dos catalisadores da oxidação lipídica com os ácidos graxos, resultando na geração de radicais livres e na geração de WOF (Pearson *apud* Byrne *et al.*, 2002). Já em temperaturas iguais ou superiores a 100°C, o desenvolvimento de WOF parece ser inibido, provavelmente devido às propriedades antioxidantes de substâncias produzidas pela reação de Maillard nestas temperaturas (Byrne *et al.*, 2002).

#### **2.1.2.4.2. Textura**

A textura é um fator importante na apreciação sensorial de um alimento, sendo que a textura da carne é influenciada pela raça do animal, sexo, idade e fatores de criação. As mudanças produzidas durante a conversão do músculo em carne afetam também de forma importante esta característica (Anadón, 2002). Da mesma forma, como resultado da reação entre lipídios oxidados e proteínas, podem ser provocados intercruzamentos entre essas moléculas, causando uma diminuição da solubilidade de proteínas ou também sua desnaturação, o que afetaria negativamente a textura da carne (Kanner, 1994).

### **2.1.2.4.3. Cor**

A coloração da carne fresca depende diretamente da concentração e estado químico dos pigmentos heme, sendo que os principais encontrados na carne de frango são a mioglobina, a hemoglobina e o citocromo C. A concentração de mioglobina, pigmento que mais contribui para a definição da cor, é significativamente mais baixa neste tipo de carne do que a encontrada em músculos de outras espécies (Anadón, 2002).

A cor da carne é afetada por fatores como idade, sexo, raça, dieta, gordura intramuscular, conteúdo de umidade e nível de estresse no momento do abate. As diferenças básicas de cor entre músculos de um mesmo animal são resultado da proporção relativa de fibras musculares brancas e vermelhas. Em relação às aves, o peito é composto principalmente por fibras brancas com baixo conteúdo em mioglobina, possuindo assim uma cor clara; já a sobrecoxa é composta principalmente por fibras vermelhas e apresenta uma cor mais escura (Daun e Akesson, 2004).

Espécies radicalares produzidas durante a oxidação lipídica podem promover a oxidação dos pigmentos heme; diversos estudos mostram a eficácia de diferentes antioxidantes na manutenção da estabilidade da cor da carne (Gray *et al.*, 1996).

## **2.2 Congelamento da Carne**

O congelamento é considerado uma das melhores alternativas de conservação a longo prazo para a maioria dos alimentos, retardando a deterioração causada por microrganismos e mantendo características como aparência, cor e aroma (Ben, 1999). Assim, o congelamento representa um método de prolongamento da vida útil de carnes, pois à medida que a temperatura é reduzida, as reações físicas, químicas e bioquímicas, responsáveis pelas alterações sensoriais, passam a ocorrer em velocidades mais lentas (Paine e Paine *apud* Vieira, 2007). Contudo, sabe-se que a deterioração do sabor devido à oxidação das gorduras representa um fator limitante da qualidade da carne e de produtos cárneos congelados (Pino, 2005).

Os benefícios da técnica de congelamento devem-se à baixa temperatura utilizada, e não à formação de gelo em si. Durante o congelamento de tecidos, a água em solução é transferida a cristais de gelo de um grau de pureza bastante alto, e assim quase todos os constituintes não aquosos são concentrados em uma quantidade mínima de água não congelada. Este efeito é similar ao da desidratação convencional, apesar de que no congelamento a temperatura é inferior e a água separada é depositada localmente na forma de gelo. Devido ao efeito de concentração por congelamento, a fase não congelada muda significativamente suas propriedades, tais como pH, força iônica e viscosidade. Estas mudanças freqüentemente favorecem o aumento das velocidades de reação, por forçar as moléculas a unir-se e interagir umas com as outras. Em conseqüência, o congelamento produz dois efeitos opostos: a diminuição da temperatura, por si, reduz as velocidades de reação, enquanto que a concentração por congelamento, muitas vezes propicia seu aumento (Fennema, 1993).

Enquanto que muitas enzimas sofrem desnaturação durante os processos de congelamento e descongelamento, outras não são afetadas ou conservam parcialmente sua atividade. Este comportamento depende principalmente do tipo de enzima, do sistema em que ela se encontra e das condições de congelamento, principalmente no que diz respeito à velocidade e oscilações de temperatura (Fennema, 1993).

A formação dos cristais de gelo é a principal causa da degradação da estrutura dos tecidos animais, devido ao rompimento das membranas e organelas celulares através de perfurações, ocasionando alterações na estrutura e localização das enzimas nestes tecidos (Mortensen *et al.*, 2006). Quanto menor for o tempo de duração da etapa de transição líquido – sólido, menores são os cristais formados dentro do alimento que está sendo congelado, e assim, ao retornar a temperatura ambiente, o tecido muscular se encontra próximo ao seu estado original. No congelamento rápido, esta etapa de transição leva até 25 minutos; já no congelamento lento, há remoção de água das células e grandes cristais de gelo são formados, podendo ocorrer danos físicos aos tecidos celulares (Pino, 2005).

Dessa forma, o congelamento e descongelamento lentos determinam, por regra geral, maiores perdas de atividade enzimática do que os processos rápidos. Flutuações da temperatura de estocagem também favorecem o crescimento dos cristais de gelo (Neves Filho *apud* Vieira, 2007).

A susceptibilidade de carnes congeladas à oxidação lipídica pode ser em função da atividade de água ( $A_a$ ), termo criado para denominar a água disponível para crescimento microbiano e reações que possam deteriorar os alimentos (Bobbio e Bobbio, 2001). Em baixos valores de atividade de água (em torno de 0,4), a água presente no alimento liga-se aos hidroperóxidos, interferindo em sua decomposição e retardando o processo de oxidação. Nesta faixa ocorre também hidratação dos íons metálicos, que são catalisadores desta reação, reduzindo sua eficiência. À medida que são alcançados valores acima de 0,4, há um aumento progressivo na velocidade de oxidação lipídica. Este comportamento pode ser devido ao aumento da quantidade de oxigênio dissolvido, que catalisa a reação; também há expansão das moléculas e exposição de seus sítios catalíticos. Finalmente, em valores de atividade de água maiores (acima de 0,8), há um retardamento na velocidade de oxidação, provavelmente devido à diluição dos catalisadores da reação (Fennema, 1993).

Durante o congelamento a  $-18^{\circ}\text{C}$ , a atividade de água que correspondia a aproximadamente 0,9 na carne fresca, é reduzida até 0,6, entrando na faixa de valores que favorecem o aumento das reações de oxidação lipídica (Pino, 2005).

### **2.3 Uso do Mineral Selênio na Dieta Animal**

Os minerais são necessários para a manutenção da vida, pois estão envolvidos em uma série de processos metabólicos e fisiológicos fundamentais à manutenção da saúde em humanos e animais. Os microminerais ou elementos-traço, particularmente o selênio, têm impacto significativo na performance e imunidade animal, induzindo mudanças fisiológicas no tecido muscular, o que pode afetar positivamente a qualidade da carne de gado e frango (Hess *et al.*, 2003).

O micronutriente selênio ocorre naturalmente em duas formas químicas, inorgânica e orgânica. O selênio inorgânico pode ser encontrado, dependendo de seu estado de oxidação, na forma de selenito, selenato ou seleneto; já a forma orgânica é encontrada incorporada aos aminoácidos metionina e cisteína. Apesar da forma inorgânica representar uma fonte economicamente mais acessível deste nutriente, ela pode ser tóxica em médias a altas concentrações, além de interagir e quelar outros minerais (Gowdy, 2004).

Em agosto de 2000, a forma de selênio orgânico selenometionina, incorporada a leveduras (Sel-Plex®, Alltech Biotechnology Center, Nicholasville, KY), foi aprovada pelo United States Food and Drug Administration como fonte de suplementação de selênio para frangos de corte (Upton Jr., 2003) e desde então esta forma tem sido uma boa alternativa de suplementação na dieta animal. Sel-Plex® é uma fonte orgânica de selênio resultante do crescimento de células de leveduras em um meio deficiente em enxofre. Desta forma, as células são forçadas a incorporar o selênio em seus aminoácidos, tornando-se enriquecidas com selenometionina, que é a mesma forma de selênio encontrada em grãos (Kelly e Powers *apud* Gowdy, 2004).

Embora as duas formas de selênio, inorgânica e orgânica, possam ser utilizadas como suplemento dietético, elas diferem bastante em suas propriedades químicas, sendo absorvidas e metabolizadas de forma diferente. Durante a absorção, a selenometionina é ativamente transportada através das membranas intestinais e acumulada no fígado e músculo. Já o selênio inorgânico, sendo absorvido como um mineral, é muito pouco retido nos tecidos, sendo a maior parte excretada (Upton Jr., 2003).

A concentração de selênio utilizada na dieta de animais de criação influencia diretamente o depósito deste elemento nos tecidos destes animais, bem como nos produtos derivados, como leite e ovos. Os órgãos geralmente acumulam maiores quantidades de selênio; o fígado da maioria das espécies contém em média quatro vezes mais selênio do que o músculo esquelético (Combs Jr., 2001). Em frangos foi observado que a concentração de selênio decresce na seguinte ordem: penas > fígado > rim > músculo > plasma (Upton Jr., 2003).

Segundo Ali *et al.* (1997), a exigência de selênio para frangos de corte, listada no NRC (1994), é de 0,15 mg/kg de ração, o que seria suficiente para otimizar a atividade da enzima glutathiona peroxidase até os 21 dias de idade; porém, o efeito da suplementação de selênio em dietas de aves pode variar de acordo com a fonte utilizada (Moreira *et al.*, 2001). Assim, a utilização de selênio na dieta de animais de criação, visando garantir níveis adequados deste elemento tanto para o animal quanto para o consumidor, deve considerar além de sua concentração, sua forma química.

Embora selenito ou selenato (formas inorgânicas) possam ser efetivos como suplementos alimentares para prevenir a deficiência de selênio em bovinos, estas formas têm pouco impacto no conteúdo de selênio na carne, leite e ovos. Níveis maiores de selênio nos tecidos podem ser alcançados usando uma fonte de selenometionina como suplemento alimentar (Combs Jr., 2001). Isto se dá devido a diferenças no metabolismo do selênio nos animais. Selenito, selenato e mesmo selenocisteína são utilizados na biossíntese de selenoproteínas biologicamente ativas, como a enzima glutathiona peroxidase; já a selenometionina é incorporada às proteínas teciduais no lugar do aminoácido metionina, garantindo o estoque muscular de selênio (Finley, 1999; Combs Jr, 2001; Whanger, 2003). Desta forma, pode-se dizer que a atividade da enzima glutathiona peroxidase é regulada predominantemente pelos níveis de selenocisteína e/ou espécies inorgânicas de selênio oriundas da dieta (Borawska *et al.*, 2004).

De acordo com Van Saun (1990), as concentrações teciduais da enzima glutathiona peroxidase servem como um bom indicador dos níveis de selênio na dieta de animais de criação. As dosagens de GSH-Px têm sido sugeridas para a avaliação de selênio em bovinos, porém como esta enzima apresenta-se em pequenas quantidades e com baixa estabilidade, o uso desta técnica é limitado.

## **2.4 Enzima Glutathiona Peroxidase**

### **2.4.1. Denominação, Correlação com Selênio e Localização**

De acordo com o Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), as peroxidases recebem genericamente a nomenclatura EC 1.11.1. Estas fazem parte do grupo de enzimas denominado oxi-redutases, as quais estão envolvidas em reações do tipo redox onde átomos de hidrogênio, oxigênio ou elétrons são transferidos entre moléculas, sendo que no caso das peroxidases essa transferência ocorre na presença de peróxidos (London South Bank University, 2007). Esta reação pode ser descrita pela Equação 4, sendo que X corresponde à molécula que sofre peroxidação:



A enzima glutationa peroxidase ou GSH-Px foi descoberta por Mills em 1957, em eritrócitos de mamíferos. Não se observa sua presença em plantas ou bactérias, embora possa ser encontrada em algumas algas e fungos (Halliwell e Gutteridge, 1985). É através da redução de hidroperóxidos que esta enzima desempenha um importante papel na prevenção de danos oxidativos em tecidos (Arai *et al.*, 1994); duas classes distintas desta enzima são conhecidas, a GSH-Px selênio-dependente (EC 1.11.1.9) e a GSH-Px selênio-independente (EC 2.5.1.18), cada uma possuindo maior especificidade por um determinado substrato (Daun e Akesson, 2004).

A glutationa peroxidase selênio-dependente é capaz de reduzir peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e uma variedade de hidroperóxidos orgânicos. Essa forma possui massa molecular de 81.000, é uma proteína tetramérica e possui um átomo de selênio em cada subunidade, na forma de selenocisteína. O segundo tipo, a enzima GSH-Px selênio-independente, tem massa molecular de 35.000, é dimérica e está apta a reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, exceto o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Punchard *et al.*, 1996), e em substituição à selenocisteína, possui um resíduo de tirosina no sítio catalítico. Esta classe de enzimas selênio-independentes correspondem às glutationa S-transferases (Arthur, 2000; Stagsted, 2006).

A atividade da GSH-Px selênio-dependente parece ter correlação positiva com a ingestão dietética deste mineral (DeVore *et al.*, 1983). Conseqüentemente,

níveis inadequados de selênio no organismo podem levar a uma redução na atividade desta enzima, ocorrendo um decréscimo na habilidade de degradar peróxido de hidrogênio. Altos níveis desta substância estão relacionados com a auto-oxidação de membranas celulares, danos ao DNA e prejuízos à função imune; pesquisas recentes demonstram uma elevação de 32% na peroxidação lipídica nos eritrócitos de frangos deficientes de selênio (Holovská Jr. *et al.*, 2003).

Foram identificadas quatro formas distintas da enzima GSH-Px selênio-dependente, que atuam em diferentes compartimentos subcelulares: citosólica, fosfolipídeo hidroperóxido, plasmática e gastrintestinal (Arthur e Beckett, 1994). Nos mamíferos e aves, a maior parte da enzima GSH-Px é encontrada na forma de glutathione peroxidase citosólica (cGSH-Px), a qual utiliza como substratos peróxido de hidrogênio, peróxido de cumeno, terc-butil hidroperóxido e hidroperóxidos de ácidos graxos. Já a glutathione peroxidase fosfolipídeo hidroperóxido (phGSH-Px), intimamente associada às membranas celulares, exibe atividade unicamente frente a hidroperóxidos de fosfolipídeos e colesterol (Ursini *et al. apud* Arthur e Beckett, 1994). A glutathione peroxidase plasmática ou extracelular (pGSH-Px), sintetizada e secretada pelas células hepáticas, metaboliza facilmente peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos de ácidos graxos, e com menos eficiência, hidroperóxidos de fosfolipídeos e colesterol. Por último, a glutathione peroxidase gastrintestinal (giGSH-Px) age nos mesmos substratos da cGSH-Px e pGSH-Px (Punchard *et al.*, 1996).

Apesar das diferentes localizações e especificidade em relação aos substratos, as formas de GSH-Px citosólica, fosfolipídeo hidroperóxido e gastrintestinal são comumente agrupadas e denominadas genericamente de glutathione peroxidase celular, devido ao fato de apresentarem características cinéticas semelhantes (Maddipati e Marnett, 1987; Lindmark-Mansson e Akesson, 2001b). Estudos recentes relatam que eritrócitos e tecidos animais contém a GSH-Px celular, enquanto que leite e plasma sanguíneo contém a forma extracelular (Chen *et al.*, 2000; Stagsted, 2006), o que explica em parte a necessidade de ajustes na técnica de determinação para os diferentes tipos de amostra.

#### 2.4.2. Presença no Tecido Muscular

As fibras musculares podem ser classificadas em dois tipos metabólicos diferentes: oxidativas (vermelhas) e glicolíticas (brancas), sendo essa classificação baseada em sua composição química e atividade enzimática. Os músculos oxidativos possuem maior número de mitocôndrias e um maior conteúdo de mioglobina do que os glicolíticos, e usam principalmente ácidos graxos como substratos, enquanto que os glicolíticos utilizam principalmente glicogênio como fonte de energia (Daun e Akesson, 2004).

Estudos anteriores realizados com frango e peru (DeVore *et al.*, 1983; Lee *et al.*, 1996) demonstraram uma maior atividade de GSH-Px no músculo oxidativo (coxa) do que no glicolítico (peito). Como esta enzima está localizada nas mitocôndrias e no citosol das células musculares, sua maior atividade nas fibras vermelhas pode ser correlacionada com a função de impedir a oxidação nestas células, as quais encontram-se principalmente sob metabolismo aeróbico (Chan e Decker, 1994).

#### 2.4.3. Princípio de Análise da Atividade

A enzima glutathione peroxidase (GSH-Px) catalisa *in vitro*, com alta especificidade, a reação que ocorre *in vivo*, ou seja, a detoxificação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) através da oxidação paralela do tripeptídeo reduzido glutathione (GSH), formado pelos resíduos dos aminoácidos glicina, glutamato e cisteína (Lehninger *et al.*, 1995). A Equação 5 representa esta reação global.



A molécula de glutathione oxidada (GSSG), formada nesta reação, é regenerada à sua forma reduzida (GSH) através da reação paralela com a molécula de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), catalisada por uma segunda enzima, a glutathione redutase (Equação 6). Apesar desta enzima não atuar diretamente na remoção de espécies radiculares, ela age

conjuntamente com a glutathiona peroxidase, impedindo a paralisação do ciclo metabólico da glutathiona (Rover Jr., 2001).



O método analítico descrito por Paglia e Valentine em 1967 para a determinação da atividade da enzima glutathiona peroxidase em eritrócitos baseia-se neste ciclo redox. Através da medida do decaimento da absorbância do NADPH a 340 nm em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, é possível determinar a atividade enzimática, já que esta é proporcional ao consumo do NADPH. Desde então, este método vem servindo de referência para a aplicação e adequação aos mais diferentes tipos de amostras, por ter-se mostrado mais conveniente e confiável (Chen *et al.*, 2000).

#### **2.4.4. Interações entre Enzima e Substratos**

Enzimas são biocatalisadores, ou seja, são moléculas que aumentam a taxa da reação química sem sofrer transformação permanente, apesar de haver uma perda gradativa de sua atividade. Apresentam geralmente alta especificidade como consequência de sua conformação tridimensional, que provoca a formação de sítios ativos. Considerando a natureza complexa das enzimas é razoável que muitos fatores influenciem a eficiência dessa atividade catalítica (London South Bank University, 2007).

Para que a reação catalisada pela glutathiona peroxidase ocorra, é necessária a participação do substrato glutathiona (GSH) em sua forma reduzida, e uma atenção especial deve ser dada à estabilidade deste tripeptídeo, visto que ele pode sofrer oxidação em função de impurezas presentes (como metais) e do valor do pH da solução tampão. Estes fatores podem levar a erros durante a análise, prejudicando a interpretação dos resultados (Rover Jr., 2001).

É necessária também a presença de alguma espécie de hidroperóxido, e este pode ser inorgânico, como etil-hidroperóxido, terc-butil hidroperóxido e

peróxido de hidrogênio, que são reduzidos à água; os hidroperóxidos de origem orgânica, como os derivados do colesterol, ácidos graxos e cumeno, são reduzidos ao seu álcool correspondente (Chaudiere *et al.*, 1984; Brenda, 2007).

Em concentrações de substrato muito baixas, a velocidade inicial de reação ( $V_0$ ) é proporcional à concentração do substrato. Entretanto, à medida que a concentração do substrato aumenta, a taxa inicial passa a crescer menos, deixando de ser proporcional a essa concentração. Com o posterior aumento na concentração do substrato, a taxa de reação torna-se essencialmente independente de sua concentração, aproximando-se de uma taxa constante. Nessa faixa pode-se dizer que a enzima está saturada com o substrato.

Todas as enzimas apresentam o efeito da saturação, porém variam em relação à concentração requerida para produzi-lo. Esse efeito de saturação levou alguns pesquisadores a estabelecerem a hipótese de que enzima e substrato reagem reversivelmente para formar um complexo, passo essencial na catálise de uma reação (Lehninger *et al.*, 1995).

As reações catalisadas pela GSH-Px extracelular (encontrada no leite e plasma sanguíneo) são cerca de dez vezes mais lentas do que aquelas catalisadas pelo tipo celular (encontrada em eritrócitos e tecido muscular); além disso, quando trata-se do tipo extracelular, a saturação pelos substratos ocorre facilmente, por este motivo este sistema necessita de concentrações mais baixas de glutathiona reduzida (GSH) e peróxido (Chen *et al.*, 2000). Já a GSH-Px celular parece não ser saturada com GSH, porém altas concentrações desse substrato também acabam bloqueando a reação enzimática, só que por outro caminho, inibindo a enzima glutathiona redutase (que atua em conjunto no ciclo redox), diminuindo desta forma a taxa de reação (Chen *et al.*, 2000).

Em 1913, L. Michaelis e L. Menten desenvolveram a teoria da ação e cinética enzimática, e a partir disso, criou-se uma Equação (7) que permite demonstrar como a velocidade de uma reação varia em função da concentração do substrato (Lehninger *et al.*, 1995):

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \quad (7)$$

Esta equação relaciona a velocidade inicial de reação ( $V_0$ ), a velocidade máxima ( $V_{max}$ ) e a concentração inicial de substrato  $[S]$  com a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ). O  $K_m$  de um substrato é a concentração do substrato na qual a velocidade inicial de reação equivale à metade da velocidade máxima; quanto menor seu valor, maior a afinidade da enzima pelo substrato. Para reações que envolvem um substrato é expressa em moles por litro e é independente da concentração da enzima. Na Tabela 1 encontram-se alguns substratos e seus respectivos  $K_m$  em relação à enzima glutatona peroxidase. Deve-se salientar que os valores de  $K_m$  não são fixos e podem variar com a estrutura do substrato, com o pH e com a temperatura; para enzimas que atuam em mais de um substrato, cada substrato possui um  $K_m$  característico (Brenda, 2007).

**Tabela 1.** Substratos e seus respectivos  $K_m$  em relação à enzima glutatona peroxidase. Fonte: Brenda (2007)

Substrato	$K_m$ (mM)	Observações
Colesterol 7 beta- hidroperóxido	0,003	
Peróxido de hidrogênio	0,003	
Terc-butil hidroperóxido	0,059	
Hidroperóxido de cumeno	0,144	
GSH	2,1	pH 7,5, 25 °C, reação com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
GSH	2,6	pH 7,5, 25 °C, reação com hidroperóxido de cumeno
GSH	5,5	pH 7,5, 25 °C, reação com terc-butil hidroperóxido

#### 2.4.5. Inibidores da Reação

Já foi constatado que ácidos mercapto-carboxílicos são inibidores potentes e específicos da GSH-Px, formando com esta complexos reversíveis. Alguns

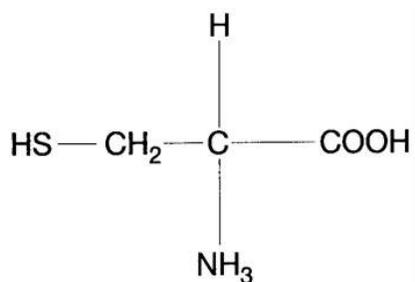
compostos análogos à GSH atuam como substratos fracamente redutores na ausência desta molécula, e assim como muitos mercaptanos, competem com a GSH no ciclo enzimático da GSH-Px (Chaudiere *et al.*, 1984).

Dentre outros inibidores da reação catalisada pela enzima GSH-Px, pode-se citar ânions polivalentes (fosfato, sulfato, maleato) e o próprio NADPH, que age provavelmente devido à inibição da glutathiona redutase durante a reação paralela (Brenda, 2007).

#### 2.4.6. Extração Enzimática

Diferentemente do que ocorre com a determinação da atividade da enzima glutathiona peroxidase no plasma, a determinação em tecidos animais requer uma extração prévia, pois a enzima encontra-se nas mitocôndrias e no citosol das células musculares (Chan e Decker, 1994). Além disso, outros fatores devem ser levados em consideração nesta fase pré-análise, com o objetivo de preservar a atividade enzimática, e entre eles pode-se citar o pH, a temperatura, a concentração de eletrólitos e a diluição empregada (Fennema, 1993).

O centro ativo da enzima glutathiona peroxidase contém o aminoácido selenocisteína, um derivado da cisteína (Figura 2) por substituição do átomo de enxofre por selênio. Este grupamento funcional, além de ser responsável pela polaridade da molécula, facilita sua oxidação, através da formação de uma ligação covalente entre dois átomos de selênio. Ligações deste tipo ocorrem facilmente, ocasionando maior estabilidade na estrutura das proteínas, e conseqüentemente ocasionando inibição no centro ativo da enzima, o que dificulta sua extração e reatividade com os substratos (Lehninger *et al.*, 1995).



**Figura 2.** Estrutura do aminoácido cisteína.

“The Comprehensive Enzyme Information System” cita que o 2-mercaptoetanol seria um agente estabilizador da enzima glutathiona peroxidase (Brenda, 2007). Esta capacidade de formação de complexos reversíveis com compostos derivados do mercaptano torna-se bastante útil na etapa de pré-ativação da GSH-Px (Chaudiere *et al.*, 1984). O 2-mercaptoetanol corresponde a um agente redutor de ação branda cuja utilização já foi descrita em outros trabalhos (Arai *et al.*, 1994) com a finalidade de prevenir a oxidação espontânea durante a extração de uma proteína (Farfán, 1994).

#### **2.4.7. Efeito do pH sobre a Atividade Enzimática**

A maior parte das enzimas apresenta sua atividade máxima na faixa de pH entre 4,5 e 8,0. Existe para cada enzima uma faixa em que a inativação é reversível, provavelmente devido à ionização dos grupos funcionais do centro ativo ou ainda de áreas que controlam a conformação da enzima. Mas em valores extremos de pH, esta atividade pode decair irreversivelmente, devido à desnaturação protéica (Fennema, 1993).

Para a glutathiona peroxidase, o pH ótimo de ação é próximo de 8,0 (Paglia e Valentine, 1967), mas esta enzima continua ativa com valores de até 9,0 (Brenda, 2007); sua atividade é mínima em pH abaixo de 6,0 (Mills, 1959). Assim, a maioria dos procedimentos de análise da GSH-Px é conduzida na faixa de pH de 7,0 a 7,6 (Punchard *et al.*, 1996).

#### **2.4.8. Efeito da Temperatura sobre a Atividade Enzimática**

A maior parte das enzimas apresenta sua máxima atividade na faixa de 30 a 40°C, e em temperaturas acima de 45°C, começam a sofrer desnaturação, diminuindo gradativamente sua atividade (Fennema, 1993). A aceleração da oxidação lipídica causada pela temperatura, que é percebida nas carnes cozidas, pode ser devida em parte à inativação das enzimas antioxidantes pelo calor (Mei *et al.*, 1994). Segundo Lee *et al.* (1996), temperaturas internas a partir de 70°C na carne já promovem a inativação da enzima glutathiona peroxidase, sendo que a 90°C nenhuma atividade foi detectada. Paralelamente, sabe-se que muitas

enzimas sofrem desnaturação durante os processos de congelamento e descongelamento (Fennema, 1993).

#### **2.4.9. Efeito dos eletrólitos sobre a enzima**

Concentrações elevadas de eletrólitos afetam em geral a solubilidade das proteínas (Fennema, 1993). De acordo com Chen *et al.* (2000), soluções tampão em baixas concentrações favorecem a atividade da GSH-Px. A maioria dos procedimentos de análise desta enzima são conduzidos em tampão tris-HCl ou fosfato, nas concentrações de 50 a 100 mM (Punchard *et al.*, 1996).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção das Amostras

##### 3.1.1. Criação das Aves

Durante os meses de abril e maio de 2006 foi conduzida a criação de frangos de corte nas instalações da Embrapa, Unidade Suínos e Aves, em Concórdia-SC. Foi adquirido um total de 1140 pintos de um dia, machos da linhagem Ross, já vacinados contra a doença de Marek. As aves foram alojadas em 30 boxes (1,60 m X 1,75 m) cujas laterais eram teladas e o piso forrado com cama de maravalha. As aves foram distribuídas nos boxes (38 aves cada) de acordo com o peso inicial (bloco) e os tratamentos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distribuição das aves no Aviário Experimental

<b>Box</b>	<b>Bloco</b>	<b>Tratamento</b>
01	1	5
02	1	4
03	1	3
04	1	2
05	1	1
06	2	1
07	2	4
08	2	3
09	2	2
10	2	5
11	3	2
12	3	3
13	3	1
14	3	5
15	3	4
16	4	5
17	4	3
18	4	1
19	4	4
20	4	2
21	5	3
22	5	4
23	5	5
24	5	1
25	5	2
26	6	5
27	6	3
28	6	1
29	6	4
30	6	2

O manejo geral das aves seguiu recomendação do Manual da linhagem, sendo fornecidas 24 horas diárias de luz nos primeiros 21 dias e 16 horas no período posterior. Água e ração foram fornecidos à vontade durante todo o experimento. A disposição dos boxes dentro de cada bloco foi planejada visando minimizar as diferenças quanto à iluminação natural, temperatura e ventilação. A Figura 3 mostra o corredor principal de acesso aos boxes no Aviário Experimental, enquanto a estrutura de um box é apresentada na Figura 4.



**Figura 3.** Visão geral do Aviário Experimental.



**Figura 4.** Box número 19 no Aviário Experimental.

### 3.1.2. Composição das Dietas

Os tratamentos experimentais consistiram de cinco dietas apresentando diferentes níveis e fontes de selênio, conforme especificado na Tabela 3. As dietas experimentais foram elaboradas a partir de fórmulas básicas seguindo a recomendação de exigência nutricional de Rostagno *et al.* (2005), considerando-se três fases de desenvolvimento das aves: inicial (1 a 21 dias), crescimento (21 a 35 dias) e final (35 a 42 dias) (Tabela 4). Para propiciar a elaboração de dietas experimentais com diferentes níveis de selênio nos tratamentos T2 a T5, o ingrediente inerte caolin das fórmulas básicas foi substituído pelas fontes de selênio inorgânico (selenito de sódio) ou orgânico (Sel-Plex®), conforme consta na Tabela 5.

**Tabela 3.** Suplementação de selênio empregada nos tratamentos na criação das aves

<b>Tratamento</b>	<b>Descrição</b>
T1	sem suplementação de selênio na dieta (controle negativo)
T2	com suplementação de selênio inorgânico 0,15 mg/kg de ração
T3	com suplementação de selênio inorgânico 0,35 mg/kg de ração
T4	com suplementação de selênio orgânico 0,15 mg/kg de ração
T5	com suplementação de selênio orgânico 0,35 mg/kg de ração

**Tabela 4.** Composição percentual das dietas nas três fases de desenvolvimento das aves

Ingrediente	Fases de desenvolvimento das aves		
	Inicial	Crescimento	Final
Milho (%)	54,815	59,459	59,011
Farelo de Soja (%)	36,323	32,460	32,342
Óleo (%)	4,985	4,195	5,063
Fosfato Bicálcico (%)	2,033	1,927	1,760
Calcário (%)	0,806	1,003	0,971
DL-Metionina (%)	0,222	0,219	0,172
Sal (%)	0,364	0,365	0,366
Cloreto Colina (60%)	0,217	0,217	0,200
PX vit – 300 (%) <sup>1</sup>	0,030	0,030	0,030
Px mineral (%) <sup>2</sup>	0,100	0,050	0,050
Coban 200 (%) <sup>3</sup>	0,060	0,030	0
Surmax-100 (%) <sup>4</sup>	0,010	0,010	0
Caolin (%) <sup>5</sup>	0,035	0,035	0,035
Total	100,00	100,00	100,00
Composição calculada			
EM (kcal/kg)	3150	3150	3200
PB (%)	21,5	20,1	20,0
Ca (%)	0,85	0,85	0,80
P disp. (%)	0,46	0,43	0,40
Metionina (%)	0,55	0,53	0,48
Metionina + Cistina (%)	0,90	0,86	0,81
Lisina (%)	1,21	1,10	1,10

<sup>1</sup> Composição por kg do produto: Vit.A,33.333.000 UI; Vit.D3,10.000.000 UI; Vit.E,133.330mg; vit.K,10.000mg; Tiamina, 6.670mg; Riboflavina, 20.000mg; Piridoxina, 13.330mg; Vit.B12, 50.000mcg; Niacina, 166.670mg; Ác.Pantotênico, 40.000mg; Ác. Fólico, 3.330mg; Biotina, 500mg.

<sup>2</sup> Composição por kg do produto: Fe, 100.000mg; Cu, 20.000mg; Mn, 160.000mg; Zn, 100.000mg; Co, 2.000mg; I, 2.000mg.

<sup>3</sup> Monensina sódica - na fase Inicial foi utilizado COBAN 200 (200 g de atividade/kg de produto); na fase de crescimento utilizou-se COBAN 400 (400 g de atividade/kg produto).

<sup>4</sup> Avilamicina, equivalente a 100g de atividade por kg do produto.

<sup>5</sup> Produto inerte utilizado para possibilitar inclusão variada de fontes de selênio que substituíram o caolin.

**Tabela 5.** Percentagem de selênio inorgânico e orgânico utilizado nas dietas das aves

Ingredientes	Tratamentos				
	T1	T2	T3	T4	T5
Caolin (%) <sup>1</sup>	0,035	0,020	0,000	0,020	0,000
PX-Se (%) <sup>2</sup>	0	0,015	0,035	0	0
Sel-Plex® (%) <sup>3</sup>	0	0	0	0,015	0,035

<sup>1</sup> Ingrediente inerte.

<sup>2</sup> Premix selênio, à base de selenito de sódio, contendo 1000 mg Se/kg.

<sup>3</sup> Produto comercial (Alltech®), contendo 1000 mg Se/kg.

### 3.1.3. Abate das Aves

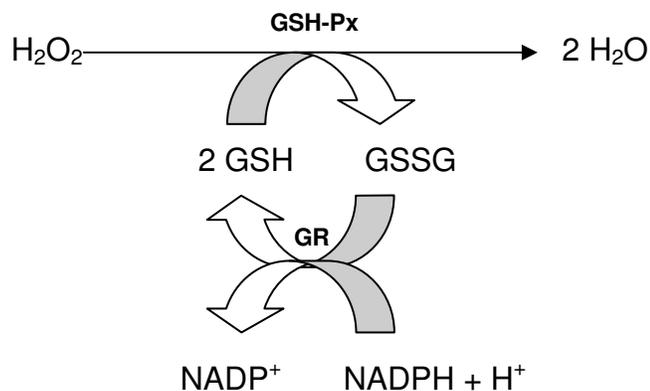
Aos 42 dias de idade foram amostradas 90 aves para serem abatidas, visando pesagem dos cortes e coleta de amostras para análises laboratoriais. Antes do abate e ainda no aviário, procedeu-se a pesagem de todas as aves, e foi calculado o peso médio por box. Em cada box foram amostradas três aves, cujo peso vivo mais se aproximava do valor médio do box de origem. As aves foram identificadas e transportadas até o Abatedouro Experimental, onde foram sacrificadas, depenadas e evisceradas. Após um período de aproximadamente 15 minutos (para o escoamento de líquidos), as carcaças evisceradas foram lavadas e separadas em partes (Figura 5), sendo as sobrecoxas embaladas em sacos plásticos devidamente identificados. O material foi conservado em caixas de isopor com gelo durante o abate e transportado nestas condições para a URI - Campus de Erechim para a realização das análises posteriores.



**Figura 5.** Lavagem das carcaças das aves e separação das partes no Abatedouro Experimental.

### 3.2 Determinação da Atividade da Enzima Glutationa Peroxidase

A atividade da enzima glutaciona peroxidase (GSH-Px) foi determinada de acordo com um procedimento modificado do método de Paglia e Valentine (1967), no qual a molécula oxidada de glutaciona (GSSG), produzida na reação primária com a GSH-Px, é reduzida por intermédio de uma segunda enzima, a glutaciona redutase, com o auxílio do cofator NADPH, como mostra a Figura 6. Esta análise foi realizada com base no decaimento da absorbância no comprimento de onda de 340 nm, devido à oxidação do NADPH provocada pela presença da enzima glutaciona peroxidase. Utilizando o coeficiente de extinção molar do NADPH ( $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), é possível calcular a atividade enzimática da GSH-Px.



**Figura 6.** Interconversão de glutaciona nas suas formas reduzida e oxidada pela ação das enzimas glutaciona peroxidase (GSH-Px) e glutaciona redutase (GR).

### **3.2.1. Amostras e Condições de Análise**

As determinações da atividade enzimática da GSH-Px foram realizadas em duas etapas distintas. Na primeira etapa, utilizou-se a carne de sobrecoxa de frango crua cerca de três horas após o abate (crua zero dia) e também cozida em água durante 40 minutos até atingir a temperatura interna de 66°C (cozida zero dia), sendo que as condições de cozimento escolhidas correspondem às utilizadas pela maioria dos consumidores. Estas mesmas amostras, crua e cozida, permaneceram congeladas durante 90 dias a uma temperatura de -18°C ( $\pm 1$ ), e foram descongeladas lentamente a uma temperatura de 4°C a fim de que se procedessem as análises, dando origem às amostras denominadas “crua 90º dia” e “cozida 90º dia”. Igualmente, o tempo e a temperatura de congelamento simulam as práticas comuns de estocagem doméstica da carne. As análises foram realizadas em duplicata em duas amostras de cada tratamento (T1, T2, T3, T4 e T5).

As determinações da segunda etapa foram realizadas em amostras cruas congeladas durante 120 dias, escolhidas aleatoriamente entre os tratamentos T2 a T5, ou seja, entre aqueles em que as aves receberam suplementação de selênio. Nesta etapa, foram testadas diferentes condições de análise, com o objetivo de otimizar as determinações. Foram variadas a concentração de peróxido de hidrogênio e a temperatura e o tempo de incubação do meio de reação; foi testada a variação de substratos, com a utilização de terc-butil hidroperóxido em lugar do peróxido de hidrogênio, e também a variação da solução tampão empregada na extração enzimática.

### **3.2.2. Obtenção do Extrato Enzimático**

O extrato enzimático foi obtido de acordo com a metodologia de Devore *et al.*, (1983), com algumas modificações. Amostras de 5 g de sobrecoxa livre de pele e gordura aparente foram homogeneizadas em 25 mL de tampão a 5°C durante 60 segundos no homogeneizador Omni-Mixer 17105 na velocidade 3, em banho de gelo. Na extração, foram usados três tipos de tampão: na primeira etapa, tampão trizma-cloridrato (Tris-HCl) 50 mM pH 7,6 (Carreras, 2004), e na segunda etapa, tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 + EDTA 1 mM + 2-mercaptoetanol 5 mM (Arai *et al.*,

1994) e tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 + EDTA 1 mM + 2-mercaptoetanol 1 mM (ZeptoMetrix Corporation, 2006). Tanto o EDTA como o 2-mercaptoetanol foram utilizados na solução tampão extrativa com o objetivo de proteger o sítio ativo da enzima.

O homogeneizado foi transferido para tubos plásticos de centrífuga com 1,5 mL de capacidade e estes foram centrifugados a 27.500 g a 4°C durante 30 minutos. O sobrenadante obtido foi filtrado através de funil de vidro e papel filtro e novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante límpido foi retirado cuidadosamente através de pipetador automático e armazenado a 4°C em tubos identificados até o momento da análise, ou seja, durante aproximadamente 60 minutos.

O pH das soluções tampão utilizadas foi mantido na faixa ideal para atividade da glutathione peroxidase, que varia de 7,0 a 7,6 (Punchard *et al.*, 1996); a temperatura também foi mantida em uma faixa que afastasse o risco de inativação térmica da enzima, com o uso de solução tampão em baixa temperatura, homogeneização realizada em banho de gelo para evitar o aquecimento produzido pela rotação das lâminas do homogeneizador e centrifugação realizada à temperatura de 4°C. As concentrações das soluções tampão utilizadas também foram mantidas na faixa que favorece a atividade da enzima GSH-Px (Chen *et al.*, 2000).

### **3.2.3. Método de Determinação da Atividade**

Para a determinação da atividade enzimática da enzima glutathione peroxidase o meio de reação era composto por 350 µL de tampão fosfato de potássio 171 mM + azida sódica 4,28 mM + EDTA 2,14 mM, 250 µL de glutathione reduzida 6 mM, 250 µL de NADPH 0,9 mM, 250 µL de glutathione redutase 2 U/mL e 150 µL de extrato enzimático. A azida sódica foi adicionada ao meio com o objetivo de inibir a atividade da enzima antioxidante catalase (Punchard *et al.*, 1996), que converte o peróxido de hidrogênio em água.

Os reativos foram pipetados em tubo de ensaio, em seqüência, à temperatura de 22°C (±1). Após rápida homogeneização, foram adicionados 250 µL de peróxido

de hidrogênio, efetuando-se a transferência do meio de reação para a cubeta de quartzo e determinando-se no espectrofotômetro a variação de absorvância a 340 nm durante 300 segundos, com leituras registradas a cada 15 segundos e zerando o aparelho com água Milli-Q. As medidas de absorvância foram realizadas no aparelho Agilent 8453 UV-Visible. Devido ao fato de possuírem baixa estabilidade, as soluções de glutathiona redutase e peróxido de hidrogênio foram preparadas minutos antes de cada análise, não sendo estocadas.

Foram testadas três concentrações de peróxido de hidrogênio, 0,72 mM, 7,2 mM e 72 mM, e em substituição a esse substrato, terc-butil hidroperóxido na concentração de 15 mM. Paralelamente, foi feita a leitura dos controles, que consistiam no mesmo meio de reação exceto o extrato enzimático, que foi substituído por água Milli-Q na mesma proporção. A medida de absorvância do controle é necessária para descontar a oxidação não enzimática que ocorre com o NADPH.

#### **3.2.4. Expressão dos Resultados**

A atividade da enzima GSH-Px é calculada com base no coeficiente de extinção molar do NADPH, que a 340 nm é igual a 6,22 mM/cm. A taxa de decaimento na absorvância ( $\Delta A/\text{min}$ ) observada para cada amostra (calculada através da subtração da taxa observada para o controle) pode ser convertida em consumo de NADPH com o uso da seguinte relação: 1 unidade de glutathiona peroxidase causa a formação de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NADP}^+$  a partir do NADPH por minuto em pH 7,0 e a 25°C (Zeptomatrix Corporation, 2006). Dependendo da amostra utilizada, a atividade da enzima glutathiona peroxidase pode ser expressa em unidades/mL ou L, unidades/g de tecido, unidades/mg de proteína ou ainda em unidades/mg de hemoglobina (Punchard *et al.*, 1996).

Neste experimento os valores de atividade foram expressos em U/g de tecido, de acordo com a Equação 8 (Zeptomatrix Corporation, 2006):

$$\text{U/g} = \Delta A/\text{min} \times F \quad (8)$$

Na Equação 8, F representa um fator teórico usado para converter a taxa de decaimento na absorvância ( $\Delta A/\text{min}$ ) às correspondentes unidades de atividade enzimática, e é calculado de acordo com a Equação 9:

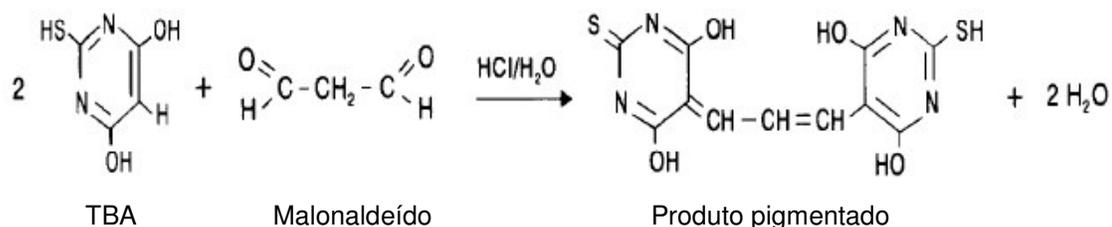
$$F = \frac{(VR/VA) \times 5}{6,22} \quad (9)$$

onde  $VR$  corresponde ao volume de reação (em mL) e  $VA$  ao volume de amostra (em mL); o número 5 corresponde à diluição empregada na extração (isto é, 5 mL de extrato enzimático é o volume que contém 1 g de tecido) e 6,22 corresponde ao coeficiente de extinção molar do NADPH (em mM/cm).

### 3.3 Determinação do grau de oxidação lipídica

As análises de TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) foram determinadas em duplicata em três amostras de cada tratamento. Foi utilizada a carne de sobrecoxa de frango crua cerca de três horas após o abate (crua zero dia) e cozida em água durante 40 minutos até atingir a temperatura interna de 66°C (cozida zero dia); estas mesmas amostras cozidas permaneceram congeladas por 90 dias a uma temperatura de -18°C ( $\pm 1$ ) (cozida 90º dia), e foram descongeladas lentamente a uma temperatura de 4°C a fim de que se procedessem as análises, segundo o método de extração ácido-aquosa, descrita por Raharjo *et al.* (1992) e modificada por Facco (2002).

Os produtos primários da oxidação lipídica constituem-se principalmente de hidroperóxidos, que são rapidamente decompostos em várias substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), sendo o malonaldeído (MDA) o elemento mais importante. O produto da reação destes compostos secundários com o TBA é colorido e absorve fortemente a 531 nm (Figura 7) (Facco, 2002; Racanicci, 2004).



**Figura 7.** Reação entre TBA e MDA com a formação do produto pigmentado que absorve a 531 nm. Fonte: Fernández *et al.* (1997).

Para execução da análise, as amostras de sobrecoxa de frango, livres de pele e gordura aparente, foram picadas manualmente e a 5 g delas foram adicionados 0,5 mL de BHT 0,15% e 20 mL de ácido tricloroacético (TCA) 5%, sendo aguardado um tempo de contato de 15 a 20 minutos para que ocorresse a extração do MDA. O BHT foi utilizado para prevenir a oxidação durante o preparo. Foi processada a homogeneização no homogeneizador Omni-Mixer 17105, na velocidade 3 durante 60 segundos. Em seguida o homogeneizado foi filtrado através de funil de vidro e papel filtro para balões volumétricos de 25 mL, e seu volume foi completado com TCA 5%. Desta solução foram retirados 2 mL que reagiram com 2 mL ácido tiobarbitúrico 0,08 M, sendo os tubos vedados, colocados em banho-maria fervente e deixados por 5 minutos após a temperatura da água ter atingido 95°C. O líquido resfriado foi centrifugado a 3.000 rpm durante cinco minutos e foi efetuada a leitura a 531 nm contra um branco contendo todos os reagentes exceto a amostra, que foi substituída por água na mesma proporção. O espectrofotômetro utilizado foi da marca Lambda, modelo EZ 150.

### 3.4 Análise Estatística

As determinações foram realizadas com três repetições e os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através de cálculos de média, desvio padrão, análise de variância e teste de Tukey, em um nível de confiança de 95%, utilizando o Software Statistica 5.0 (StatSoft Inc®).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo serão discutidos os resultados referentes às medidas de atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px) e TBARS na carne de sobrecoxa de frango. Os experimentos foram conduzidos em duas etapas; na primeira foi verificada a influência da suplementação de selênio e das condições de processamento e armazenamento sobre a atividade enzimática e os níveis de oxidação lipídica nas amostras. Na segunda etapa, foram testadas novas condições de análise com o objetivo de otimizar as determinações de GSH-Px.

### **4.1 Primeira Etapa**

Os objetivos desta primeira etapa foram verificar a influência de diferentes fontes e níveis de selênio adicionados à alimentação dos frangos sobre a atividade da enzima glutathiona peroxidase na carne e também avaliar a estabilidade desta enzima e a estabilidade oxidativa nas amostras frente ao cozimento e ao armazenamento a baixas temperaturas.

As determinações da GSH-Px foram realizadas na carne de sobrecoxa de frango crua após três horas do abate (crua zero dia) e congelada a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante 90 dias (crua 90° dia); avaliou-se também o comportamento da enzima na carne cozida em água durante 40 minutos até atingir a temperatura interna de  $66^{\circ}\text{C}$  (cozida zero dia) e depois de congelada a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante 90 dias (cozida 90° dia). As determinações de TBARS foram realizadas na carne de sobrecoxa de frango crua após três horas do abate (crua zero dia), na carne cozida em água durante 40 minutos até atingir a temperatura interna de  $66^{\circ}\text{C}$  (cozida zero dia) e depois de congelada a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante 90 dias (cozida 90° dia).

#### **4.1.1. Influência das Fontes e Níveis de Selênio sobre a Atividade da Enzima Glutathiona Peroxidase**

Na Tabela 6 são mostrados os valores de atividade da enzima GSH-Px em análise estatística individual, onde se pode verificar o efeito das fontes e níveis de selênio empregados na dieta das aves sobre a atividade enzimática da carne de

sobrecoxa crua três horas após o abate e armazenada durante 90 dias a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Estes mesmos resultados também podem ser visualizados na Figura 10.

**Tabela 6.** Atividades da GSH-Px (U/g) verificadas na carne crua três horas após o abate e na carne armazenada durante 90 dias a  $-18^{\circ}\text{C}$  nos cinco tratamentos empregados na criação das aves

Tratamento	Amostra crua dia zero	Amostra crua 90 <sup>o</sup> dia
T1 (s/ Se)	0,051 <sup>A</sup> ( $\pm 0,031$ )	0,007 <sup>C</sup> ( $\pm 0,002$ )
T2 (Se inorgânico 0,15 mg/kg)	0,083 <sup>A</sup> ( $\pm 0,014$ )	0,023 <sup>B</sup> ( $\pm 0,001$ )
T3 (Se inorgânico 0,35 mg/kg)	0,045 <sup>A</sup> ( $\pm 0,003$ )	0,003 <sup>C</sup> ( $\pm 0,002$ )
T4 (Se orgânico 0,15 mg/kg)	0,077 <sup>A</sup> ( $\pm 0,015$ )	0,020 <sup>B</sup> ( $\pm 0,002$ )
T5 (Se orgânico 0,35 mg/kg)	0,085 <sup>A</sup> ( $\pm 0,019$ )	0,036 <sup>A</sup> ( $\pm 0,010$ )

**NOTA:** <sup>A, B, C</sup> letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Analisando-se os valores iniciais de atividade da GSH-Px na carne fresca (amostra crua dia zero), verificou-se que os resultados encontrados para as amostras nos cinco tratamentos não foram significativamente diferentes entre si ( $p > 0,05$ ), inclusive para aquele grupo que não recebeu selênio na dieta (T1). Assim, neste trabalho, nenhum efeito produzido pela fonte ou nível de selênio usado na alimentação das aves foi verificado sobre a atividade da GSH-Px.

Holovská Jr. *et al.* (2003), ao determinarem a atividade desta enzima em fígado de frangos alimentados com diferentes formas e quantidades de selênio, encontraram resultados semelhantes aos deste experimento. Ao utilizar quatro tipos de dieta (basal, selênio inorgânico 0,2 mg/kg, selênio orgânico 0,2 mg/kg e selênio orgânico 0,2 mg/kg), os valores de atividade da GSH-Px medidos por estes autores não diferiram estatisticamente entre si. Moreira *et al.* (2001), em seu experimento com fígado de frango liofilizado, verificaram que a atividade enzimática da GSH-Px não foi influenciada pelas fontes de selênio utilizadas na alimentação das aves. Também em acordo, estão os resultados encontrados por Daun e Akesson (2004a), que verificaram que a variação na atividade da GSH-Px

em carne de coxa de frangos submetidos a vários tratamentos não foi devida aos diferentes conteúdos de selênio da dieta das aves.

Os resultados encontrados neste experimento, porém, contrariam os estudos realizados por diversos outros autores (Finley, 1999; Combs Jr., 2001; Whanger, 2003; Borawska *et al.*, 2004), que demonstraram que o selênio na forma inorgânica se mostra mais disponível metabolicamente para a biossíntese da GSH-Px do que na forma orgânica, pois esta última forma garantiria maior aporte do mineral no músculo, sob a forma de selênio tecidual e não sob a forma de selenoproteínas biologicamente ativas.

Uma provável explicação para o fato das diferentes concentrações de selênio não terem influenciado a atividade enzimática baseia-se na teoria de que o selênio ingerido a partir da alimentação é usado pelo organismo para a síntese de diferentes selenoproteínas (Daun e Akesson, 2004), não somente glutathione peroxidase, e esta distribuição é regulada pela necessidade metabólica do animal. Podemos citar, por exemplo, que em frangos submetidos a estresse por frio ou calor, há um aumento na síntese da selenoproteína iodotironina deiodinase tipo I, que possui, dentre outras funções, a de regular a temperatura corpórea (Arthur, 1993). Levando em consideração que já foi relatada a existência de pelo menos outras trinta selenoproteínas com papéis biológicos diversos no organismo, torna-se bem possível que o selênio ingerido na dieta seja utilizado de outras formas que não sejam na biossíntese da GSH-Px.

O conteúdo de selênio na dieta basal (representada neste estudo pelo tratamento T1) representa papel importante quando se tem o objetivo de examinar o efeito da suplementação com este mineral. Os cereais presentes na composição da dieta oferecida às aves variam bastante seu conteúdo de selênio, em função das características geoquímicas e físico-químicas dos solos onde são cultivados (Bügel *et al.*, 2004). Neste experimento, uma segunda provável explicação pela qual a atividade da glutathione peroxidase não tenha respondido à suplementação de selênio é que a dieta basal já esteja fornecendo às aves níveis relativamente altos deste mineral. Assim, a quantidade de selênio não representou um fator limitante para a síntese desta enzima (Podoll *et al.*, 1992) e, sendo a fonte nativa

deste mineral suficiente para a demanda bioquímica, quantidades superiores não mais influenciariam sua atividade.

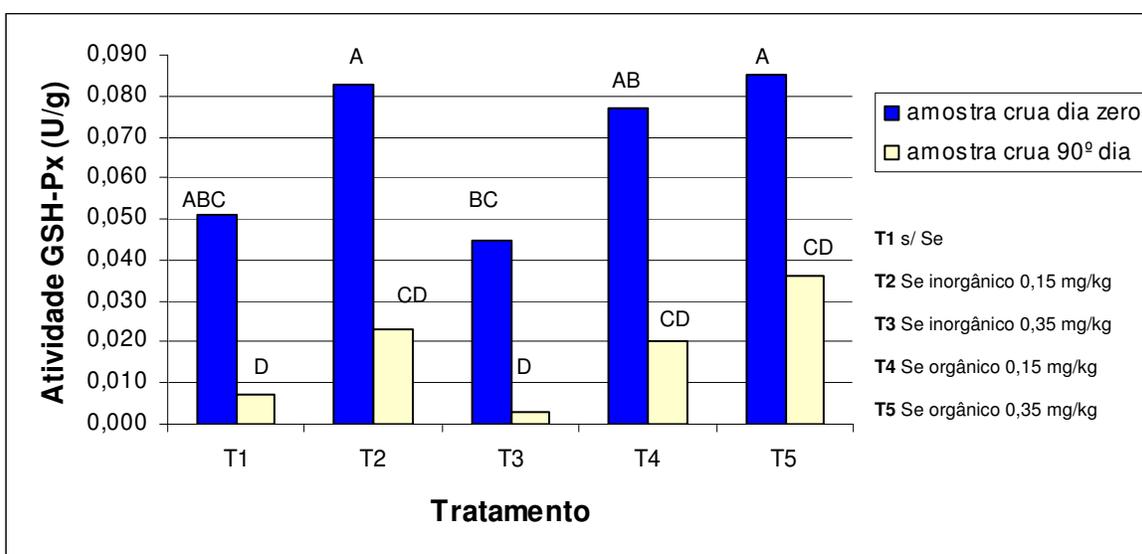
Ao analisar estatisticamente e individualmente o grupo de resultados obtidos para as amostras congeladas (Tabela 6, amostra crua 90<sup>o</sup> dia), constata-se que sobre estas amostras houve influência do tipo de suplementação utilizada na dieta. O tratamento T5 foi o que apresentou maior atividade enzimática (0,036 U/g), seguido dos tratamentos T2 (0,023 U/g) e T4 (0,020 U/g), que não diferiram estatisticamente entre si; com os menores valores, aparecem os tratamentos T1 (0,007 U/g) e T3 (0,003 U/g), que também não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ). Estes resultados apontam para a possibilidade de que, embora não haja diferença significativa entre os valores dos tratamentos na carne crua, na carne congelada a fonte e a concentração de selênio influenciaram na manutenção da atividade. Nos dois grupos de amostras, crua dia zero e crua 90<sup>o</sup> dia, os valores decrescem na mesma ordem em função do tratamento.

Nas análises com a carne congelada, apesar de ter havido diferenças significativas entre os tratamentos, estas diferenças não podem ser associadas nem à fonte, nem ao nível de selênio suplementado, pois os maiores valores de atividade da GSH-Px foram os obtidos com o selênio orgânico a 0,35 mg/kg, seguido das formas inorgânica e orgânica a 0,15 mg/kg (iguais entre si) e por último, o tratamento não-suplementado e aquele com selênio inorgânico a 0,35 mg/kg, que também apresentaram valores estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ).

Apesar da atividade da enzima glutathione peroxidase ter sido demonstrada em animais após o abate, a dimensão de sua participação na defesa contra a oxidação lipídica e, conseqüentemente, na manutenção da qualidade da carne, depende da resistência desta enzima à desnaturação durante os processos de congelamento e cozimento (Hoac *et al.*, 2006). A influência destas condições será discutida nos itens 4.1.2 e 4.1.3 deste estudo.

#### 4.1.2. Estabilidade da Enzima Glutaciona Peroxidase frente ao Armazenamento a Baixa Temperatura

A Figura 8 mostra os valores de atividade da GSH-Px para a carne crua recém abatida e crua congelada. Os resultados apresentados nesta figura foram analisados sob estatística global, para que se pudesse compreender o efeito geral produzido pela condição de congelamento sobre a atividade enzimática, não sendo levado em consideração apenas o efeito isolado exercido pelo tipo de tratamento, como já foi discutido anteriormente no item 4.1.1.



**Figura 8.** Atividades da GSH-Px (U/g) verificadas na carne crua três horas após o abate e na carne armazenada durante 90 dias a  $-18^{\circ}\text{C}$  nos cinco tratamentos empregados na criação das aves (letras diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )).

Em relação à carne crua no dia zero, a análise estatística global mostra que as maiores atividades enzimáticas, encontradas nas amostras dos tratamentos T2 e T5, diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) somente daquela encontrada no tratamento T3, que corresponde ao menor valor medido entre as amostras cruas (Figura 8). Porém, entre as amostras cruas congeladas durante 90 dias, o comportamento foi diferente, uma vez que o maior valor de atividade da GSH-Px, encontrado novamente no tratamento T5, não diferiu de nenhum dos outros quatro tratamentos na mesma condição, mesmo estes tendo apresentado menores

valores numéricos. Assim, pode-se verificar que devido ao armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$  durante 90 dias, as amostras cruas de todos os tratamentos apresentaram diminuição na atividade da enzima GSH-Px, com percentuais de 86% no T1, 72% no T2, 93% no T3, 74% no T4 e 57% no T5, o que demonstra que a enzima GSH-Px é sensível à temperatura de congelamento.

Lee *et al.* (1997), ao determinarem a atividade da GSH-Px em carne suína armazenada a  $-15^{\circ}\text{C}$  durante 10 semanas oriunda de porcos submetidos à dieta sem suplementação especial de selênio, verificaram uma redução de 32% entre os valores de atividade encontrados no dia zero e aqueles da décima semana. Surai e Dvorska (2002), durante a determinação da atividade da GSH-Px em carne de peito de frango submetida ao congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 meses, observaram que nas amostras obtidas das aves que receberam apenas a dieta basal ocorreu diminuição na atividade enzimática, enquanto que naquelas que receberam selênio na forma orgânica, a atividade se manteve constante. Diferentemente, neste experimento, todas as amostras de carne de sobrecoxa de aves apresentaram redução na atividade enzimática, independente da fonte ou do nível de selênio utilizado (Figura 8 e Tabela 6).

Em função dos resultados observados, pode-se concluir que a enzima glutationa peroxidase faz parte de um grupo de enzimas que sofre desnaturação durante o processo de congelamento e descongelamento. De acordo com Fennema (1993), esta diminuição na atividade enzimática, decorrente da desnaturação, pode ser devida a mudanças conformacionais que ocorrem no centro ativo da enzima em decorrência da passagem da água do estado líquido para o sólido. A atividade de algumas enzimas pode ser afetada também pela velocidade de congelamento, que influencia diretamente o tamanho dos cristais de gelo formados. O congelamento e descongelamento lentos, por regra geral, determinam maiores perdas da atividade enzimática do que os processos que ocorrem rapidamente, devido principalmente à formação de grandes cristais que degradam fisicamente a estrutura do tecido muscular. Estes seriam os fatores que influenciaram na perda da atividade enzimática da GSH-Px nos cinco tratamentos

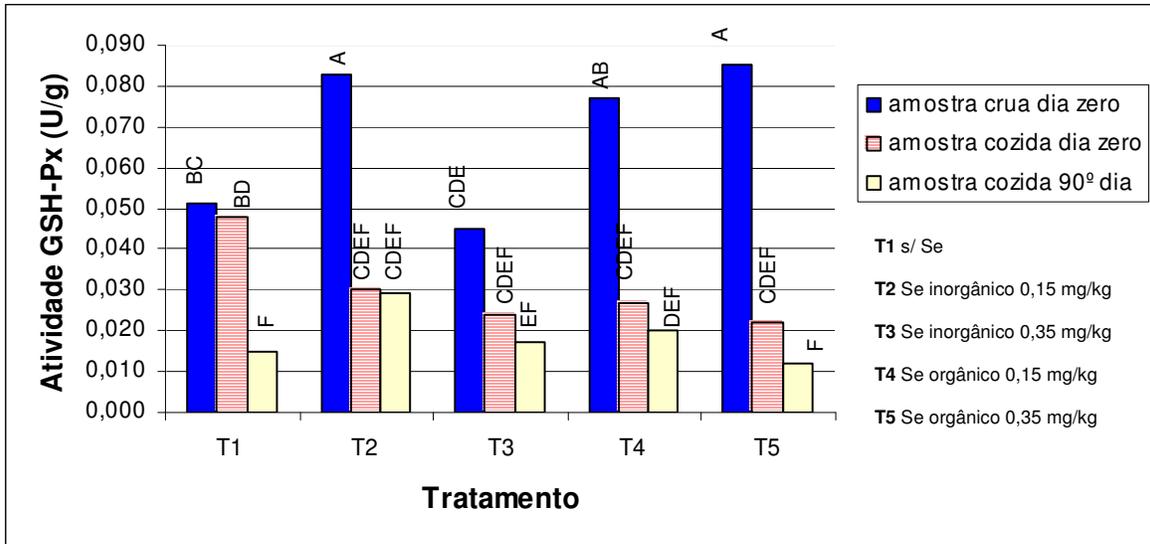
deste experimento, levando em consideração que os sistemas de congelamento e descongelamento empregados na conservação destas amostras foi lento.

#### 4.1.3. Estabilidade da Enzima Glutationa Peroxidase frente ao Cozimento

A Tabela 7 e a Figura 9 mostram as atividades da enzima GSH-Px obtidas em cada um dos cinco tratamentos na carne recém cozida à temperatura interna de 66°C e na carne cozida armazenada a -18°C durante 90 dias, tendo como referência os valores de atividade enzimática obtidos na carne crua três horas após o abate.

**Tabela 7.** Atividades da GSH-Px (U/g) verificadas na carne crua três horas após o abate, logo após o cozimento a 66°C e na carne cozida armazenada durante 90 dias a -18°C nos cinco tratamentos empregados na criação das aves

<b>Tratamento</b>	<b>Amostra crua dia zero</b>	<b>Amostra cozida dia zero</b>	<b>Amostra cozida 90º dia</b>
T1 (s/ Se)	0,051 (± 0,031)	0,048 (± 0,002)	0,015 (± 0,004)
T2 (Se inorgânico 0,15 mg/kg)	0,083 (± 0,014)	0,030 (± 0,004)	0,029 (± 0,009)
T3 (Se inorgânico 0,35 mg/kg)	0,045 (± 0,003)	0,024 (± 0,004)	0,017 (± 0,003)
T4 (Se orgânico 0,15 mg/kg)	0,077 (± 0,015)	0,027 (± 0,001)	0,020 (± 0,003)
T5 (Se orgânico 0,35 mg/kg)	0,085 (± 0,019)	0,022 (± 0,001)	0,012 (± 0,002)



**Figura 9.** Atividades da GSH-Px (U/g) verificadas na carne crua três horas após o abate, logo após o cozimento a 66°C e na carne cozida armazenada durante 90 dias a -18°C nos cinco tratamentos empregados na criação das aves (letras diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )).

Os resultados apresentados na Figura 9 nas três condições (amostra crua dia zero, cozida dia zero e cozida 90º dia) foram analisados sob estatística global, para que se pudesse compreender o efeito geral produzido pelas condições de cozimento e congelamento sobre a atividade enzimática.

Comparando as atividades medidas após o cozimento com aquelas encontradas na carne crua, pode-se dizer que os tratamentos T1 e T3 não apresentaram diferença estatística nos valores encontrados nas duas condições. Os demais tratamentos (T2, T4 e T5) apresentaram redução significativa ( $p < 0,05$ ) no valor da atividade enzimática em função do cozimento (Figura 9).

Analisando o efeito do congelamento sobre a carne previamente cozida, nota-se um comportamento interessante entre as amostras, onde somente o tratamento T1 teve sua atividade significativamente reduzida, enquanto que os demais mantiveram os valores estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) mesmo após o congelamento (Figura 9).

Em função do cozimento, as perdas percentuais de atividade ocorreram na seguinte ordem: 74% no tratamento T5, 65% no tratamento T4, 64% no tratamento T2, 47% no tratamento T3 e 6% no tratamento T1.

Mei *et al.* (1994) estudaram a atividade enzimática da enzima GSH-Px em carne suína crua e cozida de animais que não receberam suplementação especial de selênio. Assim, mediram na carne crua atividade enzimática de 0,228 U/g, na carne cozida a 60°C (temperatura interna) atividade de 0,192 U/g, a 70°C de 0,094 U/g, a 80°C de 0,007 U/g. Já a 90°, nenhuma atividade foi detectada nas amostras analisadas. Observaram, respectivamente, uma redução de atividade de 15%, 60%, 97% e 100%. Na carne de peito de frango, Hoac *et al.* (2006) constataram que o aquecimento a 60°C diminuiu em mais de 60% a atividade inicial da enzima glutathiona peroxidase. Neste experimento, a enzima GSH-Px na carne de frango apresentou comportamento semelhante, uma vez que as perdas de atividade ficaram na faixa de 64 a 74% para três dos cinco tratamentos testados. A diminuição na atividade enzimática só não foi significativa nos tratamentos T1 e T3.

De acordo com a literatura, sabe-se que a fonte e o nível de selênio na dieta animal possui correlação com a atividade enzimática de GSH-Px inicial verificada na carne crua, porém não existem trabalhos que correlacionem diretamente a suplementação deste mineral com a estabilidade da enzima frente às altas temperaturas; pois não se tem conhecimento se a forma de selênio suplementada influencia ou não a estabilidade térmica da enzima sintetizada. Mesmo assim, pode-se concluir que nas amostras dos tratamentos T1 e T3, a enzima GSH-Px mostrou-se mais estável, pois os resultados obtidos para as amostras crua e cozida são estatisticamente iguais entre si ( $p > 0,05$ ), conforme mostrado na Figura 9.

As amostras de carne de ave pertencente aos cinco tratamentos, cozidas e submetidas ao armazenamento a -18°C durante 90 dias, mostraram uma pequena diminuição em sua atividade, porém esta diminuição só foi significativa no tratamento T1, que apresentou uma perda percentual de 69% em relação ao valor encontrado na carne recém cozida. Este comportamento apresentado pelo grupo que não recebeu selênio talvez possa ser explicado pelo maior índice de desidratação ocorrido nestas amostras durante o congelamento, fazendo com que o tecido muscular não conseguisse reter a enzima.

Da mesma forma como foi observado por Hoac *et al.* (2006), neste experimento a atividade da enzima glutathiona peroxidase foi afetada em maior grau pelo aquecimento do que pelo congelamento.

#### 4.1.4. Nível de Oxidação Lipídica em função do Cozimento e Armazenamento a Baixa Temperatura

Estudos feitos em carne de diferentes espécies indicam que as enzimas antioxidantes endógenas, principalmente catalase e glutathiona peroxidase, podem retardar potencialmente o processo de rancidez oxidativa, sendo que altas atividades destas enzimas estão associadas a aumentos significativos na resistência contra a oxidação lipídica na carne armazenada (Hernández *et al.*, 2002).

O nível de oxidação lipídica medido através da reação com o ácido tiobarbitúrico constitui um bom parâmetro para a avaliação da qualidade da carne durante os processamentos aqui descritos (cozimento e congelamento). Na Tabela 8 são mostrados os valores de TBARS encontrados na carne crua três horas após o abate, recém cozida e cozida e armazenada sob congelamento. Nesta tabela é apresentada a análise estatística individual, para que se possa verificar as diferenças entre os tratamentos na mesma condição. Estes mesmos resultados podem ser visualizados na Figura 10.

**Tabela 8.** Valores de TBARS (mg de malonaldeído/ kg de tecido) encontrados na carne crua três horas após o abate, recém cozida a 66°C e armazenada durante 90 dias a -18°C nos cinco tratamentos empregados na criação das aves

Tratamento	Amostra crua dia zero	Amostra cozida dia zero	Amostra cozida 90º dia
T1 (s/ Se)	0,850 <sup>B</sup> (± 0,056)	2,241 <sup>A</sup> (± 0,561)	5,840 <sup>A</sup> (± 0,592)
T2 (Se inorgânico 0,15 mg/kg)	0,464 <sup>C</sup> (± 0,033)	1,426 <sup>B</sup> (± 0,282)	5,888 <sup>A</sup> (± 0,348)
T3 (Se inorgânico 0,35 mg/kg)	0,824 <sup>B</sup> (± 0,049)	1,700 <sup>B</sup> (± 0,182)	5,608 <sup>A</sup> (± 0,949)
T4 (Se orgânico 0,15 mg/kg)	0,776 <sup>B</sup> (± 0,038)	2,223 <sup>A</sup> (± 0,067)	5,347 <sup>A</sup> (± 0,065)
T5 (Se orgânico 0,35 mg/kg)	1,035 <sup>A</sup> (± 0,035)	2,256 <sup>A</sup> (± 0,179)	5,671 <sup>A</sup> (± 0,173)

**NOTA:** <sup>A, B, C</sup> letras diferentes em uma mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na carne crua, os valores encontrados mostram que as amostras do tratamento T5 foram as que apresentaram maior nível de oxidação lipídica, seguidas daquelas dos tratamentos T1, T3 e T4, que não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ) e por último do tratamento T2, que apresentou o menor valor de TBARS. Estes resultados sugerem que, apesar das fontes e níveis de selênio suplementado nos cinco tratamentos não ter influenciado a atividade da enzima GSH-Px na carne de frango crua (conforme Tabela 6), o nível de oxidação lipídica foi diferente nas amostras. O maior valor de TBARS foi encontrado no grupo suplementado com selênio orgânico a 0,35 mg/kg e o menor valor, no grupo que recebeu selênio inorgânico a 0,15 mg/kg. Como o tratamento T1 (sem suplementação de selênio) não diferiu estatisticamente das fontes inorgânica a 0,35 mg/kg e orgânica a 0,15 mg/kg, pode-se concluir que neste experimento que a inclusão deste mineral não ocasionou aumento da estabilidade oxidativa na carne crua.

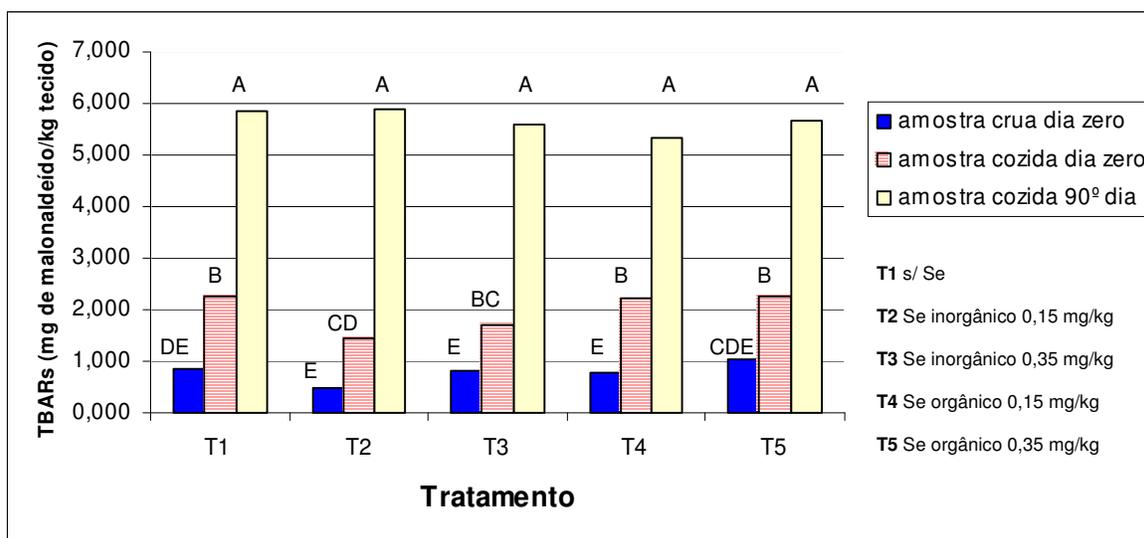
Os resultados encontrados para a carne crua neste experimento, que variaram de 0,464 a 1,035 mg malonaldeído (MDA)/ kg, estão em uma faixa bem acima dos encontrados por Pino (2005), que verificou valores entre 0,210 e 0,230 mg de malonaldeído/ kg de tecido para sobrecoxas de frangos alimentados com diferentes fontes lipídicas, porém se assemelham aos valores relatados por Maraschiello *et al.* (1998), que encontraram na carne de coxa de frango a média de 1,070 mg MDA/kg para o grupo que não recebeu suplementação de antioxidantes, ao passo que nas amostras de carne das aves que receberam  $\alpha$ -tocoferol na dieta, esses valores caíram para 0,300 mg MDA/kg, em média. Diferentemente do que estes autores relataram, a inclusão de selênio na alimentação das aves neste experimento não ocasionou menor nível de oxidação lipídica das amostras quando em comparação à dieta basal oferecida.

A análise estatística individual das amostras recém cozidas (Tabela 8, amostra cozida dia zero) revela que os maiores níveis de oxidação ocorreram nos tratamentos T1, T4 e T5 (cujos valores não diferiram entre si), seguido dos tratamentos T2 e T3, que estatisticamente também são iguais entre si ( $p > 0,05$ ). Apesar das fontes e níveis de selênio não terem influenciado a atividade da

enzima GSH-Px na carne crua (Tabela 6, amostra crua dia zero), os menores valores de TBARS na carne cozida foram os encontrados para os tratamentos que receberam selênio na forma inorgânica, T2 a 0,15 mg/kg e T3 a 0,35 mg/kg. Como já foi discutido anteriormente, esta é a forma química mais biodisponível para a enzima (Borawska *et al.*, 2004).

Pode-se observar que com o congelamento das amostras cozidas (Tabela 8, amostra cozida 90º dia), os valores de TBARS não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) entre todos os tratamentos.

A peroxidação lipídica é uma das principais causas da diminuição da qualidade em produtos cárneos crus e cozidos durante o armazenamento sob refrigeração ou congelamento (Gomes *et al.*, 2003). As alterações oxidativas na carne de sobrecoxa, decorrentes do cozimento e congelamento, podem ser observadas na Figura 10, onde os resultados verificados nas três condições (amostra crua dia zero, cozida dia zero e cozida 90º dia) estão apresentados sob análise estatística global, para que se possa compreender o efeito geral produzido pelas condições de cozimento e congelamento sobre os valores de TBARS nas amostras.



**Figura 10.** Valores de TBARS (mg de malonaldeído/ kg de tecido) encontrados na carne crua três horas após o abate, recém cozida a 66°C e armazenada durante 90 dias a -18°C nos cinco tratamentos empregados na criação das aves (letras diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )).

Comparado aos valores iniciais obtidos na carne crua, pode-se perceber que o cozimento provocou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos valores de TBARS nas amostras dos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5. O congelamento destas mesmas amostras cozidas ocasionou uma elevação significativa e ainda maior nos níveis de oxidação lipídica, também verificada em todos os tratamentos (Figura 10).

De acordo com Lee *et al.* (1996), estes resultados sugerem que o nível de oxidação das amostras aumentou devido à diminuição da eficácia do sistema de defesa antioxidante endógeno, que pode ser constatado neste experimento através da diminuição dos valores de atividade da enzima GSH-Px (Figura 9 e Tabela 7); altos níveis de atividade enzimática geralmente estão associados a baixos valores de TBARS (Sárraga *et al.*, 2002).

Maraschiello *et al.* (1999) observou, com o cozimento de amostras de sobrecoxa de frango, um aumento de até dez vezes nos valores de TBARS. O aumento da oxidação lipídica associado ao cozimento da carne deve-se a uma série de fatores, tais como a inativação das enzimas antioxidantes, a liberação de ferro cataliticamente ativo e a ruptura das membranas celulares com exposição dos AGPI aos pró-oxidantes.

O aumento do nível oxidativo da carne de frango, observado neste experimento durante o armazenamento sob congelamento, pode ser explicado devido a uma possível desidratação provocada pela baixa temperatura, que provavelmente resultou em uma diminuição nos valores de atividade de água ( $A_a$ ). Conforme Fennema (1993), sabe-se que na faixa de  $A_a$  entre 0,4 e 0,8, as reações de oxidação lipídica são favorecidas.

De acordo com Bou *et al.* (2001), existe uma relação entre os valores médios de TBARS e as avaliações sensoriais da carne. Produtos cárneos com índice de TBARS menores que 1,0 mg/kg geralmente não apresentam sabores e odores residuais de ranço característicos de oxidação lipídica (Racanucci, 2004). Os resultados de TBARS deste estudo indicam que os níveis de atividade enzimática de GSH-Px encontrados nas amostras não foram suficientes para proteger o

tecido muscular da peroxidação lipídica, gerando alterações sensoriais indesejáveis na carne cozida e armazenada sob congelamento.

Finalizada a primeira etapa de experimentos, pode-se verificar que as atividades enzimáticas mais altas foram as determinadas na carne de sobrecoxa de frango crua três horas após o abate, pois nestas amostras a enzima não sofreu nenhum grau de inativação em decorrência do cozimento e/ou congelamento. Porém, apesar de terem sido observados todos os cuidados requeridos no processo de análise, estes valores iniciais encontram-se bem abaixo dos resultados expressos em U/g de tecido mencionados na literatura. Para a carne suína *in natura*, que de acordo com a literatura possui valores de atividade de GSH-Px próximas às de frango, foram encontrados os valores de 0,228 U/g (Mei *et al.*, 1994), 0,250 U/g (Lee *et al.*, 1997) e 0,170 U/g (Hernández *et al.*, 2002). Comparada a estes resultados, a média das atividades encontradas neste experimento é cerca de três vezes menor. Para a carne de peito de frango *in natura*, Daun *et al.* (2004) e Hoac *et al.* (2006) mediram a atividade de 0,7 U/g, ou seja, um valor cerca de dez vezes maior do que a média encontrada neste experimento.

Segundo Punchard *et al.* (1996), a faixa de decaimento nos valores de absorvância considerada ideal para a enzima glutathiona peroxidase situa-se entre 0,01 e 0,05 unidades/minuto e, nesta primeira etapa, as taxas medidas foram em sua grande maioria inferiores a estes números. Como decorrência, percebeu-se a importância ímpar de um estudo mais detalhado desta enzima, decidindo-se continuar os experimentos com o intuito de aprimorar o método de análise e também obter maiores informações a respeito das características cinéticas da enzima glutathiona peroxidase. O mesmo ocorreu com Stagsted (2006), que ao tentar reproduzir o método de análise da GSH-Px já existente para leite bovino e não obtendo resultados condizentes com publicações anteriores, decidiu aprofundar o estudo, variando as condições de análise.

## 4.2 Segunda Etapa

Esta etapa foi realizada com o objetivo de otimizar as determinações da atividade da GSH-Px através da variação das condições de reação, não sendo levados em consideração os tratamentos distintos. Foram utilizadas para os experimentos amostras aleatórias de carne de sobrecoxa de frango crua congeladas durante 120 dias, escolhidas entre os tratamentos que receberam selênio na dieta (T2 a T5).

### 4.2.1. Efeito da Concentração de Peróxido de Hidrogênio sobre a Atividade da Enzima Glutathiona Peroxidase

A enzima glutathiona peroxidase reduz numerosas espécies reativas de oxigênio (ERO's), entre elas o peróxido de hidrogênio. Esta reação de redução tem como primeiro passo a oxidação direta do ânion selenolato (E-Se<sup>-</sup>) ou selenol (E-SeH), que são as duas formas cataliticamente ativas do resíduo de selenocisteína presente na GSH-Px (Prabhakar *et al.*, 2005), como mostra a Equação 10.



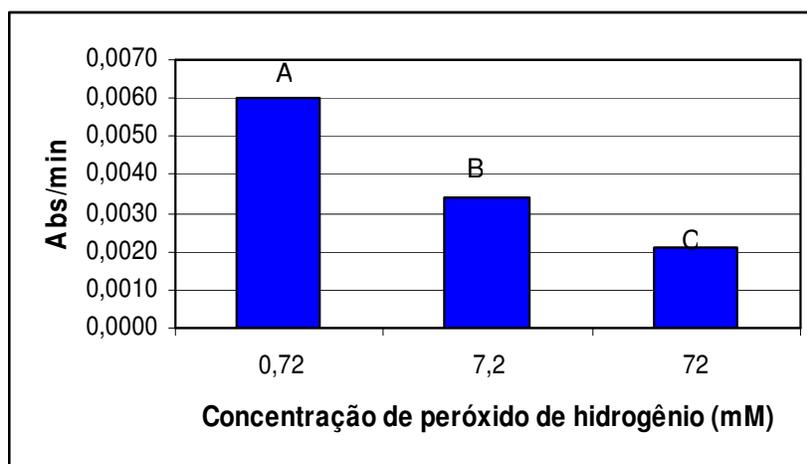
Após a oxidação do centro ativo da glutathiona peroxidase às custas do peróxido de hidrogênio, esta enzima reage com uma primeira molécula de glutathiona reduzida (GSH), dando origem a um complexo enzima-glutathiona (Equação 11). Na terceira e última reação deste ciclo, este complexo irá reagir com a segunda molécula de GSH, regenerando a enzima glutathiona peroxidase na sua forma reduzida e liberando uma molécula de glutathiona oxidada (Equação 12), a qual será novamente reduzida às custas da enzima glutathiona reductase e com a participação do NADPH (Prabhakar *et al.*, 2005).





Assim, por participar da primeira reação fundamental deste ciclo catalítico, pode-se dizer que o peróxido de hidrogênio é um fator limitante da velocidade global da reação, e sua falta ou excesso no meio pode comprometer a cinética enzimática.

Para avaliar o efeito da concentração de peróxido de hidrogênio na taxa de reação da glutathiona peroxidase, foram preparadas três soluções de diferentes concentrações, 0,72 mM, 7,2 mM e 72 mM. O restante das condições de reação foram mantidas iguais. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 11.



**Figura 11.** Variação da taxa de reação ( $\text{Abs. min}^{-1}$ ) da enzima glutathiona peroxidase observada com as diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.

Como pode ser observado na Figura 11, as taxas de reação encontradas com o uso de concentrações de peróxido de hidrogênio de 0,72 mM, 7,2 mM e 72 mM foram significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ), com valores respectivos de 0,0060, 0,0034 e 0,0021.

De acordo com Lehninger *et al.* (1995), todas as enzimas apresentam o efeito da saturação, porém variam em relação à concentração de substrato requerida para produzi-lo. Neste experimento observou-se que com a mudança da concentração do peróxido de hidrogênio para níveis superiores aos utilizados na primeira etapa do experimento (0,72 mM), a taxa de reação diminuiu, indicando que

as concentrações de 7,2 mM e 72 mM não somente promoveram a saturação da enzima glutatona peroxidase, como também a inibiram. Splittgerber e Tappel (1979), ao variar as concentrações de três tipos de hidroperóxidos e mantendo constantes as concentrações de GSH e GSH-Px parcialmente purificada extraída de fígado de rato, verificaram que conforme a concentração dos hidroperóxidos era aumentada, mais a taxa de reação diminuía. Lin e Hultin (1978) também relataram que a enzima glutatona peroxidase é facilmente saturada com peróxido de hidrogênio. A conclusão a que se pode chegar é que em concentrações elevadas, este substrato, além de reduzir a taxa de reação, tornam o processo de ativação inicial (Equação 10) mais lento.

#### **4.2.2. Efeito da Temperatura e do Tempo de Incubação do Meio de Reação sobre a Atividade da Enzima Glutaciona Peroxidase**

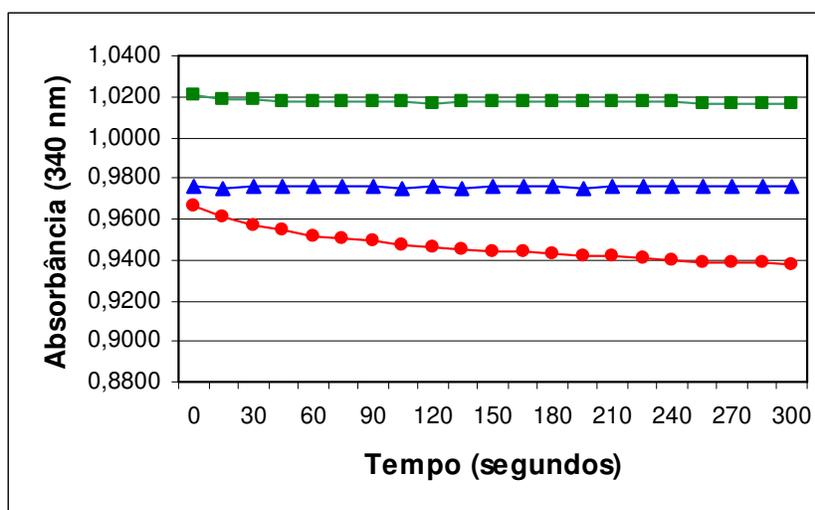
Para a medida da atividade da enzima glutatona peroxidase, existem variações no que diz respeito à temperatura e ao tempo de incubação do meio de reação. Carreras *et al.* (2004) adotaram o procedimento de pré-incubação da mistura a 30°C durante 5 minutos, com adição após este período do hidroperóxido (iniciador da reação) e subsequente leitura no espectrofotômetro, enquanto que Moreira *et al.* (2001) e Penha-Silva *et al.* (2005) incubaram o meio de reação a 37°C durante 10 minutos antes da adição do iniciador. Diversos autores citam a reação imediata a 37°C (Chen *et al.*, 2000; Lindmark-Mansson *et al.*, 2001; Holovská *et al.*, 2003; Hoac *et al.*, 2006). Constam ainda na literatura os experimentos conduzidos na faixa de temperatura de 20° a 25°C (Paglia e Valentine, 1968; Arai *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 2002). Na primeira etapa deste experimento os ensaios foram realizados a 22°C, sem pré-incubação. Devido às diferentes condutas existentes na literatura, na segunda etapa foi testada a influência destes dois fatores, tempo e temperatura, sobre a medida da atividade da GSH-Px.

Como já foi visto na revisão bibliográfica, na reação catalisada pela enzima glutatona peroxidase, a glutatona oxidada (GSSG) formada a partir da glutatona (GSH) (Equação 13) é instantaneamente e continuamente reduzida, na presença

da enzima glutationa redutase (Equação 14), para a manutenção de um nível constante de glutationa (GSH), o que evita a paralisação deste ciclo redox (Rover Jr. *et al.*, 2001; Penha-Silva *et al.*, 2005).



Neste ciclo redox, a molécula de NADPH comporta-se como um doador de elétrons, oxidando-se paralelamente (Equação 14). Essa oxidação concomitante que ocorre com o NADPH pode ser monitorada fotometricamente pelo decaimento da absorção a 340 nm, sendo que este representa, aliás, o fundamento da análise da atividade da enzima glutationa peroxidase. A Figura 12 mostra o gráfico destes valores no decorrer dos cinco minutos de reação, verificados nos diferentes modos de pré-incubação do meio de reação.



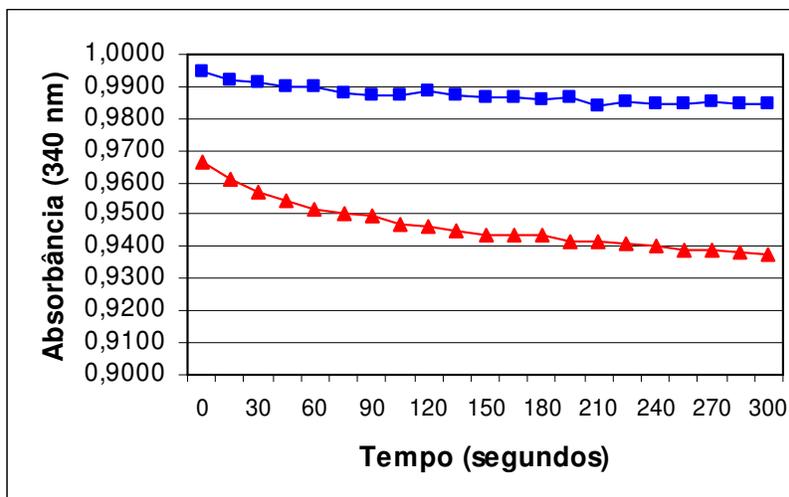
**Figura 12.** Valores de absorbância do NADPH em 340 nm no decorrer do tempo de reação verificados nos diferentes modos de pré-incubação do meio de reação. Os símbolos correspondem a: reação imediata a 22°C (O); banho-maria a 36°C durante 30 minutos (Δ) e banho-maria a 36°C durante 10 minutos ( ).

A taxa de reação ( $\Delta\text{abs}/\text{min}$ ) corresponde a 0,0003 quando foi utilizado o banho-maria a 36°C durante 30 minutos, 0,0007 para o banho-maria a 36°C durante 10 minutos e 0,0058 para a reação imediata a 22°C (Figura 12). Podemos concluir que esta reação enzimática é bastante rápida, e provavelmente ocorreu no período de incubação no banho-maria. Assim, no momento em que o espectrofotômetro começou a registrar as absorvâncias, o NADPH já estaria quase que totalmente oxidado, dando origem a taxas de reação próximas de zero, fato ocorrido quando o tempo de incubação foi de 10 e 30 minutos.

Chen *et al.* (2000), ao testar a influência da temperatura sobre a determinação da atividade da enzima glutathione peroxidase em leite, verificou que ao conduzir os ensaios a 25°C, a atividade da GSH-Px medida foi 30% mais baixa do que a 37°C. Isto ocorreu provavelmente devido a presença de diferentes formas de GSH-Px em carne e leite, como já foi visto anteriormente. O tecido muscular contém a forma celular (cGSH-Px), enquanto que no leite é encontrada a forma extracelular (eGSH-Px) (Chen *et al.*, 2000; Stagsted, 2006). Estas formas são estruturalmente e funcionalmente diferentes uma da outra, sendo inclusive que a eGSH-Px apresenta maior resistência às altas temperaturas do que a cGSH-Px (Lindmark-Mansson *et al.*, 2001a).

#### **4.2.3. Variação de Substratos: Peróxido de Hidrogênio X Terc-butil Hidroperóxido**

Embora tanto peróxido de hidrogênio quanto terc-butil hidroperóxido sejam substratos inorgânicos para a reação catalisada pela GSH-Px, os dois possuem valores de  $K_m$  diferentes em relação a esta enzima, com valores de 0,003 e 0,059 mM, respectivamente (Brenda, 2007), o que indica que a GSH-Px possui uma maior afinidade pelo peróxido de hidrogênio. A Figura 13 mostra as curvas cinéticas obtidas para cada um dos substratos testados.



**Figura 13.** Valores de absorbância do NADPH em 340 nm no decorrer do tempo de reação verificados com os substratos: terc-butil hidroperóxido 15 mM (□) e peróxido de hidrogênio 0,72 mM (Δ).

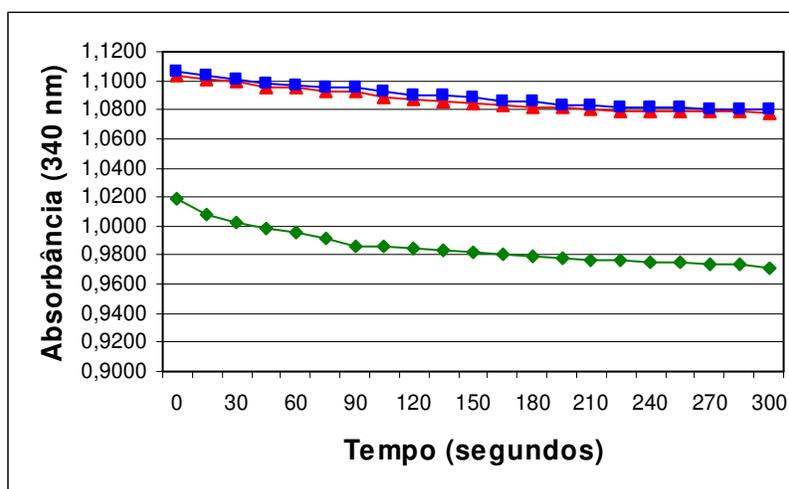
A taxa de reação (abs/min) medida com a utilização do terc-butil hidroperóxido corresponde a 0,0028 e com a utilização do peróxido de hidrogênio, 0,0077, o que confirma que a enzima GSH-Px possui maior afinidade por este último substrato (Figura 13). Contrariando estes resultados, Avissar *et al.* (1991) encontraram o mesmo valor de atividade enzimática no leite, usando tanto peróxido de hidrogênio quanto terc-butil hidroperóxido como substratos.

#### 4.2.4. Efeito do Tampão empregado na Extração Enzimática

De acordo com Farfán (1994), a substância mercaptoetanol, por comportar-se como um agente fracamente redutor, formaria com a GSH-Px um complexo reversível enzima-inibidor. Esta característica pode ser útil quando se deseja prevenir a oxidação espontânea durante a extração da enzima glutathione peroxidase. Arai *et al.* (1994) utilizaram esta substância durante o preparo do extrato enzimático de carne de frango; a técnica de extração de tecidos citada pelo manual Zeptometrix Corporation (2006) também preconiza o emprego do mercaptoetanol.

Embora Chaudiere *et al.* (1984) tenham relatado a inibição da atividade da GSH-Px devido à adição de mercaptoetanol no meio de reação, ocorrida provavelmente devido à competição com o substrato glutathione, seria esperado

que a presença deste composto na solução tampão favorecesse a pré- etapa de extração da enzima. Nas determinações da atividade enzimática da primeira etapa, foi utilizado o tampão de extração tris-HCl 50 mM pH 7,6. Utilizando a mesma amostra, porém variando a forma de extração, obteve-se as curvas cinéticas que podem ser visualizadas na Figura 14.



**Figura 14.** Valores de absorvância do NADPH em 340 nm no decorrer do tempo de reação verificados com três tipos de tampão de extração: (□) solução tampão 1 (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 + EDTA 1 mM + mercaptoetanol 1 mM), (Δ) solução tampão 2 (tris-HCl 50 mM pH 7,6 + EDTA 1 mM + mercaptoetanol 5 mM) e (◇) solução tampão 3 (tris-HCl 50 mM pH 7,6).

A taxa de reação (abs/min) para cada uma das condições testadas corresponde a 0,0062 utilizando a solução tampão 1, 0,0072 quando foi utilizado a solução tampão 2 e 0,0114 na utilização da solução tampão 3 (Figura 14). Estes resultados mostram que a maior taxa foi obtida quando a solução tampão 3 foi utilizada (tris-HCl 50 mM pH 7,6), comprovando que o mercaptoetanol não auxiliou no processo de extração da enzima.

## 5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

### 5.1 Conclusões

As diferentes fontes e os níveis de selênio utilizados na alimentação das aves não influenciaram na atividade da enzima glutathiona peroxidase na carne crua de sobrecoxa, uma vez que não ocorreu diferença significativa entre os cinco tratamentos.

O congelamento da carne crua proporcionou uma diminuição significativa na atividade enzimática das amostras de todos os tratamentos, porém os valores encontrados não diferiram entre si. Desta forma, a enzima GSH-Px mostrou-se sensível à temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$  e nenhuma fonte ou nível de selênio testada foi capaz de reduzir a perda na atividade.

O cozimento da carne de sobrecoxa de frango proporcionou uma diminuição significativa na atividade da enzima glutathiona peroxidase nos tratamentos T2, T4 e T5. Já os valores de atividade enzimática nas amostras cozidas de T1 e T3, não foram estatisticamente diferentes daqueles encontrados na carne crua.

O congelamento associado ao cozimento promoveu diminuição significativa na atividade da enzima glutathiona peroxidase apenas no tratamento T1.

Na carne crua, o maior valor de TBARS foi encontrado no tratamento T5, que diferiu significativamente de todos os outros tratamentos.

Com o cozimento, obteve-se valores de TBARS significativamente maiores para todos os tratamentos.

O congelamento das amostras cozidas ocasionou uma elevação significativa nos níveis de oxidação lipídica em todos os tratamentos.

Concentrações de peróxido de hidrogênio superiores a 0,72 mM ocasionaram saturação, e mesmo inibição da enzima glutathiona peroxidase, o que pode ser verificado através da diminuição das taxas de reação.

Foram obtidos melhores resultados de atividade da enzima glutathiona peroxidase na reação imediata à temperatura de  $22^{\circ}\text{C}$ .

O substrato terc-butil hidroperóxido promoveu diminuição das taxas de reação quando em comparação ao peróxido de hidrogênio, demonstrando que a enzima glutathiona peroxidase possui maior afinidade por este último substrato.

A solução tampão contendo mercaptoetanol não promoveu melhor extração da enzima glutathione peroxidase.

## **5.2 Sugestões para Trabalhos Futuros**

Analisar a atividade da enzima glutathione peroxidase plasmática das aves durante a criação das mesmas;

Determinar as concentrações teciduais de selênio na carne após abate;

Quantificar os níveis de selênio na ração das aves;

Estudar paralelamente os parâmetros zootécnicos dos frangos alimentados com diferentes fontes e níveis de selênio;

Utilizar uma faixa mais ampla de suplementação de selênio, com valores acima de 0,35 mg /kg;

Verificar o efeito de temperaturas de cozimento inferiores a 66°C sobre a atividade da enzima glutathione peroxidase;

Verificar o efeito da temperatura de refrigeração (4°C) em períodos inferiores a 90 dias sobre a atividade da enzima glutathione peroxidase;

Aprofundar o estudo cinético sobre o mecanismo de reação da enzima GSH-Px em carne de frango.

## 6 REFERÊNCIAS

ANADÓN, H.L.S. **Biological, Nutritional, and Processing Factors Affecting Breast Meat Quality of Broilers**. Blacksburg, Virginia, 2002, 171p. Tese (Doutorado) – Virginia Polytechnic Institute and State University

ARAI, T.; SUGAWARA, M.; SAKO, T.; MOTOYOSHI, S.; SHIMURA, T.; TSUTSUI, N.; KONNO, T. Glutathione peroxidase activity in tissues of chickens supplemented with dietary selenium. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 107A, p. 245-248, 1994

ARTEEL, G.E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, p. 153-158, 2001

ARTHUR, J.R.; NICOL, F.; BECKETT, G.J. Selenium deficiency, thyroid hormone metabolism, and thyroid hormone deiodinases. **American Journal of Clinical Nutrition Suppl.**, v. 57, p. 236- 239, 1993

ARTHUR, J.R.; BECKETT, G.J. Newer aspects of micronutrients in at risk groups (New metabolic roles for selenium). **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 53, p. 615-624, 1994

ARTHUR, J.R. The glutathione peroxidases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 1825- 1835, 2000

ARTHUR, J.R.; McKENZIE, R.C.; BECKETT, G.J. Selenium in the immune system. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1457- 1459, 2003

AVANZO, J.L.; MENDONÇA Jr., C.X.; PUGINE, S.M.P.; CESAR, M.C. Effect of vitamin E and selenium on resistance to oxidative stress in chicken superficial

pectoralis muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 129, p. 163-173, 2001

AVISSAR, N.; SLEMMON, J.R.; PALMER, I.S.; COHEN, H.J. Partial sequence of human plasma glutathione peroxidase and immunological identification of milk glutathione peroxidase as the plasma enzyme. **Journal of Nutrition**, v. 121, p. 1243- 1249, 1991

AVISSAR, N.; KERL, E.A.; BAKER, S.S.; COHEN, H.J. Extracellular glutathione peroxidase mRNA and protein in human cell lines. **Archives of Biochemistry and Biophysics** , v. 309, p. 239-246, 1994

BECKETT, G.J.; ARTHUR, J.R. Selenium and endocrine systems. **Journal of Endocrinology**, v. 184, p. 455- 465, 2005

BEHNE, D.; KYRIAKOPOULOS, A. Mammalian selenium-containing proteins. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 453-473, 2001

BEN, A.M. Effect of freezing and microbial growth in myoglobin derivatives of beef. **Food Chemistry**, v. 147, n. 10, p. 4093, 1999

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. Cap.3 Lipídios. **Química do processamento de alimentos**. 3ª edição. Editora Varela, São Paulo-SP. p. 23-41, 2001

BORAWSKA, M.H.; WITKOWSKA, A.M.; HUKALOWICZ, K.; MARKIEWICZ, R. Influence of dietary habits on serum selenium concentration. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 48, p. 134-140, 2004

BRENDA - **The Comprehensive Enzyme Information System**. Disponível em < <http://www.brenda.uni-koeln.de> > acesso em 05 de fevereiro de 2007

BRIVIBA, K.; KISSNER, R.; KOPPENOL, W.H.; SIES, H. Kinetic study of the reaction of glutathione peroxidase with peroxyxynitrite. **Chemical & Research Toxicology**, v. 11, p. 1398- 1401, 1998

BROWN, K.M.; ARTHUR, J.R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. **Public Health Nutrition**: v. 4, n. 2B, p. 593-599, 2001

BÜGEL, S.; SANDSTRÖM, B.; SKIBSTED, L. H. Pork meat: a good source of selenium? **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 17, n. 4, p. 307-311, 2004

BYRNE, D.V.; BREDIE, W.L.P.; MOTTRAM, D.S.; MARTENS, M. Sensory and chemical investigations on the effect of oven cooking on warmed-over flavour development in chicken meat. **Meat Science**, v. 61, p. 127-139, 2002

CARRERAS, I.F. **Influencia de la suplementación de antioxidantes y de la administración de enrofloxacin en la calidad y seguridad de la carne de ave.** Girona, Espanha, 2004(a), 304p. Tese (Doutorado) – Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries - Universitat de Girona

CARRERAS, I.F.; CASTELLARI, M.; REGUEIRO, J.A.G.; GUERRERO, L.; ESTEVE-GARCIA, E.; SÁRRAGA, C. Influence of enrofloxacin administration and  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplemented diets on oxidative stability of broiler tissues. **Poultry Science**, v. 83, p. 1- 7, 2004(b)

CHAN, K.M.; DECKER, E.A. Endogenous skeletal muscle antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 4, p. 403-426, 1994

CHAN, W.K.M.; FAUSTMAN, C.; YIN, M.; DECKER, E.A. Lipid oxidation induced by oxymyoglobin and metmyoglobin with involvement of  $H_2O_2$  and superoxide anion. **Meat Science**, v. 46, n. 2, p. 181-190, 1997

CHEN, J.; LINDMARK-MANSSON, H.; AKESSON, B. Optimisation of a coupled enzymatic assay of glutathione peroxidase activity in bovine milk and whey. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 347- 351, 2000

CHAUDIERE, J.; WILHELMSSEN, E.C.; TAPPEL, A.L. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acids and other mercaptans. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 2, p. 1043- 1050, 1984

COMBS, G.F.Jr. Selenium in global food systems. **British Journal of Nutrition**, v. 85, p. 517-547, 2001

COZZOLINO, S.M.F. Cap.2 Selênio. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Editora Manole, Barueri-SP. p. 539-577, 2005

DAHLE, L.K.; HILL, E.G.; HOLMAN, R.T. The thiobarbituric acid reaction and the autooxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 98, p. 253-261, 1962

DAHLKE, F.; GONZALES, E.; FURLAN, R.L.; GADELHA, A.C.; MAIORKA, A.; ALMEIDA, J.G. Avaliação de diferentes fontes e níveis de selênio para frangos de corte em diferentes temperaturas. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 21-26, 2005

DAUN, C.; AKESSON, B. Comparison of glutathione peroxidase activity, and of total and soluble selenium content in two muscles from chicken, turkey, duck, ostrich and lamb. **Food Chemistry**, v. 85, p. 295-303, 2004(a)

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

DEVORE, V.R.; GREENE, B.E. Glutathione peroxidase in post-rigor bovine semitendinosus muscle. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 1406-1409, 1982

DEVORE, V.R.; COLNAGO, G.L.; JENSEN, L.S.; GREENE, B.E. Thiobarbituric acid values and glutathione peroxidase activity in meat from chickens fed a selenium-supplemented diet. **Journal of Food Science**, v. 48, p. 300-301, 1983

DOWNS, K.M.; HESS, J.B.; BILGILI, S.F. Selenium source effect on broiler carcass characteristics, meat quality and drip loss. **Journal of Applied Animal Research**, v. 18, p. 61-72, 2000

FACCO, E.M.P. **Parâmetros de qualidade do charque relacionados ao efeito da suplementação de vitamina E na dieta de bovinos da raça Nelore em confinamento**. Campinas, São Paulo, 2002, 138p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

FARFÁN, J.A. Cap. 4. Modificação Química. **Química de Proteínas aplicada à Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. 2ª edição. Editora da Unicamp, Campinas-SP. p. 91, 1994

FENNEMA, O.R. Cap. 6. Enzimas. **Química de los Alimentos**. 2ª edição. Editora Acribia, Zaragoza, Espanha. p. 416-536, 1993

FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.A. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. **Food Chemistry**, v. 59, n. 3, p. 345-353, 1997

FINLEY, J.W. Does selenium accumulation in meat confer a health benefit to the consumer? **Proceedings of the American Society of Animal Science**, p. 1- 10, 1999

GOMES, H.A.; SILDA, E.N.; NASCIMENTO, M.R.L.; FUKUMA, H.T. Evaluation of the 2-thiobarbituric acid method for the measurement of lipid oxidation in mechanically deboned gamma irradiated chicken meat. **Food Chemistry**, v. 80, p. 433- 437, 2003

GOWDY, K. **Selenium supplementation and antioxidant protection in broiler chickens**. Graduate Faculty of North Carolina State University, 2004, 172p. Dissertação (Mestrado) - Immunology and Poultry Science Program

GRAY, J.I.; GOMAA, E.A.; BUCKLEY, D.J. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science**, v.43, n. S, p. S111-S123, 1996

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, v. 219, p. 1-14, 1984

HERNÁNDEZ, P.; PARK, D.; RHEE, K.S. Chloride salt type/ionic strength, muscle site and refrigeration effects on antioxidant enzymes and lipid oxidation in pork. **Meat Science**, v. 61, p. 405-410, 2002

HESS, J.B.; DOWNS, K.M.; BILGILI, S.F. Selenium nutrition and poultry meat quality. **Nutritional Biotechnology in the feed and food industries, proceedings of Altech's 19<sup>th</sup> International Symposium**, Norttingham University Press, Norttingham, United Kingdon, p. 107- 112, 2003

HOAC, T.; DAUN, C.; TRAFIKOWSKA, U.; ZACKRISSON, AKESSON, B. Influence of heat treatment on lipid oxidation and glutathione peroxidase activity in chicken and duck meat. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 7, p. 88- 93, 2006

HOEKSTRA, W.G. Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. **Federation Proceedings**, v. 34, p. 2083-2089, 1975

HOLOVSKÁ Jr., K.; HOLOVSKÁ, K.; BOLDIZAROVÁ, K.; CEKONOVÁ, S.; LENARTOVÁ, V.; LEVKUT, M.; JAVORSKY, P.; LENG, L. Antioxidant enzyme activities in liver tissue of chickens fed diets supplemented with various forms and amounts of selenium. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 12, p. 143-152, 2003

KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat Science**, v. 36, p. 169- 189, 1994

LEE, S.K.; MEI, L.; DECKER, E.A. Lipid oxidation in cooked turkey as effect by added antioxidant enzymes. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 726-728, 795, 1996(a)

LEE, S. K.; MEI, L.; DECKER, E. A. Role of antioxidant enzymes in the development of oxidative rancidity in cooked and salted muscle foods. **Meat Focus International**, v. 5, p. 310-311, 1996(b)

LEE, S.K.; MEI, L.; DECKER, E.A. Influence of sodium chloride on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation in frozen ground pork. **Meat Science**, v. 46, n. 4, p. 349- 355, 1997

LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003

LENG, L.; BOBCEK, R.; KURICOVÁ, S.; BOLDIZÁROVÁ, K.; GRESAKOVÁ, L.; SEVCÍKOVÁ, Z.; RÉVAJOVÁ, V.; LEVKUTOVÁ, M.; LEVKUT, M. Comparative metabolic and immune responses of chickens fed diets containing inorganic selenium and Sel-Plex™ organic selenium. **Nutritional Biotechnology in the feed and food industries, proceedings of Altech's 19<sup>th</sup> International Symposium**, Norttingham University Press, Norttingham, United Kingdon, p. 131- 145, 2003

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Cap. 8. Enzimas. **Princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier, São Paulo – SP, 2ª edição, p. 147- 176, 1995

LIN, T.S.; HULTIN, H.O. Glutathione peroxidase of skeletal muscle. **Journal of Food Biochemistry**, v. 2, p. 39-47, 1978

LINDMARK-MANSSON, H.; CHEN, J.; PAULSSON, M.; ALDÉN, G.; REN, B.; LADENSTEIN, R.; AKESSON, B. The effect of storage and heat treatment on glutathione peroxidase in bovine milk and whey. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 71- 81, 2001(a)

LINDMARK-MANSSON, H.; AKESSON, B. Purification and immunochemical assay of bovine extracellular glutathione peroxidase. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 649- 655, 2001(b)

London South Bank University. **Faculty of Engineering, Science and the Built Environment**. Disponível em < <http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/> > acesso em 02 de fevereiro de 2007

MADDIPATI, K.R.; MARNETT, L.J. Characterization of the major hydroperoxide-reducing activity of human plasma. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 36, p. 17398- 17403, 1987

MAHAN, D.C.; PARRETT, N.A. Evaluating the efficacy of selenium-enriched yeast and sodium selenite on tissue selenium retention and serum glutathione peroxidase activity in grower and finisher swine. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2967- 2974, 1996

MAHAN, D.C.; CLINE, T.R.; RICHERT, B. Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity,

carcass characteristics, and loin quality. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 2172- 2179, 1999

MARASCHIELLO, C.; SÁRRAGA, C.; REGUEIRO, J.A.G. Glutathione peroxidase activity, TBARS, and  $\alpha$ -tocoferol in meat from chickens fed different diets. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 867- 872, 1999

MEI, L.; CRUM, A.D.; DECKER, E.A. Development of lipid oxidation and inactivation of antioxidant enzymes in cooked pork and beef. **Journal of Food Lipids**, v. 1, p. 273-283, 1994

MERCIER, Y.; GATELLIER, P.; RENERRE, M. Lipid and protein oxidation in vitro, and antioxidant potential in meat from Charolais cows finished on pasture or mixed diet. **Meat Science**, v. 66, p. 467- 473, 2004

MILLS, G.C. The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 234, p. 502-506, 1959

MOREIRA, J.; SANTOS, C.D.; ABREU, C.M.P.; BERTECHINI, A.G.; OLIVEIRA, D.F.; CARDOSO, M.G. Efeito de fonte e níveis de selênio na atividade enzimática da glutathiona peroxidase e no desempenho de frangos de corte. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 3, p. 645-649, 2001

MORRISSEY, P.A.; SHEEHY, P.J.A.; GALVIN, K.; KERRY, J.P.; BUCKLEY, D.J. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, supl. 1, v. 49, p. 573-586, 1998

MORTENSEN, M.; ANDERSEN, H.J.; ENGELSEN, S.B.; BERTRAM, H.C. Effect of freezing temperature, thawing and cooking rate on water distribution in two pork qualities. **Meat Science**, v. 72, p. 34- 42, 2006

MOTTRAM, D.S. Flavour formation in meat and meat products: a review. **Food Chemistry**, v. 62, n. 4, p. 415- 424, 1998

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient Requirements of Poultry**. National Academy Press, Washington, D.C., 9ª edição, 158p. 1994

O'GRADY, M.N.; MONAHAN, F.J.; FALLON, R.J.; ALLEN, P. Effects of dietary supplementation with vitamin E and organic selenium on the oxidative stability of beef. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 2827- 2834, 2001

PABST, M.J.; HABIG., W.H.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-Transferase A – A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7140- 7150, 1974

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967

PAPAS, A.M. Diet and antioxidant status. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 999-1007, 1999

PENHA-SILVA, N.; CUNHA, G.N.; FERREIRA, F.A.; COELHO, D.P. Determinação da faixa de referência de glutathione peroxidase no soro de bovinos saudáveis. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 2, p. 89- 93, 2005

PINO, L.M. **Estabilidade oxidativa da carne de frangos alimentados com diferentes fontes lipídicas, armazenadas sob congelamento**. Piracicaba, São Paulo, 2005, 80p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo

PODOLL, K.L.; BERNARD, J.B.; ULLREY, D.E.; DEBAR, S.R.; KU, P.K.; MAGEE, W.T. Dietary selenate versus selenite for cattle, sheep, and horses. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 1965- 1970, 1992

PRABHAKAR, R.; VREVEN, T.; MOROKUMA, K.; MUSAEV, D.G. Elucidation of the mechanism of selenoprotein glutathione peroxidase catalysed hydrogen peroxide reduction by two glutathione molecules: a density functional study. **Biochemistry**, v. 44, p. 11864- 11871, 2005

PUNCHARD, N.A.; KELLY, F.J. Cap. 16. Glutathione peroxidase: activity and steady-state level of mRNA (Daret K. St. Clair e Ching K. Chow). **Free radicals: a Practical Approach**. Oxford University Press, p. 227- 240, 1996

RACANICCI, A.M.C. **O efeito do uso de óleo de vísceras de aves oxidado no desempenho de frangos de corte e na estabilidade oxidativa da carne de sobrecoxa**. Piracicaba, São Paulo, 2004, 80p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo

RAHARJO, S.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Improved speed, specificity, and limit of determination of aqueous acid extraction thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 40, p. 2182- 2185, 1992

RENERRE, M.; DUMONT, F.; GATELLIER, P. Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin. **Meat Science**, v. 43, n. 2, p. 111-121, 1996

RENERRE, M.; PONCET, K.; MERCIER, Y.; GATELLIER, P.; MÉTRO, B. Influence of dietary fat and vitamin E on antioxidant status of muscles of turkey. **Journal of Food Chemistry**, v. 47, p. 237- 244, 1999

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; DONZELE, J.L.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; BARRETO, S.L.T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, 2ª edição, 186p., 2005

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

ROVER, L.Jr.; HÖEHR, N.F.; VELLASCO, A.P.; KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001

RUTZ, F.; PAN, E.A.; XAVIER, G.B.; ANCIUTI, M.A. Meeting selenium demands of modern poultry: responses to Sel-Plex® organic selenium in broiler and breeder diets. **Nutritional Biotechnology in the feed and food industries, proceedings of Altech's 19<sup>th</sup> International Symposium**, Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom, p. 147- 161, 2003

SÁRRAGA, C.; CARRERAS, I.; REGUEIRO, J.A.G. influence of meat quality and NaCl percentage on glutathione peroxidase activity and values for acid-reactive substances of raw and dry-cured *Longissimus dorsi*. **Meat Science**, v. 62, p. 503-507, 2002

SCHRAUZER, G.N. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1653-1656, 2000

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metabolism Reviews**, v. 32(3&4), p. 307- 326, 2000

SHI, B.; SPALLHOLZ, J.E. Selenium from beef is highly bioavailable as assessed by liver glutathione peroxidase activity and tissue selenium. **British Journal of Nutrition**, v. 72, p. 873- 881, 1994

SPLITTGERBER, A.G.; TAPPEL, A.L. Steady state and pre-steady state kinetic properties of rat liver selenium-glutathione peroxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 19, p. 9807- 9813, 1979

STAGSTED, J. Absence of both glutathione peroxidase activity and glutathione in bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 662- 668, 2006

SURAI, P.F.; DVORSKA, J.E. Effect of selenium and vitamin E content of the diet on lipid peroxidation in breast muscle tissue of broiler breeder hens during storage. **Proceedings Australian Poultry Science Symposium**, v.14, p. 187- 192, 2002(a)

SURAI, P.F. Selenium in poultry nutrition- antioxidant properties, deficiency and toxicity. **World's Poultry Science Journal**, v. 58, p. 333- 347, 2002(b)

TORRES, M.C.L.; SOARES, N.F.F.; MAIA, J.F. Parâmetros cinéticos da glutathione S-transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 243- 248, 2004

ULLREY, D.E. Basis for regulation of selenium supplements in animal diets. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3922- 3927, 1992

UPTON Jr., J.R. **The effects of selenium supplementation on performance and antioxidant enzyme activity in broiler chickens**. Raleigh, North Carolina, 2003, 81p. Dissertação (Mestrado) – Dep. Nutrition and Poultry Science, North Carolina State University, USA

VAN SAUN, R.J. Rational approach to selenium supplementation essential. **Feedstuffs**, v. 62, n. 3, p. 15- 17 , 1990

VIEIRA, E.T.T. **Influência do processo de congelamento na qualidade do peito de frango**. Erechim, Rio Grande do Sul, 2007, 101p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

WEBER, M.; BALOGH, K.; ERDÉLYI, M.; MÉZES, M. Effect of T-2 toxin in combination with vitamin E, selenium and mycotoxin binder on lipid peroxide status and on the glutathione redox system in broiler chicken. **The Journal of Poultry Science**, v. 43, p. 222-227, 2006

WEISS, W.P. Selenium nutrition of dairy cows: comparing responses to organic and inorganic selenium forms. **Nutritional Biotechnology in the feed and food industries, proceedings of Altech's 19th International Symposium**, Norttingham University Press, Norttingham, United Kingdon, p. 333- 343, 2003

WHANGER, P.D. Metabolic pathways of selenium in plants and animals and their nutritional significance. **Nutritional Biotechnology in the feed and food industries, proceedings of Altech's 19<sup>th</sup> International Symposium**, Norttingham University Press, Norttingham, United Kingdon, p. 51-58, 2003

YAROSHENKO, F.O.; DVORSKA, J.E.; SURAI, P.F.; SPARKS, N.H.C. Selenium-enriched eggs as a source of selenium for human consumption. **Applied Biotechnology, Food Science and Policy**, v.1, n.1, p. 13- 23, 2003

YOSHIDA, M.; FUKUNAGA, K.; TSUCHITA, H.; YASUMOTO, K. An evaluation of the bioavailability of selenium in high-selenium yeast. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 45, p. 119- 128, 1999

YOUNG, P.R.; BRIEDIS, A.V. Purification and kinetic mechanism of the major glutathione S-transferase from bovine brain. **Biochemistry Journal**, v. 257, p. 541- 548, 1989

ZEPTOMETRIX CORPORATION. Total glutathione peroxidase assay kit (catalog # 0805002). Disponível em < [www.zeptometrix.com](http://www.zeptometrix.com) > acesso em 21 de agosto de 2006

## APÊNDICE A – DADOS SOBRE O DESEMPENHO DOS FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIFERENTES FONTES E NÍVEIS DE SELÊNIO

### Tratamentos:

T1 – sem suplementação de selênio

T2 – selênio suplementar: 0,15 mg/kg, fonte inorgânica (selenito de sódio)

T3 – selênio suplementar: 0,35 mg/kg, fonte inorgânica (selenito de sódio)

T4 – selênio suplementar: 0,15 mg/kg, fonte orgânica (selenometionina)

T5 – selênio suplementar: 0,35 mg/kg, fonte orgânica (selenometionina)

**Tabela 1.** Peso vivo (g) de frangos de corte com 1, 21, 35 e 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas com diferentes fontes e níveis de selênio

Tratamento	1º dia	21º dia	35º dia	42º dia
T1	43,90	426,3	695,8	1067,8
T2	44,11	801,0	1899,1	2546,7
T3	44,12	805,4	1883,2	2553,4
T4	44,01	791,0	1896,2	2528,6
T5	43,96	792,2	1875,0	2492,1

**Tabela 2.** Consumo de ração (g) de frangos de corte com 21, 35 e 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas com diferentes fontes e níveis de selênio

Tratamento	21º dia	35º dia	42º dia
T1	830,0	2019,9	2793,4
T2	1034,6	3061,2	4481,8
T3	1086,9	3071,1	4478,1
T4	1083,9	3115,1	4524,8
T5	1069,7	3089,2	4511,0

**Tabela 3.** Conversão alimentar (g/g) de frangos de corte com 21, 35 e 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas com diferentes fontes e níveis de selênio

<b>Tratamento</b>	<b>21º dia</b>	<b>35º dia</b>	<b>42º dia</b>
T1	2,033	2,965	2,660
T2	1,291	1,612	1,760
T3	1,351	1,632	1,754
T4	1,372	1,643	1,790
T5	1,351	1,648	1,810

**Tabela 4.** Peso vivo total (PABT), peso da coxa (CX), sobrecoxa (SCX), peito (PT) e fígado (FIG) (g) dos frangos abatidos aos 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas com diferentes fontes e níveis de selênio

<b>Tratamento</b>	<b>PABT</b>	<b>CX</b>	<b>SCX</b>	<b>PT</b>	<b>FIG</b>
T1	1652,9	164,2	217,6	342,8	45,1
T2	2547,8	254,1	350,1	610,1	60,6
T3	2529,6	250,6	350,3	598,4	59,1
T4	2511,4	253,8	340,9	596,9	57,2
T5	2484,6	254,6	340,6	571,7	58,5

**Tabela 5.** Percentagem (%) de coxa (PCX), sobrecoxa (PSCX), peito (PPT) e fígado (PFIG) em relação ao peso vivo dos frangos abatidos aos 42 dias de idade alimentados com dietas suplementadas com diferentes fontes e níveis de selênio

<b>Tratamento</b>	<b>PCX</b>	<b>PSCX</b>	<b>PPT</b>	<b>PFIG</b>
T1	9,92	13,15	20,69	2,73
T2	9,97	13,74	23,97	2,38
T3	9,91	13,85	23,65	2,33
T4	10,11	13,59	23,73	2,28
T5	10,25	13,70	22,99	2,36

