

## ÍNDICE

EFEITO DIRECTO E RESIDUAL DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE OS CONJUGADOS DO ÁCIDO LINOLEICO (CLA), ÓMEGAS N-3 E OUTROS ÁCIDOS GORDOS DA GORDURA DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS EM PASTOREIO O. A. Rego, R.M. Bouça, P. V. Portugal, A.E.S. Borba, J. D. Rosa, C. M. Vouzela e R.J. B. Bessa .....	1
ANÁLISE DE DADOS DIÁRIOS DA PRODUÇÃO DE LEITE. Parte I: A variação diária e o intervalo entre ordenhas A. Silvestre, R. Cruz, F. Petim-Batista e J. Colaço .....	23
ANÁLISE DE DADOS DIÁRIOS DA PRODUÇÃO DE LEITE. Parte II: O contraste A4, At4 e outras periodicidades de recolha de dados A. Silvestre, R. Cruz, F. Petim-Batista e J. Colaço .....	37
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SILAGENS - CONTAMINAÇÃO POR <i>Listeria monocytogenes</i> M. M. Guerra, M. Oliveira, A. Fernandes e F.M. Bernardo .....	55
O USO DE BIOMARCADORES EM ESTUDOS DE TOXICOLOGIA AQUÁTICA A.Fontainhas-Fernandes .....	67
CARACTERIZAÇÃO POLÍNICA DO MEL DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO S. M. Afonso Pires, T. Rodrigues, A. Rocha, A. Pajuelo e O. Pereira .....	87
DEFESAS ANTIOXIDANTES EM ANIMAIS P.A.C. Matos e A. Fontainhas-Fernandes .....	101

## DIRECT AND RESIDUAL EFFECT OF FISH OIL SUPPLEMENTATION ON CONJUGATED LINOLEIC ACID (CLA), OMEGA –3 AND OTHER FATTY ACIDS ON MILK FAT OF GRAZING DAIRY COWS

O. A. Rego<sup>1\*</sup>, R.M. Bouça<sup>1</sup>, P. V. Portugal<sup>2</sup>, A.E.S. Borba<sup>1</sup>, J. D. Rosa<sup>1</sup>, C. M. Vouzela<sup>1</sup> e R.J. B. Bessa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> - Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, 9700-Angra do Heroísmo, Terceira, Açores, Portugal. \* - E-mail: orego@angra.uac.pt

<sup>2</sup> - Departamento de Nutrição Animal, Estação Zootécnica Nacional, Instituto Nacional de Investigação Agrária, Fonte Boa, 5000-Santarém, Portugal

*(Aceite para publicação em 7 de Julho de 2004)*

### ABSTRACT

Eight Holstein dairy cows in mid lactation and fed on rotational grazing were selected aimed at studying the effects of grass supplementation with 320g fish oil (OP) upon cow performance and milk fatty acids (AG<sub>s</sub>) profile. Particularly, the experiment looked for a residual effect of OP on milk fat content (TB) and on some bioactive AG<sub>s</sub> like conjugated linoleic acid (CLA), trans-vaccenic acid (C18:1 trans-11-TVA) and omegas n-3 acids (C20:5, EPA and C22:6, DHA). Cow's performance data and milk samples were collected immediately before the experiment commenced (PEXP), on the last day (21<sup>st</sup> d) of OP supplementation period (POP) and during four successive periods of 10 days following OP withdrawal (P1, P2, P3 and P4). OP supplementation significantly ( $P < 0.05$ ) decreased the estimated dry matter intake, milk fat content (less 13.4 g Kg<sup>-1</sup>) and milk fat yield. No effect was detected in milk production, milk protein content, milk protein yield and live weight. While the concentration on milk fat of stearic acid (C18:0), short (C6:0 to C12:0) and medium chain (C14:0 to C16:0) AG<sub>s</sub> was depressed ( $P < 0.05$ ), the concentrations of oleic acid cis/trans isomers, CLA, linolenic acid (C18:3 n-3), EPA and DHA significantly ( $P < 0.05$ ) increased. However, transfer efficiency of EPA and DHA from fish oil to milk fat was very low (1.5%). There was no effect of OP on oleic (C18:1 cis-9) and linoleic (C18:2 cis-9, cis-12) acids of milk. OP decreased ( $P < 0.05$ ) the hipercholesteremic fraction (AG<sub>s</sub> C12:0, C14:0 and C16:0) of milk fat and increased ( $P < 0.05$ ) in total C18:1 and omega n-3. No residual effect of OP was expressed, exception made on the very long chain fatty acids i. e. > C20, EPA, DHA and DPA (C22:5 n-3) whose concentrations on milk was kept high over the forty-day post-treatment period.

**Key-words:** conjugated linoleic acid (CLA), dairy cows, fatty acids, omega n-3, pasture

## **EFEITO DIRECTO E RESIDUAL DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE SOBRE OS CONJUGADOS DO ÁCIDO LINOLEICO (CLA), ÔMEGAS N-3 E OUTROS ÁCIDOS GORDOS DA GORDURA DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS EM PASTOREIO**

### **RESUMO**

Seleccionaram-se 8 vacas leiteiras de raça Holstein, em fase média da lactação e exploradas em regime de pastoreio rotacional, com o objectivo de estudar a influência da suplementação com 320 g de óleo de peixe (OP), sobre a performance e o perfil dos ácidos gordos (AGs) da gordura do leite. Fizeram-se colheitas de dados experimentais e de amostras de leite no período pré-experimental (PEXP), no último dia (21º dia) do período de suplementação com OP (POP) e em 4 períodos intervalados de 10 dias, após retirada do OP da dieta (P1,P2,P3,P4), para estudar o eventual efeito residual da suplementação com OP, sobre o teor butíroso (TB) do leite e de alguns AGs bioactivos da gordura do leite, como os conjugados do ácido linoleico (CLA), trans-vacénico (C18:1 trans-11 – TVA) e ómegas da família n-3 (C20:5, EPA e C22:6, DHA). A suplementação com OP decresceu significativamente na estimativa da ingestão, no TB do leite ( $-13,4 \text{ g kg}^{-1}$ ) e na produção de gordura ( $P<0,05$ ), não exercendo efeito significativo sobre a produção de leite, teor proteico, produção de proteína e peso vivo ( $P>0,05$ ). Decresceram significativamente ( $P<0,05$ ) na gordura do leite as concentrações dos AGs de cadeia curta (C6:0 a C12:0), de cadeia média (C14:0 a C16:0), ácido esteárico (C18:0) e aumentaram significativamente ( $P<0,05$ ) as concentrações dos diversos isómeros cis/trans do ácido oleico, CLA, ácido linolénico (C18:3 n-3), EPA e DHA. Contudo, a eficiência de transferência dos EPA e DHA do óleo de peixe para a gordura do leite foi muito baixa (1,5 %). Não exerceu efeito significativo sobre os teores em ácido oleico (C18:1 cis-9) e linoleico (C18:2 cis-9, cis-12) da gordura do leite. A suplementação com OP, decresceu significativamente ( $P<0,05$ ) nos totais parciais da fracção hipercolesterémica (C12:0, C14:0 e C16:0) e aumentou significativamente ( $P<0,05$ ) no total C18:1 e ómegas da família n-3. Só se verificou um efeito residual da suplementação com OP sobre as concentrações na gordura do leite dos AGs de cadeia muito longa ( $> \text{C20}$ ), EPA, DHA e DPA (C22:5 n-3), que se mantiveram acima do PEXP durante os 4 períodos de colheita, eventualmente devido ao efeito da presença da farinha de peixe no alimento concentrado.

**Palavras-chave:** ácidos gordos, conjugados do ácido linoleico (CLA), ómegas n-3, pastoreio, vacas leiteiras

### **INTRODUÇÃO**

As gorduras e óleos têm sido usualmente adicionadas às misturas de concentrados, com vista a aumentar a densidade energética da dieta, permitindo

que as vacas leiteiras de elevada produção, possam exprimir todo o seu potencial produtivo, sobretudo na fase inicial da lactação. Mais recentemente, a inclusão de lípidos sobretudo insaturados na dieta, tem como objectivo principal alterar a composição do perfil dos ácidos gordos (AGs) da gordura, melhorando o valor nutricional e dietético do leite, bem como as suas propriedades físicas. Pretende-se através da manipulação alimentar da vaca, diminuir a fracção hipercolesterémica da gordura do leite (AGs saturados de cadeia média) e aumentar na fracção dos AGs mono e polinsaturados e em determinados ácidos gordos bioactivos, como os conjugados do ácido linoleico (CLA), ácido trans-vacénico (TVA) e ómeças n-3, melhorando a imagem deste produto animal junto dos consumidores (Ney, 1991; Baer *et al.*, 2001).

A gordura edível dos ruminantes é a principal fonte na dieta humana de ácido ruménico (cis 9, trans 11-C18:2), o principal isómero do CLA, que é produzido por acção de algumas estirpes de bactérias ruminais sobre o ácido linoleico da dieta e ainda, por acção da enzima  $\Delta^9$ -desaturase sobre o TVA nos tecidos dos animais e humanos (Salminen *et al.*, 1998; Griinari e Bauman, 1999). O TVA também é produzido em quantidades significativas no rúmen, por biohidrogenação dos ácidos linoleico e linolénico alimentares (Griinari e Bauman, 1999). As propriedades biológicas do CLA estão actualmente sob intensa investigação, estando já bem estabelecidas as suas potentes propriedades preventivas da carcinogénese com modelos animais e células humanas cultivadas in vitro, modeladoras sobre o sistema imunitário, de diferenciação celular e do metabolismo lipídico (revisão de Bessa *et al.*, 2000). Ip *et al.* (1999) provaram que a suplementação com pequenas doses de manteiga, proveniente de leite de vaca, naturalmente enriquecido em ácido ruménico, diminuía em 50% a incidência de tumores mamários em ratinhos.

Algumas das virtudes das dietas ricas em ácidos gordos ómega-3 são a prevenção de desenvolvimento de tumores (Willett, 1997) e de doenças cardiovasculares em humanos (Davignus *et al.*, 1997).

A suplementação com óleo de peixe (e outros produtos marinhos) a vacas leiteiras, é mais eficaz no enriquecimento da gordura do leite em CLA e ómeças n-3, do que óleos vegetais em doses semelhantes (Chilliard *et al.*, 2000). O seu efeito sobre a performance e o perfil de AGs da gordura do leite de vacas alimentadas com rações completas de mistura, está bem estudado (revisão de Chilliard *et al.*, 2001). Contudo, existe pouca informação disponível sobre a sua influência em vacas leiteiras exploradas em regime de pastoreio.

Com este trabalho pretendeu-se estudar o efeito directo e residual da suplementação com óleo de peixe (sardinha) sobre a performance e o perfil dos AGs da gordura do leite de vacas leiteiras em pastoreio.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Delineamento experimental**

O ensaio ocorreu no final da Primavera (início de Junho acabando no final de Agosto) e teve uma duração de 71 dias. Foi delineado em 3 fases: a primeira fase (período pré-experimental) com 10 dias de adaptação ao tratamento pastoreio + 4 kg de concentrado (PEXP); a segunda fase (2º período) com 21 dias de suplementação com 320 g de óleo de sardinha por vaca e dia (POP) e a terceira fase com a duração de 40 dias em que foi retirado o óleo de peixe (OP) do concentrado. Nesta terceira fase, retiraram-se amostras de leite em 4 períodos consecutivos espaçados de 10 dias (P1, P2, P3 e P4), afim de estudar o eventual efeito residual do OP, sobre a composição do leite e o perfil dos AGs da gordura.

### **Animais**

Utilizaram-se 8 vacas multíperas em lactação de raça Holstein. Os animais foram seleccionados poucos dias antes do início do ensaio de acordo com a fase de lactação, ( $134 \pm 25$  dias de lactação), produção de leite ( $21 \pm 2,6$  Kg), composição do leite (TB:  $36,8 \pm 2,1$  g kg<sup>-1</sup>) e (TP:  $32,2 \pm 1,7$  g kg<sup>-1</sup>) e peso vivo ( $556 \pm 47$  kg).

### **Alimentos**

As vacas foram confinadas em pastagens da Granja Universitária, situadas a uma altitude aproximada de 390 m, que consistiam numa consociação de gramínea-leguminosa, onde as espécies dominantes eram o azevém perene e o trevo branco.

O concentrado utilizado foi constituído por uma mistura de farinha de milho, farinha de cevada e de farinha de peixe, nas proporções de respectivamente, 500:340:160 (g Kg<sup>-1</sup> peso fresco). A farinha de peixe possuía um teor lipídico residual de aproximadamente 4%. O concentrado utilizado no período de suplementação com OP, foi formulado nas proporções de 460:300:160:80 (g Kg<sup>-1</sup> peso fresco), respectivamente por f. milho, cevada, f. peixe e óleo de peixe, de

modo a que cada vaca ingerisse 320 g de OP por dia. Num trabalho anterior, verificámos que a suplementação com OP não exerceu efeito residual sobre os ómeegas n-3 da gordura do leite. Neste ensaio pretendemos testar a inclusão de farinha de peixe no concentrado sobre um eventual efeito residual naqueles ácidos gordos.

### **Maneio e medições**

Recorreu-se ao sistema de pastoreio rotacional, em que o intervalo entre 2 turnos de pastoreio sucessivos foi de aproximadamente 25 dias, onde as vacas pastoreavam a um encabeçamento fixo de 3 vacas por ha. O concentrado foi administrado na sala de ordenha, em partes equitativas, nas ordenhas da manhã e da tarde. Todas as vacas dispuseram de água *ad libitum*.

A avaliação da ingestão individual de erva na pastagem (média por cada período de medições) foi determinada através do método baseado na performance animal (MAFF, 1975). Para tal, teve-se em conta as necessidades em energia metabolizável (EM) dos animais, determinadas pelo somatório das necessidades de manutenção, produção e composição do leite (Tyrrel e Reid, 1965) e variação do peso vivo. A este somatório de necessidades deduziu-se a EM fornecida pelo concentrado, e dividiu-se pelo valor energético da pastagem (EM Kg MS<sup>-1</sup>). Às necessidades de manutenção, acresceu-se 15% para a actividade física no pastoreio e deslocações diárias dentro do plano de maneio estipulado e exposição às condições naturais do meio ambiente.

Foram colhidas amostras de pastagem 2 vezes por dia, uma de manhã e outra à tarde, cortando pequenos bocados de erva do topo da pastagem em 20 sítios ao acaso, durante 2 dias em cada período. O concentrado também foi amostrado durante 2 dias em cada período. As vacas foram pesadas em cada período, durante 2 dias consecutivos, sempre após a ordenha da manhã, nos últimos dias de cada período de medição.

A produção de leite individual (ordenha da manhã e da tarde) dos animais experimentais foi medida durante 5 dias consecutivos, determinados nos 6 períodos. No último dia de cada período de medições, retiraram-se amostras de leite individuais, da ordenha da manhã e da tarde, para análise da gordura e proteína. As amostras foram de seguida misturadas proporcionalmente à produção da manhã e tarde e, prontamente, congeladas para posterior determinação dos ácidos gordos da gordura do leite.

## **Metodologia analítica**

### **Análise química dos alimentos e do leite**

A determinação da Matéria Seca (MS), Cinza Bruta (CB), Proteína Bruta (PB) e Gordura Bruta (GB) dos alimentos foi feita de acordo com a A.O.A.C. (1995). As amostras foram secas a uma temperatura de 65 °C numa estufa com circulação de ar, até peso constante. De seguida, foram moídas num moinho de martelos com crivo de malha de 1mm. A CB foi determinada por incineração numa mufla eléctrica a 550 °C, durante 12 h. O azoto total foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando o selénio como catalizador. A PB foi determinada multiplicando a % N por 6,25. A GB ou Extracto Etéreo (EE) foi extraída com éter de petróleo, por extracção a quente durante 1h 30 minutos, no Soxhlet. A fibra da parede celular vegetal definida pelas fracções do NDF e ADF e a lenhina ADL foram determinadas de acordo com os métodos propostos por Goering e Van Soest (1970). Os teores butírico e proteico do leite foram determinados por infra-vermelhos (Milkoscan 605, Foss Electric, Hillrod, Denmark).

### **Extracção de lípidos em amostras de alimentos**

A composição e quantificação dos AGs nos alimentos foi realizada pelo método da metilação ácida proposto por Sukhija e Palmquist (1988). Fez-se a extracção e transesterificação num só passo com uma solução de HCL metanólica a temperatura elevada.

### **Extracção de lípidos em gordura de leite**

A extracção foi feita segundo o método de Folch *et al.* (1957). Após obtenção do extracto lipídico, fez-se a metilação (transesterificação). Depois da extracção lipídica e ainda antes de os componentes lipídicos poderem ser analisados por cromatografia gasosa, foi necessário convertê-los em derivados não polares e de baixo peso molecular (Christie, 1994).

A solução obtida após a extracção pode conter até cerca de 50mg de lípidos; esta foi diluída em 1ml de tolueno seco num tubo ao qual se adicionou 0,5ml de padrão interno C19:0 metil-éster (2mg/ml). Adicionou-se 2ml de metóxido de sódio em metanol anidro 0,5M. Esta mistura foi deixada a repousar durante uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 0,1ml de ácido acético glacial e 5ml de água ultra-pura à solução. Os ésteres metílicos foram extraídos através de duas lavagens com hexano, sendo adicionados 5 ml de hexano à mistura, que depois foi agitada no vortex e centrifugada durante 5 min. à velocidade de 2500

rpm. Das duas fases obtidas, a fase orgânica foi retirada com ajuda de uma pipeta de Pasteur e colocada num tubo contendo 1g de sulfato de sódio anidro. Ao que restou no tubo, voltou-se a fazer uma segunda lavagem com hexano repetindo o mesmo passo da primeira lavagem e retirando a fase orgânica para o tubo com sulfato de sódio anidro. Depois, fez-se uma centrifugação rápida para separar o hexano do sulfato de sódio anidro, no qual o hexano foi retirado para outro tubo, vai a evaporar em corrente de azoto (N45) a 42 °C até ficar com um volume de 1 a 1,5ml de solução, do qual foi transferido para viais apropriados para análise de cromatografia gasosa.

### **Cromatografia gasosa**

A identificação dos ácidos gordos foi feita tendo como base o seu tempo de saída da coluna (tempo de retenção) e comparando ao tempo de saída de um ácido gordo conhecido. O cromatógrafo utilizado foi um Hewlett Packard HP 5890 A Séries II, equipado com um detector de chama ionizante (FID) e um sistema de injeção automática. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica: CP – Sil 88 (100m x 0,25 x 0,20 mm; Chrompack CP 7489). A fase móvel foi o azoto (N60) e o gás de arraste o hélio. O split ratio foi de 1:20. A temperatura da coluna foi de 175 °C durante 200 min. O injector operava a 250 °C e o detector a 280 °C. Numa primeira fase, os picos dos cromatogramas devem ser identificados de acordo com o tempo de retenção e por comparação com alguns ácidos gordos (Sigma e Matreya), de acordo com o estabelecido pelo esboço da Norma Portuguesa – Documento de Trabalho (1996). Também foram feitas coeluições das amostras com ácidos gordos padrão para identificação correcta dos isómeros do C18:1. Numa segunda fase, procedeu-se à determinação da percentagem de AGs identificados no total de lípidos, também de acordo com o esboço da Norma Portuguesa acima referenciada. Segundo este documento, não é obrigatório o uso de factores de correcção, mas estes devem ser usados quando se pretende uma maior exactidão de resultados.

### **Análise estatística**

O programa de estatística utilizado foi o SAS (1989) – Statistic Analysis System, version 6. Os resultados são apresentados como Médias Quadradas Mínimas (LSM). Os dados foram submetidos a uma análise de variância (medidas repetidas) para avaliar o efeito dos períodos na performance e perfil dos AGs da gordura do leite. A diferença entre médias foi determinada pelo teste de Sheffé.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Composição química e em ácidos gordos dos alimentos

A composição química da pastagem e do concentrado está presente no Quadro I. Os valores da MS da pastagem, foram elevados e aumentaram ao longo do ensaio, devendo considerar-se normais para ervas desta época do ano. A seca que se faz sentir em Julho-Agosto, é factor responsável pelo decréscimo do valor nutritivo da pastagem, estando associada a um aumento significativo na percentagem de massa deiscente, com decréscimo na massa foliar verde e na relação folha/caule. Esta composição da pastagem é responsável pelos valores baixos em PB e EE e elevados em fibra.

A composição em ácidos gordos da pastagem, dos concentrados e do óleo de peixe está presente no Quadro II. O concentrado apresenta teores mais elevados do que a pastagem, nos seguintes AGs: C16:0, C18:0, C18:1 cis-9, C18:2, enquanto a pastagem possui teores mais elevados nos AGs: C14:0; C16:1 cis-9; C18:3. A pastagem é uma boa fonte de ácido linolénico, o alimento concentrado de ácido linoleico e o óleo de peixe em polinsaturados de cadeia longa, sobretudo em C20:5 n-3 e C22:6 n-3, respectivamente EPA e DHA.

O concentrado utilizado neste ensaio, apresenta pequenas concentrações de EPA, DHA e DPA (maior concentração) devido à inclusão de farinha de peixe

Quadro I - COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PASTAGEM E DOS CONCENTRADOS (% de MS).

	Pastagem				Concentrado	
	PEXP	POP	P1,2	P3,4	SOP	COP
MS (g 100 g <sup>-1</sup> )	19,9	18,7	22,2	26,7	87,6	89,8
CB	7,2	8,6	8,5	7,6	3,4	3,1
PB	14,6	16,6	15,5	15,4	15,3	14,2
NDF	63,9	57,9	57,3	57,8	-	-
ADF	35,8	32,2	32,1	32,0	3,1	2,7
ADL	4,2	3,8	4,0	3,6	-	-
GB	1,7	1,9	1,7	1,8	3,7	11,0

MS- matéria seca; CB-cinza bruta; PB-proteína bruta; ADF- fibra insolúvel em detergente ácido; ADL- fibra insolúvel em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; NDF- fibra insolúvel em detergente neutro; GB- gordura bruta; PEXP-período pré-experimental; POP – período suplementação com óleo de peixe; P1, P2, P3, P4 - períodos; SOP- concentrado sem óleo de peixe; COP- com óleo de peixe misturado no concentrado.

na mistura, como fonte de N de baixa degradabilidade retículo-ruminal. O processo de extração dos óleos de peixe por pressão retira fundamentalmente os lípidos de reserva (triglicéridos contidos nas células adiposas), deixando grande parte dos fosfolípidos estruturais na farinha de peixe, mais ricos em ácidos polinsaturados de cadeia longa da família n-3 (Mateos *et al.*, 1996). Assim, a composição em AGs dos lípidos contidos nos óleos e na farinha de peixe são diferentes, como pode ser inferido da análise do Quadro II.

### Performance animal

Os resultados referentes ao efeito do tratamento e períodos de amostragem sobre a estimativa da ingestão e dos diversos parâmetros da produção animal estão presentes no Quadro III. A suplementação com óleo de peixe decresceu significativamente na estimativa da ingestão ( $P < 0,05$ ), relativamente ao período pré-experimental em aproximadamente 15%. Esta tendência é consistente com resultados de outros autores com rações completas de mistura (Doreau e Chilliard, 1997; Whitlock *et al.*, 2002) ou com dietas à base de silagem de erva

Quadro II – COMPOSIÇÃO DOS AGs (g 100g<sup>-1</sup> AGs) DA PASTAGEM (MÉDIA POR PERÍODOS), CONCENTRADO COM ÓLEO DE PEIXE(COP) E DO ÓLEO DE PEIXE.

	Pastagem	Concentrado	COP	Óleo Peixe
C14:0	16,15	1,97	4,56	6,11
C16:0	9,26	16,9	16,3	15,4
C16:1 cis-9	1,09	0,95	4,87	7,05
C18 :0	0,87	3,49	3,18	2,76
C18:1 cis-9	14,95	21,2	13,7	9,94
C18:2 n-6	8,99	45,36	29,68	1,46
C20:0	-	-	-	0,24
C18:3 n-3	33,9	2,47	2,98	3,81
C20:4 n-6	-	-	-	1,05
C20:4 n-3	-	-	-	1,04
C20:5 n-3 (EPA)	-	0,99	9,11	14,51
C22:5 n-3 (DPA)	-	3,93	2,65	1,85
C22:6 n-3 (DHA)	-	1,26	9,88	14,71
Outros	27,7	3,01	17,2	19,28

COP- concentrado com óleo de peixe misturado

(Keady *et al.*, 2000). Donovan *et al.* (2000) referem uma diminuição na ingestão de MS de 19 e 32,2 % para inclusões de respectivamente 2 e 3% de OP na dieta de vacas leiteiras, sugerindo que o decréscimo na ingestão aumenta em função da quantidade de OP suplementada. A penalização na ingestão é maior quando o OP é infundido no rúmen do que quando é infundido no abomaso (Doreau e Chilliard, 1997). Contudo, e de acordo com estes autores, a infusão no abomaso decresceu 10% na ingestão, sugerindo a existência de um efeito metabólico. O decréscimo na ingestão associado ao decréscimo na degradação ruminal da fibra parece pouco provável, porque a suplementação com OP aumenta a digestibilidade da MO e da fibra da dieta (Doreau e Chilliard, 1997; Keady *et al.*, 2000). É possível que o processo de biohidrogenação dos AGs de cadeia muito longa presentes no OP, produzam AGs específicos que inibem a ingestão. Parece razoável admitir-se que o OP decresce na ingestão por acção de efeitos específicos no ecossistema retículo-ruminal e no metabolismo do animal.

A suplementação com OP decresceu ligeiramente na produção de leite, sem contudo atingir a significância estatística. Como os animais experimentais estavam numa fase avançada da lactação e a disponibilidade de pastagem decresceu, a produção de leite baixou linearmente ao longo do ensaio, com especial relevo para o último período de colheita. Estes resultados vêm confirmar estudos realizados por Donovan *et al.* (2000) e Whitlock *et al.* (2002), nos quais

Quadro III – EFEITO DO TRATAMENTO SOBRE A ESTIMATIVA DA INGESTÃO (kg MS dia<sup>-1</sup>) E PERFORMANCE ANIMAL

	PEXP	POP	P1	P2	P3	P4	EPM
Ingestão	16,4 <sup>a</sup>	13,9 <sup>bc</sup>	15,9 <sup>ab</sup>	14,3 <sup>abc</sup>	15,2 <sup>ab</sup>	13,0 <sup>bc</sup>	0,24
PL (kg dia <sup>-1</sup> )	21,0 <sup>a</sup>	19,4 <sup>ab</sup>	19,9 <sup>ab</sup>	18,1 <sup>b</sup>	18,3 <sup>b</sup>	14,8 <sup>c</sup>	0,22
TB (g kg <sup>-1</sup> )	36,8 <sup>ac</sup>	23,6 <sup>b</sup>	33,1 <sup>a</sup>	36,2 <sup>ac</sup>	36,1 <sup>ac</sup>	39,6 <sup>c</sup>	0,87
PG (g dia <sup>-1</sup> )	759 <sup>a</sup>	452 <sup>b</sup>	686 <sup>ac</sup>	610 <sup>abc</sup>	657 <sup>ac</sup>	522 <sup>c</sup>	19,86
TP (g dia <sup>-1</sup> )	32,2	30,3	31,3	30,7	31,7	32,8	0,29
PP (g dia <sup>-1</sup> )	664 <sup>a</sup>	579 <sup>a</sup>	654 <sup>ab</sup>	518 <sup>bc</sup>	575 <sup>ab</sup>	429 <sup>c</sup>	15,90
PV (kg)	556	551	548	556	568	561	5,07

PL – produção leite; TB – teor butiroso; PG – produção gordura; TP – teor proteico; PP – produção de proteína; PV – peso vivo; Kg – kilos; g – gramas; PEXP – período pré-experimental; POP – período óleo de peixe; P1,P2,P3,P4 – períodos; EPM – erro padrão da média; Médias com índices diferentes (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>) apresentam diferenças significativas entre si (P<0,05)

referem que a tendência da produção de leite é baixar a elevadas quantidades de suplementação com OP. Em contraste, Chilliard e Doreau (1997 b) e Keady *et al.* (2000) apresentaram aumentos significativos na produção de leite, mesmo em casos em que a ingestão voluntária decresceu, o que sugere que a eficiência alimentar poderá ter aumentado, devido provavelmente ao aumento da digestibilidade da MO e ou do valor energético da dieta por influência do OP. Neste contexto, Doreau e Chilliard (1997) e Keady *et al.* (2000), apresentaram resultados inesperados, que referem aumentos significativos na digestibilidade da MO e do NDF de dietas baseadas em silagens de milho e de erva ministradas a vacas leiteiras, em associação directa com a inclusão de OP.

A suplementação com OP exerceu efeito significativo muito acentuado sobre o teor butíroso do leite, provocando um decréscimo de 13,2 g kg<sup>-1</sup>. Num ensaio realizado na pastagem, com um nível de suplementação igual, com óleo de sardinha, o decréscimo na gordura do leite foi 11,4 g kg<sup>-1</sup> (Rego *et al.*, 2005). O forte efeito depressivo sobre o teor butíroso do leite de vaca provocado pela suplementação com OP, é um dado adquirido, como revisto por Chilliard *et al.* (2001). Após a retirada do OP da dieta o TB aumentou para valores semelhantes ao período pré-experimental, aumentando significativamente ( $P < 0,05$ ) no último período de colheita, provavelmente devido ao efeito duma menor diluição num menor volume de leite. Por este resultado, poderemos concluir que o efeito residual do OP sobre o TB do leite não se fez sentir, já que 10 dias após a sua retirada da dieta o TB voltou para um valor idêntico ao do período pré-experimental. Certos autores referem que esta diminuição no TB do leite se deverá a uma variedade de mecanismos que podem afectar a síntese de gordura na glândula mamária, dos quais podemos referir a baixa eficiência na transferência dos AGs de cadeia longa do OP para o leite (Givens *et al.*, 2000), à redução da capacidade de captação de outros AGs pela glândula mamária devido à acção destes AGs existentes no OP (Storry *et al.*, 1974) e ao decréscimo na síntese de novo dos AGs de cadeia curta e média na glândula mamária (Chilliard e Doreau, 1997a).

Neste trabalho, a adição de OP à dieta não exerceu efeito significativo sobre o TP do leite, que se manteve constante nos diversos períodos de colheita ao longo do ensaio (Fig. 1). Contrariamente ao verificado neste ensaio, a inclusão de OP na dieta de vacas leiteiras tende a decrescer o TP do leite (Cant *et al.*, 1997; Offer *et al.*, 1999). Este decréscimo parece ser proporcional à quantidade de OP suplementada (Keady *et al.*, 2000; Rego *et al.*, 2005). Esta diminuição no TP do leite é sobretudo devida à fracção da caseína, e a suplementação com

metionina protegida, de uma dieta com OP restabelece o TP e a caseína do leite para valores idênticos ao tratamento controle (Chilliard e Doreau, 1997b). Este efeito negativo do OP sobre o TP do leite, verificou-se sobretudo em ensaios onde a ingestão voluntária foi negativamente afectada, provavelmente na sequência de alterações das fermentações ruminais com diminuição da síntese de proteína microbiana. Outros trabalhos (AbuGhazalech *et al.*, 2002; Whitlock *et al.*, 2002), não encontraram um efeito significativo da adição de OP sobre o TP do leite.

Os teores butírico e proteico do leite, estão ilustrados na Fig. 1, para uma melhor visualização da sua evolução ao longo dos diversos períodos de colheita. A produção de sólidos (gordura e proteína) é o reflexo da sua concentração no leite e da produção de leite. Assim, a produção de gordura decresceu 307 g dia<sup>-1</sup> em associação com a adição de OP à dieta, voltando aos valores normais 10 dias após a sua retirada da dieta. A produção de proteína apresentou uma evolução semelhante ao decréscimo verificado na produção de leite.

Os tratamentos não exerceram efeito significativo sobre o peso vivo dos animais experimentais, embora se verifique uma tendência para decrescer associado ao efeito da suplementação com o OP, provavelmente na sequência do seu efeito inibidor sobre a ingestão voluntária.

### Composição dos AGs da gordura do leite

A composição dos ácidos gordos da gordura do leite está presente no Quadro IV. Genericamente podemos inferir da sua observação, que a suplemen-

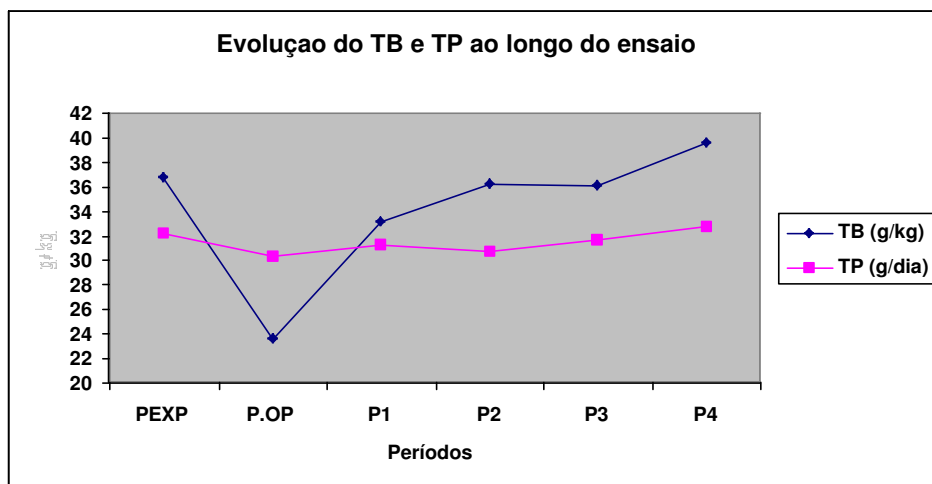


Figura 1 – Evolução dos teores butírico (TB) e proteico (TP) do leite ao longo dos períodos.

tação com OP diminui significativamente ( $P < 0,05$ ) as concentrações na gordura do leite de todos os AGs de cadeia curta (C6 a C12) e as concentrações dos AGs saturados de cadeia média (mirístico, C14:0 e palmítico, C16:0). Estes resultados são indicativos que o OP inibe a síntese *de novo* na glândula mamária dos AGs de cadeia curta e média saturados. A concentração de ácido esteárico (C18:0) decresceu significativamente ( $P < 0,05$ ) em associação com a suplementação com OP. A adição de OP não provocou um decréscimo na concentração do ácido oleico (C18:1, *cis*-9) neste ensaio, como seria de esperar em função dos resultados da bibliografia (revisão de Chilliard *et al.*, 2001). De um modo geral, esta suplementação com OP provocou acréscimos significativos em alguns AGs de cadeia média (C16:1 *cis*-9; C17:0; C17:1) e incrementou significativamente ( $P < 0,05$ ) dos diversos isómeros *cis/trans* do ácido oleico, com especial relevo para o ácido *trans*-vacénico (C18:1, *trans*-11 - TVA). A suplementação com óleo de peixe aumentou significativamente ( $P < 0,05$ ) as concentrações de CLA na gordura do leite (1,27 para 2,42 g 100 g<sup>-1</sup> AGs) e dos ómegas n-3, principalmente as concentrações de EPA, DHA e do C18:3 n-3.

Em relação aos AGs de cadeia curta e média na gordura (C6:0 a C16:0) do leite verifica-se uma grande diminuição após a suplementação com OP, confirmando resultados de ensaios anteriores (Donovan *et al.*, 2000; Keady *et al.*, 2000), a qual sugere que a diminuição da síntese *de novo* na glândula mamária dos AGs de cadeia curta e média dever-se-á ao efeito inibidor da presença de AGs de cadeia longa e muito longa ( $> C20$ ) presentes no OP (Chilliard *et al.*, 2000).

O decréscimo na concentração do ácido esteárico na gordura do leite, por efeito da suplementação com OP, é confirmado por dados de outros autores (Baer *et al.*, 2001; Chilliard *et al.*, 2001; Whitlock *et al.*, 2002). A produção de ácido esteárico no rumen diminui em dietas suplementadas com OP, que inibe a acção das bactérias do grupo B, responsáveis pela biohidrogenação do TVA a ácido esteárico (AbuGhazaleh *et al.*, 2002).

Em relação a alguns totais parciais (Quadro V) pode-se verificar que neste ensaio aumentam significativamente os níveis de AGs monoinsaturados (total C18:1) e o total de ómegas n-3, no período de suplementação com OP, enquanto a fracção dos hipercolesterolémicos diminui, o que vem melhorar o perfil dos AGs no que concerne ao valor dietético do leite.

Um dos objectivos deste estudo foi o de examinar a duração do efeito do óleo de peixe nos períodos seguidos à sua suplementação, principalmente sobre o conteúdo em CLA e ómegas-3 da gordura do leite.

Da análise da Fig. 2, é possível verificar a evolução do efeito da suplementação com óleo de peixe no conteúdo em CLA e TVA (C18:1 trans-11) nos vários períodos registados. Pode-se constatar que as concentrações de CLA

Quadro IV – EFEITO SOBRE O PERFIL DOS ÁCIDOS GORDOS DA GORDURA DO LEITE (g 100g<sup>-1</sup> AGs).

	PEXP	POP	P1	P2	P3	P4	EPM
C6:0	1,47 <sup>b</sup>	1,18 <sup>a</sup>	1,48 <sup>b</sup>	1,39 <sup>b</sup>	1,42 <sup>b</sup>	1,19 <sup>a</sup>	0,043
C8:0	0,92 <sup>d</sup>	0,55 <sup>a</sup>	0,88 <sup>d</sup>	0,81 <sup>c</sup>	0,91 <sup>d</sup>	0,70 <sup>b</sup>	0,023
C10:0	2,07 <sup>d</sup>	1,18 <sup>a</sup>	2,01 <sup>d</sup>	1,83 <sup>c</sup>	2,02 <sup>d</sup>	1,47 <sup>b</sup>	0,059
C12:0	2,57 <sup>d</sup>	1,63 <sup>a</sup>	2,51 <sup>d</sup>	2,29 <sup>c</sup>	2,55 <sup>d</sup>	1,87 <sup>b</sup>	0,066
C14:0	10,6 <sup>c</sup>	7,84 <sup>a</sup>	10,55 <sup>c</sup>	9,77 <sup>b</sup>	10,58 <sup>c</sup>	8,29 <sup>a</sup>	0,186
C15:0	1,28 <sup>c</sup>	1,05 <sup>ab</sup>	1,39 <sup>c</sup>	1,06 <sup>b</sup>	1,37 <sup>c</sup>	0,93 <sup>a</sup>	0,045
C16:0	25,7 <sup>b</sup>	23,8 <sup>a</sup>	27,8 <sup>c</sup>	25,5 <sup>b</sup>	28,0 <sup>c</sup>	23,4 <sup>a</sup>	0,473
C16:1 cis-9	1,95 <sup>a</sup>	2,24 <sup>c</sup>	2,13 <sup>bc</sup>	1,97 <sup>ab</sup>	2,06 <sup>ab</sup>	2,0 <sup>ab</sup>	0,057
C17:0	0,70 <sup>a</sup>	0,79 <sup>b</sup>	0,72 <sup>a</sup>	0,83 <sup>b</sup>	0,70 <sup>a</sup>	0,83 <sup>b</sup>	0,015
C18:0	12,1 <sup>b</sup>	9,49 <sup>a</sup>	9,96 <sup>a</sup>	12,6 <sup>b</sup>	10,3 <sup>a</sup>	13,1 <sup>b</sup>	0,357
Isómeros C18:1							
trans-6 a -8	0,30 <sup>a</sup>	0,42 <sup>b</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,29 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>	0,030
trans-9	0,24 <sup>a</sup>	0,54 <sup>a</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,24 <sup>a</sup>	0,23 <sup>a</sup>	0,29 <sup>a</sup>	0,031
trans-10	0,24 <sup>a</sup>	0,59 <sup>b</sup>	0,34 <sup>a</sup>	0,38 <sup>a</sup>	0,41 <sup>a</sup>	0,36 <sup>a</sup>	0,060
trans-11	2,39 <sup>a</sup>	4,08 <sup>b</sup>	2,64 <sup>a</sup>	2,07 <sup>a</sup>	2,25 <sup>a</sup>	2,54 <sup>a</sup>	0,218
trans-12	0,30 <sup>a</sup>	0,90 <sup>b</sup>	0,32 <sup>a</sup>	0,27 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,063
cis-9	23,6 <sup>bc</sup>	23,3 <sup>abc</sup>	22,3 <sup>ab</sup>	24,1 <sup>c</sup>	22,1 <sup>a</sup>	26,6 <sup>d</sup>	0,49
cis-11	0,18 <sup>a</sup>	0,51 <sup>b</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,18 <sup>a</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,22 <sup>a</sup>	0,050
cis-12	0,43 <sup>ab</sup>	0,56 <sup>c</sup>	0,38 <sup>a</sup>	0,48 <sup>abc</sup>	0,43 <sup>ab</sup>	0,51 <sup>bc</sup>	0,037
cis-13	0,08 <sup>a</sup>	0,11 <sup>b</sup>	0,09 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0,09 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0,005
C18:2 n-6	0,99 <sup>ab</sup>	0,95 <sup>a</sup>	1,05 <sup>bc</sup>	1,10 <sup>cd</sup>	1,08 <sup>cd</sup>	1,16 <sup>d</sup>	0,029
C20:0	0,26 <sup>b</sup>	0,47 <sup>d</sup>	0,23 <sup>ab</sup>	0,29 <sup>c</sup>	0,22 <sup>a</sup>	0,31 <sup>c</sup>	0,013
C18:3 n-3	0,51 <sup>a</sup>	0,74 <sup>c</sup>	0,57 <sup>b</sup>	0,55 <sup>ab</sup>	0,59 <sup>b</sup>	0,54 <sup>ab</sup>	0,018
CLA	1,27 <sup>ab</sup>	2,42 <sup>c</sup>	1,53 <sup>b</sup>	1,14 <sup>a</sup>	1,38 <sup>ab</sup>	1,31 <sup>ab</sup>	0,106
C20:4 n-6	0,07 <sup>a</sup>	0,11 <sup>cd</sup>	0,08 <sup>ab</sup>	0,13 <sup>d</sup>	0,09 <sup>bc</sup>	0,09 <sup>ab</sup>	0,007
C20:4 n-3	0,02 <sup>a</sup>	0,10 <sup>c</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,04 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,006
C20:5 n-3 (EPA)	0,07 <sup>a</sup>	0,15 <sup>b</sup>	0,14 <sup>b</sup>	0,14 <sup>b</sup>	0,11 <sup>ab</sup>	0,11 <sup>ab</sup>	0,010
C22:5 n-3 (DPA)	0,10 <sup>a</sup>	0,16 <sup>cd</sup>	0,14 <sup>bcd</sup>	0,17 <sup>d</sup>	0,12 <sup>ab</sup>	0,14 <sup>bc</sup>	0,010
C22:6 n-3 (DHA)	0,06 <sup>a</sup>	0,13 <sup>cd</sup>	0,15 <sup>de</sup>	0,16 <sup>e</sup>	0,10 <sup>b</sup>	0,11 <sup>bc</sup>	0,008
Outros	7,21 <sup>a</sup>	11,8 <sup>b</sup>	7,70 <sup>a</sup>	7,95 <sup>a</sup>	7,11 <sup>a</sup>	7,53 <sup>a</sup>	0,351

EPM – erro padrão da média; Médias com índices diferentes (a, b, c, d) apresentam diferenças significativas entre si (P<0,05); PEXP- período pré-experimental antes da suplementação com óleo de peixe; POP-período suplementação com óleo de peixe; P1,P2,P3,P4 – períodos.

e TVA sofrem uma evolução praticamente paralela, com um grande aumento após a suplementação com OP, baixando nos períodos seguintes para valores semelhantes ao período pré-experimental. Esta evolução média é semelhante entre as concentrações de TVA e CLA na gordura do leite e demonstra a relação precursor:produto entre estes AGs na glândula mamária. O OP é mais eficaz do que iguais quantidades de óleos vegetais, em acrescer na concentração de CLA na gordura do leite (Chilliard *et al.*, 2000). Não sendo o OP uma boa fonte de AGs polinsaturados em C18, actua sobre o processo de biohidrogenação inibindo a conversão do TVA em ácido esteárico, de modo que o primeiro se acumula no rúmen em quantidades consideráveis, sendo posteriormente utilizado na glândula mamária como precursor para a síntese endógena de CLA (Griinari *et al.*, 2000).

Este paralelismo entre os dois AGs é confirmado pela forte relação encontrada entre eles ( $R^2=0,834$ ;  $P<0,05$ ;  $n=48$ ), presente na Fig. 3. Esta relação entre o TVA e o CLA na gordura do leite é confirmada por diversos autores, para uma enorme variedade de dietas (revisão de Chilliard *et al.*, 2001). Esta relação reflecte a síntese endógena de CLA na glândula mamária e uma relação precursor/produto entre estes dois AGs. Estudos de infusão pós-ruminal, com vacas leiteiras, sugerem que sensivelmente 65 % do CLA presente na gordura do leite é sintetizado na glândula mamária por acção da  $\Delta^9$ -desaturase, utilizando o TVA como precursor (Griinari *et al.*, 2000).

Quadro V – EFEITO SOBRE OS SOMATÓRIOS PARCELARES DE CLASSES DE ÁCIDOS GORDOS DA GORDURA DO LEITE (g 100 g<sup>-1</sup> AGs).

	PEXP	POP	P1	P2	P3	P4	EPM
Total C18	39,8 <sup>a</sup>	40,5 <sup>a</sup>	36,8 <sup>b</sup>	40,6 <sup>a</sup>	36,4 <sup>b</sup>	44,2 <sup>c</sup>	0,526
Total C18:1	27,8 <sup>a</sup>	31,0 <sup>b</sup>	26,9 <sup>a</sup>	28,1 <sup>a</sup>	26,2 <sup>a</sup>	31,0 <sup>b</sup>	0,473
Total n-6	1,25 <sup>c</sup>	1,06 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>	1,13 <sup>ab</sup>	1,22 <sup>c</sup>	1,17 <sup>bc</sup>	0,031
Total n-3	0,75 <sup>a</sup>	1,18 <sup>b</sup>	0,99 <sup>c</sup>	1,02 <sup>c</sup>	0,92 <sup>c</sup>	0,89 <sup>c</sup>	0,026
Hipercolesterolémicos	38,9 <sup>ac</sup>	33,3 <sup>b</sup>	40,9 <sup>a</sup>	37,6 <sup>ac</sup>	41,1 <sup>a</sup>	33,6 <sup>b</sup>	0,616
Hipocolesterolémicos	26,6 <sup>a</sup>	27,8 <sup>a</sup>	25,8 <sup>a</sup>	27,3 <sup>ab</sup>	25,4 <sup>a</sup>	30,0 <sup>b</sup>	0,442
Relação CLA/trans11	0,53 <sup>a</sup>	0,60 <sup>b</sup>	0,58 <sup>ab</sup>	0,55 <sup>a</sup>	0,60 <sup>b</sup>	0,51 <sup>a</sup>	0,021

EPM – erro padrão da média; Médias com índices diferentes (a, b, c, d) apresentam diferenças significativas entre si ( $P<0,05$ ); PEXP- período pré-experimental antes da suplementação com óleo de peixe; POP- período de suplementação com óleo de peixe; P1,P2,P3,P4 – períodos; Hipercolestrerolémicos (C12:0 + C14:0 + C16:0); Hipocolestrerolémicos (n-3 + n-6 + C18:1 cis-9, CLA);



Os limites inferior e superior nas concentrações de CLA na gordura do leite das vacas, foi de 0,83–2,06 e 1,72-3.04 g 100 g<sup>-1</sup> AGs, respectivamente no período pré-experimental e de suplementação com OP. Esta ampla variação individual nos teores em CLA da gordura do leite, com diferentes dietas é confirmada por

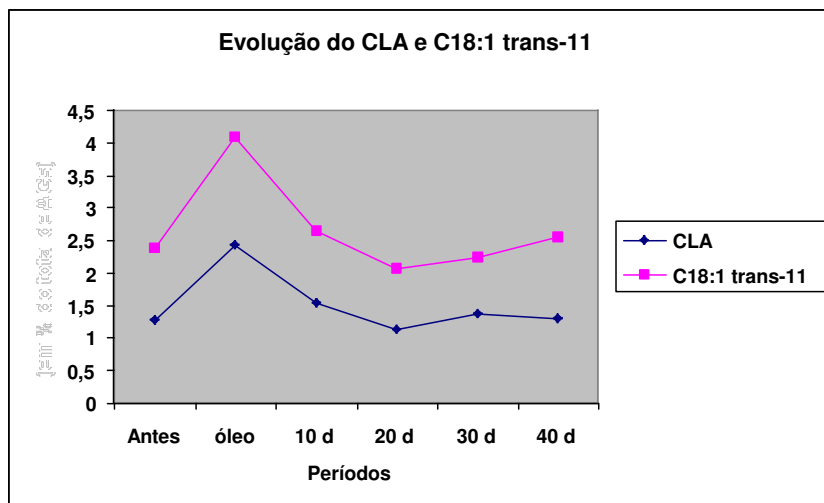


Figura 2 –Evolução das concentrações na gordura do leite em CLA e TVA (C18:1 trans-11) ao longo dos períodos.

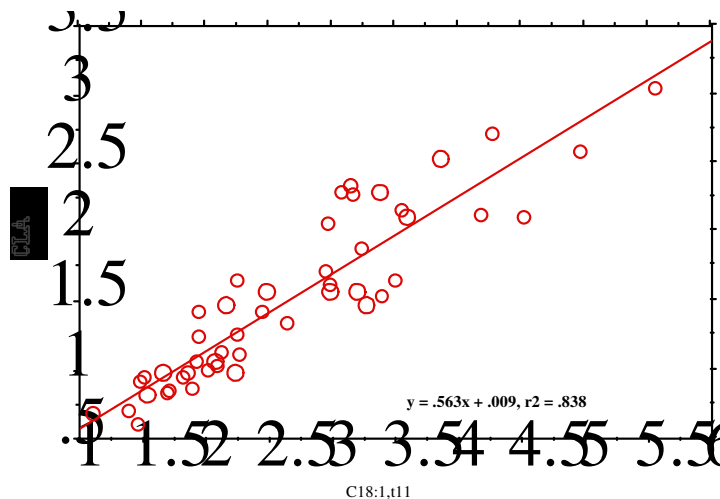


Figura 3 – Relação entre as concentrações na gordura do leite de TVA (C18:1,t11) e de CLA (n=48).

resultados de Rego *et al.* (2004). Verificamos ainda neste ensaio, que alguns animais respondem melhor do que outros à suplementação com OP, provavelmente por diferenças individuais nos padrões de biohidrogenação ruminal e na actividade da enzima  $\Delta^9$ -desaturase na glândula mamária. A Fig. 4 representa a evolução nas concentrações médias de EPA, DPA e DHA ao longo do ensaio.

Verifica-se que existe um efeito residual da suplementação com OP, sobre as concentrações dos 3 AGs na gordura do leite, que persiste, por um período de até 40 dias após a sua retirada da dieta das vacas. A persistência residual do efeito OP neste ensaio, poderá ter sido mascarada pelo facto de no alimento concentrado ter sido incorporado farinha de peixe, que possui AGs de cadeia muito longa na sua composição, embora em pequenas quantidades.

A eficiência de transferência do EPA e do DHA do OP para a gordura do leite foi muito baixa neste ensaio, sendo contudo, superior para o DPA. Foi de 1,5% para o EPA e DHA e de 8,5% para o DPA. Os valores de transferência deste ensaio, são inferiores aos apresentados por Chilliard *et al.* (2001), que apontam para valores de 4% para EPA e DHA e de 30% para o DPA. Esta baixa transferência do EPA e DHA do OP para a gordura do leite, deve-se à biohidrogenação ruminal destes AGs e à sua incorporação preferencial nos fosfolípidos e ésteres de colesterol, substratos pouco utilizados na glândula mamária, em comparação relativa com os triglicerídeos (Offer *et al.*, 1999).

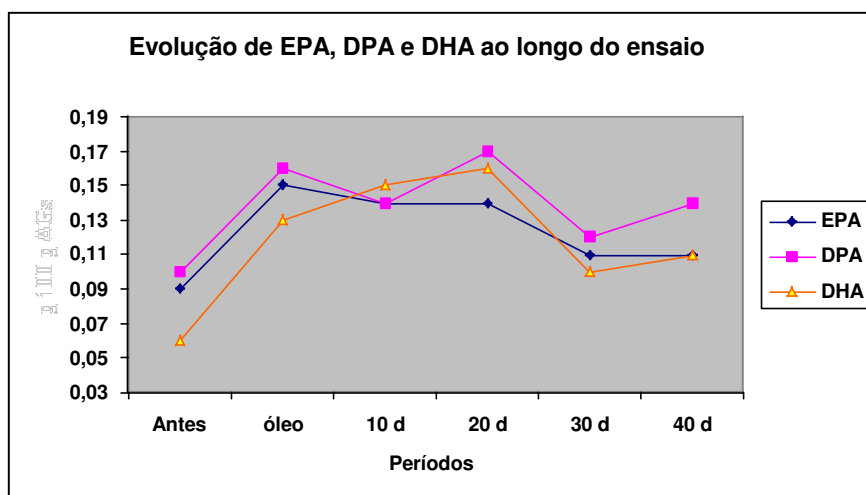


Figura 4– Evolução das concentrações na gordura do leite em EPA, DPA e DHA ao longo dos períodos.

No Quadro VI apresentamos uma matriz de correlações de alguns AGs entre si e com o TB do leite, referentes a dados do período pré-experimental e de suplementação com OP (n=16). Os AGs de cadeia curta e média (C6 a C16:0) e o ácido esteárico apresentam uma elevada correlação positiva com o TB do leite, enquanto para os AGs de cadeia longa e muito longa (C18:1 a C22:6) a correlação com o TB é negativa e de grandeza média, com excepção dos AGs oleico e linoleico. Estas correlações positivas entre o TB do leite e os AGs de cadeia curta e média e negativas com os AGs de cadeia longa, nomeadamente TVA, CLA, EPA, foram confirmadas por resultados recentes de Lóor *et al.* (2003), em estudos com vacas suplementadas com OP.

Quadro VI – MATRIZ DE CORRELAÇÕES ENTRE ALGUNS AGs DA GORDURA DO LEITE E O TEOR BUTIROSO (n=16).

	TB	C8:0	C12:0	C16:0	C18:0	C18:1,t10	C18:1,t11	CLA
C8:0	0,90							
C12:0	0,905	0,99						
C16:0	0,545	0,56	0,60					
C18:0	0,78	0,78	0,80	0,34				
C18:1,t10	- 0,57	- 0,42	- 0,46	- 0,25	- 0,75			
C18:1,t11	- 0,69	- 0,66	- 0,68	- 0,62	- 0,74	0,73		
CLA	- 0,81	- 0,85	- 0,86	- 0,63	- 0,88	0,68	0,905	
EPA	- 0,67	- 0,655	- 0,67	- 0,33	- 0,73	0,74	0,715	0,70

Todos os coeficientes de correlação superiores a 0,50 são significativos (P<0,05).

## CONCLUSÕES

Dos resultados deste ensaio conclui-se que a suplementação com 320 g de OP de vacas leiteiras em pastoreio não afecta a produção de leite e o teor proteico. O efeito sobre o decréscimo no teor butiroso do leite é muito eficiente, o que num futuro próximo poderá vir a revelar-se uma vantagem, relacionada com a qualidade do leite e com o problema de imposição da quota leiteira. A suplementação com OP exerce uma profunda alteração sobre o perfil dos AGs da gordura do leite, enriquecendo-a em componentes bioactivos desejáveis, como os conjugados do ácido linoleico (CLA) e ómegas da família n-3 e diminuindo na fracção hipercolesterémica, aumentando eventualmente o seu valor dietético junto dos consumidores mais esclarecidos.

---

**BIBLIOGRAFIA**

- ABUGHAZALEH, A. A., SCHINGOETHE, D. J., HIPPEN, A. R., KALSCHEUR, K. F. e WHITLOCK, L. A., 2002. Fatty acid profiles of milk and digesta from cows fed fish oil, extruded soybeans or their blend. *J. Dairy Sci.*, 85:2266-2276.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 1995. *Official Methods of Analysis*. 16 th., Arlington, VA, 33.
- BAER, R. J., RYALI, J., SCHINGOETHE, D. J., KASPERSON, K. M., DONOVAN, D. C., HIPPEN, A.R. e FRANKLIN, S.T., 2001. Composition and properties of milk and butter from cows fed fish oil. *J. Dairy Sci.*, 84:345-353.
- BESSA, R.J.B., SANTOS-SILVA, J., RIBEIRO, J.M.R. e PORTUGAL, A.V., 2000. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers, *Liv. Prod. Sci.*, 63:201-211.
- CANT, J. P., FREDEEN, A. H., MACINTYRE, T., GUNN, J. e CROWE, N., 1997. Effect of fish oil and monensin on milk composition in dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.*, 77:125-131.
- CHILLIARD, Y. e DOREAU, M., 1997a. Effects of ruminal or postruminal fish oil supply on cow milk yield and composition. *Reprod. Nut. Develop.*, 37:338-339.
- CHILLIARD, Y. e DOREAU, M., 1997b. Influence of supplementary fish oil and rumen-protected methionine on milk yield and composition in dairy cows. *J. Dairy Re.*, 64:173-179.
- CHILLIARD, Y., FERLAY, A. e DOREAU, M., 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Liv. Prod. Sci.*, 70:31-48.
- CHILLIARD, Y., FERLAY, A., MANSBRIDGE, R.M. e DOREAU, M., 2000. Ruminant milk fat plasticity nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.*, 49: 181-205.
- CHRISTIE, W. W., 1994. The preparation of derivatives of fatty acids, *Gas chromatography and lipids – A practical guide*, Cap. 4, The Oily Press, Glasgow, Scotland, UK, pp.64-84.
- DAVIGLUS, M.L., STAMLER, J., ORENICA, A.J., DYER, A.R., LIU, K., GREENLAND, P., WALSH, M.K., MORRIS, D. e SHEKELE, R.B., 1997. Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *New England J. Med.*, 336:1046-1053.
- DONOVAN, D.C., SCHINGOETHE, D.J., BAER, R. J., RYALI, J., HIPPEN, A.R. e FRANKLIN, S.T., 2000. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 83:2620-2628.
- DOREAU, M. e CHILLIARD, Y., 1997. Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. *Reprod. Nut. Develop.*, 37:113-124.
- FOLCH, J., LEES, M. e STANLEY, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226:497-509.
-

- GIVENS, D.I., COTTRILL, B.R., DAVIES, M., LEE, P.A., MANSBRIDGE, R.J. e MOSS, A.R., 2000. Sources of n-3 polyunsaturated fatty acids additional to fish oil for livestock diets. *Nut. Abstr. and Rev. B* 70:1-19.
- GOERING, H.K. e VAN SOEST, P.J., 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some application). USDA Agric. Handbook nº379. Washington, DC, ARS, USA.
- GRIINARI, J.M. e BAUMAN, D.E., 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acids and its incorporation into meat and milk. In: "Advances in Conjugated Linoleic Acid Research". Vol. 1. Eds. M.P. Yuracez, M.M. Mossoba, J.K.G. Kramer, M.W. Pariza, G. Nelson. By AOCS Press, Champaign, IL. pp. 180-200.
- GRIINARI, J.M., CORL, B.A., LACY, S.H., CHOUINARD, P.Y., NURMELA, K.V.V. e BAUMAN, D.E., 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized in lactating dairy cows by  $\Delta^9$ -desaturase. *J. Nutr.*, 130:2285-2291.
- IP, C., BANNI, S., ANGIONI, E., CARTA, G., MCGINLEY, J., THOMPSON, H.J., BARBANO, D. e BAUMAN, D.E., 1999. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.*, 129:2135-2142.
- KEADY, T.W.J., MAYNE, C.S. e FITZPATRICK, D.A., 2000. Effects of supplementation of dairy cattle with fish oil on silage intake, milk yield and milk composition. *J. Dairy Res.*, 67:137-153.
- LOOR, J.J., CHARDIGNY, J.M., CHABROT, J., DOREAU, M., OLLIER, A., SEBEDIO, J.L. e CHILLIARD, Y., 2003. Trans-fatty acids (TFA), CLA isomers and milk fat depression (MFD) in dairy cows receiving incremental doses of fish oil. ADSA and ASAS Joint Annual Meeting (Abstract).
- MAFF, 1975. Energy allowances and feeding systems for ruminants. Technical Bulletin nº33. London. HMSO, U.K.
- MATEOS, G.G., REBOLLAR, P.G. e MEDEL, P., 1996. Utilization de grasas y productos lipidicos en alimentacion animal: Grasas y mezclas. In: Avances en nutrición y alimentación animal. XII Curso de Especialization-FEDNA. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutricion Animal. Madrid, 7 y 8 de Noviembre de 1996, 56 p.
- NEY, D.M. 1991. Potential for enhancing the nutritional properties of milk fat. *J. Dairy Sci.*, 74:4002-4010.
- NORMA PORTUGUESA – DOCUMENTO DE TRABALHO, 1996. Óleos e gorduras de origem animal e vegetal – análise por cromatografia em fase gasosa de ésteres metílicos de ácidos gordos (ISO 5508:1990).
- OFFER, N. W., MARSDEN, M., DIXON, J., SPEAKE, B. K. e THACKER, F. E., 1999. Effect of dietary fat supplements on levels of n-3 poly-unsaturated fatty acids, trans fatty acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. *Anim. Sci.*, 69: 613-625.

- REGO, O.A., PORTUGAL, P., SOUSA, M., ROSA, H., VOUZELA, C., BORBA, A.E.S. e BESSA, R.J.B., 2004. Effect of diet on milk fatty acid pattern from dairy cows. *Anim. Res.* 53: 213-220.
- REGO, O.A., ROSA, H.D., PORTUGAL, V., CORDEIRO, R., BORBA, A.S., VOUZELA, C. e BESSA, R.B., 2005. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid, omega-3 and other fatty acids in milk fat from grazing dairy cows. *Liv. Prod. Sci.* (in press).
- SALMINEN, I., MUTANEN, M., JAUHAINEN, M. e ARO, A., 1998. Dietary trans fatty acids and increase in conjugated linoleic acid levels in human serum, *Nutr. Biochem.*, 9: 93-98.
- SAS Institute Inc., 1989. *SAS/STAT User's Guide*, Version 6, 4<sup>th</sup> ed. SAS Institute, Cary, NC.
- STORRY, J.E., BRUMBY, P.E., HALL, A.J. e TUCKLEY, B., 1974. Effects of free and protected forms of codliver oil on milk fat secretion in the dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 57:1046-1049.
- SUKHIJA, P.S. e PALMQUIST, D.L., 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.*, 36:1202-1206.
- TYRELL, H.F. e REID, J.T. 1965. Prediction of energy value of cows milk. *J. Dairy Sci.*, 48: 1215-1223.
- WHITLOCK, L.A., SCHINGOETHE, D.J., HIPPEN, A.R., KALSCHEUR, K.F., BAER, R.J., RAMASWAMY, N. e KASPERSON, K.M., 2002. Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acids in milk of dairy cows more than when fed separately. *J. Dairy Sci.*, 85:234-243.
- WILLET, W.C., 1997. Specific fatty acids and risks of breast and prostate cancer: dietary intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66:1557-1563.



## STUDY OF DAILY MILK YIELD DATA. PART I: The daily deviation and the milking interval

A. Silvestre\*, R. Cruz, F. Petim-Batista e J. Colaço

Dep. de Zootecnia - CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro,  
Apartado 1013, 5000-911 Vila Real, Portugal. \*E-mail: asilvest@utad.pt

*(Aceite para publicação em 26 de Julho de 2004)*

### ABSTRACT

Milk recording is essential for herd management and genetic improvement in dairy cattle. In recent works, the total milk yield of the lactation has been replaced by the test-day yield and this represents the base information for lactation curves study's and for genetic parameters estimation with test-day models. The electronic identification and the automatic record of the individual milking allows to know the daily milk yield, opening new perspectives for investigation. The daily yield of 145 lactations were analyzed. The 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> lactations were the less and the more productive (6582 kg and 7608 kg). The highest production was 12192 kg with 424 days in milk and occurred in a 4<sup>th</sup> lactation. The study of 68434 bi-daily records of milk yield, corresponding to 34217 days in milk of the all considered lactations, evidenced the tendency of the morning milking to be higher than the afternoon milking in  $1.9 \pm 3.9$  kg. This trend remains with the data classified by lactation number or farm. The time of milking is one of the explicatory factors of this difference because the length of the day-time interval between milkings significantly influenced the yield difference between the two daily milkings.

**Key-words:** dairy cattle, daily data

## ANÁLISE DE DADOS DIÁRIOS DA PRODUÇÃO DE LEITE. Parte I: A variação diária e o intervalo entre ordenhas

### RESUMO

Nos bovinos leiteiros o registo da produção de leite é essencial para o manejo da exploração bem como para o melhoramento genético. A análise da produção total de leite da lactação tem vindo progressivamente a dar lugar à apreciação da produção de leite do dia de teste ou contraste, que constitui a informação base para o estudo da curva de lactação e para a estimativa de parâmetros genéticos com modelo de contrastes. A identificação electrónica animal e o registo automático da produção individual de leite torna disponível a produção diária de leite, abrindo outras



perspectivas de investigação. Foram analisadas as produções diárias de 145 lactações e verificou-se que as ordens de lactação 1 e 3 foram as menos e mais produtivas (6582 e 7608 kg). A maior produção foi de 12192 kg em 424 dias e registou-se numa vaca na ordem de lactação 4. Da análise de 68434 registos bi-diários de produção de leite, correspondentes a 34217 dias de lactação constata-se a tendência para a ordenha da manhã apresentar produções superiores à ordenha da tarde em cerca de  $1,9 \pm 3,9$  kg de leite. Esta tendência mantém-se considerando os dados classificados quer por ordem de lactação quer por exploração. A hora de ordenha é um dos factores explicativos desta diferença porque a duração do intervalo diurno entre ordenhas afectou de forma significativa a diferença produtiva registada entre as duas ordenhas diárias.

**Palavras-chave:** bovinos leiteiros, dados diários

## INTRODUÇÃO

Os estudos realizados nos últimos 20 anos sobre a produção leiteira em bovinos sofreram uma metamorfose em termos de unidade experimental ou observação, em que a produção total de leite da lactação tem vindo progressivamente a dar lugar à produção de leite do dia de teste ou contraste. São disto exemplo as inúmeras publicações sobre curvas de lactação (Wood, 1976, 1980; Pérochon *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1996; Tozer e Huffaker, 1999; Tekerli *et al.*, 2000; Silvestre *et al.*, 2003b, 2003c) bem como a estimativa de parâmetros genéticos com modelos de contrastes (Varona *et al.*, 1998; Strabel e Misztal, 1999; Jamrozik *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2002; Petim-Batista *et al.*, 2002; Schenkel *et al.*, 2002; Silvestre *et al.*, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2002).

Por outro lado, o sistema de produção de leite tem vindo a apresentar níveis crescentes de industrialização, concentração e intensificação. Actualmente, a incorporação de tecnologia nesta actividade vai muito além da máquina de ordenha. A identificação electrónica dos animais, o registo automático da produção individual de leite e a presença de um computador na exploração já fazem parte do quotidiano de muitas explorações em Portugal. A ordenha robótica é uma realidade crescente em muitos países tais como Holanda, Alemanha, França, Inglaterra, Canadá e os Estados Unidos (Kruip *et al.*, 2000; Peeters e Galesloot, 2002). Este equipamento possibilita o livre acesso do animal ao ponto de ordenha o que permitirá que no futuro o estudo da produção diária de leite inclua novos parâmetros a investigar.

Com o trabalho que aqui apresentamos pretendemos fazer uso de informação disponível em explorações comerciais com identificação animal

electrónica e registo automático da produção de leite, o que ainda não está a ser completamente explorado em termos técnico-científicos. O trabalho é apresentado em duas partes sendo objectivo da 1ª parte estudar a variação da produção de leite entre ordenhas, ao longo da lactação e ao longo do ano.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Recolha e edição dos dados

Com o objectivo de recolher dados diários da produção de leite procedeu-se a um levantamento de explorações de bovinos leiteiros que satisfizessem este requisito. Para o efeito, em Março de 1999 iniciámos uma série de saídas para o campo, sendo o Minho a nossa área de acção.

No nosso sistema de recolha de dados entraram 4 explorações que designamos por L, P, Q e C. Na primeira recolha de dados consideraram-se apenas as lactações em que o sistema informático ainda retivesse os registos pelo menos até ao 5º dia de lactação. A maioria das lactações em curso há mais de um mês, na data da primeira recolha, não puderam ser consideradas. Com o avançar do tempo e à medida que ocorriam secagens e novos partos, o número de lactações em controle foi aumentando e acabou por retratar, nas últimas recolhas, a dimensão dos efectivos em produção. Assim, à data da última recolha (Maio de 2001), encontravam-se em curso 78, 51, 53 e 30 lactações nas explorações L, P, Q e C, respectivamente. Na recolha dos dados foram vários e de génese diversa os obstáculos a ultrapassar. Vamos referir apenas alguns de índole técnica:

- ↑ O sistema informático da exploração L não estava preparado para a mudança de ano 1999/2000 o que implicou uma actualização do sistema que se traduziu na não recolha de dados durante 5 ordenhas.
- ↑ O colar electrónico de identificação de uma vaca que saía da exploração passava para um animal novo que entrasse, pelo que acontecia em duas recolhas consecutivas o mesmo número de identificação corresponder a animais diferentes.
- ↑ Algumas vacas não terminavam a lactação porque eram refugadas.
- ↑ A organização da informação dos sistemas informáticos não se encontra configurada para a recolha e exportação de dados mas sim para apresentar alguns resultados úteis para o manejo da exploração, tais como produções parciais e totais, intervalos entre partos, datas previstas de secagem e parto, datas de inseminação e acções veterinárias.

↑ Os dados em bruto exigiam bastantes manipulações até atingirem uma forma tratável.

Em Maio de 2001 encontravam-se 145 lactações terminadas de 140 vacas cuja distribuição por exploração e ordem de lactação se encontra no Quadro I. O número de lactações é superior ao número de vacas porque em 5 dos animais dispomos de duas lactações consecutivas (4 casos de 1ª e 2ª lactação e 1 caso de 5ª e 6ª lactação). A exploração L contribui com 46% das lactações terminadas. Na classe ordem de lactação 5 incluem-se todas as lactações de ordem 5 ou superior. Na ordem de lactação 1 estão 1/3 das lactações.

O ficheiro das produções diárias de leite das 145 lactações apresenta 87810 registos de produção em 45194 dias de lactação (Quadro II). Seria de esperar que o número de registos de produção fosse o dobro dos dias com produção, o que corresponde a uma situação de duas ordenhas por dia. Porém, o Quadro II mostra que ocorrem entre 1 a 5 registos de produção de leite por vaca e por dia. Um registo vaca/dia surge por duas causas:

↑ Na exploração P o sistema informático registou durante alguns dias a soma das duas ordenhas diárias e não o valor de cada uma delas.

Quadro I - DISTRIBUIÇÃO DAS 145 LACTAÇÕES TERMINADAS POR EXPLORAÇÃO E ORDEM DE LACTAÇÃO (OL).

Exploração	OL 1	OL 2	OL 3	OL 4	OL 5	Total
L	31	18	10	3	5	67
P	11	13	6	6	7	43
Q	2	3	1	1	5	12
C	5	6	8	3	1	23
Total	49	40	25	13	18	145

Quadro II - RESUMO DO FICHEIRO DAS PRODUÇÕES DIÁRIAS DE LEITE DAS 145 LACTAÇÕES.

Dias com produção	45194
Registos de produção	87810
um registo vaca/dia	6977
dois registos vaca/dia	68434
três registos vaca/dia	10848
quatro registos vaca/dia	1476
cinco registos vaca/dia	75

↑ É prática antes da secagem proceder apenas a uma ordenha por dia, durante alguns dias.

Identificámos também duas causas para ocorrerem mais do que dois registos por vaca e por dia:

↑ A exploração L procedeu durante algumas semanas a 3 ordenhas por dia.

↑ É muito frequente a mesma ordenha apresentar mais do que um registo de produção de leite. Esta situação é identificada como uma repetição da mesma ordenha e apresenta geralmente valores muito baixos.

A edição dos dados foi feita com os programas Visual FoxPro 6.0 (1998) e Access (2002) e na análise estatística foi usado o S.A.S. V8. (1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Produção total e duração da lactação

No Quadro III encontra-se um resumo dos valores reais da duração da lactação, produção total e produção aos 305 dias para as 145 lactações. Embora os dados da produção de leite apresentem uma casa decimal, apresentamos os resultados arredondados às unidades. Do Quadro III retira-se que as 145 lactações apresentaram uma variação da produção total por ordem de lactação de acordo com a bibliografia (Rowlands *et al.*, 1982; Stanton *et al.*, 1992; Barash *et al.*, 1996; Friggens *et al.*, 1999) em que as ordens de lactação 1 e 3 foram as menos e mais produtivas (6582 e 7608 kg em termos totais; 6053 e 7366 kg aos 305 dias, respectivamente). A maior produção (12192 kg, em 424 dias) registou-se

Quadro III - PRODUÇÃO REAL TOTAL (KG), PRODUÇÃO AOS 305 DIAS (KG) E DURAÇÃO REAL (DIAS) DAS 145 LACTAÇÕES.

ol <sup>†</sup>	n	Duração da lactação				Produção real total				Produção real 305 dias			
		Média	dp	Min	Max	Média	dp	Min	Max	Média	dp	Min	Max
1	49	336	49	210	434	6582	1841	3482	10209	6053	1486	3145	8852
2	40	318	61	203	461	7446	1931	2726	11208	7050	1702	2726	11172
3	25	311	42	222	391	7608	2035	4666	11685	7366	1886	4604	10962
4	13	297	59	202	424	7440	2213	3347	12192	7207	1876	3347	10024
5	18	303	61	196	403	7485	1577	5082	10865	7232	1489	5082	10672
Total	145	319	55	196	461	7186	1929	2726	12192	6804	1723	2726	11172

<sup>†</sup> Ordem de lactação.

numa vaca na ordem de lactação 4 e da exploração P. A duração real da lactação apresentou a maior média na ordem de lactação 1 (336 dias), sendo os valores seguintes tendencialmente decrescentes, resultado muito próximo daquele por nós encontrado nos contrastes nacionais (Silvestre *et al.*, 2003a).

### Estudo da produção de leite das ordenhas diárias

Quando nos referimos à produção de leite do dia estamos em boa verdade a apresentar a soma dos quilos de leite de todas as ordenhas do dia, que normalmente são duas, não distinguindo as quantidades produzidas pela ordenha da manhã e pela ordenha da tarde. Neste ponto do trabalho efectuámos o estudo da produção de leite por ordenha e que passamos a denominar por produção de leite da ordenha da manhã e produção de leite da ordenha da tarde. Analisámos também a hora de realização das ordenhas (ponto subsequente). Esta abordagem prende-se com o objectivo de outro trabalho em que se estudaram os métodos de contraste A4 e At4. Ora como o método de contraste At4 apenas recorre a uma das ordenhas do dia, este estudo contribui para perceber melhor as repercussões desta metodologia.

Os dados em análise neste ponto são os 68434 registos bi-diários, correspondentes a 34217 dias de lactação (Quadro II). A representação gráfica da distribuição destas observações por dias julianos, encontra-se na Fig. 1, onde se constata o registo de cerca de 100 produções de leite diárias (200 ordenhas) por dia juliano.

O Quadro IV apresenta resultados referentes às produções diárias de leite da ordenha da manhã e da ordenha da tarde, por ordem de lactação, por exploração e no total. Procedeu-se também à comparação de médias para observações ao pares. No referido quadro constata-se a tendência para a ordenha da manhã apresentar produções superiores à ordenha da tarde uma vez que a

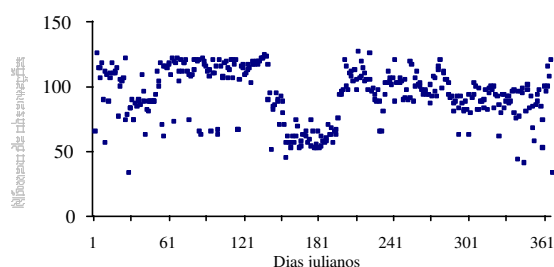


Figura 1. Distribuição das observações por dias julianos.

Quadro IV - COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO LEITE DA MANHÃ (pm) COM A PRODUÇÃO LEITE DA TARDE (pt), VALORES EM kg.

Critério <sup>1</sup>	N	pm		pt		pm-pt		t	Sig.
		Média	dp	Média	dp	Média	dp		
1	12051	10.9	4.2	9.3	3.7	1.6	3.4	51.3	***
2	9262	12.7	5.1	10.7	4.5	2.0	3.9	50.6	***
3	5723	13.1	6.6	11.4	5.9	1.7	4.7	27.6	***
4	2849	13.8	6.4	11.2	5.4	2.6	4.4	31.8	***
5	4332	13.4	5.7	11.3	4.8	2.1	3.6	38.5	***
C	7075	10.5	5.4	9.9	5.3	0.6	5.1	9.8	***
L	15081	11.2	4.5	9.9	4.3	1.3	3.2	49.9	***
P	8273	15.9	5.5	11.5	4.9	4.4	3.1	131.8	***
Q	3788	12.0	4.5	11.2	4.5	0.9	2.1	25.1	***
total	34217	12.3	5.4	10.4	4.7	1.9	3.9	89.4	***

<sup>1</sup> Ordem de lactação (1, 2, 3, 4, 5) e exploração (C, L, P, Q).

média das diferenças entre ambas é de  $1,9 \pm 3,9$  kg de leite. Esta tendência mantém-se considerando os dados classificados quer por ordem de lactação quer por exploração. Porém, em 7239 dos 34217 dias de lactação em estudo (21%) verifica-se o inverso, ou seja, é a ordenha da tarde a mais produtiva.

As diferenças entre ordenhas repercutem-se na estimativa da produção diária feita a partir de uma só ordenha por dia, sobre-estimando e sub-estimando consoante se recorre à produção da manhã ou à produção da tarde, respectivamente. Este aspecto é ilustrado na Fig. 2 que mostra a produção de leite da ordenha da manhã e da ordenha da tarde ao longo do ano.

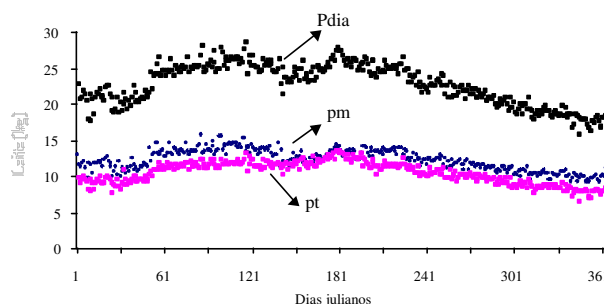


Figura 2. Produção de leite diária (Pdía), produção de leite da ordenha da manhã (pm) e produção de leite da ordenha da tarde (pt) ao longo do ano.

O período do ano em que esta diferença é menos perceptível corresponde ao intervalo 135 a 195 dias julianos (fins de Maio, Junho e Julho). Podemos ainda observar na Fig. 2 que as maiores produções média diárias (na ordem dos 25-26 kg) ocorrem sensivelmente entre os dias julianos 60 e 210 (Março a Julho).

A Fig. 3 obtém-se da classificação dos dados em dias de lactação. Daqui resulta com clareza, em termos gráficos, que também ao longo da lactação a produção de leite da ordenha da manhã é superior à produção de leite da ordenha da tarde. É ainda visível nesta figura a forma clássica da curva de lactação. As Fig. 2 e 3 são coadjuvadas pela comparação de médias para observações ao pares, para cada dia do ano (365) e para cada dia de lactação (305). Resultam 770 testes que dada a sua extensão são resumidos na Fig. 4 e para mais detalhes consultar Silvestre (2003).

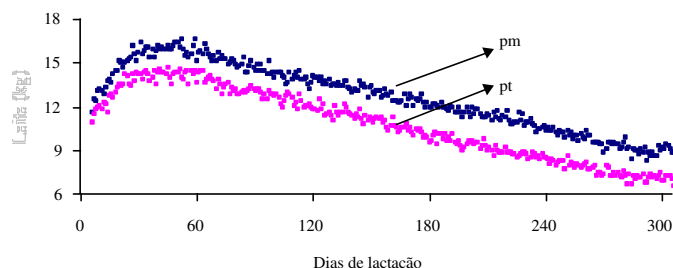


Figura 3. Produção de leite da ordenha da manhã (pm) e da ordenha da tarde (pt) ao longo da lactação.

A observação da Fig. 4 permite constatar que a diferença entre a produção da manhã e a produção da tarde é, de uma forma predominante, altamente significativa ( $P < 0,001$ ), tanto para dias julianos como para dias de lactação. Ressalva-se contudo a exceção do período de 135 a 195 dias julianos, o que está de acordo com a Fig. 2.

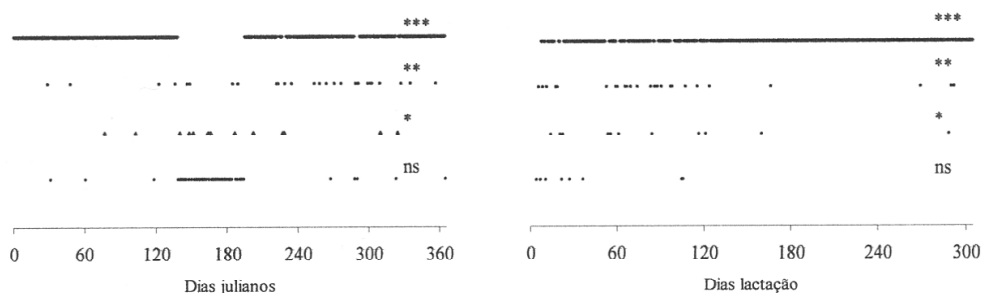


Figura 4. Diferenças entre pm e pt por dias julianos (lado direito) e diferenças entre pm e pt por dia de lactação (lado esquerdo).

### Estudo da hora da ordenha

Na perspectiva de identificar factores explicativos das diferenças entre a produção da ordenha da manhã e a produção da ordenha da tarde, vamos apresentar uma breve análise à hora de ordenha. Neste ponto em particular eliminámos todos os registos de ordenha sem hora e restringimos, após uma análise preliminar, a hora da ordenha da manhã e a hora da ordenha da tarde aos intervalos 6-12 e 14-24, o que implicou uma redução de 34217 para 26245 dias de lactação com 2 ordenhas por dia.

O Quadro V resume os resultados referente à hora de ordenha. Como seria de esperar as diferentes explorações reflectem nesta característica práticas de manejo diversas. Testámos a hipótese da duração do período entre a ordenha da manhã e a ordenha da tarde ser maior ou igual a 12 ( $\text{hora\_ot} - \text{hora\_om} \geq 12$ ), tendo esta sido rejeitada em todas as explorações e também no total.

Conclui-se que o intervalo nocturno entre ordenhas é superior ao intervalo diurno e observa-se ainda que as explorações C e P que apresentam o maior e menor intervalo diurno entre ordenhas, ocupam uma posição inversa no que se refere ao diferencial produtivo entre ordenhas apresentado anteriormente (Quadro IV). Assim, a exploração C que é a que apresenta um intervalo entre ordenhas mais próximo de 12 também é a que apresenta a menor diferença entre a produção de leite das duas ordenhas diárias. De igual forma, é na exploração P que o intervalo diurno entre ordenhas é menor e a diferença da produção de leite entre a ordenha da manhã e a ordenha da tarde é maior.

Quadro V - HORA DA ORDENHA DA MANHÃ ( $\text{hora\_om}$ ), HORA DA ORDENHA DA TARDE ( $\text{hora\_ot}$ ) E DIFERENÇA ( $\text{dif}$ ).

Exploração	N	$\text{hora\_om}$		$\text{hora\_ot}$		$\text{dif}^\dagger$		$t^\ddagger$	Sig.
		Média	sd	Média	sd	Média	sd		
C	7048	8.2	0.4	19.9	0.7	11.7	0.8	-26.22	***
L	8017	7.9	0.8	18.7	1.5	10.8	1.5	-70.84	***
P	7392	7.9	0.5	17.9	0.5	9.9	0.5	-360.84	***
Q	3788	9.5	0.6	21.1	1.0	11.5	0.9	-31.01	***
Total	26245	8.2	0.8	19.1	1.5	10.9	1.3	-139.72	***

$^\dagger \text{ dif} = \text{hora\_ot} - \text{hora\_om}$  (duração do período diurno entre ordenhas).

$^\ddagger H_0: \text{hora\_ot} - \text{hora\_om} \geq 12$ .



A Fig. 5 mostra os valores médios, por dia juliano, da hora das ordenhas da manhã e da tarde, bem como, da duração do período diurno entre ordenhas. Constata-se que, em termos médios, a ordenha da manhã decorre entre as 8 e 9h e a ordenha da tarde é realizada no período compreendido entre as 19 e 20h, sem oscilações dignas de registo ao longo do ano. Todavia, destacamos o período de dias julianos de 135 a 195 em que ocorre uma aproximação ao valor 12 do período diurno entre ordenhas, o que implica uma situação de equidistância horária entre ordenhas ao longo dos dias. Este poderá ser um dos factores a contribuir para a proximidade produtiva entre a ordenha da manhã e a ordenha da tarde que já havíamos identificado neste período do ano, aquando da discussão da produção de leite das ordenhas da manhã e da tarde ao longo do ano.

Seguindo o critério apresentado por Liu *et al.* (2000), apresentamos no Quadro VI o resultado da classificação dos dados em 4 grupos de intervalos diurnos entre ordenhas e distinguindo primíparas (ol1) de múltiparas (ol>1). Neste quadro é evidente que as maiores diferenças de produção de leite entre as ordenhas diárias ocorre quando o intervalo diurno entre ordenhas é menor, tanto para primíparas (3,4 kg) como para múltiparas (4,4).

A forma como o intervalo entre as duas ordenhas diárias afecta a produção de leite resulta da combinação de duas variáveis que evoluem de forma inversa no tempo e que são a secreção láctea e a pressão no úbere. Segundo Webster (1987) a produção de leite diária é maximizada com o intervalo entre ordenhas de 12 h para que o aumento de pressão dentro do úbere não limite a taxa de secreção do leite. Schmidt e Van Vleck (1974) referem que as primíparas são mais afectadas pelo prolongamento do intervalo entre ordenhas porque, por terem um úbere mais

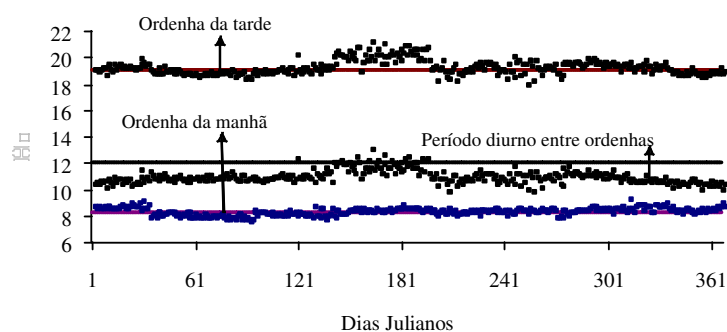


Figura 5. Hora da ordenha da manhã, hora da ordenha da tarde e duração do período diurno entre ordenhas.

pequeno do que as multíparas, sofrem um maior aumento de pressão no úbere por unidade de leite.

No Quadro VI não se observa que as maiores produções diárias ocorram em intervalos entre ordenhas próximos de 12 h. Contudo, verifica-se que a menor produção diária de leite em primíparas (19,5 kg) ocorre no intervalo diurno entre ordenhas menor que 10h e deve-se essencialmente à menor produção da ordenha da tarde. Importa aqui ressaltar que os resultados do Quadro VI são obtidos a partir de dados de campo, pelo que não está garantida a distribuição aleatória das vacas pelos referidos intervalos, o que contribui para mascarar o efeito em estudo.

Sintetizando, nos métodos de contraste A4 e At4 a produção total da lactação obtém-se a partir do somatório das produções parciais dos períodos entre contrastes. Considera-se que a produção diária de leite dentro destes períodos é igual à média das produções diárias dos contrastes que os delimitam. Como no método de contraste At4 a ordenha registada ora é a da manhã ora é a da tarde é de esperar um efeito de compensação entre a esperada sobre e sub estimação da produção diária de leite. Excepção feita aos períodos iniciais e finais da lactação em que só existe um contraste. Os resultados da Parte II deste trabalho contribuem para a apreciação desta conjectura.

Quadro VI -PRODUÇÃO DE LEITE DAS ORDENHAS DIÁRIAS CLASSIFICADAS EM 4 INTERVALOS ENTRE ORDENHAS.

Int. diurno <sup>1</sup>		<10			10-10.5			10.5-11			> 11		
		n	med	dp	n	med	dp	n	med	dp	n	med	dp
Ol1 <sup>†</sup>	pm	1949	11.4 <sup>b</sup>	4.2	1233	12.4 <sup>a</sup>	4.4	1379	11.1 <sup>b</sup>	4.2	3611	10.4 <sup>c</sup>	4.1
	pt	1949	8.1 <sup>c</sup>	3.3	1233	9.4 <sup>b</sup>	3.5	1379	9.3 <sup>b</sup>	3.5	3611	10.0 <sup>a</sup>	4.1
	pdia	1949	19.5 <sup>c</sup>	6.9	1233	21.8 <sup>a</sup>	7.4	1379	20.4 <sup>b</sup>	7.1	3611	20.4 <sup>b</sup>	7.4
ol>1 <sup>‡</sup>	Pm	4068	14.4 <sup>b</sup>	5.7	2903	14.8 <sup>a</sup>	5.9	2507	12.0 <sup>c</sup>	5.6	8595	11.6 <sup>d</sup>	5.2
	Pt	4068	10.0 <sup>b</sup>	4.3	2903	11.2 <sup>a</sup>	4.7	2507	9.9 <sup>b</sup>	4.7	8595	11.1 <sup>d</sup>	5.1
	Pdia	4068	24.4 <sup>b</sup>	9.5	2903	26.0 <sup>a</sup>	10.2	2507	21.9 <sup>d</sup>	9.6	8595	22.7 <sup>c</sup>	9.4
pm-pt (ol1)		1949	3.4 <sup>a</sup>	3.0	1233	3.0 <sup>b</sup>	3.0	1379	1.7 <sup>c</sup>	2.8	3611	0.4 <sup>d</sup>	3.7
pm-pt(ol>1)		4068	4.4 <sup>a</sup>	3.5	2903	3.6 <sup>b</sup>	3.0	2507	2.1 <sup>c</sup>	3.7	8595	0.4 <sup>d</sup>	4.1

<sup>a b c d</sup> - Na mesma linha valores com diferentes notações são significativamente diferentes (P<0,5).

<sup>1</sup> intervalo diurno entre ordenhas. <sup>†</sup> Primíparas. <sup>‡</sup> Multíparas. pm – Produção de leite da ordenha da manhã. pt – Produção de leite da ordenha da tarde. pdia – Produção de leite do dia.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise de 68434 ordenhas bi-diárias leva-nos a concluir que a produção de leite diária resulta do contributo não equitativo da produção das ordenhas da manhã e da tarde. A representação em termos gráficos da produção das ordenhas de acordo com o dia de lactação traduz de forma evidente a maior produção da ordenha da manhã em relação à ordenha da tarde. No entanto, quando classificámos as ordenhas por dia juliano a diferença já não foi tão evidente, sendo perceptível um efeito sazonal a ter em consideração. Concluímos ainda que a duração do intervalo diurno entre ordenhas afecta de forma significativa a diferença produtiva registada entre as duas produções diárias. Importa referir que a hora de ordenha é uma expressão do maneio, pelo que apresenta especificidades ao nível da exploração. A diferença produtiva entre ordenhas e o intervalo entre ordenhas são aspectos menos tratados na bibliografia o que na nossa opinião não significa que sejam de baixa importância. Traduz antes a ausência de informação que possibilite a sua análise. A vulgarização da recolha automática de dados na sala de ordenha contribuirá para a inversão deste cenário. É desejável que surjam outros trabalhos, baseados num maior volume de informação, que critiquem e complementem os resultados aqui apresentados.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Sr. Manuel Ferreira Torres, Carlos, Filipe, Paulo, Júlio e Sr.<sup>a</sup> Margarida por nos permitirem aceder aos registos produtivos das suas explorações leiteiras.

## BIBLIOGRAFIA

- BARASH, H., SILANIKOVE, N. e WELLER, J.L., 1996. Effect of season of birth on milk, fat, and protein production of Israeli Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 79: 1016-1020.
- FRIGGENS, N.C., EMMANS, G.C. e VEERKAMP, R.F., 1999. On the use of simple ratios between lactation curve coefficients to describe parity effects on milk production. *Livest. Prod. Sci.*, 62: 1-13.
- GUO, W., 2002. Functional mixed effects models. *Biometrics*, 58(1):121-128.
- JAMROZIK, J., GIANOLA, D. e SCHAEFFER, L.R., 2001. Bayesian estimation of genetic parameters for test day records in dairy cattle using linear hierarchical models. *Livest. Prod. Sci.*, 71: 223-240.
- KRUIP, T.A.M., STEFANOWSKA, J. e OUWELTJES, W., 2000. Robot milking and effect on reproduction in dairy cows: a preliminary study. *Anim. Prod. Sci.*, 60-61: 443-447.
- LIU, Z., REENTS, R., REINHARDT, F. e KUWAN, K., 2000. Approaches to estimating daily yield from single milk testing schemes and use of a.m.-p.m. records in test-day model genetic evaluation in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 83: 2672-2682.

- 
- MICROSOFT ACCESS. Copyright (c) 1992-2001 Microsoft Corporation.
- MICROSOFT VISUAL FOXPRO 6.0. Copyright (c) 1988-1998 Microsoft Corporation.
- PEETERS, R. e GALESLOOT, P.J.B., 2002. Estimating daily fat yield from a single milking on test day for herds with a robotic milking system. *J. Dairy Sci.*, 85: 682-688.
- PÉROCHON, L., COULON, J.B. e LESCOURET, F., 1996. Modelling lactation curves of dairy cows with emphasis on individual variability. *Anim. Sci.*, 63: 189-200.
- PETIM-BATISTA, F., FOULLEY, J.L., ROBERT-GRANIÉ, C., SILVESTRE, A. e COLAÇO, J., 2002. "SCS analysis in portuguese dairy cows using random coefficient models". *Proc. 7th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod.*, Montpellier, France. CD-ROM communication n° 17-04.
- ROWLANDS, G.J., LUCEY, S. e RUSSELL, A.M., 1982. A comparison of different models of the lactation curve in dairy cattle. *Anim. Prod.*, 35: 135-144.
- S.A.S. INSTITUTE INC., 1999. Users Guide, Version 8, Third Edition, Cary, NC.
- SCHENKEL, F.S., SCHAEFFER, L.R. e BOETTCHER, P.J., 2002. Comparison between estimation of breeding values and fixed effects using bayesian and empirical BLUP estimation under selection on parents and missing pedigree information. *Genet. Sel. Evol.* 34: 41-59.
- SCHMIDT, G.H. e VAN VLECK, L.D., 1974. *Bases Científicas de la Production Lechera*. Editorial Acribia.
- SCOTT, T.A., YANDELL, B., ZEPEDA, L., SHAVER, R.D e SMITH, T.R., 1996. Use of lactation curves for analysis of milk production data. *J. Dairy Sci.*, 79: 1885-1894.
- SILVESTRE, A. M. D., PETIM-BATISTA, M. F. S. e COLAÇO, J., 2002. Genetic parameters estimates of portuguese dairy cows lactation curves using splines approach. *Proc. 7th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod.*, Montpellier, France. CD-ROM communication n° 17-19.
- SILVESTRE, A. M. D., PETIM-BATISTA, M. F. S. e COLAÇO, J., 2003a. Contributo para a caracterização do ciclo produtivo da vaca leiteira em Portugal. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, Ano X(I): 49-59.
- SILVESTRE, A. M. D., PETIM-BATISTA, M. F. S. e COLAÇO, J., 2003b. Estudo longitudinal da produção de leite e da sua composição. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, Ano X(II): 23-33.
- SILVESTRE, A. M. D., PETIM-BATISTA, M. F. S. e COLAÇO, J., 2003c. Curvas de lactação para a produção de leite, gordura e proteína: uma nova abordagem. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, Ano X(I): 60-75.
- SILVESTRE, A. M. D., 2003. *Biometria da lactação em vacas leiteiras Portuguesas*. Tese de Doutoramento. UTAD, Vila Real, 196 p.
- STANTON, T.L., JONES, L.R., EVERETT, R.W. e KACHMAN, S.D., 1992. Estimating milk, fat and protein lactation curves with a test day model. *J. Dairy Sci.*, 75: 1691-1700.
- STRABEL, T. e MISZTAL, I., 1999. Genetic parameters for first and second lactation milk yields of polish black and white cattle with random regression test-day models. *J. Dairy Sci.*, 82: 2805-2810.
- TEKERLI, M., AKINCI, Z., DOGAN, I. e AKCAN, A., 2000. Factors affecting the shape of lactation curves of Holstein cows from the Balikesir province of Turkey. *J. Dairy Sci.*, 83: 1381-1386.
- TOZER, P.R. e HUFFAKER, R.H., 1999. Mathematical equations to describe lactation curves of Holstein-Frisian cows in South Wales. *Aust. J. Agric. Res.*, 50: 431-440.
- VARONA, L., MORENO, C., GARCÍA CORTÉS, L.A. e ALTARRIBA, J., 1998. Bayesian analysis of Wood's lactation curve for Spanish dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 81: 1469-1478.
- VASCONCELOS, J., MARTINS, A., PETIM-BATISTA, M., SILVESTRE, A., FERREIRA, A., COLAÇO, J. e CARVALHEIRA, J., 2002. Estimation of Lactation Yields from Test Day Yields of Milk, Fat and Protein for Portuguese Holstein Cattle using an Autoregressive Test Day Model. *Proc. 7th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod.*, Montpellier, France. CD-ROM communication n° 01-57.
-

- WEBSTER, J., 1987. Understanding the dairy cow. BSP Professional Books, 357p.
- WOOD, P.D.P., 1976. Algebraic models of the lactation curves for milk, fat and protein production, with estimates of seasonal variation. Anim. Prod., 22: 35-40.
- WOOD, P.D.P., 1980. Breed variations in the shape of the lactation curve of cattle and their implications for efficiency. Anim. Prod., 31: 133-141.

## **STUDY OF DAILY MILK YIELD DATA. Part II: Testing schemes A4, At4 and others sampling criteria**

A. Silvestre\*, R. Cruz, F. Petim-Batista e J. Colaço

Dep. de Zootecnia - CECAV, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro,

Apartado 1013, 5000-911 Vila Real, Portugal. \*E-mail: asilvest@utad.pt

*(Aceite para publicação em 26 de Julho de 2004)*

### **ABSTRACT**

The A4 and At4 milk testing schemes were compared using a daily milk yield database with 145 complete lactations. In each individual lactation the methods A4 and At4 were simulated. The study of other sampling criteria, since 4 the 44 test-days per lactation, were also made. In both methods the estimate average lactation length was in accordance with the true values, which was the expected result. The total milk yield estimate by the two testing schemes is approximately 500 kg higher ( $P < 0.05$ ) than the true milk yield. On the other hand, the statistical difference between the total milk yield estimate by the two methods was not significant ( $P > 0.05$ ). As a consequence of daily milk yield dispersion, when the A4 method was repeated, the difference between the two simulations was  $80 \pm 423$  kg. The comparisons made between ranking lists of estimate and true yields show a highly significant dependence. Therefore, even with some individual discrepancy, the lactation's rankings were similar. As expected, the increase of the interval childbirth-1<sup>st</sup> test-day as well as the increase of the interval between test-days, amplifies the estimate error. The daily milk production tends to follow the typical shape of the lactation curve (global aspect). However, oscillations occur in the daily production (local aspect) because the cow's performance can be momentarily affected by transitory factors. Those deviations show irregular duration and intensity and are able to influence the lactation curve study when just a few test day records are available, as is the case of the monthly test day recording scheme.

**Key-words:** dairy cow, testing schemes

## **ANÁLISE DE DADOS DIÁRIOS DA PRODUÇÃO DE LEITE. Parte II: O contraste A4, At4 e outras periodicidades de recolha de dados**

### **RESUMO**

Neste trabalho foram comparados os métodos de contraste A4 e At4 tendo por base dados diários de produção de leite de 145 lactações. Procedeu-se ainda à investigação de outros critérios de amostragem que variaram entre 4 e 44 contrastes por lactação. A estimativa da produção total de leite em ambos os métodos de

contraste foi superior à produção total real em cerca de 500 kg ( $P < 0,05$ ). Por outro lado, a diferença entre as duas estimativas de produção de leite não foi significativa. A repetição do método A4 permite concluir que a aplicação do mesmo método aos mesmos dados deu origem a estimativas de produção de leite que diferiram em  $80 \pm 423$  kg, destacando-se a elevada variabilidade dos resultados. As listas de ordenação produtiva das lactações mostraram uma dependência altamente significativa, embora tenham apresentado alguma discrepância ao nível individual. De acordo com o esperado, o aumento do intervalo parto-1ª lactação e do intervalo entre contrastes incrementa o erro de estimativa da produção de leite da lactação. A produção de leite de cada ordenha revela desvios pontuais, de duração e intensidade variáveis, capazes de condicionar o estudo da forma global da curva de lactação quando se dispõe de poucos registos diários, como é o caso do contraste mensal.

**Palavras-chave:** bovinos leiteiros, dados diários

## INTRODUÇÃO

A periodicidade mensal de recolha de dados na indústria leiteira encontra-se difundida em todo o mundo e é indissociável, enquanto fonte de informação, do melhoramento genético da vaca leiteira. Em Portugal são seguidos os métodos de contraste A4 e At4 regulamentados pela Portaria nº 1066/91 que pode ser consultada em [www.abln.com.pt](http://www.abln.com.pt), sendo também possível encontrar informação detalhada sobre este assunto no endereço [www.icar.org](http://www.icar.org). Devido a pressões, essencialmente economicistas, têm sido efectuados estudos para o desenvolvimento de alternativas ao método A4 (Wiggans, 1981; Liu *et al.*, 2000). Neste sentido, o método At4 tem sido objecto de intensa investigação no sentido de constituir uma alternativa (Wiggans, 1981; Lee e Wardrop, 1984; DeLorenzo e Wiggans, 1986; Cassandro *et al.*, 1995; Meinert *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2000).

Neste ponto do trabalho, o nosso objectivo consistiu em expor uma análise comparativa entre os métodos A4 e At4. Pretendemos comparar as estimativas de produção obtidas com a produção real, quer em termos médios quer em termos de afectação da ordenação produtiva. Pretendemos também trazer à discussão outras periodicidades alternativas de registo da produção de leite.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Simulação do contraste mensal

A recolha e edição dos dados aqui utilizados encontra-se descrita na primeira parte deste trabalho (Análise de dados diários da produção de leite. Parte I: A variação diária e a hora de ordenha). Para cada uma das 145 lactações simulou-

se uma série de dias de lactação recorrendo a uma rotina de números aleatórios de forma a satisfazer a condição de o primeiro valor da série estar compreendido entre 5 e 38 e os seguintes encontrarem-se dentro de intervalos consecutivos de 26 a 33 dias. Com estes dados mensais pretendemos simular os métodos de contraste A4 e At4.

Sucintamente, no método A4 são registadas mensalmente as produções das duas ordenhas diárias enquanto que pelo método At4 é apenas registada, de forma alternada, uma das ordenhas do dia. Este valor é multiplicado por 2 para se estimar a produção diária. O cálculo da produção total vai ser executado com o método de Fleischman, como vem preconizado na portaria supramencionada. O método de Fleischman baseia-se no princípio de que a produção diária entre dois contrastes é constante e igual à média dos mesmos.

Os registos mensais simulados das 145 lactações apresentam 2976 registos de produção referentes a 1540 dias de lactação. Com 1, 2, 3 e 4 registos vaca/dia encontram-se 252, 2306, 366 e 52 registos, respectivamente. Os casos de um registo vaca/dia na exploração P e que não correspondam a finais de lactações foram desdobrados em dois. Os casos de 3 e 4 registos vaca/dia foram também convertidos em 2 registos vaca/dia atendendo à hora de ordenha e à existência de repetições da mesma ordenha. O ficheiro das produções mensais passou a ter 3080 linhas correspondentes aos 1540 dias de lactação.

Atendendo aos critérios preconizados pelos métodos de contraste A4 e At4 foi calculada a produção de leite total do dia. Atendemos ainda ao critério de que se considera a vaca seca quando a produção de leite num dia é inferior a 2 litros, o que fez com que fossem eliminadas duas produções do fim da lactação obtidas pelo método At4. Procedeu-se à comparação de médias para observações ao pares (S.A.S., 1999). Os pares em cada característica testada são constituídos pelos valores real e estimado pelo que se trata de observações relacionadas, de que resultam amostras em que não se verifica a condição de independência, o que torna o teste referido adequado (Daniel, 1991). Realizámos ainda a comparação da posição ocupada por cada lactação na lista da produção real *versus* produção estimada, tendo também sido calculado o coeficiente de correlação de Spearman.

### **Simulação de outros critérios de contraste**

Para realizar a simulação de outros critérios de contraste procedemos à amostragem de 32 séries de contrastes por lactação (no ponto anterior efectuamos



apenas uma série de contrastes por lactação). Como critérios de amostragem considerámos 4 intervalos parto – 1º contraste (8, 30, 60 e 90 dias) e 8 intervalos entre contrastes numa base semanal (7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias), pelo que foram constituídos 32 grupos de contrastes. O Quadro I resume o número de contrastes por lactação em cada um dos grupos e evidencia a diversidade do número de observações por lactação. Assim, o número de contrastes por lactação desce no sentido do aumento do intervalo parto – 1º contraste e do aumento do intervalo entre contrastes, verificando-se uma variação, em termos médios, de 44 contrastes por lactação até 4. Procedemos ao cálculo pelo método de Fleischmann da duração da lactação, produção total e produção aos 305 dias para as 145x32 séries de contrastes.

Quadro I - RESUMO DO NÚMERO DE CONTRASTES POR LACTAÇÃO (n=145) PARA OS 32 CRITÉRIOS DE AMOSTRAGEM DE CONTRASTES POR LACTAÇÃO.

Intervalo entre contrastes (semanas)	Intervalo Parto – 1º contraste (dias) <sup>†</sup>			
	Int_8	Int_30	Int_60	Int_90
1	44±8	40±8	36±8	32±8
2	22±4	20±4	18±4	16±4
3	15±3	14±3	12±3	11±3
4	11±2	10±2	9±2	8±2
5	9±2	8±2	8±2	7±2
6	8±1	7±1	6±1	6±1
7	7±1	6±1	6±1	5±1
8	6±1	6±1	5±1	4±1

<sup>†</sup> Int\_8, Int\_30, Int\_60, Int\_90 - Intervalo parto – 1º contraste com a duração de 8, 30, 60 e 90 dias, respectivamente.

Pretendemos neste ponto do trabalho estudar as repercussões do intervalo parto – 1º contraste e do intervalo entre contrastes sobre a precisão da estimativa da duração da lactação e da produção da lactação. Utilizámos o desvio padrão da diferença entre valores reais e estimados como critério de quantificar a precisão da estimativa. Este critério foi também utilizado por Norman *et al.* (1999) em circunstâncias semelhantes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Simulação dos métodos de contraste A4 e At4

O método de contraste A4 está amplamente divulgado por todo o mundo (ICAR, 1995). Contudo, no sentido de promover a redução de custos, o método At4 tem vindo a constituir uma alternativa. Citando o exemplo da Alemanha, o método At4 aumentou de 2,2% (antes de 1999) para 17,8% (depois de 1999) dos contrastes (Liu *et al.*, 2000). Em dados do contraste leiteiro nacional encontrámos a proporção de A4/At4 de 45/55 (Silvestre, 2003).

O Quadro II resume os resultados referentes à estimativa da duração da lactação, produção total e produção aos 305 dias das 145 lactações obtidas no ficheiro das produções mensais, de acordo com os tipos de contrastes A4 e At4. A estimativa da duração da lactação apresentada no Quadro II coincide, em termos médios, com a duração real da lactação. Este é o resultado esperado porque a diferença entre a duração da lactação real e a duração da lactação estimada varia entre -14 e 18 dias, uma vez que se considera a lactação terminada 14 dias após o último contraste com produção. Todavia, no que se refere à produção de

Quadro II. - ESTIMATIVA DA DURAÇÃO DA LACTAÇÃO (dias), PRODUÇÃO TOTAL (kg) E PRODUÇÃO AOS 305 DIAS (kg) DAS 145 LACTAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DOS CONTRASTES a4 e at4.

MC <sup>†</sup>	ol <sup>‡</sup>	N	Duração da lactação				Produção total				Produção aos 305 dias			
			Média	dp	Min	Max	Média	dp	Min	Max	Média	Dp	Min	Max
A4	1	49	336	47	216	448	7105	1956	3540	11206	6510	1527	3271	9373
A4	2	40	319	62	198	458	7982	1879	3560	11330	7532	1635	3560	11330
A4	3	25	311	40	227	390	8215	2061	5399	11884	7967	1936	5399	11872
A4	4	13	297	59	193	421	7968	2154	3416	12133	7711	1840	3416	9953
A4	5	18	304	60	185	411	7813	1807	5230	11505	7518	1724	5230	11297
A4	T <sup>†</sup>	145	319	54	185	458	7703	1977	3416	12133	7276	1756	3271	11872
At4	1	49	336	47	216	448	7161	1956	3485	10976	6560	1546	3211	9234
At4	2	40	319	62	198	458	8028	1926	3294	11352	7558	1673	3294	11352
At4	3	25	310	41	227	390	8177	1941	4916	11722	7934	1830	4916	11722
At4	4	13	297	59	193	421	8087	2236	3300	12455	7819	1903	3300	10135
At4	5	18	304	60	185	411	7854	1812	5397	11604	7544	1755	5397	11291
At4	T	145	319	54	185	458	7744	1974	3294	12455	7307	1757	3211	11722

<sup>†</sup> Método de contraste; <sup>‡</sup> Ordem de lactação; <sup>†</sup> Total.

leite, a estimativa da produção total é superior à produção total real em 517 e 558 kg para os contrastes A4 e At4, respectivamente. Para a produção aos 305 dias a referida diferença é de 472 e 503 kg. Estes valores serão discutidos mais à frente.

Note-se que as estimativas apresentadas no Quadro II são obtidas a partir de  $12 \pm 2$  contrastes por lactação (cerca de 24 e 12 ordenhas, para o contraste A4 e At4, respectivamente). A periodicidade de cerca de 30 dias na recolha de dados do contraste leiteiro nacional implica que em cada 60 ordenhas realizadas se conheça o registo de duas ou uma ordenha, consoante é aplicado o contraste A4 ou At4. Assim, pretendemos retratar o fenómeno biológico do total da secreção láctea desde 5 dias após o parto até à secagem recorrendo a uma amostra que representa 3,8% ou 1,9% das ordenhas da lactação (Quadro III).

Numa perspectiva sumária e indicativa, o erro cometido ao estimar a produção de leite pelos métodos de contraste A4 e At4 implicou, nos nossos dados e em termos médios, um erro de sobre-estimação na ordem dos 7% o que, nesta linha de abordagem, parecerá um bom resultado. Mas é de realçar que no método At4, em que a dimensão da amostra é metade da utilizada no método A4, o acréscimo na percentagem de erro seja de apenas meio ponto percentual (Quadro III). Porém, o método A4 apresentou melhor precisão, como nos mostram os valores de desvio padrão apresentados no mesmo quadro.

A questão do número de registos por lactação ou da periodicidade do contraste é ambivalente porque se pode aduzir no sentido do seu aumento ou redução. Se o objectivo for estudar a forma da curva de lactação através de modelos matemático-estatísticos, o contraste mensal constitui uma informação escassa (KELLOGG *et al.*, 1977; SCHUTZ *et al.*, 1990; OLORI *et al.*, 1999). Contudo, se pretendemos estimar apenas a produção total da lactação, os nossos resultados são favoráveis ao recurso a 12 ordenhas, cujo registo é menos oneroso do que as 24 ordenhas e o incremento de erro é reduzido, como já vimos. Todavia, a tendência actual vai no sentido de o objecto de investigação ser o próprio contraste

Quadro III - DIMENSÃO DA AMOSTRA E ERRO MÉDIO PARA AS 145 LACTAÇÕES, EM TERMOS ABSOLUTOS E EM PERCENTAGEM DA PRODUÇÃO TOTAL DA LACTAÇÃO.

MC †	Nº ordenhas por lactação	Produção Total		Produção 305	
		média $\pm$ dp	%	média $\pm$ dp	%
A4	24 (3.8%)	517 $\pm$ 508	7.2	472 $\pm$ 476	6.9
At4	12 (1.9%)	558 $\pm$ 566	7.8	503 $\pm$ 540	7.4

† Método de contraste.

em detrimento da produção total da lactação (Veerkamp e Goddard, 1998; Pool e Meuwissen, 1999, 2000). Mesmo assim parece-nos que a produção total da lactação continuará a ser requerida pelos produtores.

O Quadro IV apresenta os resultados da comparação de médias para observações ao pares entre a produção real (total e aos 305 dias) e a produção estimada (total e aos 305 dias) pelos métodos A4 e At4. Há vários trabalhos que comparam a aplicação destes métodos (Wiggans, 1981; Lee e Wardrop, 1984; DeLorenzo e Wiggans, 1986; Cassandro *et al.*, 1995) que, sucintamente, baseiam-se em simular o método At4 em contrastes obtidos pelo método A4, na perspectiva de estimar a produção de leite da lactação. Mais recentemente, Liu *et al.* (2000) comparam a utilização de contrastes A4 e At4 em modelos de contrastes ou *test-day model*. Norman *et al.* (1999) trabalharam dados diários da produção de leite e registaram valores concordantes com os apresentados no Quadro IV (em termos de médias e desvios padrão), embora com menor ordem de grandeza. Contudo, a forma como trataram os dados foi impeditiva de procederem a testes de hipóteses, como os próprios autores referem.

Quadro IV - COMPARAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO REAL (total e aos 305 dias) E A PRODUÇÃO ESTIMADA (total e aos 305 dias) PELOS MÉTODOS a4 E at4.

MC <sup>†</sup>	OL <sup>‡</sup>	n	Produção total					Sig.	Produção aos 305 dias					Sig.
			Média	dp	Min	Max	T		Média	dp	Min	Max	t	
A4	1	49	-523	477	-1749	922	-7.7	***	-457	386	-1165	819	-8.3	***
A4	2	40	-536	360	-1362	278	-9.4	***	-482	368	-1281	535	-8.3	***
A4	3	25	-607	756	-2087	1357	-3.4	**	-601	741	-2068	1357	-3.4	**
A4	4	13	-528	495	-1271	59	-3.8	**	-504	471	-1271	71	-3.9	**
A4	5	18	-328	474	-1418	862	-2.9	**	-286	463	-1390	862	-2.6	*
A4	T <sup>§</sup>	145	-517	508	-2087	1357	-11.9	***	-472	476	-2068	1357	-11.5	***
At4	1	49	-579	513	-1520	975	-7.9	***	-507	438	-1431	872	-8.1	***
At4	2	40	-582	366	-1426	100	-10.1	***	-508	375	-1341	252	-8.6	***
At4	3	25	-569	900	-1844	1507	-2.7	*	-568	879	-2141	1507	-2.7	*
At4	4	13	-647	570	-1493	47	-4.1	**	-612	559	-1487	47	-3.9	**
At4	5	18	-369	482	-1257	695	-3.2	**	-312	500	-1232	695	-2.6	*
At4	T	145	-558	566	-1844	1507	-11.6	***	-503	540	-2141	1507	-10.9	***

<sup>†</sup> Método de contraste.

<sup>‡</sup> Ordem de lactação.

<sup>§</sup> Total.

Como estamos a apresentar resultados de diferenças entre valores reais e valores estimados, resultados negativos implicam uma situação de sobre-estimação. Duma primeira leitura resulta que, quando consideramos as 145 lactações, a diferença entre a produção real e a produção estimada é sempre altamente significativa nas 4 situações consideradas. Considerando a ordem de lactação, a hipótese nula continua a ser rejeitada, mas com diferentes enquadramentos da probabilidade de erro. Assim, a ilação a retirar é que a estimativa da produção de leite da lactação difere da produção real para ambos os métodos de contraste. Esta abordagem, metodologicamente mais robusta do que a apresentada no Quadro III não é favorável aos métodos de contraste A4 e At4.

Importa ainda notar que, em termos individuais, ocorrem sobre-estimativas superiores a 2000 kg e sub-estimativas a diferirem do valor real em mais de 1000 kg de leite. A questão da variabilidade apresentada no Quadro IV pelos valores de desvios padrão, bem como a elevada amplitude de variação, é de eminente importância e será enquadrada no ponto referente à simulação de outros critérios de contraste.

De acordo com vários autores, a ordem de lactação 1 apresenta menor produção máxima e maior persistência do que as restantes ordens de lactação (Rowlands *et al.*, 1982; Batra, 1986; Friggens *et al.*, 1999; Tekerli *et al.* 2000) pelo que são as primíparas que apresentam a curva de lactação mais linear. Assim, e como em termos teóricos a eficiência do método de Fleischmann depende de forma positiva da linearidade do fenómeno que está a descrever, seria de esperar que a ordem de lactação 1 apresentasse as menores diferenças entre valores reais e estimados. Porém tal não se verifica (Quadro IV).

O Quadro V mostra os resultados da comparação de médias para observações ao pares entre as estimativas obtidas pelos métodos de contraste A4 e At4, para a produção total e aos 305 dias. Quer considerando as 145 lactações no conjunto quer por ordem de lactação, a diferença entre os dois métodos de contraste é sempre não significativa. A estimativa obtida pelo contraste At4 é em média superior em 41 e 31 kg à estimativa obtida pelo contraste A4 para a produção total e aos 305 dias, respectivamente. Estas diferenças são substancialmente menores do que as apresentadas no Quadro IV em que se comparava a produção real com a produção estimada. Por conseguinte, os resultados do Quadro V. vêm mais uma vez mostrar a proximidade existente, em termos médios, nos resultados dos dois métodos de contraste.

Quadro V - COMPARAÇÃO ENTRE AS ESTIMATIVAS OBTIDAS PELOS MÉTODOS DE CONTRASTE a4 e at4, PARA A PRODUÇÃO TOTAL E AOS 305 DIAS.

OL <sup>†</sup>	N	Produção total						Produção aos 305 dias					
		Média	dp	Min	Max	t	Sig.	Média	dp	Min	Max	t	Sig.
1	49	-56	237	-619	457	-1.7	ns	-50	213	-612	404	-1.7	ns
2	40	-46	228	-743	666	-1.3	ns	-26	253	-810	647	-0.6	ns
3	25	37	432	-714	975	0.4	ns	32	423	-714	912	0.4	ns
4	13	-119	273	-755	333	-1.6	ns	-108	268	-755	333	-1.5	ns
5	18	-41	227	-526	337	-0.8	ns	-26	253	-526	451	-0.4	ns
Total	145	-41	279	-755	975	-1.8	ns	-31	278	-810	912	-1.4	ns

<sup>†</sup> Ordem de lactação.

### Repetição do método A4

Como já vimos, a estimativa da produção de leite obtida a partir de dados dos métodos de contraste A4 e At4 foi, em média, superior à produção real. Verificou-se também uma grande disparidade de resultados que se traduz na ocorrência de sub-estimativas e sobre-estimativas superiores a 1000 e 2000 kg (Quadro IV). Neste ponto do trabalho tencionamos contribuir para o melhor entendimento destes resultados.

Repetimos o procedimento de simulação do método A4 nas 145 lactações pelo que passamos a dispor de 2 simulações (simulação 1 e simulação 2). Calculámos para cada uma das lactações a diferença entre a estimativa da produção total de leite obtida por cada uma das simulações (simulação 1 - simulação 2) e obtivemos o resultado de  $80 \pm 423$  kg o que, com o contributo da Fig. 1, elucida sobre a dispersão dos resultados obtidos. Daqui advém que a repetição do mesmo critério de amostragem de dias de lactação não gera necessariamente estimativas semelhantes para a produção de leite da lactação.

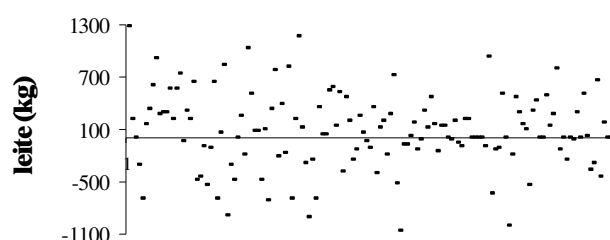


Figura 1. Diferença entre a estimativa da produção de leite da simulação 1 e 2 do método A4, para as 145 lactações.

Consideramos existirem dois aspectos, um global e outro local, a considerar em simultâneo quando nos referimos à produção de leite da lactação. O aspecto global, sobejamente tratado na bibliografia (Wood, 1976; Cobby e Le Du, 1978; Masselin *et al.*, 1987; Wilmink, 1987; Grossman e Koops, 1988; Morant e Gnanasakthy, 1989; Friggens *et al.*, 1999; Grossman *et al.*, 1999; Tekerli *et al.*, 2000) diz respeito à forma não linear da curva de lactação dita típica que consta nos manuais de fisiologia (Kolb, 1987; Swenson, 1988). A forma não linear da curva de lactação tem constituído um objecto aliciante para a investigação. São vários os estudos efectuados que visam desenvolver e comparar modelos matemático-estatísticos para descrever a curva de lactação tendo por base contrastes mensais (dados em larga escala) mas também com contrastes quinzenais e semanais (dados em escala restrita). Estes trabalhos incidem mormente no propósito de encontrar o modelo e a periodicidade de recolha de dados que melhor se enquadre na curva de lactação típica.

Todavia, como Olori *et al.* (1999) referem, coexiste um aspecto de carácter local ou de pormenor a considerar e que só é observável quando se conhece a produção diária. Embora a produção de leite diária tenda a seguir a forma típica da curva de lactação, ocorrem oscilações acentuadas de dia para dia. A produção de leite diária traduz um potencial genético que enquanto processo fisiológico traduz o resultado derradeiro de muitos factores limitantes.

Anomalias pontuais no manejo alimentar, distúrbios metabólicos, manifestações de cio, ocorrências de mamites são alguns dos factores causadores de quebras na secreção de leite. Swalve (2000) refere que durante o cio a vaca produz menos 40 a 50% do leite produzido no dia anterior. Estas quebras podem-se manter por períodos curtos de tempo, podendo-se manifestar inclusivamente em apenas uma ou duas ordenhas.

### **Os métodos de contraste e a ordenação produtiva das lactações**

Qual a repercussão do recurso aos métodos de contraste A4 e At4 na estimativa da produção de leite? Uma consequência já identificada é a sobre estimação da produção de leite da lactação. Porém, pretendemos fazer uma abordagem mais abrangente na resposta a esta questão, no sentido de indagar sobre a forma como a produção total de cada lactação é afectada em termos da posição relativa ocupada numa lista ordenada. Para este propósito procedemos à ordenação das lactações de acordo com 6 critérios, a saber: Produção total real, produção total estimada pelo método A4, produção total estimada pelo método

At4, produção aos 305 dias real, produção aos 305 dias estimada pelo método A4 e produção aos 305 dias estimada pelo método At4.

No Quadro VI apresentamos o coeficiente de correlação de Spearman  $r_s$  entre a produção real e a produção estimada por cada um dos métodos de contraste e entre estes. Apresentamos ainda um resumo do módulo da diferença da posição ocupada pelas lactações para as 6 comparações que constam no referido quadro. Recorremos ao módulo da diferença porque a soma das diferenças de posição é zero.

Da leitura do Quadro VI retira-se que nas seis comparações efectuadas o coeficiente de correlação de Spearman é altamente significativo ( $P < 0,001$ ), pelo que é rejeitada a hipótese de independência entre cada um dos seis pares de critérios de ordenação das lactações. Porém, a ordenação das produções estimadas pelos métodos de contraste A4 e At4 está mais próxima entre si ( $r_s = 0,99$ ) do que a ordenação da produção real e a ordenação da produção obtida pelos métodos de contraste ( $r_s = 0,96$ ). Também sob este prisma se reitera a proximidade entre os métodos de contraste A4 e At4 e a sua equidistância aos valores reais.

Do Quadro VI podem-se retirar outras ilações. Reportando-nos apenas aos valores totais da lactação é de salientar que o resultado mais frequente para o módulo da diferença de posição é baixo (1, 2 e 1 para as listagens Real-A4, Real-At4 e A4-At4, respectivamente) e que 25% das lactações não diferem mais que 2,

Quadro VI - COMPARAÇÃO DA POSIÇÃO OCUPADA POR CADA LACTAÇÃO, EM LISTAS ORDENADAS PELA PRODUÇÃO, DA PRODUÇÃO REAL COM OS MÉTODOS a4 e at4 E ENTRE ESTES (real-a4, a4-at4 e a4-at4, RESPECTIVAMENTE) PARA A PRODUÇÃO TOTAL E AOS 305 DIAS.

	Produção Total			Produção aos 305 dias		
	Real-A4	Real-At4	A4-At4	Real-A4	Real-At4	A4-At4
N	145	145	145	145	145	145
Média	8	9	4	8	9	5
Mediana	7	7	3	6	8	3
Moda	1	2	1	1	1	1
Q3	13	14	7	13	13	6
Q1	2	3	1	2	3	1
Máximo	42	43	20	42	40	16
Soma	1182	1350	636	1216	1372	660
$r_s^1$	0.96***	0.96***	0.99***	0.96***	0.96***	0.99***

<sup>1</sup> Coeficiente de correlação de Spearman (\*\*\*  $P < 0.001$ ).



3 e 1 posições, para as mesmas comparações de listagens. Os resultados para o 3º quartil permite constatar que pelo menos 75% das lactações não diferem mais que 13, 14 e 7 lugares nas comparações que temos vindo a referir. Conquanto não é menos importante dar destaque às restantes 25% de lactações (no máximo) que excedem os referidos valores. Referir, por exemplo, as consideráveis diferenças de 40, 42 e 43 lugares numa listagem de 145 (Quadro VI).

Assim, ao considerarmos as listas das lactações ordenadas pela produção real e pela produção estimada pelos métodos de contraste A4 e At4 verificamos que existe coerência na posição ocupada pelas lactações nas várias listas, ainda que em termos individuais ocorram diferenças de ordem de grandeza considerável, isto se atendermos à dimensão dos dados. Todavia, não vemos como sustentar a tese de que estas diferenças aumentariam na mesma proporção dum eventual aumento do número de lactações em estudo. Sendo assim, a diferença de 43 lugares supramencionada perderia impacto se a nossa lista fosse composta por milhares de lactações.

### Simulação de outros critérios de contraste

Neste ponto do trabalho apresentamos os resultados da simulação de 32 critérios de contraste resultantes de 4 intervalos parto - 1º contraste e 8 intervalos entre contrastes (Quadro I). Aqui será apresentada uma síntese dos resultados recorrendo a gráficos sendo no entanto possível encontrar a totalidade dos resultados em SILVESTRE (2003). São evidenciados os resultados relacionados com a precisão da estimativa da produção total de leite e da duração da lactação.

A Fig. 2 representa a média da diferença entre a produção total real e a estimada, de acordo com os 32 critérios de selecção de contrastes. As médias negativas mostram, mais uma vez, a tendência de sobre estimação do método

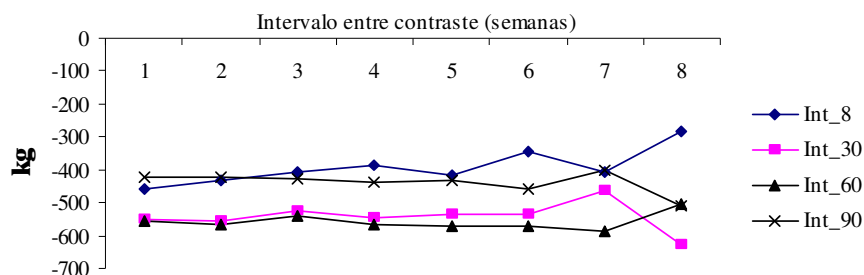


Figura 2. Média da diferença entre a produção real e a produção estimada.

de Fleischmann. Como já foi referido, o número de contrastes por lactação é tanto maior quanto menor for o intervalo entre contrastes (Quadro I). Assim, seria de esperar que aos maiores intervalos entre contrastes correspondesse uma menor proximidade entre as estimativas da produção de leite e os valores reais. Porém, a Fig. 2 contraria esta expectativa na medida em que não é observável qualquer tendência de ocorrer um aumento (em módulo) da média da diferença entre a produção real e a produção estimada com o aumento do intervalo entre contrastes. Verifica-se inclusive que a média mais próxima de zero está num intervalo entre contrastes de 8 semanas.

A intuição dir-nos-ia que quanto mais tarde se inicie o registo dos contrastes maior será a imprecisão da estimativa da produção de leite da lactação, pelo que seria de esperar que o Int\_90 apresentasse a média da diferença entre a produção total real e a estimada com os maiores valores absolutos, seguido pelo Int\_60, Int\_30 e Int\_8. Tal não se verifica, sendo que o Int\_90 apresenta médias mais próximas de zero que os Int\_60 e Int\_30, chegando a superar o Int\_8 no intervalo entre contrastes de uma semana (Fig. 2).

Se terminássemos a discussão neste momento, poderíamos aludir que o contraste leiteiro bi-mensal, com o primeiro registo efectuado até ao oitavo dia de lactação, é preferível ao contraste leiteiro mensal, quinzenal, semanal bem como a todas as outras periodicidades consideradas. Tal ilação não seria correcta, pois importa também conhecer a dispersão dos valores apresentados na Fig. 2.

Na Fig. 3 podemos analisar o desvio padrão das médias expostas na Fig. 2. Este é um aspecto a destacar porque facilita o nosso exercício de análise. Vamos realçar 3 pontos:

- A variabilidade aumenta com o aumento do intervalo entre contrastes.
- A variabilidade aumenta com o aumento do intervalo parto – 1º contraste.

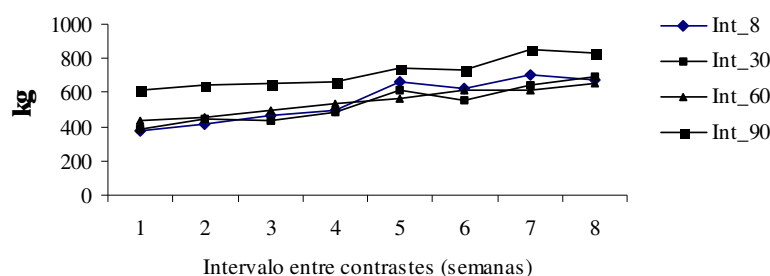


Figura 3. Desvios padrão das médias apresentadas na Fig. 2.

- A variabilidade do Int\_90 destaca-se dos restantes intervalos parto – 1º contraste por apresentar os maiores valores de desvio padrão.

Assim, ao valor a que tínhamos dado destaque para o Int\_90 com um intervalo entre contrastes de 8 dias por parecer dissonante apresenta afinal baixo valor estimativo pois é o que apresenta maior desvio padrão.

Advogamos que a proximidade a zero da média da diferença entre valores reais e estimativas não constitui um atributo suficiente para a comparação dos vários critérios de amostragem de dias de lactação. É mais importante a homogeneidade dessas diferenças porque reflecte que o método de amostragem afecta as lactações de forma semelhante, o que confere maior confiança no posicionamento relativo de cada estimativa. Nestas circunstâncias, e caso se entendesse conveniente, poder-se-ia alterar o método de cálculo da produção de leite por forma a corrigir uma insuficiência sistemática. Por exemplo e por absurdo, se averiguássemos que a estimativa da produção de leite apresentava sistematicamente um erro de 1000 kg, seria muito simples proceder à sua remoção.

Sob o ponto de vista de estimar a produção de leite da lactação e minorar o ónus da recolha de dados, os nossos resultados mostram que o intervalo entre contrastes de 4 semanas sem que se ultrapasse os 60 dias para a recolha do 1º contraste constitui a escolha acertada. Este corolário abona em favor do contraste leiteiro nacional na medida em que este preconiza, por norma, um intervalo entre contrastes entre 26 e 33 dias e que o intervalo parto – 1º contraste não ultrapasse os 38 dias.

Na Fig. 4 apresentamos as médias da diferença entre a duração da lactação real e estimada para os 4 intervalos parto – 1º contraste e os 8 intervalo entre contrastes. Numa apreciação global, as médias obtidas apresentam valores positivos e nunca superiores a 8, o que mostra que o método de Fleischmann

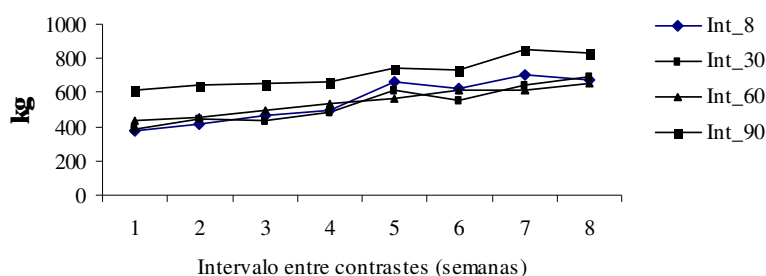


Figura 4. Média da diferença entre a duração da lactação real e estimada

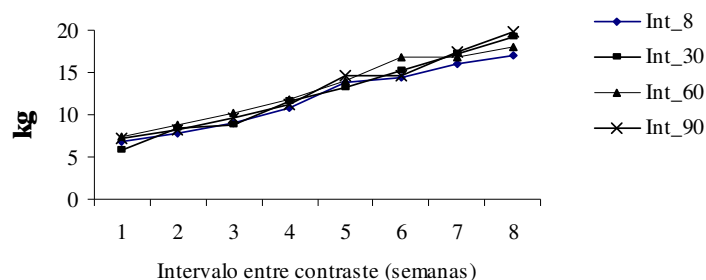


Figura 5. Desvios padrão das médias apresentadas na Fig. 4.

subestima de forma ténue a duração da lactação. É digno de nota que a disparidade de contrastes por lactação, a variar desde 4 a 44 (Quadro I), não encontre aqui reflexo. Todavia, em termos de desvio padrão verifica-se um aumento do desvio padrão de cerca de 7 dias até 19 dias, ao longo dos intervalos entre contrastes e para os 4 intervalos parto - 1º contraste (Fig. 5).

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatámos que os critérios de amostragem A4 e At4 conduziram a estimativas de produção de leite da lactação que diferiram em termos médios da produção real, sendo de realçar a elevada variabilidade do erro. Por outro lado, os dois métodos de amostragem não implicaram diferenças em termos médios na estimativa da produção total de ambos. A comparação da ordenação produtiva das produções estimadas e reais mostrou que os métodos de amostragem A4 e At4 estão mais próximos entre si do que com a produção real. Com a simulação de outras periodicidades de recolha de dados obtivemos resultados favoráveis à periodicidade mensal. Assim, em função dos resultados apresentados e no âmbito da estimação da produção de leite da lactação, não encontramos critérios objectivos para preterir um método de amostragem em relação ao outro. Porém, somos da opinião que no âmbito da avaliação genética com modelos de contrastes, o método A4 é preferível ao método At4 na medida em que nestas circunstâncias não é relevante a questão da compensação produtiva entre contrastes que caracteriza o método At4.

A lactação foi e continua a ser estudada pela sua forma de variação global. Porém, a produção de leite de cada ordenha revela desvios pontuais, de duração

e intensidade variáveis, capazes de condicionar o estudo da forma global da curva de lactação quando se dispõe de poucos registos diários, como é o caso do contraste mensal.

### **Agradecimentos**

Agradecemos ao Sr. Manuel Ferreira Torres, Carlos, Filipe, Paulo, Júlio e Sr.<sup>a</sup> Margarida por nos permitirem aceder aos registos produtivos das suas explorações leiteiras.

### **BIBLIOGRAFIA**

- BATRA, T.R., 1986. Comparison of two mathematical models in fitting lactation curves for pureline and crossline dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.*, 66: 405-417.
- CASSANDRO, M.P., CARNIER, L., GALLO, R., MANTOVNI, B., CONTIERO, G., BITTANTE e JANSEN, G.B., 1995. Bias and accuracy of single milk schemes to estimate daily and lactation milk yield. *J. Dairy Sci.*, 78: 2884-2893.
- COBBY, J.M. e LE DU, Y.L.P., 1978. On fitting curves to lactation data. *Anim. Prod.*, 26: 127-133.
- DANIEL, W.D., 1991. *Biostatistic: A foundation for analysis in the health sciences*. John Wiley & Sons (5<sup>th</sup> ed.), 740 p.
- DELORENZO, M.A. e WIGGANS, G.R., 1986. Factors for estimating daily yield of milk, fat and protein from a single milking for herds milked twice a day. *J. Dairy Sci.*, 69: 2386-2394.
- FRIGGENS, N.C., EMMANS, G.C. e VEERKAMP, R.F., 1999. On the use of simple ratios between lactation curve coefficients to describe parity effects on milk production. *Livest. Prod. Sci.*, 62: 1-13.
- GROSSMAN, M. e KOOPS, W.J., 1988. Multiphasic analysis of lactation curves in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 71: 1598-1608.
- GROSSMAN, M., HARTZ, S.M. e KOOPS, W.J., 1999. Persistency of Lactation Yield: A Novel Approach. *J. Dairy Sci.*, 82: 2192-2197.
- ICAR, INTERNATIONAL COMMITTEE FOR ANIMAL RECORDING, 1995. *Appendices to the International Agreement of Recording practices*. Via A. Torlonia 15/A, 1-00161 Rome, Italy, 369p.
- KELLOGG, D.W., URQUHART, N.S. e ORTEGA, A.J., 1977. Estimating lactation curves with a gamma curve. *J. Dairy Sci.*, 55: 1308-1315.
- KOLB, E., 1987. *Fisiologia Veterinária*. Editora Guanabara, 4<sup>a</sup> edição, 611 p.
- LEE, A. J. e WARDROP, J., 1984. Predicting daily milk yield, fat percent and protein percent from morning or afternoon tests. *J. Dairy Sci.*, 67: 351-357.
- LIU, Z., REENTS, R., REINHARDT, F. e KUWAN, K., 2000. Approaches to estimating daily yield from single milk testing schemes and use of a.m.-p.m. records in test-day model genetic evaluation in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 83: 2672-2682.
- MASSELIN, S., SAUVANT, D., CHAPOUTOT, P., MILAN, D., 1987. Les Modeles D'Ajustement des Coubes de lactation. *Ann. Zootech.*, 36 (2):171-206

- MEINERT, T.R., NORMAN, H.D. e DICKINSON, F.N., 1996. Consideration of percentage of milk shipped for calculation of total lactation yields from various morning and evening plans of milk sampling. *J. Dairy Sci.*, 79: 291-300.
- MORANT, S.V. e GNANASAKTHY, A., 1989. A new approach to the mathematical formulation of lactation curves. *Anim. Prod.*, 49: 151-162.
- NORMAN, H.D., VANRADEN, P.M., WRIGHT, J.R. e SMITH, L.A., 1999. Mathematical representations of correlations among yield traits and somatic cell score on test day. *J. Dairy Sci.*, 82: 2205-2211.
- OLORI, V.E., BROTHERSTONE, S., HILL, W.G. e MCGUIRK, B.J., 1999a. Fit of standard models of the lactation curve to weekly records of milk production of cows in a single herd. *Livest. Prod. Sci.*, 58: 55-63.
- POOL, M.H. e MEUWISSEN, T.H.E., 1999. Prediction of daily milk yields from a limited number of test days using test day models. *J. Dairy Sci.*, 82: 1555-1564.
- POOL, M.H. e MEUWISSEN, T.H.E., 2000. Reduction of the number of parameters needed for a polynomial random regression test day model. *Livest. Prod. Sci.*, 64: 133-145.
- ROWLANDS, G.J., LUCEY, S. e RUSSELL, A.M., 1982. A comparison of different models of the lactation curve in dairy cattle. *Anim. Prod.*, 35: 135-144.
- SAS INSTITUTE INC., 1999. Users Guide, Version 8, Third Edition, Cary, NC.
- SCHUTZ, M.M., HANSEN, L.B. e STEUERNAGEL, G.R., 1990. Variation of milk, fat, protein and somatic cells for dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 73: 484-493.
- SILVESTRE, A.M.D., 2003. Biometria da lactação em vacas leiteiras Portuguesas. Tese de Doutorado. UTAD, Vila Real, 196 p.
- SWALVE, H.H., 2000. Theoretical basis and computational methods for different test-day genetic evaluation methods. *J. Dairy Sci.*, 83: 1115-1124.
- SWENSON, M.J., 1988. *Dukes: Fisiologia dos Animais Domésticos*, 10ª Edição. Editora Guanabara, 799p.
- TEKERLI, M., AKINCI, Z., DOGAN, I. e AKCAN, A., 2000. Factors affecting the shape of lactation curves of Holstein cows from the Balikesir province of Turkey. *J. Dairy Sci.*, 83: 1381-1386.
- VEERKAMP, R.F. e GODDARD, M.E., 1998. Covariance functions across herd production levels for test day records on milk, fat and protein yield. *J. Dairy Sci.*, 81: 1690-1701.
- WIGGANS, G.W., 1981. Methods to estimate milk and fat yields from a.m./p.m. plans. *J. Dairy Sci.*, 64: 1621-1624.
- WILMINK, J.B.M., 1987. Adjustment of test-day milk, fat and protein yield for age, season and stage of lactation. *Livest. Prod. Sci.*, 16: 335-348.
- WOOD, P.D.P., 1976. Algebraic models of the lactation curves for milk, fat and protein production, with estimates of seasonal variation. *Anim. Prod.*, 22: 35-40.

## MICROBIAL QUALITY OF SILAGES - *Listeria monocytogenes* CONTAMINATION

M. M. Guerra <sup>1\*</sup>, M. Oliveira<sup>1</sup>, A. Fernandes<sup>2</sup> e F.M. Bernardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Inspeção Sanitária/CIIISA- Faculdade de Medicina Veterinária,  
Rua Prof. Cid dos Santos, Polo Universitário da Ajuda, 1300 Lisboa;

<sup>2</sup> Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho,  
Quinta S. José, S. Pedro de Merelim, 4700-859 Braga  
correspondência: Escola Superior de Hotelaria e Turismo do Estoril,  
Av. Condes de Barcelona, 2769-510 Estoril; email: manuela.guerra@eshte.pt

( Aceite para publicação em 30 de Julho de 2004)

### ABSTRACT

Silage is produced by the natural fermentation of plant materials more frequently associated to animal listeriosis. Many cases result from feeding animals with bad quality silages, improperly fermented, where *L. monocytogenes* can reach high levels. For the assessment of the microbial quality of silages produced in Portugal, 145 silage samples were analysed for the detection of *Listeria* spp, 71 obtained from horizontal silos and 74 from the interior and surface of 37 big bale silos. Enumeration of *L. monocytogenes* was performed in 117 samples. The lactic acid microflora, yeasts and moulds quantification was also assessed in 18 samples. *Listeria* spp. was isolated from 20 horizontal silo samples (28%), 10 with *L. monocytogenes* (14%) and 10 with *L. innocua* (14%). Eleven (15%) big bale silos were contaminated with *L. monocytogenes* and 9 (12%) simultaneously with *L. innocua*. Two samples collected from the same big bale silo (interior and surface) contained *L. monocytogenes* higher than 10<sup>6</sup> UFC/g and two others collected from the surface of a silo and the interior of another one, had 100 UFC/g levels. Levels of lactic acid bacteria ranged from 9.9x10<sup>4</sup> and 5.5x10<sup>8</sup> UFC/g and yeasts and moulds from <100 and > 1x10<sup>7</sup> UFC/g.

**Key-words:** *Listeria monocytogenes*, quality, silage

## QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE SILAGENS - CONTAMINAÇÃO POR *Listeria monocytogenes*

### RESUMO

A silagem, produto utilizado na alimentação animal e obtido pela fermentação natural de materiais vegetais, é frequentemente associada à listeriose animal. Muitos

casos resultam do consumo de silagem de má qualidade, com uma fermentação inadequada, em que *L. monocytogenes* pode atingir teores bastante elevados. Com vista a uma primeira avaliação relativa à ocorrência de *L. monocytogenes* em silagens de milho produzidas em Portugal analisaram-se 145 amostras, 71 provenientes de silos horizontais e 74 provenientes da superfície e interior de 37 silos em fardo. Pesquisou-se *Listeria* spp. na totalidade das amostras e em 117 quantificou-se a presença de *L. monocytogenes*. Quantificou-se ainda a flora láctica e micológica em 18 das amostras de silos horizontais. 20 amostras dos silos horizontais estavam contaminadas (28%), 10 por *L. monocytogenes* (14%) e 10 por *L. innocua* (14%), enquanto 11 (15%) das amostras de silos em fardo estavam contaminadas com *L. monocytogenes* e 9 (12%) em simultâneo com *L. innocua*. Duas amostras provenientes do mesmo silo em fardo (interior e superfície do silo) apresentaram teores superiores a  $10^6$  UFC/g e outras 2, originárias da superfície de um silo e do interior de outro, teores de 100 UFC/g. As concentrações de flora láctica e micológica variaram entre  $9,9 \times 10^4$  e  $5,5 \times 10^8$  UFC/g e entre  $<100$  e  $> 1 \times 10^7$  UFC/g, respectivamente.

**Palavras chave:** *Listeria monocytogenes*, qualidade, silagem

## INTRODUÇÃO

A listeriose é uma doença infecciosa causada por microrganismos do género *Listeria*, que pode afectar tanto as pessoas como os animais e, em ambos os casos, pode manifestar-se através de formas patológicas bastante severas - meningite, encefalite, aborto ou septicemia (Gray e Killinger, 1966). Das seis espécies que o género *Listeria* inclui, *L. monocytogenes* é considerada como sendo a mais patogénica para o Homem e para os animais (McLauchlin, 1987).

Os animais podem ser infectados pela ingestão de vários tipos de alimentos contaminados (pastagens frescas, palha e outros tipos de alimentos (Fenlon *et al.*, 1986; McCarthy, 1990), mas a silagem é o alimento que com maior frequência é associado à listeriose dos ruminantes (Fenlon, 1999).

Esta associação foi pela primeira vez estabelecida em 1922 na Islândia, local onde ficou conhecida como a doença da silagem (Gray, 1966). Desde então, a relação entre listeriose e consumo de silagem tem sido bem documentada, quer no que respeita ao gado bovino leiteiro (Fenlon, 1986; Ryser e Marth, 1991), ovino (Grønstøl, 1979; Fenlon, 1986; Gitter *et al.*, 1986; Vazquez-Boland *et al.*, 1992) e caprino (Fensterbank *et al.*, 1984; Ryser e Marth, 1991).

Muitos dos casos são resultantes do consumo de silagem de má qualidade, ou seja, silagem de fermentação inadequada, com valores de pH >



4,0, onde o microrganismo pode estar presente em grandes quantidades ( $10^4$  UFC/g) (Fenlon, 1986; Skovgaard e Morgen 1988; Donald *et al.*, 1995; Ryser *et al.*, 1997). A aplicação de novas formas de produção de silagem em fardos ("big baler"), foi associada ao aumento da prevalência de *L. monocytogenes* em silagens de má qualidade e consequentemente da listeriose nos ruminantes. Como *L. monocytogenes* é um agente que se multiplica à superfície e estas silagens têm grandes áreas de exposição, existem maiores dificuldades no estabelecimento das condições de anaerobiose adequadas à fermentação dos açúcares (Fenlon, 1985; 1999; Donald *et al.*, 1995).

Grande parte da contaminação de *L. monocytogenes* em silagens, ocorre em zonas onde o desenvolvimento de bolores é evidente. Se esta camada superficial for removida antes da silagem ser fornecida aos animais, o perigo de contaminação será reduzido (Fenlon, 1999).

Por outro lado, também existem trabalhos que demonstram a contaminação por *L. monocytogenes* do mesmo tipo das implicadas em surtos de listeriose humana, em silagens de milho consideradas de boa qualidade ( $\text{pH} < 4$ ) (Ryser *et al.*, 1997; Boerlin *et al.*, 2003).

As silagens estão associadas à listeriose animal e também são consideradas como a principal fonte de contaminação do leite durante a ordenha (Gray, 1960; Grønstøl, 1979; Fensterbank *et al.*, 1984; Fenlon, 1986; 1999; Gitter *et al.*, 1986; Ryser e Marth, 1991; Vazquez-Boland *et al.*, 1992). A presença de *Listeria* no leite e nas fábricas de laticínios aumenta o risco de contaminação dos produtos lácteos, os quais poderão funcionar como potenciais veículos de listeriose humana, sobretudo se não se verificarem as devidas condições de tratamento térmico (pasteurização) (Wehr, 1987; Skovgaard e Morgen 1988; Perry e Donnelly, 1990). Em Portugal, a ocorrência de *Listeria* em silagens não está estudada. Com o presente trabalho, procurou-se realizar uma abordagem preliminar à ocorrência de *Listeria monocytogenes* em amostras de silos horizontais e em fardo produzidas neste país.

## MATERIALE MÉTODOS

Foram analisadas 145 amostras de silagem de milho, 71 provenientes de silos horizontais obtidos em explorações de bovinos de leite situadas nas proximidades de Lisboa e 74 provenientes da superfície (10 cm) e do interior (50 cm) de 37 silos produzidos em fardo numa região do Norte de Portugal (Minho).

### **Deteção e contagem de *Listeria* spp.**

As amostras foram analisadas de acordo com o protocolo de pesquisa (todas as amostras) e contagem (apenas 117 amostras) de *Listeria* spp. anteriormente optimizado (Guerra e Bernardo, 2000), adaptado das normas NF EN ISO 11290-1.2.

Para a detecção de *Listeria* spp., homogeneizaram-se 25 g de cada amostra de silagem em 225 ml de Água Peptonada Tamponada (Oxoid CM 509) (APT), e após 24 h de incubação a 30 °C, transferiu-se 1ml para 10ml de caldo Fraser (Merk 110398) com adição de suplemento selectivo (Merk 110399). Após o período de incubação (24h/30 °C), seguiu-se a sementeira à superfície de geloses selectivas - Palcam (Oxoid CM 8719, SR150 E) e McBride (Difco 0922-17). Ambas as geloses foram incubadas a 37 °C durante 24-48 h. Sub-cultivaram-se 4 a 5 colónias suspeitas de pertencerem ao género *Listeria* em gelose de Triptona de Soja (Oxoid CM 131) enriquecida com 0,6% de Extracto de Levedura (Difco 0127-01-7) e após incubação (24h/37 °C), os isolados foram identificados através das seguintes provas: catalase, coloração Gram, pesquisa de  $\beta$ -hemólise em gelose Columbia com 5,0% de agar sangue de carneiro (Bio-Merieux 43 041), e identificação bioquímica através de galeria Api *Listeria* (Bio-Merieux 10300). Os isolados identificados como *L. monocytogenes*, foram serotipificados, utilizando soro Bacto-*Listeria* O poli-serotipos 1,4 (Difco Laboratories, Detroit, MI).

Determinou-se o teor de *Listeria* spp. em 43 amostras provenientes dos silos convencionais e na totalidade das amostras dos silos em fardo. Fizeram-se diluições decimais a partir do pré-enriquecimento, após 2-4 h de incubação à temperatura ambiente. Semeou-se 0,1 ml de cada uma das diluições por espalhamento à superfície de placas de gelose Palcam. Após a incubação (37 °C/24-48 h) procedeu-se à contagem das colónias suspeitas e à sua identificação, de acordo com os procedimentos anteriormente referidos. As sementeiras foram realizadas em duplicado.

### **Quantificação e recolha de flora láctica e micológica**

Quantificou-se e recolheu-se flora láctica e micológica em 18 das amostras de silos convencionais. A partir da suspensão inicial em APT fizeram-se diluições decimais. Semeou-se 1ml de cada diluição por espalhamento à superfície de placas de gelose de Man, Rogosa & Sharpe (Oxoid CM361) (MRS) para recolha e identificação de flora láctica e 0,25 ml à superfície de 4 placas de gelose Rose Bengal Chloramphenicol Agar (BK 151HA) (CRB). As placas de MRS foram

incubadas a 37 °C durante 48 h em microaerofilia e as placas de CRB foram incubadas a 25 °C durante 5-8 dias. As sementeiras foram efectuadas em duplicado.

## RESULTADOS

### Presença e teor de *Listeria* spp. nas silagens

Nas amostras provenientes dos silos horizontais verificou-se que 20 amostras estavam contaminadas (28%), 10 por *L. monocytogenes* (14%) e 10 por *L. innocua* (14%) (Quadro I). Das 43 amostras em que se determinou o teor de *Listeria* spp. isolou-se unicamente *L. innocua*, num teor de  $1 \times 10^6$  UFC/g em duas.

Quadro I - Ocorrência de *Listeria monocytogenes* e *L. innocua* em silos horizontais e em fardo produzidos em Portugal.

Tipo de silo	Nº de amostras (%)	Resultados microbiológicos		
		Negativos (%)	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>
horizontais	71 (49%)	51	10	10
fardo	74 (51%)	61	11*	11*
Total	145 (100%)	112 (77%)	21 (15%)	21 (15%)

\* nove amostras encontravam-se contaminadas por *L. monocytogenes* e *L. innocua* em simultâneo

Nas amostras de silos em fardo verificou-se que 11 (15%) estavam contaminadas com *L. monocytogenes* (Quadro II), 2 das quais provenientes do mesmo silo (E53 e E54), com teores acima de  $10^6$  UFC/g e outras 2 originárias da superfície de um silo e do interior de outro, com teores de 100 UFC/g, (E7 e E59) (Quadro II). Quatro silos estavam contaminados por *L. monocytogenes* nas regiões interiores e superficiais, dois silos apresentaram contaminação só no interior e um outro só à superfície. Também foi isolada *L. innocua* em 11 amostras, nove (12%) das quais em simultâneo com *L. monocytogenes* (Quadro I).

Todos os isolados de *L. monocytogenes* aglutinaram o soro Bacto-*Listeria* O poli-serotipos 1,4.

### Teores de flora láctica e micológica presentes nas silagens

Verificaram-se teores de flora láctica entre  $9,9 \times 10^4$  e  $5,5 \times 10^8$  UFC/g e micológica entre  $<100$  e  $> 1 \times 10^7$  UFC/g (Quadro III). 4 amostras revelaram a

Quadro II – PRESENÇA E TEOR DE *Listeria* spp. NAS AMOSTRAS DE SILOS EM FARDO.

Nº amostras	Região do silo	Teor de <i>L. monocytogenes</i> (ufc/g)	Detecção de <i>Listeria</i> spp.	
E7*	superfície	1x10 <sup>2</sup>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
E8 *	interior	neg	<i>L. monocytogenes</i>	—
E32	superfície	neg	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
E34	interior	neg	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
E52	superfície	neg	—	<i>L. innocua</i>
E53*	superfície	1,5x10 <sup>7</sup>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
E54*	interior	3x10 <sup>6</sup>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
E59*	interior	1x10 <sup>2</sup>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
E60*	superfície	neg	<i>L. monocytogenes</i>	—
E61*	superfície	neg	—	<i>L. innocua</i>
E62*	interior	neg	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
E72*	superfície	neg	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
E73*	interior	neg	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
Total			11 (15%)	11 (15%)

\*amostras provenientes do mesmo silo (E7 e E8; E53 e E54; E59 e E60; E 61 e E62; E72 e E73); neg; negativo; —: não detectado

presença de *L. innocua*. Nestas amostras, os teores de flora láctica foram superiores a 1x 10<sup>6</sup>UFC/g.

## DISCUSSÃO

O presente estudo revela a presença de *L. monocytogenes* e *L. innocua* em silagens de milho produzidas em Portugal segundo dois processos tecnológicos diferentes, silos horizontais e em fardo. A presença de *Listeria* spp. registada neste tipo de alimentos para animais é comparável a outros estudos levados a cabo em áreas geográficas diferentes (revisão de Laithier *et al.*, 2000). Por exemplo, Fenlon (1985), na Escócia detectou *L. innocua* em 10 e 17,8% das amostras de silagem (silos horizontais) examinadas em 1983 e 1984, respectivamente. No mesmo estudo, *L. monocytogenes* foi isolada em 2,5% das amostras pesquisadas no primeiro ano referido e em 5,9% das que foram estudadas no ano seguinte. Anos antes, Grønstol (1979) registou uma ocorrência bastante mais elevada ao isolar *L. monocytogenes* a partir de

Quadro III – TEORES DE FLORA LÁCTICA E MICOLÓGICA PRESENTES EM 18 AMOSTRAS DE SILAGEM.

Amostra ( <i>Listeria</i> spp.*)	Teor de flora láctica (UFC/g)	Teor (UFC/g) de flora micológica
S29	$> 1 \times 10^6$	Bolores: $4 \times 10^3$ Leveduras: $2,8 \times 10^4$
S30 ( <i>L. innocua</i> )	$> 1 \times 10^6$	Bolores: $2 \times 10^2$ Leveduras: $5,8 \times 10^4$
S31	$> 1 \times 10^6$	Bolores: $1 \times 10^3$ Leveduras: $3,3 \times 10^5$
S32	$> 1 \times 10^6$	Bolores: $1,7 \times 10^4$ Leveduras: $8,4 \times 10^5$
S33	$1,5 \times 10^8$	Bolores: $1 \times 10^5$ Leveduras: $> 1 \times 10^7$
S34	$5,5 \times 10^8$	Bolores: $1 \times 10^5$ Leveduras: $> 1 \times 10^7$
S35	—	Bolores: $< 100$
S36	$2,6 \times 10^6$	Bolores: $< 100$
S37	$7,0 \times 10^6$	Bolores: $< 100$
S38	—	Bolores: $2,2 \times 10^4$ Leveduras: $3,2 \times 10^5$
S39 ( <i>L. innocua</i> )	$7,5 \times 10^7$	—
S40	$9,9 \times 10^4$	—
S41	$2,1 \times 10^6$	—
S42	$4,2 \times 10^6$	—
S43 ( <i>L. innocua</i> )	$2,7 \times 10^7$	—
S44 ( <i>L. innocua</i> )	$6,0 \times 10^7$	—
S45	—	—
S46	$3,2 \times 10^5$	—

(*Listeria* spp.\*) contaminada com *Listeria* spp.; —: não determinado

28% das amostras estudadas. Perry e Donnelly (1990) nos Estados Unidos, isolaram *L. innocua* em 15,2% das amostras e *L. monocytogenes* a partir de 2,9% das silagens de milho e de erva examinadas.

*L. monocytogenes* e *L. innocua* são frequentemente as únicas espécies isoladas nas silagens. O isolamento de *L. innocua* não deixa de ter interesse já que partilha, em parte, o mesmo habitat de *L. monocytogenes*. Assim, a sua presença pode ser considerada como causa presumível de um risco potencial da contaminação por aquela espécie patogénica para o Homem.

A presença de *Listeria* spp. nas silagens, geralmente num número reduzido, decorre da contaminação das forragens, no campo de cultivo. Por sua vez, a presença daqueles microrganismos na vegetação é atribuída aos dejectos dos animais em pastoreio, à vegetação em decomposição, e ainda à

disseminação por animais selvagens, nomeadamente aves silvestres (Fenlon, 1985; Fenlon *et al.*, 1996; Duarte *et al.*, 2003).

Um dos principais factores que mais está associado à multiplicação de *Listeria* nas silagens é o pH (Fenlon, 1999). Embora não tenha sido um parâmetro estudado, há que referir que uma silagem de boa qualidade, devidamente acondicionada e protegida contra a deterioração aeróbica, deve sofrer uma fermentação activa com produção de ácido láctico, reduzindo o pH para um valor abaixo de 4,2, o qual inibe *L. monocytogenes*. Efectivamente, este microrganismo é detectado mais frequentemente nas silagens com pH superior a 4 - 4,5 (Fenlon, 1985, Laithier *et al.*, 2000). Existem vários factores que directa ou indirectamente afectam o pH. Uma forragem com uma elevada disponibilidade de hidratos de carbono solúveis em água, com um baixo poder tampão e uma quantidade adequada de matéria seca conduzirá a uma silagem de baixo pH. Um outro factor de relevo na redução do pH da silagem está relacionado com a maior ou menor exclusão de oxigénio do silo. O oxigénio poderá, adicionalmente, provocar a deterioração aeróbia após a fermentação da silagem estar completa (Perry e Donnelly, 1990). Estes dois factores poderão aumentar as hipóteses de contaminação de *Listeria* nas silagens.

A deterioração aeróbia, habitualmente activa microrganismos aeróbios letárgicos, como os bolores e as leveduras. Alguns autores sugerem que a multiplicação de bolores e leveduras pode aumentar o pH das silagens, permitindo a multiplicação de *Listeria*. No presente caso, nas amostras onde foi quantificada a flora micológica não foi detectada *L. monocytogenes*, apenas uma amostra revelou a presença de *L. innocua*. De notar, no entanto, os teores elevados ( $> 10^6$  UFC/g na maioria das amostras) de flora láctica presente naquelas amostras, na qual se reconhece a capacidade inibidora de *Listeria* por parte de algumas espécies que a constituem (Guerra e Bernardo, 1999). No estudo de Perry e Donnelly (1990) anteriormente referido, foram isolados 5 grupos de *Lactobacillus plantarum* e um de *Pediococci* a partir das amostras de silagem, que inibiram *L. monocytogenes* no decorrer de um ensaio de antagonismo.

Impedir a infiltração de ar no silo e dispor de mecanismos que o excluam do silo, são factores considerados decisivos na supressão da multiplicação de *Listeria* (Kalac, 1982; Fenlon, 1999).

Relacionado com o nível de oxigénio no silo está o tipo de silo utilizado. Algumas alterações na tecnologia de produção e embalagem de palhas, fenos

e silagens (rolos cobertos com plástico) podem constituir um factor de risco na multiplicação de *Listeria* nos alimentos para animais. As amostras de silagem analisadas no presente estudo eram provenientes de dois tipos de silos diferentes, horizontais (em trincheira) e em fardo. Embora não se tivessem verificado diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) na ocorrência de *Listeria* entre os dois tipos de silos, *L. monocytogenes* estava presente em teores quantificáveis em quatro amostras dos silos em fardo e, em duas delas (provenientes do mesmo silo) com teores bastante elevados ( $> 10^6$  UFC/g). Este aspecto pode sugerir que *L. monocytogenes* pode encontrar condições mais favoráveis à sua multiplicação nos silos em fardo. No entanto, como as amostras de silagens foram obtidas em regiões diferentes de Portugal (Minho e Estremadura), outros factores podem concorrer para esta situação, como as condições climáticas, a quantidade de matéria seca, entre outras.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo parecem ser indicadores do eventual risco que as silagens constituem na transmissão da listeriose. Contudo, são necessários estudos mais aprofundados que possam indicar com representatividade, a situação que se verifica em Portugal e que contribuam para compreender a influência da tecnologia de produção de silagem na ocorrência de *Listeria* nestes alimentos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Doutor Miguel Saraiva Lima pelo fornecimento de parte das amostras de silagens colhidas na região de Lisboa e aos Drs. Enrique Sanchez e Gonçalo Andrade pelo processamento de parte das amostras.

## BIBLIOGRAFIA

- BOERLIN, P., BOERLIN-PETZOLD, F. e JEMMI, T., 2003. Use of Listeriolysin O and Internalin A in a seroepidemiological study of Listeriosis in Swiss dairy cows. J. Clin. Microbiol., 41: 1055-10061.
- DONALD, A. S., FENLON, D. R. e SEDDON, B., 1995. The relationship between ecophysiology, indigenous microflora and growth of *Listeria monocytogenes* in grass silage. J. Appl. Bacteriol., 79: 141-148.

- DUARTE, E. L., GUERRA, M. M. e BERNARDO, F. M., 2002. *Salmonella* and *Listeria* spp. carriage by gulls (larids). Rev. Port. Ciên. Vet., 97 (544): 181-187.
- FENLON, D. R., 1985. Wild birds and silage as reservoir of *Listeria* in the agricultural environment. J. Appl. Bacteriol., 59: 537-543.
- FENLON, D. R., 1986. Rapid quantitative assessment of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves. Vet. Rec., 118: 240-242.
- FENLON, D. R. 1999., *Listeria monocytogenes* in the environment. In: *Listeria*, Listeriosis and Food Safety, Ryser e Marth (eds), New York, USA, pp. 21-37.
- FENLON, D. R., WILSON, J. e DONACHIE, W., 1996. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. J. Appl. Bacteriol., 81: 641-650.
- FENSTERBANK, R., AUDURIER, A., GODU, J., GUERRAULT, P e MALO, N., 1984. Study of *Listeria* strains from sick animals and from the silage consumed. Ann. Rech. Vet., 15: 113-118.
- GITTER, M., STJ STEBBINGS, R., MORRIS, J. A., HANNAM, D. e HARRIS, C., 1986. Relationship between ovine listeriosis and silage feeding. Vet. Rec., 118: 207-208.
- GRAY, M. L., 1960. A possible link in the relationship between silage feeding and listeriosis. J. Am. Vet. Assoc., 136: 205-208.
- GRAY, M.L. e KILLINGUER, A.H., 1966. *Listeria monocytogenes* and *Listeria* infections. Bact. Rev., 30: 309-382.
- GRØNSTØL, H. 1979. Listeriosis in sheep. Isolation of *Listeria monocytogenes* from grass silage. Acta Vet. Scand., 20: 492-497.
- GUERRA, M.M. e Bernardo, F.M.A., 2000. Ocorrência de *Listeria* spp. em leite e laticínios tradicionais portugueses. Rev. Port. Zoot., VII (2): 37-47.
- GUERRA, M.M. e BERNARDO, F.M.A., 2001. Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo. Rev. Port. Ciênc. Veter., 96. (538): 65-69.
- KALAC, P., 1982. A review of some aspects of possible association between feeding of silage and animal health. Brit. Vet. J., 138:314-315. (citado por Perry e Donnelly, 1990).
- LAITHIER, C., HEUCHEL, V., CORROT, G. e MÉNARD, J.-L., 2000. La contamination des fourrages par *Listeria monocytogenes*: synthèse des connaissances. 7<sup>e</sup> Rencontre Recherches Ruminants *Libre de Resumes*. 316 Institut de Lélevage - INRA Paris les 6 et 7 Décembre 2000, pp. 347-350.
- MCCARTHY, S.A., 1990. *Listeria* in the environment. In: Foodborne listeriosis, A.J. Miller, J.L. Smith e G. A. Somkuti (eds), Society For Industrial Microbiology. Elsevier, Amsterdam, pp. 25-29.
- MCLAUCHLIN, J., 1987. The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective. R. Medical Microbiol., 8: 1-14.
- PERRY, C.M. e DONNELLY, C.W., 1990. Incidence of *Listeria monocytogenes* in silage and its subsequent control by specific and nonspecific antagonism. J. Food Protec., 8: 642-647.
- RYSER, E.T. e MARTH, E.H., 1991. *Listeria*, listeriosis and food safety. Marcel Dekker, Inc., New York, 642 p.



- RYSER, E.T., ARIMI, S.M. e DONNELLY, C.W., 1997. Effects of pH on distribution of *Listeria* ribotypes in corn, hay and grass silage. *Appl. Environm. Microbiol.*, 63: 3695-3697.
- SKOVAARD, N. e Morgen, C.A., 1988. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animal in feeds, and in raw foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.*, 6: 229-242.
- WEHR, H. M., 1987. *Listeria monocytogenes* – A current dilemma. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70: 769-772.
- VAQUEZ-BOLAND, J.A., DOMINGUEZ, L., BLANCO, M., ROCOURT, J., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F., GUTIERREZ, C.B. e TASCON, R.I., 1992. Epidemiological investigation of a silage-associated epizootic of ovine listeric encephalitis, using a new *Listeria*-selective enumeration medium and phage typing. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 368-371.

## THE USE OF BIOMARKERS IN AQUATIC TOXICOLOGY STUDIES

A.Fontainhas-Fernandes

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - Centro de Estudos Tecnológicos,  
do Ambiente e da Vida, Apartado 1013, 5000-911 Vila Real

*(Aceite para publicação em 30 de Julho de 2004)*

### ABSTRACT

The main objective of this review is to present an overview about the biomarkers responses in fish from contaminated sites, which offer great promises for providing information that can contribute to environmental monitoring programmes. In fact biomarkers assays are particularly useful when they relate to toxic effect and not just exposure. The most important reason for using biomarkers in environmental risk assessment is that they can give information on the effects of pollutants. Thus, the use of biomarkers is complementary to biomonitoring which involves the determination of levels of environmental chemicals. In order to assess the exposure to environmental pollutants on aquatic ecosystems, the different types of biomarkers are examined in some detail. A number of specific fish biomarkers are also presented, namely biotransformation enzymes, oxidative stress parameters, biotransformation products, stress proteins, haematological, genotoxic and immunological parameters, and physiological histological and morphological parameters. Finally, the advantages and limitations of the use of the biomarkers were presented, like its biological and toxicological relevance.

**Key-words:** Aquatic toxicology, biomarkers, environment

## O USO DE BIOMARCADORES EM ESTUDOS DE TOXICOLOGIA AQUÁTICA

### RESUMO

O principal objectivo do presente trabalho de revisão consiste na apresentação de uma visão global sobre as respostas dos biomarcadores em peixes de locais contaminados, as quais constituem uma forma promissora para fornecer informação que pode contribuir para programas de monitorização ambiental. Na realidade, os

biomarcadores são particularmente úteis quando relacionados com os efeitos tóxicos e não apenas com a simples exposição. A principal razão para o uso dos biomarcadores em estudos de carácter ambiental é a de dar indicações sobre os efeitos dos poluentes. Então, o uso dos biomarcadores tem como função complementar a biomonitorização que envolve a determinação de níveis compostos químicos. Os diferentes tipos de biomarcadores são analisados com algum detalhe, com vista a determinar a exposição a poluentes em ecossistemas aquáticos. São também apresentados exemplos de diferentes biomarcadores, nomeadamente, das enzimas de biotransformação, parâmetros de stresse oxidativo, produtos de biotransformação, parâmetros hematológicos, genotóxicos e imunológicos, bem como de parâmetros histológicos e morfológicos. Finalmente, apresentam-se as principais vantagens e limitações do uso de biomarcadores, bem como a sua relevância biológica e toxicológica.

**Palavras-chave:** Ambiente, biomarcadores, toxicologia aquática

## INTRODUÇÃO

Numerosos compostos orgânicos estranhos aos sistemas biológicos provenientes da actividade tecnológica humana, resultantes de comunidades urbanas, da indústria e da agricultura exercem uma pressão constante sobre o ambiente. Existe também uma grande diversidade de compostos naturais, entre os quais se destacam os metabolitos secundários sintetizados pelas plantas, as toxinas produzidas por fungos, plantas e animais, e mesmo os produtos provenientes de transformações geoquímicas ou pirocatalíticas, como os hidrocarbonetos.

Estes compostos tóxicos, tanto de origem natural como antropogénica, são usualmente denominados xenobióticos e podem exercer uma acção sobre os ecossistemas, em particular, ao nível dos ecossistemas aquáticos. Na realidade, o estudo dos efeitos da sua exposição e o modo como interactivam com o ambiente tem sido objecto de intensa investigação no domínio da toxicologia aquática.

Por outro lado, os peixes têm sido utilizados como um importante modelo biológico com o objectivo de investigar as potenciais interacções químicas dos xenobióticos ao nível do Homem. Em paralelo, o estudo do metabolismo deste tipo de compostos nos peixes permite compreender a toxicidade química nos diferentes níveis de organização biológica, tanto ao nível individual, como da população ou da comunidade. Trata-se de uma área que tem merecido uma atenção crescente, mesmo até nos mamíferos, que exige a compreensão ao nível molecular dos mecanismos de acção das enzimas envolvidas e dos processos que regulam a sua expressão, ou seja, requer a caracterização das

enzimas, o isolamento dos seus genes, bem como dos factores de regulação e a definição do impacto dos poluentes ambientais nos sistemas biológicos.

Na actualidade, o metabolismo do processo de biotransformação dos compostos orgânicos pode ser dividido em duas fases: A Fase I que envolve a alteração da estrutura molecular do substrato e a Fase II que permite a conjugação do substrato com compostos endógenos, defendendo alguns autores a existência da Fase III relacionada com a excreção do poluente (Van der Oost *et al.*, 2003). De referir que os estudos efectuados sobre a actividade da Fase II em peixes têm sido menos extensivos do que os relacionados com a Fase I (Tate, 1988). O metabolismo da biotransformação pode levar, por vezes, à desintoxicação e a uma maior solubilidade em água, o que aumenta a taxa de excreção.

Em suma, a presença de concentrações elevadas dos poluentes referidos pode conduzir a efeitos nefastos ao nível dos diferentes organismos. Dada a necessidade de conhecer o impacto destes compostos na qualidade do meio aquático, têm sido identificados biomarcadores, os quais traduzem uma resposta biológica, desde os níveis molecular, celular e fisiológico até comportamental, a qual pode estar relacionada com a exposição a efeitos tóxicos de produtos químicos libertados no ambiente. De acordo com o NRC (1987) e WHO (1993), os biomarcadores podem ser subdivididos em biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade, os quais serão sucintamente caracterizados mais adiante, bem como as suas aplicações e limitações.

### **PROCESSOS DE ENTRADA, DISTRIBUIÇÃO E EXCREÇÃO DOS POLUENTES**

Tanto as substâncias estranhas de origem natural, como as sinteticamente produzidas pelo Homem podem ser absorvidas pelos diferentes organismos animais, através quer da dieta, quer do ambiente. Entre as principais barreiras que separam os organismos superiores do ambiente, destacam-se a pele, os pulmões e o tracto gastro-intestinal.

Os compostos tóxicos atravessam as membranas celulares e entram na circulação sanguínea, através de um processo usualmente designado por absorção. De referir que estes compostos penetram as membranas mediante um processo idêntico ao das principais substâncias biológicas, como os nutrientes e o oxigénio. A pele é a principal barreira que separa os mamíferos e mesmo o Homem dos principais contaminantes ambientais, dada a sua reduzida

permeabilidade, embora alguns produtos químicos possam ser absorvidos por este meio em quantidades suficientes para produzir efeitos de natureza sistémica.

Por sua vez, o tracto gastro-intestinal é um dos locais mais importantes que intervém na absorção de compostos tóxicos, podendo numerosas substâncias entrar na cadeia alimentar e ser absorvidas juntamente com os alimentos a este nível. Os pulmões constituem outra das vias de entrada de poluentes nos organismos, podendo um número significativo de produtos químicos ser absorvido por inalação de gases e de vapores (Klaassen e Watkins, 1999).

No meio aquático, tal como nos mamíferos, as substâncias químicas dissolvidas ou em suspensão na água podem ter entrada nos organismos biológicos através da pele, do tracto gastro-intestinal e, no caso dos peixes, pela brânquia. Os compostos químicos existentes ao nível dos sedimentos são absorvidos por contacto directo com a derme e por ingestão. Por sua vez, os compostos presentes nas plantas e nos organismos de baixo nível trófico podem ser absorvidos ao nível do tracto gastro-intestinal. De referir que os xenobióticos são absorvidos mais rapidamente pelos organismos por via aquática do que aérea, o que se deve em grande parte às propriedades universais da água como solvente (James e Kleinaw, 1994).

Quanto ao papel da dieta na entrada e transferência de poluentes na cadeia alimentar ao nível aquático, existe uma considerável controvérsia. Diversos estudos têm sugerido que, pelo menos, no caso dos compostos persistentes como os organoclorados, o nível observado nos organismos aquáticos pode ser explicado pela partilha directa entre a água e os tecidos (Bruggeman *et al.*, 1981; Shaw e Connell, 1984). Por sua vez, estudos realizados em condições laboratoriais sugerem que os peixes acumulam níveis superiores de organoclorados provenientes da água em relação a organismos presentes no alimento (Epifanio, 1973; Jarvinen *et al.*, 1977). Em condições naturais, os peixes cultivados mostram que o alimento é uma fonte importante de contaminação (Reinert *et al.*, 1974).

Os compostos tóxicos, após a sua entrada para a corrente sanguínea, estão disponíveis para circulação pelo organismo, em geral, de um modo rápido. No entanto, a sua distribuição depende, em larga escala, da afinidade do xenobiótico para os diversos tecidos. Algumas proteínas plasmáticas, entre as quais a albumina, ligam-se aos xenobióticos, variando a intensidade de fixação com o tipo de xenobiótico.

Os principais locais de armazenamento de compostos tóxicos são o fígado e o rim, podendo concentrar mais tóxicos do que todos os outros órgãos

combinados. Contudo, a gordura e os ossos são outros locais que funcionam como depósito de armazenamento (Klaassen e Watkins, 1999). Estes autores referem que a excreção dos tóxicos dos organismos pode ser efectuada por diversas vias, embora o rim assuma um papel particular. A excreção fecal e os pulmões são outras vias utilizadas na eliminação de poluentes, tendo esta última assumido um papel central na excreção de gases. O leite, o suor e a saliva também podem desempenhar a função de excreção, embora em menor grau.

## **BIOTRANSFORMAÇÃO**

O metabolismo da biotransformação é um processo que permite a conversão dos xenobióticos por reacções enzimáticas e não enzimáticas em metabolitos de menor toxicidade, que são mais facilmente excretáveis em relação ao composto original (Vermeulen, 1996). No caso dos mamíferos, o principal papel deste processo consiste na transformação de moléculas tóxicas em derivados hidrossolúveis, de modo a que possam ser excretados de um modo mais rápido. Caso contrário, os xenobióticos acumulam-se no corpo dos mamíferos, aumentando a possibilidade de uma resposta tóxica.

Nos mamíferos, o fígado representa o principal órgão envolvido no referido metabolismo de biotransformação de compostos estranhos. Nesta perspectiva, os estudos realizados à escala laboratorial têm sido efectuados neste órgão uma vez que possui uma elevada concentração de enzimas envolvidas na biotransformação, tem uma dimensão significativa e na sua constituição apresenta poucos tipos de células. Pelo contrário, embora alguns locais extra-hepáticos contenham níveis consideráveis de enzimas biotransformadoras, o seu reduzido tamanho minimiza a sua contribuição global para o processo de biotransformação dos xenobióticos (Klaassen e Watkins, 1999).

### **Principais reacções de biotransformação**

De acordo com o exposto, as enzimas envolvidas na biotransformação dos xenobióticos estão amplamente distribuídas pelo organismo, em particular, ao nível do fígado. A pele, o pulmão, a mucosa nasal, o olho e o tracto gastro-intestinal são outros locais que desempenham um papel activo nesta matéria (Klaassen e Watkins, 1999). Com efeito, esta distribuição pode estar relacionada com o facto de estes tecidos serem os principais locais de exposição aos xenobióticos, bem como outros tecidos, designadamente, o rim, o pâncreas, o baço, o coração, o

cérebro, os testículos, os ovários, entre outros.

As reacções de biotransformação têm lugar em diversos locais da célula como o citoplasma e a mitocôndria, embora a maior parte ocorra ao nível do retículo endoplasmático. As células que se localizam proximamente dos principais pontos de entrada dos xenobióticos no organismo, nomeadamente a língua, o fígado e o intestino, em geral, possuem uma concentração de enzimas de biotransformação mais elevada.

Os xenobióticos são alvo de uma série de reacções sequenciais, que conduzem à sua activação, desintoxificação e mesmo à sua excreção. O conceito de reacções da Fase I tem sido vulgarizado, o qual consiste numa alteração da molécula original, que por sua vez pode ser conjugada na Fase II (conjugação e desintoxificação) e, por fim, catabolizada na Fase III (Commandeur *et al.*, 1995).

A principal característica da Fase I centra-se na aquisição de um grupo funcional para formar um produto usualmente designado metabolito primário, enquanto as reacções da Fase II são de conjugação (Yu, 2001). A Fase II integra as reacções em que os metabolitos que possuem grupos funcionais são conjugados com determinadas substâncias, designadamente com o glucoronato, glutamato, sulfato e a glutationa. A conjugação aumenta, em geral, a solubilidade que promove uma rápida excreção. Por último, as enzimas da Fase III catalisam o catabolismo dos metabolitos conjugados, com o objectivo de formar produtos excretáveis (Van der Oost *et al.*, 2003).

Em síntese, a Fase I conduz à alteração das moléculas estranhas, que pode ser conjugada na Fase II. As principais reacções da Fase I são catalisadas pelas enzimas mono-oxigenases, como são os casos do citocromo P450, citocromo b5 e da NADPH citocromo P450 redutase. Por sua vez, as enzimas da Fase II catalisam reacções de conjugação, que facilitam a excreção dos produtos da Fase I mediante a adição à molécula de grupos mais polares, como os anteriormente referidos (Commandeur *et al.*, 1995). As enzimas da Fase III, como são os casos das peptidases, hidrolases e liases, catalisam reacções de metabolitos conjugados para formar produtos mais facilmente excretáveis. As reacções de biotransformação das Fases I e II nos peixes podem ser revistas mais detalhadamente em artigos da especialidade (Sijm e Opperhuizen, 1989).

De um modo geral, as diferentes substâncias estranhas aos organismos animais seguem o processo de biotransformação de acordo com o modo sequencial referido, embora possam existir excepções. Com efeito, algumas moléculas são excretadas na forma de metabolitos da Fase I, enquanto outras o

são apenas após as reacções da Fase II (McKee e McKee, 1996). Em contraste, a Fase II do processo de biotransformação pode ou não ser precedida pelas reacções da Fase I.

### Reacções da Fase I

As reacções que integram a denominada Fase I, têm como principal objectivo expor ou incorporar novos grupos funcionais (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH, ou -COOH), facto que pode conduzir a um aumento da hidrofília e à diminuição da actividade biológica ou da toxicidade dos compostos. Em certos casos, as substâncias estranhas como são os casos das drogas e dos compostos carcinogénicos, apenas se tornam biologicamente activas, benéficas ou tóxicas, quando forem submetidas às reacções da Fase I.

As principais enzimas desta Fase I localizam-se na membrana do retículo endoplasmático, embora outras possam existir no citoplasma, designadamente, as desidrogenases (álcool-desidrogenase e peroxidases). Contudo, algumas enzimas situam-se na mitocôndria, como é o caso da monoamina-oxidase.

As enzimas que predominam no metabolismo oxidativo microssomal são as mono-oxigenases, as quais também são usualmente denominadas por oxidases de função mista, dado que numa reacção típica é consumida uma molécula de oxigénio pela molécula de substrato, aparecendo um átomo de oxigénio no produto e outro na molécula de água. As mono-oxigenases podem promover uma imensa variedade de reacções químicas, formando algumas destas reacções intermediários instáveis e, por vezes, tóxicos.

As principais enzimas envolvidas na Fase I do metabolismo de biotransformação participam em reacções de hidrólise, de redução e de oxidação, processos que podem ser estudados com maior detalhe em bibliografia da especialidade (Klaassen e Watkins, 1999).

### Reacções da Fase II

A Fase II do metabolismo envolve a conjugação dos xenobióticos ou dos seus metabolitos com um composto endógeno, a qual consiste em reacções de adição em que grupos químicos polares ou compostos como açúcares e aminoácidos se ligam, de um modo covalente, aos xenobióticos ou drogas (Lech e Vodick, 1985). De um modo geral, as enzimas desta Fase II catalisam as reacções de conjugação, que facilitam a excreção de compostos químicos através da adição de grupos mais polares, como são os casos anteriormente mencionados



da glutatona e do ácido glucorónico à molécula (Commandeur *et al.*, 1995). Alguns xenobióticos possuem determinados grupos funcionais, como o COOH, -OH ou -NH<sub>2</sub>, que são requeridos para os sistemas do metabolismo da Fase II, enquanto outros são metabolizados por um processo integrado que envolve a acção prévia das enzimas da Fase I (George, 1994).

A Fase II integra diversas reacções de biotransformação, entre as quais se incluem a glucoronidação, sulfatação, acetilação, metilação, a conjugação com a glutatona (síntese do ácido mercaptúrico) e a conjugação com aminoácidos, tais como a glicina, taurina e ácido glutâmico (Klaassen e Watkins, 1999). De acordo com estes autores, os cofactores envolvidos nestas reacções reagem com os grupos funcionais presentes nos xenobióticos ou que neles são introduzidos ou expostos durante as reacções da Fase I, resultando no aumento significativo da hidrofília e, por isso, promovem a excreção dos químicos exógenos.

As enzimas da Fase II, de um modo geral, localizam-se no citosol, embora as UDP-glucoronosil-transferases constituam uma excepção, dado que são enzimas microssomais. Entre as diversas reacções que integram o metabolismo da Fase II, a glucoronidação é a principal via para a inactivação e posterior excreção de compostos endógenos e xenobióticos nos mamíferos (Lech e Vodcnick, 1985; George, 1994). Diversos xenobióticos submetidos a glucoronidação também sofrem conjugação com o sulfato, a qual produz usualmente um éster de ácido sulfúrico muito hidrossolúvel. A reacção é catalisada pelas sulfotransferases, um grupo de enzimas que se encontram no fígado, rim, tracto gastro-intestinal, cérebro, entre outros órgãos. Importa referir, que além dos mencionados, existem diferentes sistemas enzimáticos envolvidos na Fase II, como a metilação e a acetilação.

## BIOMARCADORES

A monitorização de todos os contaminantes presentes no ambiente, tanto de natureza antropogénica como natural, é uma tarefa manifestamente impossível. Todavia, a necessidade de avaliar a qualidade do ambiente aquático, tem determinado que a análise das respostas bioquímicas que reflectem a potencialidade dos poluentes em influenciar os diferentes processos fisiológicos nos organismos expostos constitui uma forma promissora (McCarthy e Shugart, 1990).

Nesta perspectiva, a necessidade de avaliação do impacto da poluição ao nível da qualidade ambiental, em especial, da presença de concentrações

reduzidas de misturas complexas de produtos químicos, tem conduzido ao desenvolvimento de marcadores moleculares de efeito biológico de poluentes nos animais. No passado, estes indicadores eram designados índices de stresse, sendo actualmente denominados biomarcadores, tanto no domínio da ecotoxicologia como da toxicologia humana (Livingstone, 1993; Timbrell, 1996).

Inicialmente, os biomarcadores eram considerados indicadores de alterações funcionais em sistemas biológicos ou amostras, provocados pela exposição a determinados poluentes, que eram expressos em termos de organização biológica a um nível inferior ao de organismo (NRC, 1987). Por sua vez, Adams (1990) modificou a definição original, tendo incluído características dos organismos, populações ou comunidades que respondam a alterações do ambiente. Posteriormente, Depledge *et al.* (1993) acrescentaram à definição original as respostas do ponto de vista comportamental, com o propósito de incluir outras perspectivas ao nível ecotoxicológico, como a diversidade genética.

Mais recentemente, Peakall (1994) considerou o conceito de biomarcador como sendo uma alteração traduzida por uma resposta biológica, desde os níveis molecular, celular e fisiológico até ao comportamental, que pode estar relacionada com a exposição a efeitos tóxicos de produtos químicos libertados no ambiente. Este conceito de biomarcador é idêntico ao anteriormente mencionado por Depledge (1993), segundo o qual se trata de uma variação mensurável ao nível molecular, bioquímico, celular, fisiológico ou comportamental, que pode ser medida nos tecidos ou fluidos corporais, ou mesmo ao nível do organismo, que por sua vez indica a presença ou o efeito de um ou mais poluentes e/ou radiações.

O termo biomarcador, por vezes, é apresentado de uma forma comparativa com os conceitos de bioindicador e indicador ecológico, tendo Van Gestel e Van Brummelen (1994) relacionado-os com os diferentes níveis de organização biológica. Com efeito, estes autores consideram que um biomarcador é uma resposta biológica a um ambiente químico ao nível subcelular, que pode ser medida num organismo ou nos seus produtos e que indica um desvio que não pode ser detectado num organismo intacto. Em contraste, consideram que o termo bioindicador é um organismo que fornece informação sobre as condições ambientais do seu habitat, através da sua presença ou ausência, ou mesmo pelo seu comportamento. Por outro lado, um indicador ecológico consiste num parâmetro do ecossistema que descreve a estrutura e funcionamento dos ecossistemas.

Em suma, Adams (2002) considera que os biomarcadores podem ser

considerados como sendo medidas de exposição, enquanto os bioindicadores são definidos com menor precisão e podem ser vistos, tanto como entidades estruturais, como espécies sentinela, ou mesmo serem considerados como efeitos funcionais em níveis de organização mais elevada. Este autor acrescenta que os biomarcadores indicam a exposição de um organismo a um agente de stresse, enquanto os bioindicadores são indicadores de stresse em níveis de organização mais elevados, principalmente, devido à sua natureza integrativa.

### **Classificação**

Os biomarcadores podem ser subdivididos em biomarcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade (NRC, 1987; WHO, 1993). Esta divisão referida na bibliografia da especialidade é difusa, dado que os biomarcadores de exposição e de efeito são diferenciados pelo modo como são utilizados e não pela sua inerente dicotomia (Suter, 1993). De acordo com van der Oost *et al.* (2003), as respostas dos biomarcadores podem ser observadas como efeitos ao nível biológico ou bioquímico após a exposição a certos compostos tóxicos, o que os torna teoricamente úteis como indicadores de exposição e efeito. Estes autores acrescentam que os biomarcadores de exposição podem ser utilizados para avaliar a exposição de populações ou indivíduos a uma substância particular ou a um grupo, fornecendo uma ligação entre a exposição externa e interna. Por sua vez, os biomarcadores de efeito podem ser usados para documentar, quer as alterações pré-clínicas quer os efeitos adversos de saúde devido a uma exposição externa e absorção de um produto químico. Ainda de acordo com os autores citados, os biomarcadores de susceptibilidade ajudam a esclarecer as variações no grau de resposta à exposição a um tóxico, observadas entre diferentes indivíduos. A bioacumulação de certos poluentes ambientais persistentes em tecidos animais pode ser considerada um biomarcador de exposição a estes químicos (NRC, 1987; WHO, 1993).

Existem numerosos exemplos de biomarcadores de exposição que têm sido objecto de caracterização em diferentes estudos, designadamente, a indução do citocromo P450 1A provocada pela exposição a hidrocarbonetos aromáticos (Bucheli e Fent, 1995; Stegeman e Lech, 1991); a indução de vitelogenina plasmática devida à acção de estrogénios ambientais (Sumpter e Jobling, 1995); a indução de aductos de DNA causada por PAHs (Shugart *et al.*, 1992); a presença de compostos fluorescentes aromáticos na bÍlis (FACs) (Krahn *et al.*, 1984), entre outros.

Os biomarcadores de efeito incluem alterações bioquímicas, fisiológicas ou outras, mensuráveis em tecidos ou fluidos corporais de um organismo, que podem estar associados com uma possível doença (Van der Oost *et al.*, 2003). Este tipo de biomarcadores podem ser medidos desde o nível molecular até ao ecossistema e variar na sua especificidade. Entre os biomarcadores de efeito, podem-se citar como exemplos as enzimas libertadas no sangue de um tecido danificado, tal como as diversas transaminases que indicam uma alteração hepática (Mayer *et al.*, 1992).

Segundo Van der Oost *et al.* (2003), os biomarcadores de susceptibilidade indicam a capacidade de um organismo em responder a alterações de exposição a um xenobiótico específico, incluindo factores genéticos e alterações nos receptores, os quais podem alterar a susceptibilidade de um organismo à exposição. No entanto, Schlenk (1999) considera que esta categoria de biomarcador é raramente mencionada quando se consideram estudos de ecotoxicologia, embora seja inerente do ponto de vista geral em estudos de biomarcadores e da determinação de riscos ecológicos. Este autor considera ainda que este tipo de biomarcador, indica mecanismos que causam variabilidade nos compartimentos em continuidade com a exposição e efeito, apresentando como exemplos as variações interindividuais na entrada de químicos; nas enzimas de desintoxificação; no efeito celular; na capacidade de um tecido, entre outros.

Não obstante a classificação apresentada anteriormente, Livingstone *et al.* (2000) referem que em ecotoxicologia é crucial a distinção dos biomarcadores, em gerais e específicos. Os biomarcadores gerais respondem aos principais tipos de stress ambiental e fornecem uma medida quantitativa de performance animal ou condição física (Widdows e Donkin, 1992), enquanto os específicos respondem a grupos particulares de compostos químicos e, por este motivo, são o diagnóstico das referidas condições de exposição (Livingstone, 1993).

### **Principais grupos de biomarcadores**

De acordo com a bibliografia publicada mais recentemente, existem diversos grupos de biomarcadores, que têm sido objecto de intensa investigação, em particular, ao nível dos ecossistemas aquáticos (Van der Oost *et al.* (2003).

Os biomarcadores mais sensíveis são as alterações das enzimas de biotransformação (Fases I e II), cuja actividade nos peixes pode induzir ou inibir após a exposição a xenobióticos (Bucheli e Fent, 1995). A título de exemplo, pode-se referir a indução do citocromo P450 em truta exposta a PCBs, a qual foi observada em duas fases: numa primeira fase, a indução consistiu na activação

das enzimas existentes, enquanto a segunda fase inclui a síntese de enzimas *de novo* (Sijm e Oppenhuizen, 1989).

Os parâmetros do stresse oxidativo constituem outro grupo importante de biomarcadores, atendendo a que diversos compostos tóxicos existentes no ambiente ou seus metabolitos podem exercer efeitos tóxicos neste domínio (Winston e Di Giulio, 1991). Os efeitos oxidantes com potencial apropriado como biomarcadores incluem quer as respostas adaptativas, quer manifestações de toxicidade como a oxidação de proteínas, lípidos e de ácidos nucleicos (Winston e di Giulio, 1991). Os sistemas de defesa que tendem a inibir a formação de oxiradicaís incluem as enzimas antioxidantes, tal como a superóxido-dismutase, catalase, glutathiona-peroxidase e a glutathiona-redutase, cujo doseamento enzimático é utilizado frequentemente em estudos de ecotoxicologia.

Neste domínio, merecem também realce os produtos de biotransformação. Com efeito, atendendo a que, por vezes, a exposição de xenobióticos não pode ser confirmada por determinação dos níveis nos tecidos, torna-se mais fácil a monitorização dos metabolitos de um xenobiótico, o que requer o conhecimento da extensão do seu metabolismo e dos tipos de metabolitos de um composto particular produzido por um organismo. Melancon *et al.* (1992) apresentam com maior detalhe exemplos de biomarcadores deste tipo.

As proteínas do stresse e as metalotioninas compreendem um grupo importante de biomarcadores, que estão envolvidas na protecção e reparação da célula, em resposta a condições adversas e de stresse, em que se incluem alterações de temperatura, luz ultravioleta, salinidade, metais pesados, xenobióticos, entre outros factores (Di Giulio *et al.*, 1995). Na realidade, as metalotioninas representam uma família de proteínas que funcionam na regulação de determinados metais, bem como na sua desintoxificação, cuja possibilidade prática de funcionarem como biomarcadores de exposição a metais ou de stresse causado por metais foi estudada em diversos estudos efectuados em organismos aquáticos (Stegeman *et al.*, 1992; La Fontaine *et al.*, 2000).

Os componentes hematológicos são biomarcadores promissores em peixes, porque além de não ser necessário o recurso a técnicas destrutivas, fornecem uma indicação da fisiologia geral e do estado de saúde dos organismos (Beyer, 1996). A alanina-transaminase e a aspartato-transaminase são exemplos de aminotransferases cujo aumento de actividade ao nível plasmático pode ser um indicador sensível de danificação celular. Os parâmetros imunológicos também têm sido considerados como candidatos a biomarcadores com fins de

monitorização ambiental. Contudo, deve-se ter em atenção que o sistema imunitário pode ser influenciado por diversos agentes de stresse, o que implica que embora estes biomarcadores possam ser úteis e sensíveis, por vezes, não sejam específicos (Weeks *et al.*, 1992).

Um número considerável de xenobióticos com larga distribuição no ambiente exerce um efeito ao nível endócrino e influenciar o processo reprodutivo. Consequentemente, os parâmetros reprodutivos e endócrinos constituem um importante grupo de biomarcadores. A título de exemplo, refira-se que Jones *et al.* (2000) mencionam diversos poluentes ambientais com acção estrogénica, dada a sua capacidade de induzir respostas similares às do estradiol. Por outro lado, referem que determinados compostos químicos encontrados em águas residuais, como os insecticidas organoclorados, derivados do DDT, compostos de origem industrial como o bifenol A, PAHs, PCBs e seus derivados, e mesmo compostos naturais, como fitoestrogénios e micoestrogénios, mimetizam a acção estrogénica nos animais (Sumpter, 1995). Kime (1995) num artigo de revisão mostra uma panorâmica global sobre os principais efeitos de níveis subletais de poluição, tanto de origem agrícola como industrial em diferentes aspectos reprodutivos, desde o desenvolvimento da gónada até à desova. Em suma, considera-se da maior relevância que os biomarcadores de reprodução devem ser desenvolvidos e validados pelo seu significado ecotoxicológico, tendo Sadik e Witt (1999) fornecido uma panorâmica geral sobre os métodos e as estratégias para monitorizar o impacto dos compostos químicos com efeitos de disrupção endócrina.

De igual modo, a análise de determinados parâmetros neurotóxicos tem assumido um particular interesse neste domínio, sendo as colinesterases as enzimas que assumem maior relevância do ponto de vista das funções neurais (Payne *et al.*, 1996). Alguns xenobióticos, como os pesticidas organofosfatos e carbamatos, têm sido referidos como inibidores efectivos da enzima referida, cujo doseamento tem sido utilizado em diversos estudos realizados em diferentes níveis de poluição (Sturm *et al.*, 2000).

Recentemente, o estudo de parâmetros genotóxicos tem assumido uma considerável expressão, atendendo a que a exposição de um organismo a compostos químicos genotóxicos pode induzir diversas alterações que foram objecto de revisão por Shugart (2000). Neste âmbito, o estudo das alterações induzidas por poluentes ao nível do material genético pode envolver diferentes

aspectos, designadamente, alterações estruturais do DNA e a expressão de alterações do DNA em genes mutantes.

As alterações ao nível fisiológico e morfológico constituem importantes respostas do ponto de vista químico e celular à presença de poluentes, sendo um indicador de danificação irreversível (Hinton *et al.*, 1992). Na realidade, os indicadores de crescimento e reprodutivos têm a vantagem de possuir um elevado significado biológico e ecológico, embora tenham uma reduzida sensibilidade ao stresse. Com efeito, as alterações histológicas têm lugar mais cedo do que as de natureza reprodutiva e são mais sensíveis do que o crescimento ou os parâmetros reprodutivos e, por outro lado, como parâmetro integrado fornecem uma melhor avaliação do estado de saúde do que um simples parâmetro bioquímico (Teh *et al.*, 1997). O uso de parâmetros histopatológicos como biomarcador em sistemas aquáticos tem sido objecto de investigação em numerosos estudos (Hinton *et al.*, 1992; Hinton, 1994; Tricklebank, 2001). Neste domínio, a histopatologia de diversos órgãos, entre os quais merecem destaque o fígado, o rim e a brânquia tem sido utilizada como biomarcador (Triebkorn *et al.*, 2002). As principais alterações observadas em peixes em estudos relacionados com a monitorização da poluição marinha foram objecto de revisão por Vethaak e ap Reinallt (1992). De um modo geral, assume-se que os biomarcadores histopatológicos são indicadores válidos da saúde do peixe e reflectem os efeitos da exposição a diferentes tipos de poluentes que induzem stresse (Hinton *et al.*, 1992; Teh *et al.*, 1997).

### **Aplicações e limitações dos biomarcadores**

A utilização dos biomarcadores representa um novo campo de pesquisa no domínio do ambiente, que tem sido objecto de uma rápida expansão e desenvolvimento e mesmo merecido a atenção de agências internacionais. A utilização dos biomarcadores tem sido bem sucedida como um instrumento de monitorização da poluição ambiental, mas também como uma eficiente sentinela na detecção precoce de riscos ecológicos. No entanto, antes do seu uso como rotina, torna-se necessário definir uma estratégia, que permita que a sua aplicação seja delineada e validada. Com efeito, o uso dos biomarcadores tem sido apontado como uma solução para alguns dos problemas no domínio da gestão ambiental (McCarthy e Shuggart, 1990).

Contudo, têm sido apontadas algumas críticas ao seu uso, entre as quais se destacam as dificuldades de medição, a falta de especificidade porque podem ser induzidos por mais do que um poluente e por diversos factores de stresse

ambiental. Por outro lado, determinados biomarcadores não permitem detectar a exposição a poluentes e importa também registar que a resposta do biomarcador pode ter lugar antes de ocorrer algum efeito ao nível do organismo ou da população. Ainda no domínio das principais limitações ao uso dos biomarcadores, Adams (2002) considera que são, em geral, caracterizados por uma relativa variabilidade na resposta, raramente integram os efeitos dos agentes de stresse por um longo período de tempo e, mais importante, de um modo geral têm pouca relevância do ponto de vista ecológico.

Em termos gerais, os biomarcadores são considerados potenciais indicadores de contaminação química e, neste contexto, têm sido amplamente utilizados até ao momento (Wells *et al.*, 2001). A título de exemplo, refira-se que é preferível efectuar a quantificação da concentração dos metais ligados às metalotioninas em tecidos do que a monitorização contínua das concentrações de metais nos sedimentos, água ou biota (Pederson *et al.*, 1997; Hylland *et al.*, 1998). De um modo semelhante, em vez de se usar a concentração em pesticidas organofosforados nos tecidos, pode ser determinada a inibição da acetilcolinesterase no tecido nervoso ou no sangue para fornecer uma estimativa da exposição (Fulton e Key, 2001; Galloway *et al.*, 2002). Em ambos os casos mencionados, é evidente que o metal específico ou o pesticida a que o organismo está exposto não pode ser assegurado pela resposta do biomarcador, mas pode alertar para um problema ambiental que deverá ser objecto de futura investigação.

As vantagens da aplicação dos biomarcadores para complementar os métodos químicos de detecção de poluição são consideráveis. Com efeito, Handy *et al.* (2002) referem que os biomarcadores podem indicar a presença de um poluente biologicamente disponível, que o seu uso pode revelar a presença de poluentes que não eram suspeitos inicialmente. Por outro lado, salientam que a resposta do biomarcador pode persistir durante longo tempo após uma exposição transitória a um poluente que então tem sido degradado e não é detectado por muito tempo e que a análise de biomarcadores, em muitos casos, é mais fácil de se conseguir e consideravelmente mais barata do que as análises químicas.

Em suma, a utilização dos biomarcadores em estudos de carácter ambiental tem assumido uma expressão significativa como forma de demonstrar que os organismos são expostos a poluentes e, por outro lado, que a exposição está associada com a deterioração da saúde, que pode centrar-se na redução do crescimento e da actividade reprodutiva, as quais têm um elevado significado ecológico.



## BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, S.M., 1990. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 8: 1-8.
- ADAMS, S.M., 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress: Introduction and overview. In: S.M. Adams (ed), *Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress*. American Fisheries Society, Maryland, pp. 1-11.
- BEYER, J., 1996. Fish biomarkers in marine pollution monitoring: evaluation and validation in laboratory and field studies. Academic Thesis, University of Bergen, Norway.
- BRUGGEMAN, W.A., MARTRON, L.B.J.M., KOOLMAN, D. e HUTZINGER, O., 1981. Accumulation and elimination kinetics of di-, tri- and tetrachlorobiphenyls by goldfish after dietary and aqueous exposure. *Chemosphere*, 10: 811.
- BUCHELI, T.D. e FENT, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 25: 201-268.
- COMMANDEUR, J.N.M., STIJNTJES, G.J. e VERMEULEN, N.P.E., 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol. Rev.*, 47: 271-330.
- DEPLEDGE, M.H., 1993. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In: Fossi, M.C. e Leonzio, C. (eds), *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 261-285.
- DEPLEDGE, M.H., AMARAL-MENDES, J.J., DANIEL, B., HALBROOK, R.S., KLOEPPER-SAMS, P., MOORE, M.N. e PEAKALL, D.B., 1993. The conceptual basis of the biomarker approach. In: D. Peakall e L.R. Shugart (eds), *Biomarkers*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 15-29.
- DI GIULIO, R.T., BENSON, W.H., SANDERS, B.M. e VAN VELD, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: Rand, G.M. (ed), *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Taylor and Francis, Second Edition, London, UK, pp. 523-562.
- EPIFANIO, C.E., 1973. Dieldrin uptake by larvae of the crab (*Leptodius floridanus*). *Mar. Biol.*, 19: 320.
- FULTON, M.H. e KEY, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 37-45.
- GALLOWAY, T.S., MILLWARD, N., BROWNE, M.A. e DEPLEDGE, M.H., 2002. Rapid assessment of organophosphorous pesticide exposure using combined esterases as biomarkers. *Aquat. Toxicol.*, 61: 169-180.
- GEORGE, S.G., 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*, D. C. Malins e G. K. Ostrander (eds). Lewis Publishers, Florida, USA, pp. 37-85.
- HANDY, R.D., GALLOWAY, T.S. e DEPLEDGE, M.H., 2002. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology*, 12: 331-343.

- HINTON, D.E., 1994. Cells, cellular responses, and their markers in chronic toxicity of fishes. In: Malins, D.C. e Ostrander, G.K. (eds), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, CRC Press, pp. 207-240.
- HINTON, D.E., BAUMANN, P.C., GARDNER, G.C., HAWKINS, W.E., HENDRICKS, J.D., MURCHELANO, R.A. e OKIHIRO, M.S., 1992. Histopatologic biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M. e Bergman, H.L. (eds), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 155-210.
- HYLLAND, K., NISSENIE, T., CHRISTENSEN, P.G. e SANDVIK, M., 1998. Natural modulation of hepatic metallothionein and cytochrome P4501A in flounder, *Platichthys flesus* L. *Mar. Environ. Res.*, 46: 51-55.
- JAMES, M.O. e KLEINOW, K.M., 1994. Trophic transfer of chemicals in the aquatic environment. In: *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*, D.C. Malins e G. K. Ostrander (eds). Lewis Publishers, Florida, USA, pp. 1-35.
- JARVINEN, A.W., HOFFMAN, M.J., e THORSUND, T.W., 1977. Long-term toxic effects of DDT food and water exposure on fathead minnows (*Pimephales promelas*). *J. Fish. Res. Board Can.*, 34: 2089.
- JONES, P.D., DE COEN, W.M., TREMBLAY, L. e GIESY, J.P., 2000. Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Water Sci. Technol.*, 42 (7-8): 1-14.
- KIME, D.E., 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 5: 52-96.
- KLAASSEN, C.D. e WATKINS III, J.B., 1999. *Toxicologia. A Ciência Básica dos Tóxicos de Casarett & Douls*. McGraw-Hill de Portugal, 5ª edição, 864 p.
- KRAHN, M.M., MYERS, M.S., BURROWS, D.G. e MALINS, D.C., 1984. Determination of metabolites of xenobiotics in the bile of fish from polluted waterways. *Xenobiotica*, 14: 633-646.
- LAFONTAINE, Y., GAGNÉ, F., BLAISE, C., COSTAN, G., GAGNON, P. e CHAN, H. M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence river (Canada). *Aquat. Toxicol.*, 50: 51-71.
- LECH, J.J. e VODICNIK, M.J., 1985. Biotransformation. In: Tand, G.M. e Petrocelli, S.R. (eds), *Fundamentals of Aquatic Toxicology; Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA, pp. 526-557.
- LIVINGSTONE, D.R., 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Tech. Biotech.*, 57: 195-211.
- LIVINGSTONE, D.R., CHIPMAN, J.K., LOWE, D.M., MINIER, C., MITCHELMORE, C.L., MOORE, M.N., PETERS, L.D. e PIPE, R.K., 2000. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *J. Environment Poll.*, 13 (1-6): 56-91.
- MAYER, F.L., VERSTEEG, D.J., MCKEE, M.J., FOLMAR, L.C., GRANEY, R.L., McCUME, D.C. e RATTNER, B.A., 1992. Metabolic products as biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M. e Bergman, H.L. (eds), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 5-86.

- MCCARTHY, J.F. e SHUGART, L.R., 1990. Biological markers of environmental contamination. In: McCarthy, J.F. e Shugart, L.R. (eds), Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 3-16.
- McKEE, T. e McKEE, J.R., 1996. Biotransformation. In: Biochemistry: An Introduction. Wm. C. Brown Publishers, pp. 557-576.
- MELANCON, M.J., ALSCHER, R., BENSON, W., KRUYNSKI, G., LEE, R.F., SIKKA, H.C. e SPIES, R.B., 1992. Metabolic products as biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M. e Bergman, H.L. (eds), Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 87-124.
- NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research. Environ. Health Perspect., 74: 3-9.
- PAYNE, J.F., MATHIEU, A., MELVIN, W. e FANCEY, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future ? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. Mar. Pollut. Bull., 32: 225-231.
- PEAKALL, D.W., 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. Toxicol. Ecotoxicol. News, 1: 55-60.
- PEDERSEN, S.N., LUNDEBYE, A.K. e DEPLEDGE, M.H., 1997. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. Aquat. Toxicol., 37: 183-200.
- REINERT, R.E., STONE, L.J. e BERGMAN, H.L., 1974. Dieldrin and DDT: accumulation from water and food by lake trout (*Salvelinus namaycush*) in the laboratory. Proc. 17<sup>th</sup> Conf. Great Lakes Res., 1974.
- SADIK, O.A. e WITT, D.M., 1999. Monitoring endocrine-disrupting chemicals. Environ. Sci. Technol., 33: 368A-374A..
- SCHLENK, D., 1999. Necessity of defining biomarkers for uses in ecological risk assessments. Mar. Pollut. Bull., 39 (1-2): 48-53.
- SHAW, G.R. e CONNELL, D.W., 1984. Physiochemical properties controlling PCB concentrations in aquatic organisms. Environ. Sci. Technol., 18: 18.
- SHUGART, L.R., 2000. DNA damage as a biomarker of exposure. Ecotoxicology, 9 (5): 329-340.
- SHUGART, L.R., MCCARTHY, J.F. e HALBROOK, R.S., 1992. Biological markers of environmental and ecological contamination: an overview, 12: 353-360.
- SJUM, D.T.H.M. e OPPERHUIZEN, A., 1989. Biotransformation of organic chemicals by fish: enzyme activities and reactions. In: Hutzinger, O. (ed), Handbook of Environmental Chemistry and Processes, Vol. 2E. Springer, Berlin, pp. 163-235.
- STEGEMAN, J.J. e LECH, J.J., 1991. Cytochrome P450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. Environ. Health Persp., 90: 101-109.
- STEGEMAN, J.J., BROUWER, M., RICHARD, T.D.G., FORLIN, L., FOWLER, B.A., SANDERS, B.M. e VAN VELD, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A.,

- Mehrle, P.M. e Bergman, H.L. (eds), Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 235-335.
- STURM, A., WOGRAM, J., SEGNER, H. e LIESS, M., 2000. Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): application in biomonitoring. *Envir. Toxicol. Chem.*, 19: 1607-1615.
- SUMPTER, J.P. e JOBLING, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.*, 103 (suppl. 7): 173-178.
- SUMPTER, J.P., 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicol. Lett.*, 82: 737-742.
- SUTER, G.W., 1993. Ecological Risk Assessment. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 538 p.
- TATE, L.G., 1988. Characterization of phase I and phase II drug metabolism and the effect of b-naphthoflavone in the liver and posterior kidney of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 17: 325-332.
- TEH, S.J., ADAMS, S.M. e HINTON, D.E., 1997. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquat. Toxicol.*, 37: 51-70.
- TIMBRELL, J.A., 1996. Editorial. Biomarkers, (1): 1-2.
- TRICKLEBANK, K.A., 2001. Histological alterations in fish from Sydney reefs: possible biomarkers for environmental effects? *Biomarkers*, 6(1): 26-32.
- TRIEBSKORN, R., ADAM, S., CASPER, H., HONNEN, W., PAWERT, M., SCHRAMM, M., SCHWAIGER, J. e KOHLER, H.R., 2002. Biomarkers as diagnostic tools for evaluating effects of unknown past water quality conditions on stream organisms. *Ecotoxicology*, 11: 451-465.
- VAN DER OOST, R., BEYER, J. e VERMEULEN, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 13: 57-149.
- VAN GASTEL, C.A.M. e VAN BRUMMELEN, T.C., 1994. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 5: 217-225.
- VERMEULEN, N.P.E., 1996. Role of metabolism in chemical toxicity. In: Ioannides, C. (ed), *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 29-53.
- VETHAAK, A.D. e AP REINALLT, T., 1992. Fish disease as a monitor for marine pollution: the case of the North sea. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 2: 1-32.
- WEEKS, B.A., ANDERSON, D.P., DUFOUR, A.P., FAIRBROTHER, A., GOVEN, A.J., LAHVIS, G.P. e PETERS, G., 1992. Immunological biomarkers to assess environmental stress. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M. e Bergman, H.L. (eds), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 211-234.
- WELLS, P.G., DEPLEDGE, M.H., BUTLER, J.N., MANOCK, J.J. e KNAP, A.H., 2001. Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants – exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. *Mar. Pollut. Bull.*, 42: 799-804.
- WHO - International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria* 155, World Health Organization, Geneva.

- WIDDOWS, J. e DONKIN, P., 1992. Mussels and environmental contaminants: bioaccumulation and physiological aspects. In: Gosling, E. (ed), The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. Elsevier Sci. Publishers, Amsterdam, pp. 211-234.
- WINSTON, G.W. e Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.*, 19: 137-161.
- YU, M.H., 2001. Environmental Toxicology: Impacts of Environmental Toxicants on Living Systems. CRC Press, 255 p.

## POLLEN SPECTRA OF HONEYS FROM TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

S. M. Afonso Pires<sup>1</sup>, T. Rodrigues<sup>1</sup>, A. Rocha<sup>1</sup>, A. Pajuelo<sup>2</sup> e O. Pereira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior Agrária de Bragança, Departamento de Zootecnia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, [spires@ipb.pt](mailto:spires@ipb.pt);

<sup>2</sup>C/ Sant Josef, 2-8º - 12004 Castellón, España [pajuelo@infocsn.net](mailto:pajuelo@infocsn.net)

<sup>3</sup> Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Departamento de Zootecnia, Apartado 1013, 5000-911 Vila Real [opereira@utad.pt](mailto:opereira@utad.pt)

(Aceite para publicação em 18 de Novembro de 2004)

### ABSTRACT

The aim of this study was to characterise the pollinic spectra of honeys from the “Trás-os-Montes e Alto Douro” (Portugal). A botanical study of the area was carried out and a reference collection of pollen grains was made. More than 800 pollen grains were counted per sample. Qualitative microscopical pollen analyses were carried out on the 40 samples of honey gathered from bee hives kept in the region of study. According to the pollen spectra recorded, 25 samples were considered as multifloral honeys, twelve as monofloral honeys of *Lavandula pedunculata*, and 3 as monofloral honeys of Rosaceae. Forty two pollen types were recorded belonging to 36 families. The Rosaceae, Leguminosae, Fagaceae, Boraginaceae and Labiatae families were the most represented.

**Key-words:** pollen, melissopalynology, honey

### RESUMO

## CARACTERIZAÇÃO POLÍNICA DO MEL DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Este estudo teve como objectivo caracterizar o espectro polínico dos méis da região de Trás-os-Montes e Alto Douro. Para o efeito, realizámos um estudo prévio da flora desta região e elaboramos uma palinoteca de referência. Foram seleccionadas 40 amostras de mel, provenientes de apiários desta região, as quais foram analisadas por microscopia óptica. Nas análises qualitativas realizadas foram contados mais de 800 grãos de pólen por amostra de mel. Vinte e cinco amostras foram classificadas como méis multiflorais, 12 como méis monoflorais de rosmaninho (*Lavandula pedunculata*) e 3 como méis monoflorais de Rosaceae. No espectro polínico dos méis

estudados foram identificados 42 tipos polínicos, pertencentes a 36 famílias. As Rosaceae, Leguminosae, Fagaceae, Boraginaceae e Labiatae foram as famílias mais representadas nas amostras de mel estudadas.

**Palavras-chave:** mel, melissopalínologia, pólen

## INTRODUÇÃO

A análise polínica desempenha frequentemente um papel relevante no controlo regular da qualidade do mel, sendo fundamental para a emissão de certificados de origem botânica e/ou geográfica. Todavia, existem dois tipos de análises polínicas: a qualitativa e a quantitativa (Louveaux *et al.*, 1978).

A análise polínica qualitativa indica em que proporções se encontram os grãos de pólen de distintas espécies (ou tipos polínicos) no mel, sugerindo o conhecimento da sua origem geográfica e botânica (Louveaux *et al.*, 1978; Moar, 1985; Carretero, 1989). Por sua vez, a análise polínica quantitativa fornece indicação do número absoluto de cada tipo de elementos (grãos de pólen e/ou outros) contidos no mel, relativamente ao volume de mel estudado. Assim, além da informação disponibilizada pela análise polínica qualitativa, permite ainda (i) deduzir o método usado na extracção do mel (por exemplo, centrifugação ou prensagem) e (ii) conhecer o número de outras partículas (além dos grãos polínicos) existentes por unidade de mel (por exemplo, detritos, elementos de melada ou leveduras).

Independentemente do tipo de análise polínica efectuada, a determinação da origem botânica e geográfica do mel apresenta limitações que derivam da interpretação dos resultados obtidos. Regra geral, tende-se a considerar que se uma espécie de mel tem um pólen dominante (isto é, com representação superior a 45%, no total dos pólenes observados no mel) deverá ser denominado como mel monofloral da espécie vegetal que o originou. No entanto, existem casos de espécies vegetais em que os grãos de pólen estão sub-representados [como, por exemplo, no rosmaninho (*Lavandula pedunculata*)], significando que a percentagem de pólen no mel é inferior à respectiva percentagem de néctar incorporado, pelas abelhas, nesse mesmo mel. Noutros casos a situação é inversa (sobre-representação polínica), como, por exemplo, no castanheiro *Castanea sativa* (Louveaux *et al.*, 1978; Campos, 1988). Assim, as espécies vegetais com sub-representação polínica nos néctares que produzem, apresentam frequências polínicas relativamente baixas, como sucede no caso das famílias Rutaceae e Labiatae (10 a 20%; Campos, 1988; Alcaraz, 1995). Esta situação, levou Serra

(1987) a propor 10 a 13% e 20% (do total de pólen presente num dado mel) como limites mínimos para a atribuição de monofloralidade aos méis de rosmaninho (produzidos a partir de *Lavandula pedunculata*) e de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), respectivamente. Valbuena (1992) defende que, para a generalidade dos méis de rosmaninho, a percentagem mínima de pólen de Lavandula para atribuição de monofloralidade aos méis não deve ser inferior a 15%. Regra geral, méis maioritariamente provenientes de espécies vegetais com sub-representação polínica nos néctares que produzem apresentam um número reduzido de grãos de pólen por unidade de volume (Louveaux *et al.*, 1978; Campos, 1988).

No caso das espécies com sobre-representação polínica, Louveaux *et al.* (1978) e Campos (1988) referem como valor mínimo para a atribuição da qualificação monofloral, 90% de frequência polínica. No entanto, Gomez-Ferreras (1990) considera suficiente 70% de frequência polínica de *C. sativa* para o mel de castanheiro poder ser considerado como monofloral.

Neste contexto, este estudo visou caracterizar polinicamente alguns dos méis produzidos em Trás-os-Montes e Alto Douro, de modo a permitir conhecer a sua origem botânica e a possibilitar a definição de perfis polínicos para os méis desta região.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado na Escola Superior Agrária de Bragança, de Fevereiro a Julho de 1999. A primeira fase do estudo consistiu na inventariação da flora da área do Parque Natural de Montesinho e na elaboração de uma palinoteca de referência. Numa segunda fase, foram seleccionadas aleatoriamente 40 amostras, de um universo de 500 recolhidas na região de Trás-os-Montes e Alto Douro por técnicos da Direcção Regional de Agricultura de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Posteriormente, efectuaram-se dois tipos de preparações microscópicas: uma de grãos de pólen das flores recolhidas na primeira fase do estudo (palinoteca de referência), e uma outra a partir das amostras de mel seleccionadas. A preparação e montagem dos grãos polínicos da palinoteca com o pólen fresco, foi efectuada segundo o método de Louveaux *et al.* (1978). No que se refere às amostras de mel, optou-se pela realização de análises polínicas qualitativas, também segundo a metodologia descrita por Louveaux *et al.* (1978). Por cada amostra de mel analisado, foram efectuadas duas preparações e contados, pelo



menos, 400 grãos de pólen em cada uma das lâminas (Vergeron, 1964). A identificação dos grãos de pólen foi realizada por microscopia óptica com ampliação total (400x). Sempre que possível, a identificação polínica foi efectuada ao nível da espécie vegetal. Quando tal se revelou impossível (no contexto da metodologia seguida), enquadraram-se os pólenes nos “tipos polínicos” considerados na classificação de Valdés *et al.* (1987). Noutros casos ainda - face à grande semelhança observada entre alguns dos grãos de pólen encontrados nos méis estudados (nomeadamente entre pólenes de géneros vegetais pertencentes à mesma família onde manifestamente seria impossível separá-los seguramente na análise polínica efectuada) – optou-se por agrupar os pólenes em famílias botânicas.

## RESULTADOS

No Parque Natural de Montesinho foram recolhidas 98 espécies de plantas, pertencentes a 36 famílias (Figura 1). O número de espécies recolhidas pertencentes às famílias Leguminosae, Labiatae, Asteraceae e Rosaceae foi elevado (40). As famílias Caryophyllaceae, Ericaceae, Cistaceae e Cruciferae, estiveram razoavelmente representadas (16). As restantes famílias surgiram com uma menor representatividade, o que poderá não significar menor interesse apícola.

Em relação ao espectro polínico da globalidade das amostras de mel estudadas (Figura 2), verificou-se a predominância de pólenes da família Rosaceae (34,09%), nomeadamente de fruteiras dos géneros *Prunus* e *Rubus*. Encontraram-se também bem representadas as Leguminosae (20,79 %, *Medicago sp* e *Trifolium sp*), as Fagaceae (12,41%, *Castanea sativa* e *Quercus sp*), as Boraginaceae (7,91%, *Echium sp* e *Anchusa sp*), as Labiatae (7,45%, *Lavandula pedunculata* e *Rosmarinus officinalis*), e as Ericaceae (6,45%, *Erica sp*).

No espectro polínico dos méis estudados foram identificados 42 tipos polínicos (Quadro I). Em média foram encontrados  $14 \pm 3$  (média  $\pm$  desvio padrão) tipos polínicos por amostra de mel estudado, tendo o seu número variado entre 8 e 22.

Oito amostras foram consideradas méis monoflorais de Rosmaninho (*Lavandula pedunculata*), com uma percentagem média de pólenes desta espécie de  $10,85 \pm 1,09$ , dada a classificação de um mel como monofloral de rosmaninho requerer uma representação polínica mínima de 10% deste tipo de pólenes. As

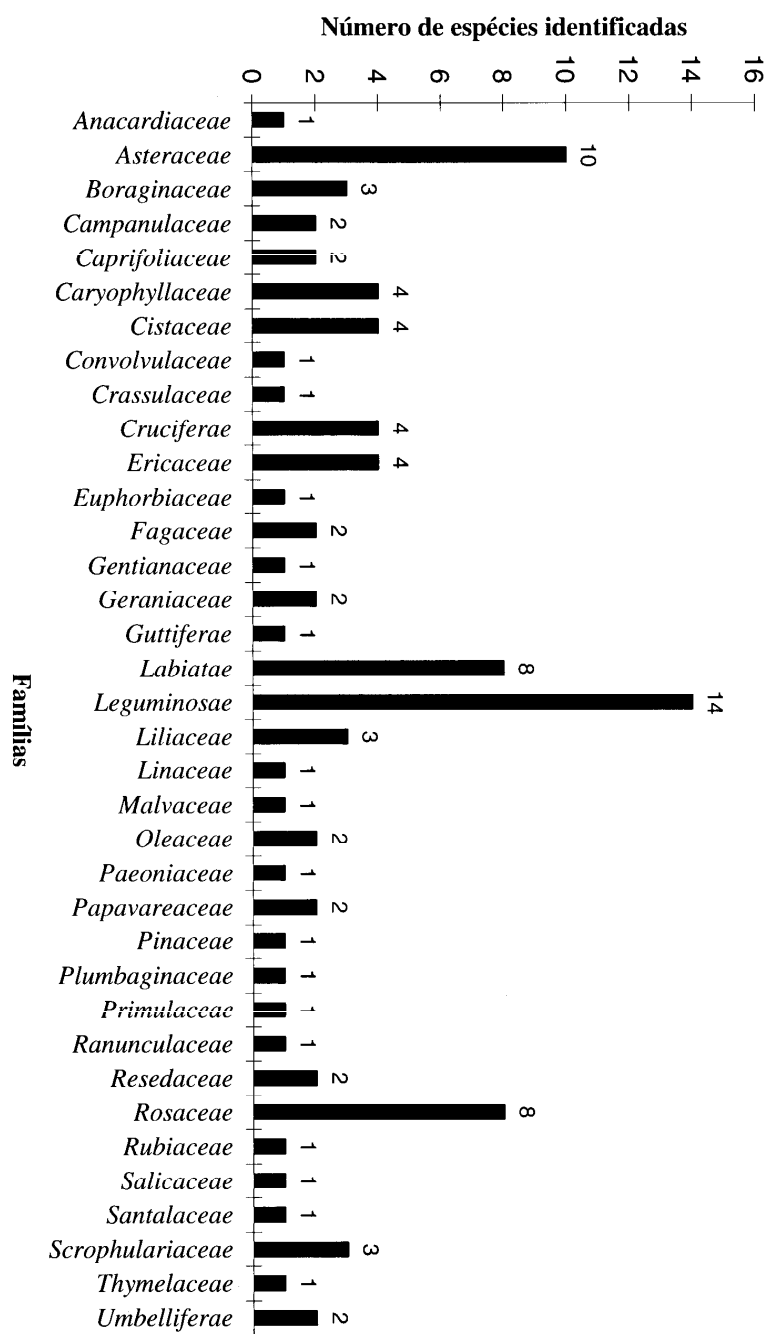


Figura 1. Distribuição, por famílias, das espécies vegetais colhidas para a elaboração da coleção (palinoteca) de referência.

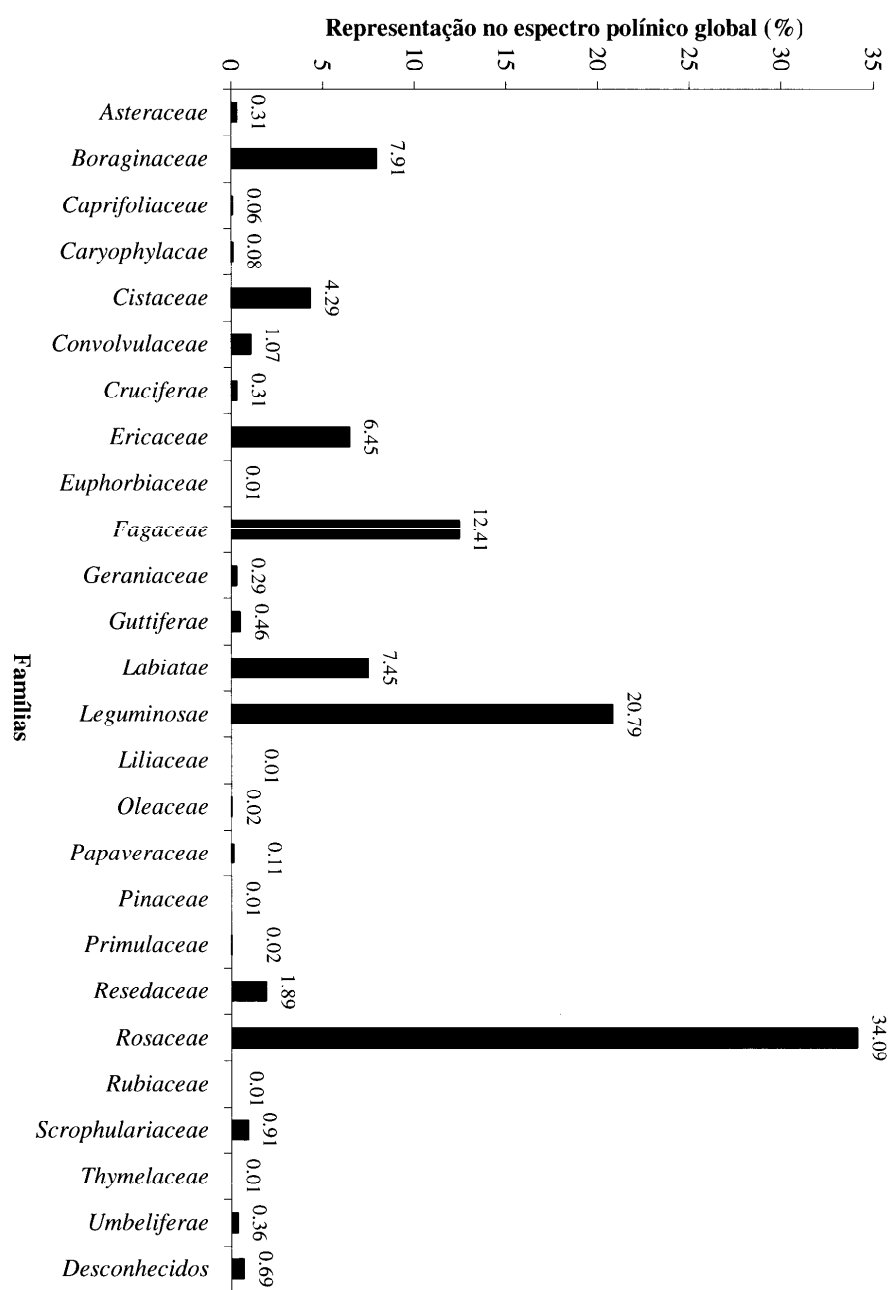


Figura 2 . Distribuição, por famílias, de espécies/tipos polínicos identificados na globalidade das 40 amostras de mel estudadas.

93

**QUADRO II – CLASSES POLÍNICAS INDIVIDUAIS DAS 20 AMOSTRAS DE MEL ESTUDADAS (D = PÓLEN DOMINANTE, >45%; S = PÓLEN SECUNDÁRIO, 16 E 45%; M = PÓLEN MINORITÁRIO, 3 E 16%; R = PÓLEN RARO, <3%). CLASSES DE REPRESENTAÇÃO POLÍNICA SEGUNDO CAMPOS (1988) E SORKIN E DOGAN (1995).**

Famílias	Amostra de mel																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ASTERACEAE	R	M		R			R				M	M	R	M	R			R		
BORAGINACEAE	M		M	R	M	M	M	R		R	M	M	R	M	M	R	M	M	M	M
CISTACEAE	M	M	M	R	R	M	R	R	M	R	R	R		R	R	R	R	M		M
CRUCIFERAE		R					R	R	R			R					R			R
CARYOPHYLLACEAE	R	R											R					R		
CAPRIFOLIACEAE		R										R			R					
CONVOLVULACEAE				R	R	M		R	R	M	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ERICACEAE	R	R	R		M	R	M	S		M	M	M	S	M	S		M		S	S
EUPHORBIACEAE			R																	
FAGACEAE	S	R	M	S	S		S	M		S	M	S	S	M	S	M	S	S	R	R
GERANIACEAE							R		R	R	R		M							
GUTTIFERAE	R	R		R	R				R	R	R	R		R	R		R		R	R
LABIATAE	M	M	M	M	R	M	M	M	M	R	M	M	M	M	M	M	R	M	M	M
LEGUMINOSAE	M	S	M	M	S	S	S	S	S	M	S	M	M	S	M	S	S	S	S	S
LILIACEAE	R																			
MALVACEAE																		R		
OLEACEAE																				
PINACEAE	R																			
PAPAVERACEAE												R			R					
PRIMULACEAE												R								
ROSACEAE	S	S	D	S	S	S	S	S	D	S	S	S	M	S	S	S	D	S	S	S
RUBIACEAE																				
RESEDACEAE	R	M	R	M	R	R	R	R	M	M	M	R	M	R			R	R	R	M
SCROPHULARIACEAE	R	R	R	R		R			R	M	R	R	R	R	R		R	R	R	R
THYMELACEAE																				
UMBELIFERAE	R	R	R		R					R	M	R			R			R	R	

(continua)

**QUADRO II – CLASSES POLÍNICAS INDIVIDUAIS DAS 20 AMOSTRAS DE MEL ESTUDADAS (D = PÓLEN DOMINANTE, >45%; S = PÓLEN SECUNDÁRIO, Ž16 E -45%; M = PÓLEN MINORITÁRIO, Ž3 E <16%; R = PÓLEN RARO, <3%). CLASSES DE REPRESENTAÇÃO POLÍNICA SEGUNDO CAMPOS (1988) E SORKUN E DOĞAN (1995).**

(Continuação)

Famílias	Amostra de mel																			
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
ASTERACEAE		R		R			R	R	R	M								R		
BORAGINACEAE	S	M	M	R	M	M	S	M	R	M	M	M	R	M	M	R	M	M	S	M
CISTACEAE	R	R	R	M	R	M	R	S	M	M	S	M	R	M	M	M	M	M	R	R
CRUCIFERAE		R	R		R			R					R	R		R	R			
CARYOPHYLLACEAE		R					R						R							
CAPRIFOLIACEAE																				
CONVOLVULACEAE	R	M	M			R	R		R	R	R		R	R	R	R	R		R	R
ERICACEAE	R	M	R	R	M	M			R	R				M	R	R	R	R		S
EUPHORBIACEAE																				
FAGACEAE		S	S	M	S	R	R	M	R		R	M	S	R	R	R				S
GERANIACEAE		R	R				R	R		R										
GUTTIFERAE		R	R	R		R		R	R		R	R	R	R	R					
LABIATAE	M	M	R	M	M	M	R	M	M	M	S	M	R	M	M	S	M	M	M	R
LEGUMINOSAE	S	M	M	S	S	S	S	M	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LILIACEAE																				
MALVACEAE																				
OLEACEAE							R													
PINACEAE																				
PAPAVERACEAE								R		R			R							
PRIMULACEAE																				
ROSACEAE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	D	S	S	S	S	S	S	S	D	S	S
RUBIACEAE										R										
RESEDACEAE		M	M		R	M	R	R	R	R	R	M	M	R	R	R				
SCROPHULARIACEAE		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		M	R	R					R
THYMELACEAE																				
UMBELLIFERAE	R	R						R		R	R			R	R	R	R	R	R	R

restantes amostras caracterizaram-se por apresentar combinações de pólen das famílias Leguminosae, Fagaceae, Ericaceae e Boraginaceae, tendo sido consideradas como representativas de méis multiflorais.

No Quadro II estão expressos os resultados individuais das classes polínicas dos méis estudados, segundo a classificação de Campos (1988) e Sorkun e Dogan (1995).

Tipos polínicos classificados como “de apresentação rara minoritária” foram observados em todas as amostras estudadas. Pólen classificados como “secundários” foram observados em quase todos os méis, onde se observaram também pólen cuja identificação se mostrou impossível no âmbito deste trabalho.

## DISCUSSÃO

Quer as 36 famílias identificadas através da recolha de plantas para a elaboração da palinoteca de referência, quer a distribuição dos tipos polínicos nas amostras de mel estudadas estão em sintonia com resultados de estudos anteriores Pires (1991) e Rocha (1996) que incidiram na vegetação mais característica da região de Trás-os-Montes (as Leguminosae, Fagaceae, Boraginaceae, Labiatae, Ericaceae e Cistaceae). O que nos permite especular sobre a possibilidade desta combinação poder vir a ser usada na identificação da origem geográfica dos méis desta região.

Poder-se-á admitir que a predominância, nos méis de Trás-os-Montes e Alto Douro, de pólen de Rosaceae está associada à grande disponibilidade local de plantas pertencentes a esta família, as quais são muito procuradas pelas colónias de abelhas da região.

Curiosamente, não foram encontrados pólen do género *Thymus*, o qual está bem representado na região (Aguiar, 1994; Rocha, 1996) e é muito procurado pelas abelhas. Esta situação poderá estar eventualmente relacionada com a existência de floração concorrente que seja preterida pelas abelhas melíferas. Um outro aspecto que merece relevo é o facto de não se terem encontrado méis monoflorais de “*Erica*”, apesar de algumas das espécies pertencentes à família Ericaceae estarem bem representadas na região, e de terem relevância apícola [uma vez que são simultaneamente fontes de néctar e de pólen para as colónias de abelhas; Arroyo e Herrera (1998) e Montero e Tormo (1990)]. Contudo, é de salientar, que os tipos polínicos desta família surgem representados em todas as amostras de mel classificadas como multiflorais. Aparentemente, esta situação

resulta (i) da considerável cobertura geográfica que esta família tem na região estudada, (ii) do facto das espécies pertencentes a esta família apresentarem diferentes épocas de floração (que ocorrem regionalmente desde Março a Dezembro) e (iii) de só se realizar uma cresta por ano nesta região.

Costa (1999), nas análises polínicas que efectuou aos méis do Parque Arqueológico do Vale do Côa, observou que a família mais representada era a das Cistaceae (80%), assumindo particular importância espécies como o *Halimium halimifolium*, o *Cistus ladanifer*, e o *Cistus albidus*. Nos nossos resultados, esta família tem uma representação bastante inferior (4,29%) o que poderá ser explicado pelo facto das nossas amostras representarem uma área mais abrangente e, floristicamente, mais heterogénea do que a representada pelo Vale do Côa. Baño Breis *et al.* (1994), em análises polínicas efectuadas aos méis da região de Murcia (Espanha), verificaram que as famílias vegetais de maior interesse apícola eram as Labiatae e as Leguminosae. As plantas da família Labiatae tendem a ser grandes produtoras de néctar e muitas das espécies da família Leguminosae (embora não produzam néctar) têm uma grande representação na nossa flora (sendo os seus pólenes muito frequentes nos méis; Herrera, 1985). Estes resultados suportam os nossos, na medida em que duas das famílias mais representadas neste estudo foram também as Leguminosae e as Labiatae.

Almeida (1992) verificou que existiam méis produzidos na região da “Terra Quente Transmontana” cuja percentagem de pólen de Papilionaceae era superior a 45%, mostrando simultaneamente uma percentagem de pólenes de Labiatae superior a 10 ou 20%. O nosso estudo concluiu também por níveis semelhantes de representação polínica desta última família. Os nossos resultados suportam também Vorwohl (1994), quando afirma que os méis de países mediterrâneos apresentam elevadas frequências (e uma certa regularidade) de pólenes da família Boraginaceae.

## CONCLUSÃO

Tendo em conta as condições em que este estudo foi desenvolvido, a metodologia utilizada, e os resultados obtidos conclui-se que os méis de Trás-os-Montes e Alto Douro apresentam um espectro polínico variado, manifestando contudo algumas características comuns (como sejam, por exemplo, a presença constante de pólenes das famílias das Rosaceae, Labiatae, Leguminosae, Fagaceae, Boraginaceae e Ericaceae). Os resultados obtidos, sugerem ainda a



possibilidade de se produzirem méis monoflorais na região, que incorporem maior valor acrescentado para os apicultores.

## BIBLIOGRAFIA

- AGUIAR, C., 1994. Carta de vegetação actual do Parque Natural de Montesinho e Serra de Nogueira: memória descritiva. Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 22 p.
- ALCARAZ, D., 1995. Flora de Extremadura. Universitas Ed. Badajoz, pp 128-141.
- ALMEIDA, P.A.R., 1992. Contribuição para a caracterização do mel da zona agrária da Terra Quente. Relatório Final de Estágio em Engenharia Zootécnica. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 35 p.
- Arroyo, J. e Herrera, J., 1988. Producción y arquitectura floral en Ericaceae de Andalucía Occidental. Lagasalia, 15: 613-622.
- BAÑO BREIS, F., PÉREZ SÁNCHEZ, Y. e CANDELA CASTILLO, M.E., 1994. Palinoteca. Referencia para el análisis polínico de mieles de la región de Murcia. 2ª floración de verano. Vida Apícola, 62: 33-39.
- CAMPOS, M.G.R., 1988. Contribuição para o estudo do pólen, geleia real e propólis. Faculdade de farmácia. Universidade de Coimbra, Coimbra, 19 p.
- CARRETERO, J.L., 1989. Análisis polínico de la miel. Ediciones Mundi-prensa, Madrid, 124 p.
- COSTA, M.M.F., 1999. Contribuição para a caracterização do mel do Parque Arqueológico do Vale do Côa. Relatório Final de Estágio em Engenharia Zootécnica. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 77 p.
- GOMEZ-FERRERAS, C., 1990. Análisis polínico de mieles de valles Pirenaicos Navarros y Oscenses. Actas II Coloquio Internac. Bot. Pirenaico-cantabrica, 1989. Monograf. Inst. Pir. Ecol. 5: 657-664.
- HERRERA, J., 1985. Nectar secretion patterns in southern Spanish mediterranean scrublands. Israel Journal of Botany, 34: 47-58.
- LOUVEAUX, J., MAURIZIO, A. e VORWOHL, G., 1978. Methods of melissopalynology. Bee World, 59 (4): 139-157.
- MOAR, N.T., 1985. Pollen analysis of New Zeland honey. Rev. New Zeland J. of Agricultural Research, 28: 39-70.
- MONTERO, I. e TORMO, R. 1990. Análisis polínico de mieles de cuatro zonas montañosas de Extremadura. Nacional Asociación Palinologica Lengua Española, 5: 71-78.
- PIRES, S.M.A., 1991. Composição química, físico-química e polínica do mel do Parque Natural de Montesinho. Relatório final de Estágio em Engenharia Zootécnica. UTAD, 35 p.
- ROCHA, A.M.M., 1996. Contribuição ao estudo de produção de mel pela abelha (*Apis mellifera* L.) na região de Bragança. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências do Porto, Porto, 99 p.

- SERRA, J.B., 1987. Propriétés physico-chimiques, composition et spectre pollinique des mieles de *Lavandula latifolia* Med. Produits en Espagne. *Science des Aliments*, 8 : 295-307.
- SORKUN, K. e DOGAN, C., 1995. Pollen analysis Rize-Anzer (Turkish) honey. Hacettep University, Faculty of Science, Biology Department, Ankara, 75-82.
- VALBUENA, A.O., 1992. Contribución de la denominación de origen à la miel de la Alcarria, Tesis Doctoral, Madrid, 131 p.
- VALDÉS, B., DIEZ, M.J. e Fernández, I., 1987. Atlas Polínico de Andalucía Occidental. Instituto de Desarrollo Regional de la Universidad de Sevilla, 450 p.
- VERGERON, P., 1964. Interprétation statistique des résultats en matière d'analys pollinique des mieles. *Ann. Abeille*, 7 (4) : 349-364.
- VORWOHL, G., 1994. Melissopalynology. In: *Trabajos de Palinología básica y aplicada. X Simposio de Palinologia (A.P.L.E.)*, Universidad de València, pp. 15-29.



## ANTIOXIDANT DEFENCES IN ANIMALS

P.A.C. Matos e A. Fontainhas-Fernandes

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, CETAV, Apartado 1013, 5000-911

Vila Real, Portugal; pmatos@utad.pt

*(Aceite para publicação em 20 de Novembro de 2004)*

### ABSTRACT

The biological systems are systematically a target of the action of several toxic compounds which origin results from urban communities, agricultural and industrial activities. Some of these environmental contaminants or their metabolites, natural or anthropogenic, known as xenobiotics, may cause toxic effects relationed to oxidative stress. The defence systems are involved in the reactive oxygen species (ROS) elimination or in the prevention of its formation, using antioxidant enzymes. There are several antioxidant effects that may be used as biomarkers and they include the adaptative responses such as the increase of the antioxidant enzymes activity and the concentration of non-enzymatic compounds, as well as evidences such as protein, lipid and nucleic acids oxidation. The purpose of this work is to make a short review about the defence systems that can inhibit ROS formation, namely the principal antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase.

**Key-words:** antioxidant enzymes, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase

## DEFESAS ANTIOXIDANTES EM ANIMAIS

### RESUMO

Os sistemas biológicos estão a ser continuamente agredidos por diversos compostos orgânicos estranhos, proveniente das comunidades urbanas, da indústria e da agricultura. Alguns destes contaminantes ambientais ou os seus metabolitos, naturais ou antropogénicos, conhecidos como xenobióticos podem exercer efeitos tóxicos relacionados com o stresse oxidativo. Os sistemas de defesa estão envolvidos na eliminação de espécies reactivas de oxigénio (EROS) ou na prevenção da sua formação, usando enzimas antioxidantes. Existem efeitos oxidantes que podem ser

usados como biomarcadores e incluem as respostas adaptativas, tal como um aumento da actividade das enzimas antioxidantes e a concentração de compostos não enzimáticos, bem como manifestações de toxicidade como oxidações de proteínas, lípidos e de ácidos nucleicos. O objectivo do presente trabalho é o de apresentar uma revisão sobre os sistemas de defesa que tendem a inibir a formação de EROS, em particular, das principais enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase, glutatião peroxidase e glutatião redutase.

**Palavras-chave:** catalase, enzimas antioxidantes, espécies reactivas de oxigénio (EROS), glutatião peroxidase, glutatião redutase, superóxido dismutase

## INTRODUÇÃO

Quando os primeiros organismos vivos surgiram na Terra, a atmosfera continha, no entanto, muito pouco  $O_2$ , o que implicava que eles fossem essencialmente anaeróbios (Halliwell e Gutteridge, 1999). À medida que a concentração de  $O_2$  atmosférico foi aumentando, muitos dos organismos primitivos acabaram por morrer. Os seres anaeróbios que existem actualmente, presumivelmente, descendentes dos organismos primitivos, conseguiram sobreviver graças à adaptação a ambientes cada vez mais ricos em  $O_2$ , a par da desistência de permanência em ambientes estritamente anaeróbios (Halliwell e Gutteridge, 1998). No entanto, outros organismos iniciaram um processo evolutivo que envolvia sistemas de defesa antioxidantes e que lhes permitia e continua a permitir, protegerem-se dos efeitos tóxicos do oxigénio, destacando-se a necessidade de eliminarem as espécies reactivas de oxigénio (EROS) que são substâncias tóxicas geradas durante o metabolismo ou a partir de factores ambientais (Scandalios, 1993). O meio mais eficiente para eliminar as espécies tóxicas indesejáveis é a via da sua catálise (McCord, 2000).

Através de processos como a pressão selectiva ou a evolução, foram desenvolvidos numerosos mecanismos de defesa antioxidantes, enzimáticos e não enzimáticos (Quadro I), cujo objectivo é o de protegerem as células de danos causados pelos radicais livres e EROS (Scandalios, 1993; Beckman e Ames, 1998).

O conhecimento da capacidade antioxidante de "*scavengers*" químicos específicos e da sua actividade com os diferentes oxidantes é fundamental para perceber e prever a susceptibilidade dos tecidos biológicos ao stresse oxidativo. No entanto, a complexidade do balanço celular entre um determinado oxidante e

a respectiva resposta antioxidante, não permite que se generalize o potencial impacto causado pelas espécies reactivas de oxigénio e na resposta a um único agente oxidante.

As enzimas oxidativas evoluíram de modo a ultrapassar a restrição do *spin* dos electrões desemparelhados, bem como conseguem realizar a redução do  $O_2$  sem a libertação de intermediários. Assim, a maioria do oxigénio consumido pelas células é utilizado pela citocromo oxidase, que reduz o oxigénio a água, sem a libertação de  $O_2^{\cdot-}$  ou de  $H_2O_2$  (Antonini, 1970).

Entre os mecanismos não enzimáticos destacam-se as vitaminas C e E, o  $\beta$ -caroteno, o glutatião (Larson, 1988; Winston, 1991; Scandalios, 1993), os flavonóides, a cisteína, as hidroquinonas, o manitol, alguns alcalóides (Ames, 1983; Larson, 1988; Scandalios, 1993) e alguma maquinaria celular (glucose-6-fosfato desidrogenase), que mantêm o ambiente celular reduzido (Beckman e Ames, 1998). Existem, ainda, proteínas que actuam como *scavengers* de moléculas oxidantes captando o electrão desemparelhado, como é o caso da albumina (Halliwell, 1988), ou com a capacidade de sequestrar metais de transição, impedindo os iões metálicos de participar em reacções envolvendo radicais livres, como são os casos da transferrina (Aruoma e Halliwell, 1987) e da ceruloplasmina (Gutteridge, 1983).

As defesas enzimáticas incluem enzimas capazes de remover, neutralizar ou de actuar como "*scavengers*" dos radicais livres e das espécies reactivas de oxigénio (Frei *et al.*, 1990; Scandalios, 1993). Entre elas destacam-se a superóxido dismutase (SOD) responsável pela dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ , a catalase (CAT) e a glutatião peroxidase (GPx), que convertem o  $H_2O_2$  em água e eliminam peróxidos orgânicos (Frei *et al.*, 1990; Winston, 1991; Scandalios, 1993; McCord, 2000), a ascorbato peroxidase/desidroascorbato redutase e a glutatião redutase (GR), enzimas envolvidas na redução das formas oxidadas de pequenas moléculas antioxidantes (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995; Beckman e Ames, 1998), como o glutatião e o ascorbato (Allen, 1995).

O equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes pode ser quebrado. O consequente desequilíbrio em favor dos primeiros induz stresse oxidativo. Além do número de trabalhos envolvendo, simultaneamente, os peixes e as defesas antioxidantes ser relativamente reduzido, a sua existência também é relativamente recente, sendo que a maioria foi realizada no decurso da última década. Assim, podem encontrar-se referências ao nível do efeito de metais pesados (Thomas e Wofford, 1993; Basha e Rani, 2003), de xenobióticos (Förlin *et al.*, 1994; Paris-

Palacios *et al.*, 2000; Matos, 2003), poluentes ambientais (Stein *et al.*, 1992; Lackner, 1998; Filho *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003a; Zhang *et al.*, 2003b) e alterações relacionadas com factores ambientais (Parihar *et al.*, 1997; Hermes-Lima e Zenteno-Savín, 2002).

Quadro I - LISTA DE ENZIMAS E COMPOSTOS ANTIOXIDANTES.

SISTEMAS	AÇÃO
<b>Não enzimáticos</b>	
Vitamina E	Quebram reacções em cadeia
$\beta$ -caroteno	<i>Quencher</i> do oxigénio singuleto
Ubiquinol-10	<i>Scavenger</i> de radicais
Vitamina C (ascorbato)	Diversas funções antioxidantes
Glutatião (GSH)	Diversas funções antioxidantes
Ácido úrico	<i>Scavenger</i> de radicais
Bilirrubina	Antioxidante plasmático
Flavonóides	Antioxidantes de plantas
Proteínas plasmáticas	Ligação de metais
<b>Enzimáticos</b>	
Superóxido dismutase	Dismutação do radical superóxido
Glutatião peroxidase	Redução do peróxido de hidrogénio e de outros hidroperóxidos
Catalase	Dismutação do peróxido de hidrogénio
Glutatião S-transferase	Redução de peróxidos
NADPH-quinona oxidoreductase	Redução por dois electrões
Glutatião redutase	Manutenção dos níveis de GSH
Fornecedor de NADPH	NADPH para a GSSG redutase
Sistemas transportadores	Exportação de GSSG
	Exportação de tioéster
Sistemas reparadores	Sistemas de reparação do DNA
	<i>Turnover</i> de proteínas oxidadas
	<i>Turnover</i> de fosfolípidos oxidados

Atendendo ao crescente interesse e preocupação por esta área de investigação, julgámos pertinente efectuar uma abordagem a um dos sistemas de defesa celular menos conhecido.

## DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS

### Vitamina E

A Vitamina E é o nome genérico atribuído a uma família homogénea de compostos, nomeadamente o  $\alpha$ -tocoferol cuja estrutura molecular consiste numa hidroquinona metilada e o restante uma cadeia isoprenóide (Fig. 1).

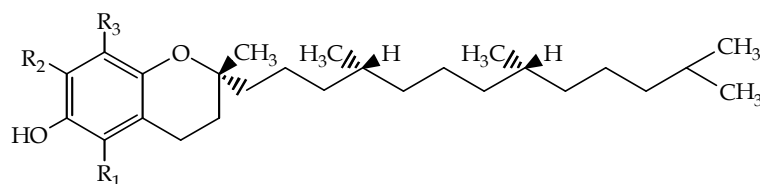


Figura 1. Estrutura da vitamina E (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995).

Segundo Cadenas (1989), a vitamina E tem a capacidade de reagir com uma grande variedade de radicais com uma velocidade considerável, originando o correspondente radical  $\alpha$ -tocoferilo ( $\text{Vit-E}^{\bullet}$ ). Esta reacção pode envolver a abstracção de um  $\text{H}^{\bullet}$  existindo também a possibilidade de ocorrer a transferência de um electrão (Willson, 1985), em particular, em meios apolares tais como lípidos e membranas, sendo seguida de desprotonação do catião radicalar, numa reacção que ocorre na interface lípido/água.

A vitamina E possui um grupo fenólico hidroxilado responsável pela sua capacidade antioxidante e uma cadeia lateral hidrocarbonatada ( $\text{C}_{16}\text{H}_{33}$ ) que favorece a sua inserção na região da bicamada lipídica da membrana celular. Nos sistemas biológicos, uma molécula de vitamina E parece ser capaz de proteger 10.000 moléculas de ácidos gordos insaturados (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995).

Esta vitamina é reconhecida como sendo a última possibilidade de prevenção da peroxidação lipídica das membranas (Burton *et al.*, 1983; Packer e Landvik, 1990), através do "*scavenging*" dos radicais  $\text{LOO}^{\bullet}$  envolvidos nas reacções de peroxidação que ocorrem em cadeia (Packer e Landvik, 1990). *In vivo*, a vitamina E protege contra a peroxidação lipídica, sendo considerada o principal agente antioxidante lipossolúvel de membranas biológicas (Pryor, 1976; Burton e Ingold, 1986). Além disso, realiza o "*quenching*" do oxigénio singuleto e reage lentamente com o radical superóxido (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995; Halliwell e Gutteridge, 1999). O "*scavenging*" do oxigénio singuleto pelos tocoferóis inclui o "*quenching*"



"físico, no qual o estado excitado do oxigénio deixa de existir e sem emissão de luz, e o "quenching" químico, que conduz à produção de vários produtos de oxidação (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995).

Importa registar o facto da vitamina E reagir com radicais peróxido lipídicos para formar radicais de vitamina E, que não são suficientemente reactivos para abstrair o H<sup>•</sup> dos grupos metileno dos fosfolípidos membranares ou com as proteínas das membranas (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995; Halliwell e Gutteridge, 1999). Assim, a vitamina E consegue parar a reacção, actuando como um terminador da reacção em cadeia. Os radicais de vitamina E produzidos são estáveis, porque o electrão desemparelhado do átomo de oxigénio pode ser deslocado para a estrutura aromática anelar (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995). Esta estabilidade dos radicais permite que sejam regenerados através de uma sequência de reacções envolvendo a vitamina C e o NAD<sup>+</sup> (Fig. 2).

As plantas e a maioria dos animais sintetizam o ácido ascórbico a partir da glucose. No entanto, os humanos não são capazes de o fazer, sendo por isso, necessário a sua obtenção a partir da dieta (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995).

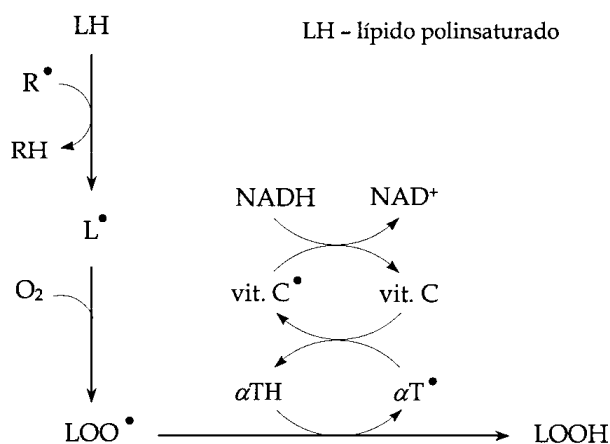


Figura 2. Efeito cooperativo do ácido ascórbico (vitamina C) e do  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E).  
(Roberfroid e Buc-Calderon, 1995).

### Vitamina C (ácido ascórbico)

O ácido ascórbico, ou ascorbato, é necessário *in vivo* como cofactor de, pelo menos, oito enzimas (Halliwell e Gutteridge, 1999) e a sua deficiência em termos da dieta alimentar é responsável pelo aparecimento de ascorbuto, sendo

o colagénio sintetizado na ausência de ácido ascórbico não é suficientemente hidroxilado e as suas fibras não se formam devidamente (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995; Nishikimi e Yagi, 1996).

A cedência de um electrão pelo ascorbato dá origem ao radical semi-desidroascorbato ou radical ascorbilo, o qual pode ser posteriormente oxidado, dando origem ao desidroascorbato (Halliwell e Gutteridge, 1999).

O ascorbato é um importante antioxidante (Ames, 1983; Frei *et al.*, 1990), sendo o único antioxidante endógeno do plasma capaz de proteger os tecidos contra os danos provocados pela peroxidação, induzidos pelos radicais peroxilo aquosos e os oxidantes libertados por acção dos neutrófilos. Frei *et al.* (1990) sugerem que a formação de hidroperóxidos lipídicos como resultado da activação crónica de leucócitos contra situações patológicas pode ser prevenida com uma suplementação em ascorbato, desde que não estejam presentes no meio catalisadores metálicos no estado livre.

Como foi mencionado, o ascorbato parece estar igualmente envolvido na transferência de  $H^{\cdot}$  no processo de regeneração da vitamina E, assim como numa acção directa com os radicais peroxilo e o oxigénio singleto (Bendich *et al.*, 1986). O ascorbato assume um papel importante *In vitro* na defesa antioxidante, uma vez que actua como "scavenger" dos radicais superóxido, hidroperoxilo, hidroxilo e tiólo, além de prevenir a peroxidação lipídica resultante de misturas contendo hemoglobina e  $H_2O_2$  ou mioglobina e  $H_2O_2$  (Halliwell e Gutteridge, 1999). Segundo estes autores, parecerazoável que esta molécula também apresente *in vivo* uma acção antioxidante, embora as evidências directas sejam limitadas.

### Carotenóides

Os carotenóides desempenham um papel como precursores da vitamina A ou retinol, embora existam mais de 50 carotenóides capazes de o fazer (Krinsky, 1993). É do conhecimento geral que os carotenóides serem rapidamente oxidados, inibindo as reacções de oxidação (Krinsky, 1979). Todavia, há cerca de 15 a 20 anos aumentou a evidência de que estas biomoléculas actuam como agentes antioxidantes, reagindo com espécies reactivas de oxigénio (Burton e Ingold, 1984; Krinsky, 1987).

De facto, os carotenóides são poderosos *scavengers* do oxigénio singleto e conduzem à formação de um radical carotenóide e do oxigénio tripleto. A multiplicidade de duplas ligações permite ao caroteno actuar como um "escoador" para uma larga gama de moléculas, em particular, as moléculas que contêm

electrões antiligantes em orbitais acima do estado fundamental. Estas orbitais conjugadas permitem um rápido "decaimento" da molécula excitada. Este tipo de decaimento conduz ao aumento da energia vibracional das ligações, o que conduz à dissipação da energia através da produção de calor e não pela emissão de luz. A molécula carotenóide original é regenerada, pelo que o  $\beta$ -caroteno não é consumido na realização do "quenching" do oxigénio singuleto (Krinsky, 1989),

O  $\beta$ -caroteno não só realiza o "quenching" do oxigénio singuleto, como também actua como *scavenger* de diversas espécies reactivas de oxigénio (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995) e de outras espécies de radicais livres (Krinsky, 1993). A Por outro lado, o  $\beta$ -caroteno é um eficiente terminador das reacções em cadeia realizadas a baixas pressões de oxigénio. De facto, na presença de radicais peroxilo, o  $\beta$ -caroteno produz um radical carotenilo com o electrão desemparelhado centrado no carbono ( $\beta$ -car) $\cdot$ , o qual, na ausência de oxigénio é um eficiente terminador das reacções de oxidação que se realizam em cadeia (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995).

A presença de oxigénio permite, contudo, a propagação em cadeia dado que o radical carotenilo reage reversivelmente com o oxigénio, proporcionando o aparecimento de espécies reactivas que alimentam as reacções em cadeia, e do radical  $\beta$ -caroteno peroxilo ( $\beta$ -car-OO) $\cdot$ , o qual induz outros processos oxidativos (Rousseau *et al.*, 1992).

Em termos de acção protectora, a capacidade antioxidante do  $\beta$ -caroteno reside no facto de em dietas ricas nesta molécula, ter ocorrido menores perdas pelas mitocôndrias de retinol, tocoferol e ácidos gordos polinsaturados (Yamane e Lamola, 1973). Num outro estudo (Blakely *et al.*, 1988), foi administrado na dieta alimentar de ratos  $\beta$ -caroteno durante 6 semanas, que, pelo facto de possuir um teor elevado em gordura, conduzia à formação de radicais peroxilo e ao consequente aumento da actividade enzimática da SOD. O  $\beta$ -caroteno teve a capacidade de fazer diminuir a actividade desta enzima, comparando os seus atributos antioxidantes.

### Glutatião

O glutatião (L-g-glutamyl-L-cisteinil-glicina) é o principal tiol intracelular que participa, directa ou indirectamente, em numerosos fenómenos biológicos de importância vital para a célula (Meister e Anderson, 1983; Serrano e Llobell, 1993; Mourad *et al.*, 2000), nomeadamente na síntese proteica e de DNA, em mecanismos de transporte, na actividade enzimática, no metabolismo e protecção

celulares (Meister e Anderson, 1983), ao manter, neste caso, o estado reduzido das proteínas e participando na desintoxicação do  $H_2O_2$  (Rennenberg, 1982).

Apesar de existir na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) representado na Fig. 3, o seu estado reduzido prevalece nos tecidos em condições normais (deKok e Oosterhuis, 1983; Meister, 1983). O nível elevado de GSH é mantido pela acção de uma enzima dependente do NADPH, que já se referiu ser a glutatião redutase.

É conhecido que este tripéptido constituído por glicina (Gli), cisteína (Cis) e ácido glutâmico (Glu) desempenha um papel central no sistema de defesa celular, quelatando os iões cobre e diminuindo, assim, a sua capacidade de gerar radicais livres ou de os libertar em solução (Hanna e Mason, 1992), reagindo com considerável rapidez com radicais livres (Cadenas, 1989), prevenindo a peroxidação lipídica devida a estes e às espécies reactivas de oxigénio (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995).

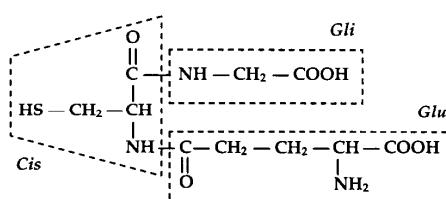


Figura 3. Fórmula de estrutura do glutatião reduzido (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995).

De facto, o glutatião participa na inactivação de um determinado número de fármacos e no metabolismo de certos compostos endógenos, como os estrogénios e as prostaglandinas (Fig. 4). Foram, de igual modo, descritos alguns tipos de protecção ao nível das proteínas citoplasmáticas e de enzimas membranares que utilizam a GSH como substrato ou cofactor, casos da glutatião S-transferase, glutatião peroxidase dependente do selénio e fosfolipase hidroperóxido glutatião peroxidase (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995).

Segundo Cadenas (1989) e Halliwell e Gutteridge (1999), as interacções entre o GSH e os radicais livres encontram-se bem caracterizadas e, como regra, o radical glutationilo ( $GS^\cdot$ ) é o principal produto que delas resulta, muito embora também se possa formar o radical superóxido (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Deste modo, a não ser que o  $GS^\cdot$  esteja perfeitamente estabilizado, este radical é alvo de uma série de reacções, as quais incluem além do seu "quenching

"pelo  $O_2$ , a conjugação dos dois radicais, a oxidação do GSH e a reacção com o  $GSSG^{\cdot-}$ .

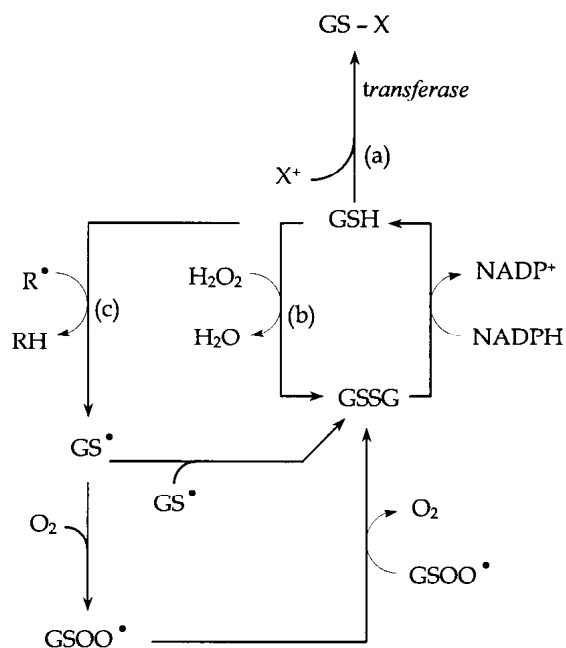


Figura 4. Acção da GSH contra metabolitos electrolíticos (a), peróxidos (b) e radicais livres (c) ( $X^+$  é um metabolito electrolítico) (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995).

De cada vez é mais evidente o papel assumido pelo  $H_2O_2$  no stresse oxidativo, quer como precursor do  $\cdot OH$  – a espécie radical directamente responsável pela degradação de proteínas e do DNA –, quer como agente oxidante do GSH, através da glutatión peroxidase, conduzindo a um desequilíbrio da razão GSH/GSSG e da homeostase do  $Ca^{2+}$ . Devido à elevada actividade de GPx nas células do fígado, esta enzima elimina o  $H_2O_2$  eficazmente, dependendo, no entanto, a eficácia da disponibilidade de GSH intracelular e na capacidade da célula voltar a reduzir o glutatión oxidado (GSSG).

Consequentemente, o fornecimento de glutatión exógeno ao fígado ou de precursores para a sua síntese, pode ter efeitos benéficos contra o stresse oxidativo. No entanto, um estudo relativamente recente, em que se injectou, intravenosamente uma dose elevada de GSH duas horas antes da ocorrência de isquemia, não evidenciou qualquer efeito protector (Cho *et al.*, 1990).

Níveis de GSH hepático superiores aos níveis fisiológicos normais só conseguiram ser atingidos quando ocorre uma depleção de GSH, seguida de uma síntese *de novo* do mesmo e por um período de tempo limitado. Assim, só poderão ser esperados efeitos significativos se a administração de GSH ocorrer numa altura em que os níveis de GSH teciduais forem reduzidos, ou seja, quando o consumo de GSH for superior à respectiva síntese como resultado da falta dos aminoácidos precursores. Dado que o GSH se “perde” na forma de GSSG no sangue ou na bÍlis, as subseqüentes degradação e reabsorção dos aminoácidos no intestino e rins permitiu que a cisteína, o substrato limitante, fique novamente disponível para nova síntese de GSH no fígado.

A quantidade total de GSH nas células depende do seu consumo e da sua produção pelos seguintes processos:

- a) Redução do GSSG, reacção catalisada pela glutatíão redutase NADPH-dependente;
- b) Síntese a partir de substratos endógenos e exógenos que devem estar disponíveis para penetrar nas células;
- c) Inibição da sua destruição por intermédio de antioxidantes.

Dado que o GSH não penetra eficazmente na célula, têm sido testados muitos compostos como possíveis precursores de GSH ou indutores de enzimas que participam na sua síntese. De facto, vários compostos contendo grupos tiol demonstraram ser precursores efectivos ou regeneradores do glutatíão e têm sido aplicados terapêuticamente como hepatoprotectores e radioprotectores.

### Flavonóides

Os flavonóides são compostos fenólicos largamente distribuídos nas plantas vasculares (Middleton, 1984; Bors *et al.*, 1990). Derivam da flavona (Fig. 5A), da qual a quercetina (Fig. 5B) é um exemplo, e pertencem a um vasto grupo de outros compostos dos quais são conhecidas numerosas substâncias (Kühnau, 1976; Harborne, 1988).

Está demonstrado que influenciaram determinadas funções biológicas, tais como a permeabilidade capilar, os processos de secreção celular envolvidos na resposta inflamatória e a inibição da actividade de enzimas, receptores e transportadores (Middleton, 1984).

Os flavonóides actuam como antioxidantes, provavelmente, devido a serem *scavengers* de radicais (Torel *et al.*, 1986). No entanto, Bors *et al.* (1990) afirmam

que, apesar de se terem testado vários compostos com diferentes componentes estruturais, apenas é possível retirar conclusões qualitativas.

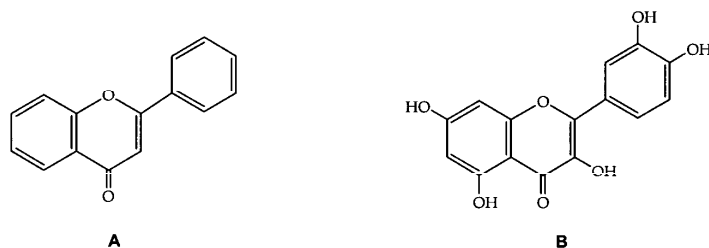


Figura 5. Estruturas da flavona (2-fenil-4-cromenona) e da quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona) (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995).

No caso dos flavonóides, são duas as componentes estruturais que podem ser responsáveis pela sua capacidade antioxidante óptima:

- a) O grupo catecol no anel B confere estabilidade elevada aos radicais aroxilo;
- b) A elevada deslocalização electrónica é assegurada pela conjugação do anel B com a estrutura 4-oxo através de uma dupla ligação  $C_2-C_3$ .

Quanto à realização de *scavenging* do  $O_2^{\cdot-}$ , a presença de grupos hidroxilo no anel B é essencial e a presença de um grupo hidroxilo em  $C_3$  confere aos flavonóides esta capacidade de um modo mais abrangente (Nègre-Salvayre e Salvayre, 1992). Alguns flavonóides são fortes *scavengers* de radicais de oxigénio, bons quelantes metálicos e têm boa capacidade de prevenção da peroxidação lipídica. Os flavonóides polifenólicos inibem a peroxidação lipídica de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e a sua subsequente citotoxicidade (Sichel *et al.*, 1991).

### Outros compostos

O ácido úrico tem sido referido como um importante antioxidante (Ames *et al.*, 1981; Hilliker *et al.*, 1992). Dado que não é objecto de análise deste artigo, a sua importância pode ser confirmada na bibliografia da especialidade (Anderson e Harris, 2003; Waring *et al.*, 2003; Ihara *et al.*, 2004). Existem estudos *in vitro* que demonstram a capacidade antioxidante e/ou a acção de *scavengers* de moléculas como a bilirrubina, os  $\alpha$ -cetoácidos, algumas hormonas sexuais femininas (*e.g.* estradiol), a melatonina, o ácido lipóico e a coenzima Q (Halliwell e Gutteridge, 1999).

## DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS

### Superóxido dismutase (SOD)

A SOD (EC 1.15.1.1) foi isolada a partir de sangue bovino como sendo uma proteína verde-azulado que contém cobre na constituição, e que se julgava ser responsável pelo armazenamento deste metal (Scandalios, 1993; Bertini *et al.*, 1998). Em 1969 foi descoberta a função catalítica da SOD (McCord e Fridovich, 1969), sendo a sua designação alterada, tendo já sido denominada eritrocupreína, indofenol oxidase e tetrazolium oxidase (Scandalios, 1993).

As SODs naturais têm sido utilizadas como agentes protectores num conjunto alargado de estados patológicos directamente relacionados com EROS, como é o caso dos danos causados por radiações (Petkau *et al.*, 1975; Schwartz *et al.*, 1982), os processos inflamatórios (Hubert e Saifer, 1977; Mc Cornick *et al.*, 1981; Frank, 1983), a isquemia celular (Shlafer *et al.*, 1982; Stewart *et al.*, 1982; McCord, 1985) e os mecanismos indutores de carcinogénese na pele (Solanki *et al.*, 1981; Armato *et al.*, 1984). Scandalios (1990) e Bowler *et al.* (1992) observaram que o stress oxidativo induz ou possibilita a actividade da SOD em procariotas e eucariotas.

O mecanismo de catálise envolvido na dismutação do radical superóxido pela SOD foi sugerido ser semelhante a um mecanismo de “ping-pong”, no qual o ião localizado na enzima oscila entre dois estados de oxidação (Goldstein e Czapski, 1983; Asimov, 1988; Samuni *et al.*, 1988; Goldstein *et al.*, 1990). A SOD, juntamente com a catalase, é a defesa enzimática antioxidante mais eficiente (Scandalios, 1993). A sua acção conjunta converte o radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) e o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em água e  $\text{O}_2$ , evitando danos a nível celular. Torna-se, assim, evidente que a SOD assume um papel chave contra os efeitos tóxicos das espécies reactivas de oxigénio (Fridovich, 1989). Investigações efectuadas em vários organismos revelam existirem três tipos diferentes de SODs, cujas diferenças se baseiam no ião metálico presente nos locais activos, existindo casos que contêm cobre e zinco (Cu/Zn-SOD), manganésio (Mn-SOD) ou ferro (Fe-SOD) (Bowler *et al.*, 1992; Scandalios, 1993; McCord, 2000).

Estes diferentes tipos de SOD podem ser distinguidos pela diferente sensibilidade que apresentam ao cianeto de potássio e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo a Cu/Zn-SOD caracterizada por ser sensível aos dois inibidores, a Fe-SOD sensível ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a Mn-SOD resistente a ambos os inibidores (Van Camp *et al.*, 1990; Fridovich, 1995; Bertini *et al.*, 1998). Em termos de estrutura química, a Fe-SOD e a Mn-SOD são



semelhantes, enquanto a Cu/Zn-SOD não apresenta qualquer tipo de relação com as restantes (Meier *et al.*, 1982; Stallings *et al.*, 1984; Bowler *et al.*, 1995).

Exceptuando alguns casos, a Cu/Zn-SOD encontra-se, geralmente, em quase todos os eucariotas (Bertini *et al.*, 1998). Nos animais, encontra-se no citosol, no núcleo (Bertini *et al.*, 1998; Pedrajas *et al.*, 1998), nos peroxissomas (Fridovich, 1995; Pedrajas *et al.*, 1998), nos lisossomas e no espaço intermembranar das mitocôndrias (Bertini *et al.*, 1998). Nas plantas, encontra-se nos cloroplastos (Bowler *et al.*, 1992; Pedrajas *et al.*, 1998). Quanto à sua presença em procariotas, tem vindo a aumentar o número de trabalhos que referem a sua presença em bactérias e cianobactérias (Bertini *et al.*, 1998).

A Mn-SOD encontra-se na matriz mitocondrial de plantas e animais (Fridovich, 1995) e em bactérias (Bowler *et al.*, 1992; Fridovich, 1995; Pedrajas *et al.*, 1998). Alguns crustáceos parecem ser a excepção, dado ter sido encontrada a enzima também no citosol (Brouwer *et al.*, 1997). A Fe-SOD está presente em procariotas e nalgumas plantas (Bowler *et al.*, 1992; Duke e Salin, 1985; Bertini *et al.*, 1998), não tendo sido possível localizá-la em tecidos animais (Bertini *et al.*, 1998).

### **Catalase (CAT)**

Contrariamente ao anião superóxido, o qual se verificou ser menos reactivo (Sawyer e Gibian, 1979; Fee, 1982; Fridovich, 1986), o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece ser um bom candidato para explicar a maioria dos efeitos produzidos pelas espécies reactivas de oxigénio. De facto, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> não sendo um radical, trata-se de uma molécula estável e consegue difundir-se através das membranas biológicas. É formado por redução divalente do oxigénio molecular, por acção de enzimas como a xantina oxidase e a oxidase do ácido úrico, ou por dismutação do anião superóxido (Chance *et al.*, 1979; Roberfroid e Buc-Calderon, 1995).

A sua toxicidade pode ser directa ou indirecta. De um modo directo, conduz à depleção do ATP, do glutatião reduzido (GSH) e do NADPH, induz o aumento citosólico de Ca<sup>2+</sup> livre (activando, consequentemente, vários processos metabólicos dependentes do cálcio) e activa algumas polimerases, conduzindo à morte celular (Schraufstatter *et al.*, 1986; Hyslop *et al.*, 1988). De um modo indirecto, devido à quebra da ligação do peróxido por meio da reacção de Fenton, conduzindo à formação do radical hidroxilo. Por esta via, induz a degradação macromoléculas: dos lípidos, devido à peroxidação lipídica, açúcares, devido à sua oxidação, proteínas, devido à oxidação dos grupos tiol, e ácidos nucleicos, devido à quebra da sua cadeia (Floyd e Lewis, 1983; Jonas *et al.*, 1989).

A catalase (EC 1.11.1.6), uma enzima que se encontra localizada, sobretudo, nos peroxissomas (Chance *et al.*, 1979; Roberfroid e Buc-Calderon, 1995), dado aí existirem inúmeras enzimas capazes de gerar peróxido de hidrogénio, protege as células da acumulação de  $H_2O_2$ , dismutando-o, formando  $H_2O$  e  $O_2$ , ou utilizando-o como um oxidante, e apresenta actividade de peroxidase (Roberfroid e Buc-Calderon, 1995). Segundo Halliwell e Gutteridge (1999), é possível encontrar CAT, em quantidades reduzidas, em mitocôndrias, cloroplastos e no retículo endoplasmático. Radi *et al.* (1991) afirmam ter encontrado CAT na matriz mitocondrial de coração de rato.

Em termos de localização, apesar de se encontrar bastante confinada, esta enzima pode desempenhar um papel importante na defesa contra o stresse oxidativo dado o  $H_2O_2$  se difundir muito rapidamente através das membranas (Bowler *et al.*, 1992). Segundo Roberfroid e Buc-Calderon (1995) e Halliwell e Gutteridge (1999), até à data foram descritos dois modos de acção para a CAT: actuando como dismutase e como peroxidase.

### **Glutatião peroxidase (GPx)**

A glutatião peroxidase (EC 1.11.1.9) é uma enzima que se encontra presente em numerosos tecidos animais, catalisando a redução do peróxido de hidrogénio, uma reacção dependente do GSH (Chance *et al.*, 1979; Schulte-Frohlind e van Sonntag, 1985; Halliwell e Gutteridge, 1999). A GPx não se encontra geralmente presente nas plantas superiores e bactérias. No entanto, ocorre em algas e fungos (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A redução do  $H_2O_2$  nos eritrócitos na presença de GSH e da glutatião peroxidase está associada à oxidação da glucose-6-fosfato e do 6-fosfogluconato, gerando o NADPH necessário à via das pentoses-fosfato (Meister e Anderson, 1983; Halliwell e Gutteridge, 1999). Esta rota metabólica do  $H_2O_2$  é responsável pela redução de muitos peróxidos orgânicos (Flohe e Gunzler, 1974; Chance *et al.*, 1978) e, como tal, é importante na protecção dos lípidos das membranas contra a peroxidação (Meister e Anderson, 1983).

Ao contrário do que acontece com a CAT, a GPx encontra-se em grandes quantidades no fígado, sobretudo no citosol e em menor concentração na matriz mitocondrial (Halliwell e Gutteridge, 1999). Isto implica que o  $H_2O_2$  proveniente da actividade de enzimas (peroxissomais), como a oxidase do glicolato ou a oxidase do ácido úrico, é removido maioritariamente pela CAT, enquanto aquele proveniente de mitocôndrias, do retículo endoplasmático ou da actividade de enzimas solúveis (citosólicas) é reduzido pela GPx (Chance *et al.*, 1979).

### **Glutatião redutase (GR)**

A glutatião redutase (EC 1.6.4.2) é uma flavoproteína largamente existente em organismos fotossintéticos, quer procariotas, quer eucariotas (Mahan e Burke, 1987; Anderson *et al.*, 1990; Edwards *et al.*, 1990), nomeadamente em vários tecidos de mamíferos, como eritrócitos humanos (Worthington e Rosemeyer, 1974; Krohne-Ehrich *et al.*, 1977), eritrócitos de suíno (Boggaram *et al.*, 1979), em fígado de rato (Carlberg e Mannervik, 1975) e de ratinho (López-Barea e Lee, 1979).

A GR foi detectada a primeira vez em 1930, tendo sido isolada posteriormente a partir de várias fontes (Meister, 1975). Quanto às suas funções, a GR está envolvida nas plantas no *scavenging* do  $H_2O_2$  nos cloroplastos, bem como na protecção contra o stresse oxidativo induzido, por exemplo, por electrões que se perdem da cadeia na fotossíntese (Foyer e Halliwell, 1976) e por determinados gases oxidantes como o ozono (Tanaka *et al.*, 1988). Nos animais, a sua acção é mais facilmente observada quando são expostos a drogas, pesticidas e compostos químicos capazes de gerar peróxidos (Ziegler, 1985).

### **Glutatião transferase (GST)**

A glutatião transferase (GST), também designada glutatião S-transferase (EC 2.5.1.18), é uma enzima que se encontra em plantas, insectos e nos animais em geral (Meister e Anderson, 1983). Nos mamíferos, a sua concentração é elevada em determinados tecidos, como é o fígado.

As funções que a GST desempenha são diversas, ao nível do metabolismo do etanol (Hetu *et al.*, 1982), de metais pesados (Dierickx, 1982) e de determinadas drogas (Chasseaud, 1979) e na redução de peróxidos (Burk *et al.*, 1978; Saneto *et al.*, 1982). Um exemplo concreto ocorre em plantas, nomeadamente no milho, onde a desintoxicação do herbicida atrazina ocorre por conjugação deste com o glutatião. Esta conjugação é catalisada nesta planta em particular pela GST (Timmermann, 1989), um processo comum a muitos xenobióticos administrados aos organismos (Halliwell e Gutteridge, 1999).

De facto, a conjugação com o GSH constitui o primeiro passo na desintoxicação de xenobióticos e dos seus metabolitos (Almar *et al.*, 1998). No entanto, verifica-se frequentemente que os produtos resultantes são mais tóxicos e causam mais danos (conjugação do GSH com alguns hidrocarbonetos halogenados) (Halliwell e Gutteridge, 1999). Por outro lado, elevadas concentrações de xenobióticos podem diminuir a concentração hepática de GSH, reduzindo e prejudicando a capacidade de defesa antioxidante do fígado (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A título de exemplo, em alguns dos compostos metabolizados, em animais, pela GST incluem-se o clorofórmio, nitratos orgânicos, o bromobenzeno, a aflotoxina, o DDT, o paracetamol e o naftaleno (Halliwell e Gutteridge, 1999).

## BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, R.D., 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.*, 107: 1049-1054.
- ALMAR, M., OTERO, L., SANTOS, C. e GALLEGO, J.G., 1998. Liver glutathione content and glutathione-dependent enzymes of two species of freshwater fish as bioindicators of chemical pollution. *J.Environ.Sci.Health*, B33: 769-783.
- AMES, B., 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221: 1256-1264.
- AMES, B.N., CATHCART, R., SCHWIERS, E. e HOCHSTEIN, P., 1981. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 78: 6858-6862.
- ANDERSON, J.V., HESS, J.L. e CHENOVE, B.L., 1990. Purification, characterization and immunological properties of two isoforms of glutathione reductase from Eastern white pine needles. *Plant Physiol.*, 94: 1402-1409.
- ANDERSON, R.F. e HARRIS, T.A., 2003. Dopamine and uric acid act as antioxidants in the repair of DNA radicals: implications in Parkinson's disease. *Free Radic.Res.*, 37: 1131-1136.
- ANTONINI, A., 1970. Catalytic mechanism of cytochrome oxidase. *Nature*, 228: 936-937.
- ARMATO, U., ANDREIS, P.G. e ROMANO, F., 1984. Exogenous Cu,Zn-superoxide dismutase suppresses the stimulation of neonatal rat hepatocytes' growth by tumor promoters. *Carcinogenesis*, 5: 1547-1555.
- ARUOMA, O.I. e HALLIWELL, B., 1987. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation? *Biochem.J.*, 241: 273-278.
- ASIMOV, I., 1988. A relatividade do erro, Edições 70, Lisboa, 231 p.
- BASHA, P.S. e RANI, A.U., 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicol.Environ.Saf.*, 56: 218-221.
- BECKMAN, K.B. e AMES, B.N., 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol.Rev.*, 78: 547-581.
- BENDICH, A., BURTON, G.W., MACHLIN, L.J., SCANDURRA, O. e WAYNER, D.D.M., 1986. The antioxidant role of vitamin C. *Adv.Free Radic.Biol.Med.*, 2: 419-444.
- BERTINI, I., MANGANI, S. e VIEZZOLI, M.S., 1998. Structure and properties of copper-zinc superoxide dismutases. *Adv.Inorg.Chem.*, 45: 127-250.
- BLAKELY, S.R., SLAUGHTER, L., ADKINS, J. e KNIGHT, E.V., 1988. Effects of b-carotene and retinyl palmitate on corn oil-induced superoxide dismutase and catalase in rats. *J.Nutr.*, 118: 152-158.

- BOGGARAM, V., BROBJER, T., LARSON, K. e MANNERVIK, B., 1979. Purification of glutathione reductase from porcine erythrocytes by the use of affinity chromatography on 2', 5'-ADP- Sepharose 4B and crystallization of the enzyme. *Anal.Biochem.*, 98: 335-340.
- BORS, W., HELLER, W., MICHEL, C. e SARAN, M., 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Meth.Enzymol.*, 186: 343-355.
- BOWLER, C., VAN CAMP, W., VAN MONTAGU, M. e INZÉ, D., 1994. Superoxide dismutases in plants. *Crit.Rev.Plant Sci.*, 13: 199-218.
- BOWLER, C., VAN MONTAGU, M. e INZÉ, D., 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.*, 43: 83-116.
- BROUWER, M., BROUWER, T.H., GRATER, W., ENGHILD, J.J. e THOGERSEN, I.B., 1997. The paradigm that all oxygen-respiring eukaryotes have cytosolic CuZn-superoxide dismutase and that Mn-superoxide dismutase is localized to the mitochondria does not apply to a large group of marine arthropods. *Biochem.*, 36: 13381-13388.
- BURK, R.F., NISHIKI, K., LAWRENCE, R.A. e CHANCE, B., 1978. Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in hemoglobin- free perfused rat liver. *J.Biol.Chem.*, 253: 43-46.
- BURTON, G.W. e INGOLD, K.U., 1984.  $\beta$ -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224: 569-573.
- BURTON, G.W. e INGOLD, K.U., 1986. Vitamin E: application of the principles of physical organic chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc.Chem.Res.*, 19: 194-201.
- BURTON, G.W., JOYCE, A. e INGOLD, K.U., 1983. Is vitamin E the only lipid soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arch.Biochem.Biophys.*, 221: 281-290.
- CADENAS, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu.Rev.Biochem.*, 58: 79-110.
- CARLBERG, I. e MANNERVIK, B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J.Biol.Chem.*, 250: 5475-5480.
- CHANCE, B., BOVERIS, A., NAKASE, Y. e SIES, H., 1978. Hydroperoxide metabolism: an overview. In *Functions of Glutathione in Liver and Kidney*. Sies, H. and Wendel, A. Springer. Berlin/ Heidelberg/New York, pp. 95-106.
- CHANCE, B., SIES, H. e BOVERIS, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol.Rev.*, 59: 527-605.
- CHASSEAUD, L.F., 1979. The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Adv.Cancer Res.*, 29: 175-274.
- DEKOK, L.J. e OOSTERHUIS, F.A., 1983. Effects of frost hardening and salinity on glutathione and sulphhydryl levels in spinach leaves. *Physiol.Plant.*, 58: 47-51.
- DIERICKX, P.J., 1982. *In vitro* inhibition of the soluble glutathione S-transferases from rat liver by heavy metals. *Enzyme*, 27: 25-32.
- DUKE, M.V. e SALIN, M.L., 1985. Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eukaryote, *Ginkgo biloba*. *Arch.Biochem.Biophys.*, 243: 305-314.
- EDWARDS, E.A., RAWSTHORNE, S. e MULLINEAUX, P.M., 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180: 278-284.

- FEE, J.A., 1982. Is superoxide important in oxygen poisoning? *Trends Biochem.Sci.*, 7: 84-86.
- FILHO, D.W., TORRES, M.A., TRIBESS, T.B., PEDROSA, R.C. e SOARES, C.H.L., 2001. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acar ( *Geophagus brasiliensis* ). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34: 719-726.
- FLOHE, L. e GUNZLER, W.A., 1974. *Glutathione*. Proc. 16<sup>th</sup> Conf. German Soc. Biol. Chem. Tübingen. Stuttgart: Thieme, pp. 132-145.
- FLOYD, R.A. e LEWIS, C.A., 1983. Hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide by ferrous iron-nucleotide complexes. *Biochemistry*, 22: 2645-2649.
- Foyer, C.H. e Halliwell, B., 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133: 21-25.
- FÖRLIN, L., LEMAIRE, P. e LIVINGSTONE, D.R., 1994 . Comparative studies of hepatic xenobiotic metabolizing and antioxidant enzymes in different fish species. *Marine Environ. Research*, 39: 201-204.
- FRANK, L., 1983. Superoxide dismutase and lung toxicity. *Trends Pharmacol.Sci.*, 4: 124-128.
- FREI, B., STOKER, R., ENGLAND, L. e AMES, B. N., 1990. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. In *Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine*. Emerit, I. and Packer, L. Plenum Press, New York, pp. 155-163.
- FRIDOVICH, I., 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch.Bioch.Biophys.*, 247: 1-11.
- FRIDOVICH, I., 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J.Biol.Chem.*, 264: 7761-7764.
- FRIDOVICH, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu.Rev.Biochem.*, 64: 97-112.
- GOLDSTEIN, S. e CZAPSKI, G., 1983. Mechanisms of the dismutation of superoxide catalyzed by the copper(II) phenanthroline complex and of the oxidation of the copper(I) phenanthroline complex by oxygen in aqueous solutions. *J.Am.Chem.Soc.*, 105: 7276-7280.
- GOLDSTEIN, S., CZAPSKI, G. e MEYERSTEIN, D., 1990. A mechanistic study of the copper(II)-peptide-catalyzed superoxide dismutation. A pulse radiolysis study. *J.Am.Chem.Soc.*, 112: 6489-6492.
- GUTTERIDGE, J.M.C., 1983. Antioxidant properties of caeruloplasmin towards iron- and copper-dependent oxygen radical formation. *FEBS Lett.*, 157: 37-40.
- HALLIWELL, B., 1988. Albumin - an important extracellular antioxidant? *Biochem.Pharmacol.*, 37: 569-571.
- HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J.M.C., 1998. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. C. (Eds.). Oxford University Press, Oxford, 936 p.
- HANNA, P.M. e MASON, R.P., 1992. Direct evidence for inhibition of free radical formation from Cu(I) and hydrogen peroxide by glutathione and other potential ligands using the EPR spin-trapping technique. *Arch.Biochem.Biophys.*, 295: 205-213.
- HARBORNE, J.B., 1988. *The Flavonoids - Advances in Research Since 1980*. Harborne, J. B. (Ed.). Chapman and Hall, London.
- HERMES-LIMA, M. e ZENTENO-SAVN, T., 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp.Biochem.Physiol.*, 133C: 537-556.

- HETU, C., YELLE, L. e JOLY, J.-G., 1982. Influence of ethanol on hepatic glutathione content and on the activity of glutathione S-transferases and epoxide hydase in the rat. *Drug Metab.Dispos.*, 10: 246-250.
- HILLIKER, A.J., DUYF, B., EVANS, D. e PHILLIPS, J.P., 1992. Urate-null rosy mutants of *Drosophila melanogaster* are hypersensitive to oxygen stress. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 89: 4343-4347.
- HUBERT, W. e SAIFER, M. G., 1977. Superoxide and Superoxide Dismutase. Michelson, A. M., McCord, J. M. e Fridovich, I. (Eds.). Academic Press, New York.
- HYSLOP, P.A., HINSHAW, D.B., HASLEY, W.A., SCHRAUFSTATTER, I.U., SAUERHEBER, R.D., SPRAGG, R.G., JACKSON, J.H. e COCHRANE, C.G., 1988. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. *J.Biol.Chem.*, 263: 1665-1675.
- IHARA, H., HASHIZUME, N., HASEGAWA, T. e YOSHIDA, M., 2004. Antioxidant capacities of ascorbic acid, uric acid, alpha-tocopherol, and bilirubin can be measured in the presence of another antioxidant, serum albumin. *J.Clin.Lab.Anal.*, 18: 45-49.
- JONAS, S.K., RILEY, P.A. e WILLSON, R.L., 1989. Hydrogen peroxide cytotoxicity. Low-temperature enhancement by ascorbate or reduced lipoate. *Biochem.J.*, 264: 651-655.
- KRINSKY, N.I., 1979. Carotenoid protection against oxidation. *Pure & Appl.Chem.*, 51: 649-660.
- KRINSKY, N.I., 1987. Mechanisms of inactivation of oxygen species by carotenoids. In *Anticarcinogenesis and Radiation Protection*. Simic, M. G. and Nygaard, O. F. Plenum Press, New York, pp. 41-46.
- KRINSKY, N.I., 1989. Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radical Biol.Med.*, 7: 617-635.
- KRINSKY, N.I., 1993. Actions of carotenoids in biological systems. *Annu.Rev.Nutr.*, 13: 561-587.
- KROHNE-EHRICH, G., SCHIRMER, R.H. e UNTUCHT-GRAU, R., 1977. Glutathione reductase from human erythrocytes. Isolation of the enzyme and sequence analysis of the redox-active peptide. *Eur.J.Biochem.*, 80: 65-71.
- KÜHNAU, J., 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev.Nutr.Diet.*, 24: 117-191.
- LACKNER, R., 1998. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In *Fish Ecotoxicology*. Braunbeck, T., Hinton, D. E. e Streit, B. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 203-224.
- LARSON, R.A., 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27: 969-978.
- LÓPEZ-BAREA, J. e LEE, C.-Y., 1979. Mouse-liver glutathione reductase. Purification, kinetics, and regulation. *Eur.J.Biochem.*, 98: 487-499.
- MAHAN, J.R. e BURKE, J.J., 1987. Purification and characterization of glutathione reductase from corn mesophyll chloroplasts. *Physiol.Plant.*, 71: 352-358.
- MATOS, P.A.C., 2003. Efeito do carbaril em parâmetros bioquímicos do stresse oxidativo e na histologia de fígado de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Tese de Mestrado, UTAD.
- Mc CORNICK, J.R., HARKIN, M.M., JOHNSON, K.J. e WARD, P.A., 1981. Suppression by superoxide dismutase of immune-complex-induced pulmonary alveolitis and dermal inflammation. *Am.J.Pathol.*, 102: 55-61.
- McCORD, J.M., 1985. Superoxide Dismutase. Oberley, L. W. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, 143 p.

- McCord, J.M., 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am.J.Med.*, 108: 652-659.
- McCord, J.M. e Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J.Biol.Chem.*, **244**: 6049-6055.
- Meier, B., Barra, D., Bossa, F., Calabrese, L. e Rotilio, G., 1982. Synthesis of either Fe- or Mn-superoxide dismutase with an apparently identical protein moiety by an anaerobic bacterium dependent on the metal supplied. *J.Biol.Chem.*, 257: 13977-13980.
- Meister, A., 1975. Metabolism of Sulfur Compounds, Metabolic Pathways. Greenberg, D. M. pp. Academic Press, New York, 188 p.
- Meister, A., 1983. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220: 472-476.
- Meister, A. e Anderson, M.E., 1983. Glutathione. *Annu.Rev.Biochem.*, 52: 711-760.
- Middleton, E., 1984. The flavonoids. *Trends Pharmacol.Sci.*, 5: 335-338.
- Mourad, T., Min, K.-L. e Steghens, J.-P., 2000. Measurement of oxidized glutathione by enzymatic recycling coupled to bioluminescent detection. *Anal.Biochem.*, 283: 146-152.
- Nègre-Salvayre, A. e Salvayre, R., 1992. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Radical Biol.Med.*, 12: 101-106.
- Nishikimi, M. e Yagi, K., 1996. Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. In *Subcellular Biochemistry*. Harris, R. J. Plenum Press, New York, pp. 17-39.
- Packer, L. e Landvik, S., 1990. Vitamin E in biological systems. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 264: 93-103.
- Parihar, M.S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A.K. e Prakash, P., 1997. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *J.Thermal Biol.*, 22: 151-156.
- Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S. e Vernet, G., 2000. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. *Aquat.Toxicol.*, 50: 109-124.
- Pedrajas, J.R., Gavilanes, F., López-Barea, J. e Peinado, J., 1998. Incubation of superoxide dismutase with malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal forms new active isoforms and adducts. An evaluation of xenobiotics in fish. *Chemico Biological Interactions*, 116: 1-17.
- Petkau, A., Chelack, W.S., Pleskach, S.D., Meeker, B.E. e Brady, C.M., 1975. Radioprotection of mice by superoxide dismutase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 65: 886-893.
- Pryor, W.A., 1976. Free Radicals in Biology. Pryor, W. A. (Ed.). Academic Press, Inc. London.
- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crafo, J.D. e Freeman, B.A., 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J.Biol.Chem.*, 266: 22028-22034.
- Rennenberg, H., 1982. Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry*, 21: 2771-2781.
- Roberfroid, M. e Buc-Calderon, P., 1995. Free Radicals and Oxidation Phenomena in Biological Systems. Roberfroid, M. e Buc-Calderon, P. (Eds.). Marcel Dekker, Inc. New York.
- Rousseau, E.J., Davison, A.J. e Dunn, B., 1992. Protection by beta-carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Free Radical Biol.Med.*, 13: 407-433.



- SAMUNI, A., KRISHNA, C.M., RIESZ, P., FINKELSTEIN, E. e RUSSO, A., 1988. A novel metal-free low molecular weight superoxide dismutase mimic. *J.Biol.Chem.*, 263: 17921-17924.
- SANETO, R.P., AWASTHI, Y. C. e SRIVASTAVA, S.K., 1982. Glutathione S-transferases of the bovine retina. Evidence that glutathione peroxidase activity is the result of glutathione S-transferase. *Biochem. J.*, **205**: 213-217.
- SAWYER, D.T. e GIBIAN, M.J., 1979. The chemistry of superoxide ion. *Tetrahedron*, **35**: 1471-1481.
- SCANDALIOS, J.G., 1990. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Adv.Genet.*, 28: 1-41.
- SCANDALIOS, J.G., 1993. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.*, 101: 7-12.
- SCHRAUFSTATTER, I.U., HYSLOP, P.A., HINSHAW, D.B., SPRAGG, R.G., SKLAR, L.A. e COCHRANE, C.G., 1986. Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 83: 4908-4912.
- Schulte-Frohlinde, D. e van Sonntag, C., 1985. In *Oxidative Stress*. Sies, H. Academic Press, London.
- SCHWARTZ, D.J., BALIS, J.U. e JENSEN, R., 1982. Parental superoxide dismutase (SOD) prophylaxis for thoracic irradiation. *Am.Rev.Resp.Dis.*, 125: 228.
- Serrano, A. e Llobell, A., 1993. Occurrence of two isoforms of glutathione reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, 190: 199-205.
- SHLAFFER, M., KANE, P.F. e KIRSH, M.M., 1982. Superoxide dismutase plus catalase enhances the efficacy of hypothermic cardioplegia to protect the globally ischemic, reperfused heart. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.*, 83: 830-839.
- SICHEL, G., CORSARO, C., SCALIA, M., DI BILIO, A. e BONOMO, R., 1991. *In vitro* scavenger activity of some flavonoids and melanins against  $O_2^{\cdot-}$ . *Free Radical Biol.Med.*, 11: 1-8.
- SIES, H., 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur.J.Biochem.*, 215: 213-219.
- SOLANKI, V., RANA, R.S. e SLAGA, T.J., 1981. Diminution of mouse epidermal superoxide dismutase and catalase activities by tumor promoters. *Carcinogenesis*, 2: 1141-1146.
- STALLINGS, W.C., PATTRIDGE, K.A., STRONG, R.K. e LUDWIG, M.L., 1984. Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. *J.Biol.Chem.*, 259: 10695-10699.
- STEIN, J.E., COLLIER, T.K., REICHERT, W.L., CASILLAS, E., HOM, T. e VARANASI, U., 1992. Bioindicators of contaminant exposure and sublethal effects: studies with benthic fish in Puget Sound, Washington. *Environ.Toxicol.Chem.*, 11: 701-714.
- STEWART, J.R., BLACKWELL, W.H., CRUTE, S.L., LOUGHLIN, V., HESS, M.L. e GREENFIELD, L.J., 1982. Prevention of myocardial ischemia reperfusion injury with oxygen free-radical scavengers. *Surg.Forum*, 33: 317-320.
- TANAKA, K., SAJI, H. e KONDO, N., 1988. Immunological properties of spinach glutathione reductase and inductive biosynthesis of the enzyme with ozone. *Plant Cell Physiol.*, 29: 637-642.
- THOMAS, P. e WOFFORD, H.W., 1993. Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. *Aquat.Toxicol.*, **27**: 159-178.
- TIMMERMANN, K.P., 1989. Molecular characterization of corn glutathione S-transferase isozymes involved in herbicide detoxication. *Physiol.Plant.*, 77: 465-471.

- TOREL, J., CILLARD, J. e CILLARD, P., 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry*, **25**: 383-385.
- VAN CAMP, W., BOWLER, C., VILLARROEL, R., TSANG, E.W.T., VAN MONTAGU, M. e INZÉ, D., 1990. Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **87**: 9903-9907.
- WARING, W.S., CONVERY, A., MISHRA, V., SHENKIN, A., WEBB, D.J. e MAXWELL, S.R., 2003. Uric acid reduces exercise-induced oxidative stress in healthy adults. *Clin.Sci.(Lond)*, **105**: 425-430.
- WILLSON, R.L., 1985. In *Oxidative Stress*. Sies, H. Academic Press, London, pp. 41-72.
- WINSTON, G.W., 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp.Biochem.Physiol.*, **100C**: 173-176.
- WORTHINGTON, D.J. e ROSEMEYER, M.A., 1974. Human glutathione reductase: purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur.J.Biochem.*, **48**: 167-177.
- YAMANE, T. e LAMOLA, A.A., 1973. Red blood cells lysis induced by a product of singlet oxygen and cholesterol. *Proceedings of the First Ann. Mt Am.Soc. Photobiology*, Sarasota, p. 66.
- ZHANG, J.F., SHEN, H., XU, T.L., WANG, X.R. e GU, Y.F., 2003a. Effects of long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish. *Bull. Environ.Contam.Toxicol.*, **71**: 234-239.
- ZHANG, J.F., WANG, X.R., GUO, H.Y., WU, J.C. e XUE, Y.Q., 2003b. Effects of water-soluble fractions of diesel oil on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*. *Ecotoxicol.Environ.Saf.*, **58**: 110-116.
- ZIEGLER, D. M., 1985. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annu.Rev.Biochem.*, **54**: 305-329.

