



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TROPICAL**

LEONARDO VAZ BURNS

**EFEITO DA DISTÂNCIA DE TRANSPORTE E CONDIÇÕES
CLIMÁTICAS SOBRE OS INDICADORES FISIOLÓGICOS DE BEM-
ESTAR DOS BOVINOS**

ARAGUAÍNA-TO

2019

LEONARDO VAZ BURNS

**EFEITO DA DISTÂNCIA DE TRANSPORTE E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS SOBRE
OS INDICADORES FISIOLÓGICOS DE BEM-ESTAR DOS BOVINOS**

**Tese apresentada para obtenção do título
de Doutor, junto ao Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal Tropical da
Universidade Federal do Tocantins.**

Área de concentração: Produção Animal

Orientadora: Silvia Minharro Barbosa

Co-orientador: Adriano Tony Ramos

**Co-orientador: Fabiano Mendes de
Cordova**

Araguaína

2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

V393e Vaz Burns, Leonardo.
EFEITO DA DISTÂNCIA DE TRANSPORTE E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS SOBRE OS INDICADORES FISIOLÓGICOS DE BEM-ESTAR DOS BOVINOS. / Leonardo Vaz Burns. – Araguaína, TO, 2019.
91 f.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Ciência Animal Tropical, 2019.
Orientadora.: Sílvia Minharro Barbosa
Coorientador: Adriano Tony Ramos
Coorientador: Fabiano Mendes de Cordova
1. Bovinos. 2. Transporte. 3. Qualidade da carne. 4. Método colorimétrico. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizada desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LEONARDO VAZ BURNS

EFEITO DA DISTÂNCIA DE TRANSPORTE E CONDIÇÕES CLIMÁTICAS SOBRE
OS INDICADORES FISIOLÓGICOS DE BEM-ESTAR DOS BOVINOS

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor, junto ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Animal Tropical da Universidade
Federal do Tocantins.

Orientadora: Sílvia Minharro Barbosa

Co-orientador: Adriano Tony Ramos

Co-orientador: Fabiano Mendes de Cordova

Avaliação em 23/04/2019

Banca examinadora:



Prof. Dr. Fabiano Mendes de Cordova, Co-orientador, UFT



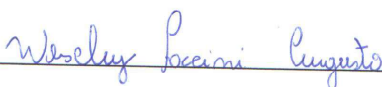
Prof^a. Dr^a. Fabrícia Rocha Chaves Miotto, UFT



Prof^a. Dr^a. Clarissa Amorim Silva de Cordova, UFT



Prof. Dr. Gerson Fausto da Silva, UFT



Dr. Wesley Faccini Augusto, UFT

A Deus, à minha família e amigos

Dedico

Agradecimentos

Agradeço a Deus por sempre proteger e iluminar os meus caminhos em todos os dias da minha existência, principalmente nos momentos de maior dificuldade.

À minha esposa Camila De Angeli Burns pelo amor, companheirismo e compreensão.

Ao meu pai Roberto Madureira Burns (*in memoriam*) e minha mãe Diva Regina Vaz Burns por todo amor, apoio e ensinamentos que me fazem seguir adiante.

À minha madrinha Ana Beatriz, aos meus irmãos Eduardo e Guilherme, cunhadas Débora e Márcia, sobrinhos Otávio, Isadora, Roberto e Maria Eduarda pelo carinho e incentivo.

Aos meus falecidos avós Ataídes Vaz, Olinda Vaz e Laura Burns, saudade eterna.

Ao meu sogro Geraldo De Angeli e sogra Marta Sueli De Angeli por todo carinho e por torcerem pelas minhas conquistas.

À minha orientadora Prof^a. Silvia Minharro e co-orientadores Prof. Adriano T. Ramos e Fabiano M. de Cordova pela amizade, paciência, confiança e por todos os ensinamentos teóricos e práticos.

Aos professores Eduardo Viana, Luciano Fernandes, Clarissa de Cordova, Fabrícia Miotto, Gerson Fausto, Francielli Zimermann, Sandro Moron, Angela Veiga, Valério Portela, Guilherme Serena e Emerson Alexandrino por todo auxílio intelectual e técnico.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal do Tocantins pelos ensinamentos que contribuíram para minha qualificação.

Às técnicas Gilzelle e Liana pela amizade e pelos serviços prestados durante as análises no Laboratório de Morfo-fisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais, sob supervisão do Prof. Sandro Moron.

Ao frigorífico, em especial aos senhores Edivan, Edson, Vera Lúcia, Alexandre, Fábio e a todos os membros do Setor de Controle da Garantia de Qualidade, por permitirem que eu pudesse desenvolver meu projeto de pesquisa.

Aos colegas, alunos e amigos Wesley Faccini, Raquel Martins, Jhone Tallison, Rafael de Oliveira, Bergson Pereira, Gabriel Sobreira, Caio Felipe, Ana Cristina Mesquita, Helen Quézia Aguiar, Douglas Campos, Letícia Alencar, Kamilla Rezende, Priscylla Araújo, Juliana Anacleto, Érica Defensor, Raissa Meneses que me auxiliaram durante as coletas no frigorífico e nas análises laboratoriais. Vocês foram fundamentais para o desenvolvimento da minha pesquisa.

A todos os amigos e parentes que sempre incentivaram e torceram pelo meu sucesso profissional.

MUITO OBRIGADO!!!

RESUMO GERAL

O primeiro capítulo teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes distâncias de transporte ao frigorífico sobre o bem-estar de bovinos machos e fêmeas durante a época de chuva e seca, a partir da análise de indicadores hematobioquímicos e físico-químicos da carcaça. Foram utilizados 297 bovinos anelados e mestiços, sendo 147 fêmeas e 150 machos não-castrados provenientes de fazendas do Tocantins. Os animais foram alocados em grupos de acordo com a condição sexual, época do ano e distância de transporte: <50 km, 100-200 km, 201-300 km e >300 km. Foram coletadas amostras de sangue para análises hematobioquímicas e o pH da carcaça fria foi medido após 24 horas de resfriamento. O transporte por longas distâncias aumenta o hematócrito, ureia, creatinina, lactato, creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e o pH final (pH_u) da carcaça. Os machos tiveram aumento da creatinina, de CK e AST e do pH_u, e as fêmeas apresentaram aumento do hematócrito, ureia, glicose e lactato. Transporte na época de seca eleva a albumina, creatinina, glicose, CK e AST. Já o transporte na época de chuva aumenta a ureia. As proteínas totais, hematócrito, lactato e pH_u foram afetados tanto pela época de seca quanto pela época de chuva. Podemos concluir que o transporte por longas distâncias prejudica o bem-estar, causando desidratação e estresse físico, contribuindo para formação de uma carne DFD. Os machos foram mais sensíveis ao estresse físico e às lesões musculares. Já as fêmeas apresentaram maior reatividade ao estresse e menor capacidade de adaptação aos agentes estressores. O transporte durante a época de seca causa desidratação e estresse psicológico e físico. O segundo capítulo objetivou comparar a técnica colorimétrica e a coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS) para quantificar o glicogênio hepático, na tentativa de estabelecer correlação entre elas e a possibilidade da utilização de ambas as técnicas de mensuração do glicogênio na rotina laboratorial. Para a análise do glicogênio, foram coletadas amostras de 5 cm² de fígado de 297 bovinos na linha de abate, embaladas em saco plástico e refrigerados logo após a coleta. Amostras de 1 cm² do fígado foram fixadas em formol 10% tamponado para análise histoquímica e o restante foi congelado em freezer a -20°C para determinação bioquímica do glicogênio. Para análise histoquímica do glicogênio, foi feita a coloração do tecido pelo ácido periódico de Schiff (PAS) enquanto que para a avaliação bioquímica foi utilizado método colorimétrico segundo metodologia de Dubois *et al.* (1956). Os resultados mostram não haver correlação significativa ($R^2=0,29$) entre o método colorimétrico e a coloração de PAS para quantificação do glicogênio hepático. Conclui-se que a análise bioquímica pelo método colorimétrico, por se tratar de um método quantitativo, deve ser a metodologia de escolha a ser aplicada para quantificação do glicogênio hepático na rotina laboratorial.

Palavras-chave: Bovinos, Glicogênio hepático, Método colorimétrico, Qualidade da carne, Transporte

ABSTRACT

In the first chapter, the aim was to evaluate the effects of transport distance on the welfare of male and female cattle transported to the slaughterhouse during rainy and dry season, from the hematological parameters and physicochemical analysis of the carcass. A total of 297 bovines Nelore and crossbred, being 147 females and 150 non-castrated males. The animals were allocated in groups according to sex and distance traveled to the slaughterhouse: <50 km, 100-200 km, 201-300 km and > 300 km. Blood samples were collected during exsanguination for hemato-biochemical and the pH final (pH_u) was measured in cold carcass after 24 hours of cooling. As results, transport over long distances cause increase in hematocrit, urea, creatinine, lactate and increase serum activity of creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase (AST) and pH_u of the carcass. Males had increased creatinine, CK and AST and higher pH_u of the carcass. Females had increased in hematocrit, urea, glucose and lactate. The animals transported during dry season had increase in albumin, creatinine, glucose, CK and AST. The animals transported in the rainy season had increase in serum urea. The total proteins, hematocrit, lactate and pH_u were affected both by dry and rainy season. We conclude that transport over long distances interferes with well-being, causing dehydration and physical stress, resulting in increased pH_u of the carcass, contributing to form DFD meat. Males were more sensitive to physical stress and muscle injuries. Females showed greater reactivity to effects of stress and less capacity of adapt to stress. Animals transported during the dry season presented dehydration and increased emotional and physical stress. In the second chapter, the aim was to establish if there is a correlation between the colorimetric technique and the periodic-acid Schiff (PAS) staining method for quantification of glycogen, allowing the use of both techniques in the measurement of liver glycogen. Samples of 5 cm² of liver were collected of 297 bovines after evisceration in slaughter line, packed in plastic bag, identified and refrigerated immediately after collection. Then, 1 cm² samples of liver were fixed in 10% buffered formalin for histochemical analysis and the remainder frozen in a freezer at -20 °C for biochemical analysis of glycogen. For the histochemical analysis, the tissue was stained by periodic-acid Schiff (PAS) while to biochemical evaluation was used colorimetric method according to Dubois *et al.* (1956). A simple correlation analysis was performed to compare the glycogen content results obtained by the colorimetric and the PAS staining method. The significance level considered was 95%. The results show no significant correlation ($R^2 = 0.29$) between the colorimetric method and the PAS staining for liver glycogen quantification. Thus, it can be concluded that the biochemical analysis by the colorimetric method, because it is a quantitative method, should be the methodology of choice to be applied for quantification of liver glycogen in the laboratory routine.

Keywords: Bovine, Colorimetric method, Liver glycogen, Meat quality, Transport

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Informações sobre temperatura (mínima e máxima), umidade, tempo de transporte, quilometragem e percentual percorrido em estrada não pavimentada, e quantidade de bovinos utilizados de acordo com a condição sexual, época do ano e distância percorrida no transporte ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.	39
Tabela 2.2. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre a albumina em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.	41
Tabela 2.3. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre as proteínas totais (PT) em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.....	43
Tabela 2.4. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre o hematócrito em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.	45
Tabela 2.5. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre a creatinina em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.	47
Tabela 2.6. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre a ureia em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.	49
Tabela 2.7. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre a creatina quinase (CK) em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.....	51
Tabela 2.8. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre a aspartato aminotransferase (AST) em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018...	54
Tabela 2.9. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre o lactato enzimático em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.....	56
Tabela 2.10. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre a glicose em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.	58
Tabela 2.11. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre o pH final (pH _u) da carcaça em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.....	61

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1. Avaliação do glicogênio hepático de bovinos. (A) Bovino, fígado, coloração pelo ácido periódico de Schiff com marcação dos grânulos de glicogênio no citoplasma dos hepatócitos em cor púrpura-magenta, PAS, 40X. (B) Bovino, fígado, do fígado corado pelo ácido periódico de Schiff (PAS) após a análise pelo software ImageJ, criando uma máscara em preto e branco que elimina outros componentes da imagem, restando apenas o glicogênio. O programa computa a quantidade de glicogênio expressa em pixels por imagem, PAS, 40X.....84

SUMÁRIO

CAPITULO 1	11
1.1 INTRODUÇÃO	11
1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.2.1 Situação atual da bovinocultura de corte no Brasil e Tocantins	12
1.2.2 Bem-estar animal e o mecanismo de estresse.....	12
1.2.3 Transporte rodoviário de bovinos ao frigorífico	15
1.2.4 Indicadores sanguíneos de estresse.....	18
1.2.4.1 Hematócrito, albumina e proteínas totais (PT)	19
1.2.4.2 Creatinina e ureia	20
1.2.4.3 Creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e lactato....	20
1.2.4.4 Glicogênio hepático e glicose.....	21
1.2.5 Glicogênio muscular e pH final (pH _u).....	23
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
Capítulo 2. Parâmetros hematobioquímicos e qualidade físico-química da carne de bovinos transportados ao frigorífico	34
RESUMO.....	34
ABSTRACT	35
2.1 INTRODUÇÃO	36
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.2.1 Animais e tratamento	38
2.2.2 Colheita das amostras de sangue	39
2.2.3 Análises hematobioquímicas.....	40
2.2.4 Medida do pH muscular.....	40
2.2.5 Análises estatísticas.....	40
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
2.4 CONCLUSÕES	64
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
Capítulo 3. Métodos de mensuração do glicogênio hepático em bovinos: análise de correlação.....	75
ABSTRACT	76
3.1 INTRODUÇÃO	77
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	78

3.2.1 Animais e tratamento	78
3.2.2 Coleta e acondicionamento das amostras de fígado.....	79
3.2.3 Coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS).....	79
3.2.3.1 Processamento das amostras	79
3.2.3.2 Protocolo de coloração.....	80
3.2.3.3 Quantificação do glicogênio	80
3.2.4 Análise do glicogênio hepático pelo método colorimétrico	81
3.2.4.1 Digestão do tecido hepático	81
3.2.4.2 Extração pelo etanol.....	81
3.2.4.3 Método colorimétrico utilizando reagente fenol-ácido sulfúrico	81
3.2.4.4 Quantificação do glicogênio	82
3.2.4.5 Análise estatística	82
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
3.4 CONCLUSÕES	87
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

CAPITULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

Um dos principais fatores que pode afetar a qualidade da carne e o aproveitamento de carcaças é o manejo pré-abate, este envolve a formação dos grupos de animais e confinamento nas fazendas de origem, embarque e confinamento nos caminhões de transporte, deslocamento, desembarque no frigorífico e confinamento nos currais de espera (MIRANDA-DE LA LAMA, VILLARROEL e MARIA, 2014). Apesar de todas essas situações serem importantes agentes estressores, o transporte pode ser considerado causa mais importante de estresse, prejudicando o bem-estar animal (BULITA, ARADOM e GEBRESENBET, 2015). Assim, no momento em que uma ou mais dessas etapas não forem realizadas adequadamente poderá haver comprometimento do bem-estar dos animais (BROOM, 1986), resultando em perdas quantitativas e qualitativas da carne.

Estudos realizados em frigoríficos da região norte do Mato Grosso revelam prejuízos de R\$ 200.000,00/ano devido às lesões nas carcaças de bovinos transportados ao frigorífico por mais de 2 horas (NETO *et al.*, 2015). Em Araguaína, região norte do Tocantins, o manejo pré-abate inadequado nas fazendas e frigoríficos, resultou em perdas econômicas de aproximadamente R\$ 116.550,00 (FERREIRA *et al.*, 2010).

Além das lesões, outra questão importante que causa prejuízos para as indústrias e para o consumidor é a carne DFD (*Dark, Firm, Dry*) de qualidade inferior, que está associada com transportes por longos períodos e altas densidades nos currais de descanso (ROMERO *et al.*, 2017). Essas alterações qualitativas podem levar a perdas econômicas importantes nos frigoríficos, visto que na Espanha existem empresas que penalizam o preço da carcaça com descontos que variam entre 30 e 60% quando o pH está acima de 5,8 (MACH *et al.*, 2008). Já nos Estados Unidos, estima-se que a carne DFD custe à indústria em torno de US\$ 5 para cada bovino abatido (LUDTKE *et al.*, 2012).

Para importação dos cortes cárneos, existem variações entre alguns países em relação às exigências dos valores de pH. O Chile exige pH inferior a 5,8, enquanto a União Europeia aceita pH entre 5,5 a 5,99. Assim, a produção brasileira de carcaças ou cortes cárneos com pH acima de 6,0 não são destinados para

exportação, sendo aproveitados e comercializados no mercado interno (LUDTKE *et al.*, 2012).

Como a pecuária é uma das principais atividades econômicas no Brasil, com abate de 39,2 milhões de cabeças ao ano, torna-se necessária avaliação do bem-estar de bovinos por análise dos efeitos do estresse pré-abate e sua influência sobre a saúde dos animais e qualidade físico-química da carne que irá ser comercializada.

São avaliações importantes, visto que os consumidores estão cada vez mais preocupados com a maneira de produção da carne, que inclui condições ideais de abate e bem-estar aos animais.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 Situação atual da bovinocultura de corte no Brasil e Tocantins

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial, possuindo rebanho com cerca de 221,81 milhões de cabeças. Em 2017, o número de animais abatidos foi de 39,2 milhões, produzindo volume de carne que chegou a 9,71 milhões de toneladas equivalente carcaça. Do total de carne produzida, 20% foram exportadas e 80% abasteceu o mercado interno, garantindo consumo de 37,5 kg de carne bovina por habitante. A pecuária bovina de corte movimentou R\$ 523,25 bilhões em 2017, representando um crescimento de 3,6% em relação aos R\$ 504 bilhões somados em 2016 (ABIEC, 2018).

O Tocantins possui rebanho efetivo bovino de 8.739.554 de cabeças, correspondendo a 3,94% do rebanho nacional, tendo um crescimento de 12,61% nos últimos 11 anos. Do quantitativo total de bovinos no Tocantins, 86,56% tem como aptidão a produção de carne (ABIEC, 2018).

Em relação à capacidade de abate, o Tocantins ocupa o 11º lugar no ranking brasileiro, com abate diário de 6.249 bovinos, deste 92,28% correspondem ao abate em estabelecimentos com Serviço de Inspeção Federal (SIF); 6,24% com Serviço de Inspeção Estadual (SIE) e 1,48% com Serviço de Inspeção Municipal (SIM) (ABIEC, 2016).

1.2.2 Bem-estar animal e o mecanismo de estresse

O principal conceito de bem-estar está relacionado às cinco liberdades desenvolvidas pela “*Farm Animal Welfare*” (Bem-estar dos Animais de Fazenda) em

1965: animais livres de fome e sede; livres de desconforto; livres de dor, lesões e doenças; livres para expressar comportamento normal; livres de medo e estresse (BRAMBELL, 1965). No entanto, essas liberdades podem estar comprometidas durante o transporte e demais situações que envolvem o manejo pré-abate.

A ciência do bem-estar animal é relativamente nova e está em constante evolução, podendo causar impacto econômico positivo nas indústrias de produção de alimentos. Entretanto, situações que tornam o bem-estar pobre, como deficiências estruturais e erros no manejo dos bovinos de corte leva a perdas econômicas pelo aumento da incidência de mortes, redução no peso de carcaça, contusões e presença de cortes escuros que afetam negativamente a qualidade da carne (GALLO e HUERTAS, 2016).

Nesse cenário, o interesse pelo bem-estar dos animais de produção baseia-se mais em razões econômicas, relacionadas à perda de qualidade e quantidade de carne por maus-tratos ou problemas de acesso a mercados de preços mais altos, do que apenas por razões éticas. No entanto, a estratégia utilizada pelos pesquisadores tem sido produzir evidências científicas que identifiquem os pontos críticos que interferem no bem-estar durante o manejo pré-abate e que também afetam a qualidade da carne (GALLO e HUERTAS, 2016).

Para avaliação do bem-estar, não se utiliza um único parâmetro de forma isolada e sim um conjunto de indicadores fisiológicos, associados à qualidade do produto final (BROOM, 2008). Entre eles, podemos destacar as análises de parâmetros sanguíneos e metabólicos (MARÍA, 2009), como cortisol (BULITTA, ARADOM e GEBRESENBET, 2015), proteínas totais, albumina e hematócrito (PT) (KNOWLES; WARRISS, 2000), ureia e creatinina (DAS *et al.*, 2012), atividade sérica da enzima creatina quinase e aspartato aminotransferase (VALENTINE e McGAVIN, 2009; ALLISON, 2012), lactato (KNOWLES, WARRISS e VOGEL, 2014), glicose (ERIKSEN *et al.*, 2013) e também a avaliação da qualidade da carne por medição do pH final (pH_u) na carcaça fria (JIMENEZ FILHO, 2012).

O estresse é considerado um mecanismo de defesa frente às adversidades diárias que os animais são submetidos (SGAI *et al.*, 2010). Muitos vivem em habitat que normalmente não estão em equilíbrio e necessitam se adaptar através de modificações fisiológicas, morfológicas e comportamentais (WINGFIELD e RAMENOFISKY, 1999).

Os elementos imprevisíveis da vida causam um "estágio de emergência" (WINGFIELD e RAMENOFKY, 1999), modificando o status endócrino e metabólico de um organismo (MÖSTL e PALME, 2002). Esse estágio inicia com a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e sistema simpático, aumentando os níveis de glicocorticoides e catecolaminas, respectivamente (ERIKSEN *et al.*, 2013).

Durante as situações de estresse (físico ou psicológico), há um estímulo ao hipotálamo para liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) que age sobre a hipófise fazendo com que ela produza adrenocorticotrofina (ACTH). Esta, por sua vez, estimula a região cortical da glândula adrenal a produzir glicocorticoides (cortisol) (ROMERO *et al.*, 2017).

A secreção do cortisol durante o estresse, mediada pelo sistema nervoso central, é imediata e se eleva significativamente em poucos minutos. Entretanto, se torna proporcional à gravidade dos eventos estressantes, ou seja, quanto maior o nível do estresse, maior será a liberação de cortisol na circulação (GOFF, 2017).

Os principais efeitos do cortisol sobre o metabolismo estão relacionados à gliconeogênese hepática a partir da proteólise e lipólise e, conseqüentemente, aumento da glicemia. Nas situações de estresse físico, em que há maior liberação de cortisol na circulação, essas reações se tornam mais intensas também no tecido muscular, onde ocorre inibição da síntese e aumento na degradação das proteínas em aminoácidos para serem convertidos em glicose no fígado (GOFF, 2017).

Em situações de luta ou fuga, onde existe estresse extremo, ocorre ativação da região medular da adrenal e produção das catecolaminas, conhecidas por adrenalina, principal catecolamina produzida, e noradrenalina, considerada um neurotransmissor do sistema nervoso simpático (GOFF, 2017).

Os efeitos da adrenalina e noradrenalina envolvem o metabolismo intermediário e respostas dos animais diante do estresse agudo, mediados pelos receptores adrenérgicos presentes nos tecidos-alvo. Os principais receptores adrenérgicos são classificados em α e β , com subtipos α_1 , α_2 , β_1 e β_2 . Os receptores α_1 e α_2 estão situados nas terminações nervosas pós e pré-sinápticas, respectivamente. Já os receptores β_1 estão em maior quantidade no coração, responsáveis pelo aumento da contração e frequência cardíaca, e os β_2 são abundantes no fígado, músculos e artérias coronárias, com efeito sobre o metabolismo intermediário e contração da musculatura lisa (GOFF, 2017).

Em relação ao estresse físico, a adrenalina estimula a glicogenólise hepática, causando hiperglicemia, e glicogenólise muscular para fornecimento de energia ao músculo (luta ou fuga), tendo como produto final o lactato que pode ser utilizado pelo fígado na síntese de glicose pela gliconeogênese (GOFF, 2017).

Assim, todas essas informações revelam que o estresse físico e psicológico desencadeia uma série de atividades hormonais exacerbadas que promovem a quebra da homeostase prejudicando o bem-estar dos animais.

1.2.3 Transporte rodoviário de bovinos ao frigorífico

O transporte rodoviário por caminhões é a maneira mais comum de condução de bovinos aos abatedouros (TARRANT, KENNY e HARRINGTON, 1988), no entanto, pode ser considerado causa importante de estresse, prejudicando o bem-estar animal (BULITA, ARADOM e GEBRESENBET, 2015).

O embarque, desembarque, transporte, confinamento, vibrações, fatores emocionais como reagrupamento social, ambientes desconhecidos, privação de água e alimentos, alteração nas condições climáticas, são importantes potenciais estressores (MIRANDA-DE LA LAMA, VILLARROEL e MARÍA, 2014). Esses fatores alteram a homeostase na tentativa do organismo em se adaptar à nova situação e buscar novamente o equilíbrio, porém, sob essas condições, os animais podem manifestar medo, desidratação, fome, aumento da atividade física, fadiga e lesões musculoesqueléticas (FERGUSON e WARNER, 2008).

Se a resposta ao estresse for bastante significativa, tanto a produção quanto a qualidade da carne podem ser comprometidas (GRANDIN e SHIVLEY, 2015), principalmente pela redução do rendimento de carcaça (ADZITEY, 2011). Assim, quanto mais prejudicado o bem-estar, maior poderá ser as perdas econômicas (INGENBLEEK *et al.*, 2013).

Transportes prolongados ou percorridos em longas distâncias (CHULAYO, BRADLEY e MUCHENJE, 2016), modelo ou tipo de caminhão, densidade do carregamento e qualidade das rodovias (HARTUNG, 2003) também são capazes de influenciar o bem-estar animal.

Em relação ao transporte, bovinos submetidos a viagens com duração variando entre 6 e 24 horas, percorrendo 280 e 1192 Km, respectivamente, sofrem perdas significativas de peso vivo possivelmente por esvaziamento intestinal ao

longo da viagem, desidratação, micção frequente e jejum (EARLEY, MURRAY e PRENDIVILLE, 2010).

Estudos realizados por Bulita, Aradom e Gebresenbet (2015) relatam que o transporte por 4 a 8 horas acarreta maior comprometimento do bem-estar animal em relação a trajetos percorridos por 12 horas, pois as alterações comportamentais e elevação dos hormônios do estresse (cortisol) são mais significativas em viagens de curta duração, se tornando estáveis com o aumento do tempo de viagem devido à capacidade de adaptação.

O transporte pode induzir a manifestação de alterações subclínicas e clínicas, inclusive a morte de bovinos (MALENA *et al.*, 2007), visto que o estresse afeta diretamente a saúde animal (VEČEREK *et al.*, 2006a). Durante o descarregamento no frigorífico, alguns animais podem estar doentes, agonizantes, em decúbito, com fraturas, contusões, hipo ou hipertermia (BRASIL, 2017). Nesses casos, o Sistema de Inspeção Federal (SIF) determina que esses sejam encaminhados para o abate de emergência, logo após a chegada dos animais ao frigorífico, realizado sempre por auditor fiscal federal com formação em Medicina Veterinária (BRASIL, 2017).

As razões para o encaminhamento a esse tipo de abate podem estar relacionadas às situações estressantes em que os animais convivem durante o transporte e ocorrem com maior frequência em vacas quando comparada a outras categorias (VEČEREK *et al.*, 2003).

Estudos revelam que animais destinados ao abate de emergência sofrem estresse severo, por serem transportados em longas distâncias e com densidades elevadas, acarretando contusões graves que afetam o sistema músculo-esquelético, levando a degeneração de miofibrilas, aumento das atividades séricas de creatina quinase, alanina aminotransferase e elevação do pH muscular, com média de 6,39 (BURNS, 2014).

A quantidade de animais que morrem durante o transporte pode ser um indicador de bem-estar (VEČEREK *et al.*, 2006a). Alguns trabalhos relatam a taxa de mortalidade durante o transporte em diferentes localidades e períodos: África do Sul em 1980: 0,01%; em 1990: 0% (HENNING, 1993); Estados Unidos da América: 1% (IRWIN e GENTLEMAN, 1978); Austrália [Vitória] de 1998 a 2000: 0,64% (CAVE, CALLINAN e WOONTON, 2005); Hungria: 0,01% e Austrália [Queensland]: 0,25% (CONNELL, 1984). No Brasil, Bertoloni *et al.* (2012) ao avaliarem o transporte de bovinos em diferentes distâncias e modelos de carrocerias não registraram nenhuma

morte durante o experimento. Não obstante, Burns *et al.* (2014) registraram 6 mortes de vacas durante o transporte em longas distâncias, num período de 6 meses de pesquisa.

Como citado anteriormente, a morte de bovinos decorrente do transporte é rara, e, quando ocorre, é devido ao pisoteio, asfixia (FERGUSON e WARNER, 2008) e insuficiência cardíaca (CONNELL, 1984). Com o intuito de determinar a causa da morte de bovinos durante o transporte ao frigorífico, Burns *et al.* (2014) concluíram que as hemorragias causadas por pisoteios, associadas à desidratação por perda de fluídos, promovem quadro de choque hipovolêmico que se torna irreversível, levando os animais à morte.

No que se refere ao modelo ou tipo de caminhão, veículos de dois eixos com carroceria estendida podem causar maiores vibrações para os animais devido ao efeito de deslocamento centrífugo ser mais acentuado que nos caminhões menores e isso ocorre pela maior distância entre a carroceria e a área da frente do veículo (GHEZZI *et al.* 2008).

Ainda, veículos longos possuem mais divisões e as portas geralmente são menores em relação à largura do veículo, dificultando a movimentação dos animais durante o embarque e desembarque, podendo causar desconforto e contusões (BERTOLONI *et al.*, 2012).

A densidade do carregamento consiste no espaço disponível aos animais nos compartimentos dos caminhões de transporte, sendo expresso em Kg/m^2 ou animal/m^2 (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN *et al.*, 2012). No Brasil, a densidade varia de 390 a 410 kg/m^2 (ROÇA, 2002), sendo consideradas alta 600 kg/m^2 , média 400 kg/m^2 e baixa densidade 200 kg/m^2 (TARRANT, KENNY e HARRINGTON, 1988). Estudos realizados na região de Araguaína-TO revelam que a densidade de carga é em média 465,63 Kg/m^2 (FERREIRA *et al.*, 2010). A densidade do carregamento influencia diretamente o conforto e o bem-estar, pois altas ou baixas densidades podem afetar a integridade física (MIRANDA-DE LA LAMA, VILLARROEL e MARÍA, 2014).

Animais transportados em altas densidades são mais propensos ao estresse e contusões (JIMENEZ FILHO, 2012). Entretanto, baixas densidades, apesar do conforto proporcionado, propiciam lesões devido ao choque entre animais e paredes do veículo (HERNANDÉZ *et al.*, 2010).

De acordo com Valdes (2002), aumento da densidade de 400 kg/m² para 500 kg/m² eleva o percentual de contusões nas carcaças de 42% para 56%. Entretanto, Andrade *et al.* (2008) não observaram efeito de diferentes densidades sobre a extensão e quantidade de contusões.

Durante o transporte, os animais podem ficar expostos às chuvas e oscilações de umidade e temperatura, visto que os caminhões não oferecem proteção contra o clima (FRIMPONG *et al.*, 2014). Assim, o clima seco e com temperaturas elevadas durante o percurso pode causar estresse e contribuir para desidratação dos animais (MIRANDA-DE LA LAMA *et al.*, 2010).

Bovinos transportados por longas distâncias durante o verão (temperatura entre 17,3 a 33,2°C e 56 a 64% de umidade), e inverno (temperatura entre -7,1 e 6,9°C e 72 a 89% de umidade) mantiveram a temperatura corporal dentro dos padrões fisiológicos, sofrendo apenas pequenas oscilações, que apontam para ausência de estresse por calor ou por tempo de transporte (BERNARDINI *et al.*, 2012).

Além das interferências de temperatura e umidade externa ao caminhão que podem causar estresse e prejudicar o bem-estar, logo após o embarque, a temperatura e umidade no interior do caminhão podem se elevar de forma acelerada, principalmente em carregamentos com altas densidades (MIRANDA-DE LA LAMA *et al.*, 2010), estimulando a perda de calor por evaporação (suor e ofego) e promovendo um microclima que favorece a desidratação (CAULFIELD *et al.*, 2014).

1.2.4 Indicadores sanguíneos de estresse

Com o objetivo de avaliar os efeitos do estresse na quebra da homeostase, diferentes indicadores podem ser analisados, incluindo os parâmetros sanguíneos, que tem sua dinâmica influenciada pelo transporte (CROOKSHANK *et al.*, 1979), podendo ser utilizados como parâmetros de bem-estar animal (AVERÓS *et al.*, 2008). Entre eles, podemos destacar as proteínas totais, albumina, hematócrito, ureia e creatinina, algumas enzimas como creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST), glicocorticoides, catecolaminas, glicose e lactato, e ainda leucócitos (neutrófilos e linfócitos).

1.2.4.1 Hematócrito, albumina e proteínas totais (PT)

Alguns indicadores são usados para avaliar o grau de hidratação, como proteínas totais, albumina e hematócrito (KNOWLES e WARRISS, 2000). O aumento do hematócrito está relacionado ao mecanismo de estresse, onde há liberação de catecolaminas que estimulam o baço a liberar hemácias na circulação, melhorando a perfusão tecidual, tanto no sistema nervoso central quanto na musculatura esquelética (PIGHIN *et al.*, 2013). Também ocorre por desidratação devido a não ingestão de água e alimentos ou por perdas evaporativas (FERREIRA *et al.*, 2009), situações bastante comuns durante o transporte ao frigorífico.

As PT e albumina são importantes marcadores da homeostase proteica que estão presentes em concentrações elevadas em casos de desidratação (EARLEY *et al.*, 2012). Vale ressaltar que albumina é considerada importante agente antioxidante, atuando na proteção celular pela eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, por isso, a hiperalbuminemia relatada em animais submetidos ao transporte também pode sugerir resposta do organismo ao estresse (KRIZANOVIC *et al.*, 2008).

Ainda, estudos com bovinos mostram aumento da albumina 9 horas após o início da viagem, retornando aos valores fisiológicos num período de 24 horas pós-transporte, podendo ser uma compensação do organismo ao quadro de acidose metabólica ocasionada pela perda de líquidos e restrição alimentar (EARLEY, DRENNAN e O'RIORDAN, 2013).

Em relação às PT, alguns autores registraram que estresse associado ao transporte pode reduzir sua concentração plasmática devido a alterações metabólicas referentes à duração da viagem e se os animais foram ou não submetidos ao jejum antes do embarque (BUCKHAM SPORER *et al.*, 2008).

Esses resultados divergem de Earley, Murray e Prendiville (2010) que observaram maiores concentrações de proteínas totais à medida que o tempo de viagem aumentava, retornando aos valores basais aproximadamente 12 horas pós-transporte. Outros estudos mostram aumento significativo das proteínas totais após 63 horas de percurso, causado pelo estresse do transporte e restrição hídrica, sendo verificado leve declínio na concentração plasmática de proteínas somente 21 dias após o desembarque (WERNER *et al.*, 2013).

1.2.4.2 Creatinina e ureia

Creatinina e ureia são indicadores frequentemente utilizados na avaliação dos efeitos do estresse físico ou função da atividade renal em bovinos (DAS *et al.*, 2012). A creatinina é um produto nitrogenado não proteico que tem origem do metabolismo muscular da creatina ou fosfocreatina (GREGORY *et al.*, 2004).

O aumento dos níveis de creatinina no sangue de animais estressados pode ocorrer pela queda na perfusão renal resultante da redução do líquido extracelular, diminuindo sua depuração pelos rins (SRIKANDAKUMAR e JOHNSON, 2004) ou pelo aumento da degradação não enzimática da creatina muscular devido ao estresse físico (PIGHIN *et al.*, 2013).

A ureia plasmática se eleva em razão de qualquer processo que aumente o catabolismo proteico, dos quais pode-se destacar a hipercortisolemia decorrente do estresse ou como resultado da restrição alimentar durante o transporte (KNOWLES, WARRISS e VOGEL, 2014).

Pesquisa sobre a resposta fisiológica pré-abate de bovinos, transportados por aproximadamente 4 horas, não verificou desidratação ou alterações no metabolismo proteico, indicados pelos valores normais de creatinina e ureia plasmática (ROMERO, URIBE-VELÁSQUEZ e SÁNCHEZ, 2014).

No entanto, outros autores relatam bovinos com concentrações elevadas de ureia e creatinina durante longas viagens e em períodos quentes, indicando disfunção renal e certo grau de subnutrição (PHILLIPS e SANTURTUN, 2013).

1.2.4.3 Creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e lactato

Nas situações em que existe algum dano na membrana plasmática da miofibrila ou necrose de um segmento das fibras musculares, constituintes das células musculares podem extravasar e serem captados pela corrente sanguínea e a atividade sérica da enzima CK e AST são frequentemente usadas como indicador de lesão da miofibrila (VALENTINE e McGAVIN, 2009).

Uma maior atividade sérica da AST pode estar relacionada a lesões musculares mais graves, tendo em vista a presença desta enzima não só em citoplasma, como observado na CK, mas também nas mitocôndrias (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

Atividades aumentadas dessas enzimas no sangue são decorrentes, além de danos teciduais, da baixa reperusão no tecido muscular, redução na dissipação do calor, hipóxia e fadiga (TADICH *et al.*, 2005; LOPEZ *et al.*, 2006). O estresse de bovinos devido ao transporte por longos períodos, associado às contusões musculares severas, verificadas durante avaliação da carcaça, e degenerações das miofibras, observadas em análise histopatológica, foram fatores de extrema importância para o aumento de CK e AST (BURNS, 2014).

Estudos realizados por Bernardini *et al.* (2012) também descrevem aumento nas atividades de CK e AST em bovinos transportados por longas distâncias. Porém, a CK nem sempre se eleva devido à duração da viagem, sendo bastante sensíveis a choques e contusões que ocorrem durante o transporte (FISHER *et al.*, 2009).

O lactato é utilizado como indicador de atividade física e tem sua produção elevada tanto no músculo quanto no plasma de animais submetidos a exercícios intensos e extenuantes, como resultado de um aumento no metabolismo anaeróbico da glicose (KNOWLES, WARRISS e VOGEL, 2014). Ainda, as concentrações elevadas de lactato também podem estar relacionadas ao estresse comportamental de animais ao desembarcarem no matadouro (GRUBER *et al.*, 2010).

Em relação ao transporte, bovinos conduzidos durante o verão ou inverno apresentaram concentrações similares de lactato, indicando que o estresse físico não foi afetado pelo clima (ISHIWATA *et al.*, 2008). Porém, outros autores descrevem que os níveis de lactato de animais transportados durante o verão demoraram até quatro dias após o desembarque para retornarem aos valores iniciais, demonstrando que a adaptação desses animais se torna lenta em épocas mais quentes (BERNARDINI *et al.*, 2012).

Concentração de lactato está correlacionada ao tempo de transporte de vacas durante o verão e inverno, com pico de produção após 8 horas de transporte, e em touros ao longo do verão, aumentando significativamente após 12 horas de transporte (BULITTA, ARADOM e GEBRESENBET, 2015).

1.2.4.4 Glicogênio hepático e glicose

No fígado encontra-se a maior reserva de carboidrato que pode ser facilmente mobilizada durante o jejum ou exercício físico (MINKA e AYO, 2009). Dessa forma, a resposta fisiológica dos animais será a hiperglicemia, provocada pelo estresse do

transporte. Este promove a liberação de catecolaminas e glicocorticóides que estimulam a glicogenólise hepática (KNOWLES, WARRISS e VOGEL, 2014).

Esse aumento da glicemia também está relacionado à restrição alimentar ao longo da viagem, visto que no jejum prolongado há inibição da insulina e ativação do glucagon. Conseqüentemente, ocorre ativação da gliconeogênese e glicogenólise hepáticas e inibição da síntese de glicogênio e da glicólise no fígado (NELSON e COX, 2014).

Bovinos transportados por cerca de 120 km, apesar de apresentarem aumento do cortisol, a glicose se manteve estável, ou seja, a hipercortisolemia não foi suficiente para alterar a glicemia (NJISANE e MUCHENJE, 2017).

Outros trabalhos revelam que nos estágios iniciais do transporte a glicose ainda permanece alta enquanto o cortisol está baixo, ou seja, indicando menor efeito do estresse. Contudo, após viagem de 800 km até o abatedouro, houve redução da glicose e aumento máximo do cortisol devido ao estresse ambiental e esgotamento físico (CHULAYO, BRADLEY e MUCHENJE, 2016).

Conforme Earley, Drennan e O'Riordan (2013), maiores concentrações plasmáticas de glicose também podem ser observadas na tentativa dos animais se adaptarem à acidose metabólica provocada por restrição alimentar e perda de líquidos durante a viagem.

Diante dessas informações, pode-se inferir que a hiperglicemia a curto ou longo prazo devido ao estresse do transporte indica uma depleção metabólica associada à mobilização das reservas de energia (MIRANDA-DE LA LAMA *et al.*, 2011).

Para um melhor entendimento dos efeitos do estresse ocasionado pelo transporte e restrição alimentar sobre o metabolismo dos carboidratos, torna-se importante quantificar o glicogênio em amostras de tecido hepático (PELLETIER *et al.*, 2013).

Diversos métodos têm sido descritos para mensurar a quantidade de glicogênio presente nos tecidos. Entre eles podemos destacar o método químico através do reagente fenol-ácido sulfúrico que quantifica os açúcares dos polissacarídeos, glicoproteínas, proteoglicanos e glicolipídeos (DUBOIS *et al.*, 1956).

Existe também a técnica semiquantitativa de análise do glicogênio e que foi descrita previamente por McManus (1946). Consiste no método de coloração do tecido hepático pelo ácido periódico de Schiff (PAS) que marca polissacarídeos e

mucosubstâncias, como glicoproteínas, glicolípídeos e mucinas nos tecidos (McMANUS, 1946; NGOKERE *et al.*, 2016).

1.2.5 Glicogênio muscular e pH final (pH_u)

A concentração muscular de glicogênio no abate é determinada pela diferença entre a quantidade de glicogênio sintetizada na fazenda de origem e o que foi mobilizado como fonte de energia no período pré-abate em resposta ao estresse ou contração muscular (McGILCHRIST *et al.*, 2012).

Em bovinos no período *post-mortem*, o nível de ATP é mantido inicialmente pela fosfocreatina (fosfocreatina + ADP ↔ creatina + ATP) e, somente após seu esgotamento na musculatura é que o glicogênio muscular irá se tornar a sua principal fonte de energia (ROÇA, 2014), produzindo ATP e ácido láctico por ação glicolítica, tornando o pH muscular mais ácido (RAMOS e GOMIDE, 2007).

A mensuração do pH final (pH_u) é utilizada para avaliar a qualidade da carne em nível comercial (VILLARROEL *et al.*, 2001), sendo considerado pH_u normal (5,4–5,79), pH_u intermediário (5,8–6,19) e pH_u elevado (> 6,2) (WULF *et al.*, 2002).

O limite de pH_u para a classificação de carne DFD (“Dark, Firm, Dry”) é acima de pH 6,0, no entanto alguns autores consideram DFD a carne com pH a partir de 5,8 (ENGLAND *et al.*, 2016).

A carne DFD possui maior grau de firmeza por menor ativação das enzimas calpaína e calpastatina (JIMENEZ FILHO, 2012), cortes mais escuros por redução da oximioglobina (MAGANHINI *et al.*, 2007) e maior retenção de água nas proteínas musculares devido ao pH estar distante de seu ponto isoelétrico (GUÀRDIA *et al.*, 2005). Além disso, o pH elevado faz com que a carne se torne um meio propício para o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes (FRANCO *et al.*, 2015).

Maior prevalência de carne DFD também está associada com transportes por longos períodos e altas densidades nos currais de descanso (ROMERO *et al.*, 2017). Ainda se observou predomínio de carne DFD quando o atordoamento não foi efetivo, sendo um resultado inesperado (ROMERO *et al.*, 2017), já que o estresse no momento do abate frequentemente acelera o declínio do pH *post-mortem* (BOURGUET *et al.*, 2015). Mesmo não havendo relatos prévios sobre a interação entre a eficiência do atordoamento e a prevalência da carne DFD, isso pode ter ocorrido pelo estresse e reação física durante o atordoamento, ocasionando depleção do glicogênio (ROMERO *et al.*, 2017).

O aumento das lesões físicas, manejo inapropriado e jejum prolongado podem causar a depleção das reservas de glicogênio muscular antes do abate (STRAPPINI *et al.*, 2010), fazendo com que a glicólise *post-mortem* produza menores concentrações de ácido láctico, mantendo o pH_u da carne acima de 5,8 (COOMBES *et al.*, 2014). De acordo com Romero *et al.* (2013), em 37% dos animais com pH maior que 5,8 houve correlação positiva com a presença de contusões e hematomas. Resultados semelhantes foram obtidos por Strappini *et al.* (2010) relatando que hematomas estão significativamente associados ao aumento do pH nas carcaças de vacas, bois e novilhas.

Outro fator importante que pode alterar a concentração de glicogênio muscular é a estimulação elétrica da carcaça. Esta induz a contração e aceleração da glicólise muscular e do declínio do pH (SIMMONS *et al.*, 2008). Esses dados corroboram com Strydom e Frylinck (2014), os quais referem que a estimulação elétrica por 15, 45 e 90 segundos acelera a redução do pH da carcaça, promovendo maior amaciamento da carne, minimizando os efeitos do estresse pré-abate.

Em relação à categoria animal, não foi observada diferença significativa no pH_u de touros (5,73), vacas (5,88) e novilhas (5,79) transportados por distâncias que variaram entre 200 e 800 km (CHULAYO, BRADLEY e MUCHENJE, 2016). Não obstante, outros autores observaram que pH_u foi afetado pelo gênero, com incidência de $pH_u \geq 5,8$ maior em machos que em fêmeas (MACH *et al.*, 2008).

Outra questão que pode impactar na síntese e mobilização do glicogênio é o temperamento dos animais (VOISINET *et al.*, 1997). Nas fazendas de origem, bovinos com temperamento agitado tendem a consumir menos alimento àqueles mais calmos (CAFE *et al.*, 2011), podendo haver redução no substrato disponível para glicogênese no músculo, refletindo diretamente na redução das concentrações de glicogênio muscular antes do abate (COOMBES *et al.*, 2014).

Ainda, animais agitados têm maior contração muscular, estimulando a mobilização do glicogênio (GRANDIN, 1993), portanto, associação desses fatores pode aumentar a incidência de carne DFD (COOMBES *et al.*, 2014). No entanto, pesquisa avaliando diferentes tipos de comportamento de bovinos (agitado/calmo) sobre a qualidade da carne demonstrou que as concentrações de glicogênio e o pH_u não foram influenciadas pelo comportamento, sugerindo que bovinos de todos os temperamentos tem a mesma probabilidade de desenvolver carne DFD (McGILCHRIST *et al.*, 2012; COOMBES *et al.*, 2014).

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Perfil da pecuária no Brasil: Relatório anual 2016**. São Paulo, 2016. 46 p.

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Perfil da pecuária no Brasil: Relatório anual 2018**. São Paulo, 2018. 49 p.

ADZITEY, F. Effect of pre-slaughter animal handling on carcass and meat quality. **International Food Research Journal**, v.18, p.486-491, 2011.

ALLISON, R.W. Laboratory evaluation of plasma and serum proteins. In: THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL T.W. (Eds.). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Ames: Wiley-Blackwell, 2012. chap. 29, p. 460-475.

ANDRADE, E.N.; ROÇA, R.O.; SILVA, R.A.M.S; GONÇALVES, H.C; PINHEIRO, R.S.B. Prevalência de lesões em carcaças de bovinos de corte abatidos no Pantanal Sul Mato-Grossense transportados por vias fluviais. **Ciência Tecnologia Alimentar**, v.28, n.4, p.822-829, 2008.

AVERÓS, X.; MARTIN, S.; RIU, M.; SERRATOSA, J.; GOSÁLVES, L.F. Stress response of extensively reared young bulls being transported to growing-finishing farms under Spanish summer commercial conditions. **Livestock Science**, v.119, p.174-182, 2008.

BERNARDINI, D.; GERARDI, G.; PELI, A.; NANNI COSTA, L.; AMADORI, M.; SEGATO, S. The effects of different environmental conditions on thermoregulation and clinical and hematological variables in long-distance road-transported calves. **Journal of Animal Science**, v.90, p.1183-1191, 2012.

BERTOLONI, W.; SILVA, J.L.; ABREU, J.S.; ANDREOLLA, D.L. Bem-estar e taxa de hematomas de bovinos transportados em diferentes distâncias e modelos de carroceria no estado do Mato Grosso-Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, p.850-859, 2012.

BOURGUET, C.; DEISS, V.; BOISSY, A.; TERLOUW, E.M.C. Young Blond d'Aquitaine, Angus and Limousin bulls differ in emotional reactivity: Relationships with animal traits, stress reactions at slaughter and post-mortem muscle metabolism. **Applied Animal Behaviour Science**, v.164, p.41-55, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **RIISPOA** (Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal). Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2017.

BRAMBELL, F. W. R. The welfares of animals. In: _____. **Report on the technical committee to enquire into the welfare of livestock kept under intensive conditions**. London: Her Majesty's Stationary Office, 1965. chap.5, p.25-46.

BUCKHAM SPORER, K.R.; WEBER, P.S.D.; BURTON, J.L.; EARLEY, B.; CROWE, M.A. Transportation of young beef bulls alters circulating physiological parameters that may be effective biomarkers of stress. **Journal of Animal Science**, v.86, p.1325-1334, 2008.

BULITTA, F.S.; ARADOM, S.; GEBRESENBET, G. Effect of transport time of up to 12 hours on welfare of cows and bulls. **Journal of Service Science and Management**, v.8, p.161-182, 2015.

BURNS, L.V. **Determinação do nível de estresse em bovinos com lesões graves e causa da morte durante o transporte ao frigorífico**. 2014. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, 2014.

BURNS, L.V.; MORON, S.E.; CORDOVA, F.M.; SOUSA, L.F.; VEIGA, A.P.M.; BARBOSA, S.M.; CANDIDO, F.R.; CRUZ, O.M.; PRATA, D.M.; FEITOSA, A.C.F.; STEFANINE, N.R.; MONTEIRO, K.B.; SILVA, A.K.; ZIMERMANN, F.C.; RAMOS, A.T. Deaths of cows during long distance transportation to the slaughterhouse. Changes on histopathological examination, muscle and liver glycogen storage and muscle pH. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.7, p.07-13, 2014.

BROOM, D.M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, v.142, n.6, p.524-526, 1986.

BROOM, D.M. The welfare of livestock during road transport. In: APPLEBY, M.C.; CUSSEN, V.; GARCÉS, L.; LAMBERT, L.; TURNER, J. (Eds.) **Long distance transport and welfare of farm animals**. Oxfordshire: CAB International, 2008. chap.7, p.157-181.

CAFE, L.M.; ROBINSON, D.L.; FERGUSON, D.M.; MCINTYRE, B.L.; GEESINK, G.H.; GREENWOOD, P.L. Cattle temperament: Persistence of assessments and associations with productivity, efficiency, carcass and meat quality traits. **Journal of Animal Science**, v.89, n.5, p.1452-1465, 2011.

CAULFIELD, M.P.; CAMBRIDGE, H.; FOSTER, S.F.; MCGREEVY, P.D. Heat stress: A major contributor to poor animal welfare associated with long-haul live export voyages. **The Veterinary Journal**, v.199, p.223-228, 2014.

CAVE, J.G.; CALLINAN, A.P.L.; WOONTON, W.K. Mortalities in bobby calves associated with long distance transport. **Australian Veterinary Journal**, v.83, n.1-2, p.82-84, 2005.

CHULAYO, A.Y.; BRADLEY, G.; MUCHENJE, V. Effects of transport distance, lairage time and stunning efficiency on cortisol, glucose, HSPA1A and how they relate with meat quality in cattle. **Meat Science**, v.117, p.89-96, 2016.

CONNELL, J. International transport of farm animals intended for slaughter. **Commission of the European Communities**, Report EUR 9556. p.67, 1984.

COOMBES, S.V.; GARDNER, G.E.; PETHICK, D.W.; MCGILCHRIST, P. The impact of beef cattle temperament assessed using flight speed on muscle glycogen, muscle lactate and plasma lactate concentrations at slaughter. **Meat Science**, v.98, p.815-821, 2014.

CROOKSHANK, H.R.; ELISSALDE, M.H.; WHITE, R.G.; CLANTON, D.C.; SMALLEY, H.E. Effect of transportation and handling of calves upon blood serum composition. **Journal of Animal Science**, v.48, p.430-435, 1979.

DAS, T.K.; MANI, V.; KAUR, H.; KEWALRAMANI, N.; AGARWAL, A. Effect of vitamin E supplementation on hematological and plasma biochemical parameters during long term exposure of arsenic in goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.25, n.9, p.1262-1268, 2012.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

EARLEY, B.; DRENNAN, M.; O'RIORDAN, E.G. The effect of road transport in comparison to a novel environment on the physiological, metabolic and behavioural responses of bulls. **Research in Veterinary Science**, v.95, p.811-818, 2013.

EARLEY, B.; MURRAY, M.; PRENDIVILLE, D.J. Effect of road transport for up to 24 hours followed by twenty-four hour recovery on live weight and physiological responses of bulls. **BMC Veterinary Research**, v.6, n.38, p.1-13, 2010.

EARLEY, B.; MURRAY, M.; PRENDIVILLE, D.J.; PINTADO, B.; BORQUE, C.; CANALI, E. The effect of transport by road and sea on physiology, immunity and behaviour of beef cattle. **Research in Veterinary Science**, v.92, p.531-541, 2012.

ENGLAND, E.M.; MATARNEH, S.K.; OLIVER, E.M.; APAOBLAZA, A.; SCHEFFLER, T.L.; SHI, H.; GERRARD, D.E. Excess glycogen does not resolve high ultimate pH of oxidative muscle. **Meat Science**, v.114, p.95-102, 2016.

ERIKSEN, M.S.; RØDBOTTEN, R.; GRØNDAHL, A.M.; FRIESTAD, M.; ANDERSEN, I.L.; MEJDELL, C.M. Mobile abattoir versus conventional slaughterhouse-Impact on stress parameters and meat quality characteristics in Norwegian lambs. **Applied Animal Behaviour Science**, v.149, p.21-29, 2013.

FERGUSON D.M.; WARNER R.D. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? **Meat Science**, v.80, n.1, p.12-19, 2008.

FERREIRA, F.; CAMPOS, W.E.; CARVALHO, A.U.; PIRES, M.F.A.; MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; VERNEQUE, R.S.; SILVA, P.F. Parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e hormonais de bovinos submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.4, p.769-776, 2009.

FERREIRA, J.L.; CAVALCANTE, T.V.; MARINHO, J.P.; LOPES, F.B.; MINHARRO, S. Influência do Manejo Pré-Abate na Produção de Carne Bovina no Município de Araguaína, Tocantins. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.15, p.1-12, 2010.

FISHER, A.D.; COLDITZ, I.G.; LEE, C.; FERGUSON, D.M. The influence of land transport on animal welfare in extensive farming systems. **Journal of Veterinary Behavior**, v.4, p.157-162, 2009.

FRANCO, D.; MATO, A.; SALGADO, F.J.; LÓPEZ-PEDROUSO, M.; CARRERA, M.; BRAVO, S.; ZAPATA, C. Tackling proteome changes in the longissimus thoracis bovine muscle in response to pre-slaughter stress. **Journal of Proteomics**, v.122, p.73-85, 2015.

FRIMPONG, S.; GEBRESENBET, G.; BOBOBEE, E.; AKLAKU, E.D.; HAMDU, I. Effect of transportation and pre-slaughter handling on welfare and meat quality of cattle: Case study of Kumasi abattoir, Ghana. **Veterinary Sciences**, v.1, p.174-191, 2014.

GALLO, C.B.; HUERTAS, S.M. Main animal welfare problems in ruminant livestock during preslaughter operations: A south American view. **Animal**, v.10, n.2, p.357-364, 2016.

GHEZZI, M.D.; ACERBI, R.; BALLERIO, M.; REBAGLIATI, J.E.; DIAZ, M.D.; BERGONZELLI, P.; CIVIT, D.; RODRÍGUEZ, E.M.; PASSUCCI, J.A.; CEPEDA, R.; SAÑUDO, M.E.; COPELLO, M.; SCORZIELO, J.; CALÓ, M.; CAMUSSI, E.; BERTOLI, J.; ABA, M.A. Buenas practicas ganaderas bienestar animal. Evaluación de las prácticas relacionadas con el transporte terrestre de hacienda que causan perjuicios económicos en la cadena de ganados y carne. **Cuadernillo técnico IPCVA**, v.5, p.1-29, 2008.

GOFF, J.P. Sistema endócrino. In: DUKES, H.H. (Ed.). **Dukes-Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. chap. 9, p.599-635.

GRANDIN, T. Behavioral agitation during handling of cattle is persistent over time. **Applied Animal Behavior Science**, v.36, n.1, p.1-9, 1993.

GRANDIN, T.; SHIVLEY, C. How Farm Animals React and Perceive Stressful Situations Such As Handling, Restraint, and Transport. **Animals**, v.5, n.4, p.1233-1251, 2015.

GREGORY, L.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; D'ANGELINO, J.L.; BENESI, F.J.; DE ARAÚJO, W.P.; BIRGEL, E.H. Valores de referência dos teores séricos da ureia e creatinina em bovinos da raça Jersey criados no estado de São Paulo. Influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.3, p.339-345, 2004.

GRUBER, S.L.; TATUM, J.D.; ENGLE, T.E.; CHAPMAN, P.L.; BELK K.E.; SMITH, G.C. Relationships of behavioural and physiological symptoms of pre-slaughter stress to beef longissimus muscle tenderness. **Journal of Animal Science**, v.88, p.1148-1159, 2010.

GUÀRDIA, M.D.; ESTANY, J.; BALASCH, S.; OLIVER, M.A.; GISPERT, M.; DIESTRE, A. Risk assessment of DFD meat due to pre-slaughter conditions in pigs. **Meat Science**, v.70, n.4, p.709-716, 2005.

HARTUNG, J. Effects of transport on health of farm animals. **Veterinary Research Communications**, v.27, p.525-527, 2003.

HENNING, P.A. Transportation of animals by road for slaughter in South Africa. In: LIVESTOCK ENVIRONMENT IV, 1993, Coventry. **Proceedings of 4th International Symposium on Livestock Environment**. Coventry: American Society of Agricultural Engineers, 1993. p.536-541.

HERNÁNDEZ, T.I.; ARENAS, R.; LEZAMA, P.A.C.; SIMÓN, B.A.; HERNÁNDEZ, D.F.; HUERTA, V.G. Manejo pré-abate e qualidade de carne. **Revista electrónica de Veterinaria**, v.11, n.8, p.1-11, 2010.

INGENBLEEK, P.T.M.; HARVEY, D.; ILIESKI, V.; IMMINK, V.M.; DE ROEST, K.; SCHMID, O. The European Market for Animal-Friendly Products in a Societal Context. **Animals**, v.3, n.3, p.808-829, 2013.

IRWIN, M.R.; GENTLEMAN, W.R. Transportation of cattle in a rail car containing feed and water. **South Western Veterinarian**, v.31, p.205-208, 1978.

ISHIWATA, T.; UETAKE, K.; EGUCHI, Y.; TANAKA, T. Steer stress levels during long distance transport throughout the year in Japan. **Journal of Animal Science**, v.79, p.510-517, 2008.

JIMENEZ FILHO, D.L. Efeitos do transporte sobre a qualidade da carne – revisão. **Medicina Veterinária**, v.6, n.4, p.26-31, 2012.

KNOWLES, T.G.; WARRISS, P.D. Stress physiology of animals during transport. In: GRANDIN, T. (Ed.). **Livestock Handling and Transport**. Wallingford: CAB International, 2000. p.385-407.

KNOWLES, T.G.; WARRISS, P.D.; VOGEL, K. Stress physiology of animals during transport. In: GRANDIN, T. (Ed.). **Livestock Handling and Transport**. Wallingford: CAB International, 2014. chap. 21, p.399-420.

KRIZANOVIC, D.; SUSIC, V.; BOZIC, P.; STOKOVIC, I.; EKERT-KABALIN, A. Changes of bovine lipid peroxides and some antioxidants in the cause of growth. **Veterinarski Arhiv**, v. 78, p.269-278, 2008.

LOPEZ, O.; MARCO, I.; MONTANE, J.; LAVIN, S. Transport stress in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) and its modulation by acepromazine. **Veterinary Journal**, v.1720, p.347-355, 2006.

LUDTKE, C.B.; CIOCCA, J.R.P.; DANDIN, T.; BARBALHO, P.C.; VILELA, J.A.; FERRARINI, C. Estresse e qualidade da carne. In: _____. **Abate humanitário de bovinos**. Rio de Janeiro: WSPA, 2012. p.101-130.

MACH, N.; BACH, A.; VELARDE, A.; DEVANT, M. Association between animal, transportation, slaughterhouse practices, and meat pH in beef. **Meat Science**, v.78, p.232–238, 2008.

McMANUS, J.F.A. Histological Demonstration of Mucin after Periodic Acid. **Nature**, n.158, p.158-202, 1946.

MAGANHINI, M.B.; MARIANO, B.; SOARES, A.L.; GUARNIERI, P.D.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I. Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) e DFD (Dark, Firm, Dry) em lombo suíno numa linha de abate industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.69-72, 2007.

MALENA, M.; VOŠLÁŘOVÁ, E.; KOZÁK, A.; BĚLOBRÁDEK, P.; BEDÁŇOVÁ, I.; STEINHAUSER, L.; VEČEREK, V. Comparison of mortality rates in different categories of pigs and cattle during transport for slaughter. **Acta Veterinaria Brno**, v.72, p.109-116, 2007.

MARÍA, G.A. Consecuencias de la intensificación sobre el bienestar animal en corderos. In: **PRIMER ENCUENTRO DE INVESTIGADORES EN BIENESTAR ANIMAL**, 2009, Huesca: Diputación Provincial, 2009. p.82-103.

McGILCHRIST, P.; ALSTON, C. L.; GARDNER, G. E.; THOMSON, K. L.; PETHICK, D. W. Beef carcasses with larger eye muscle areas, lower ossification scores and improved nutrition have a lower incidence of dark cutting. **Meat Science**, v.92, n.4, p.474-480, 2012.

MINKA, N.S.; AYO, J.O. Physiological responses of food animals to road transportation stress. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.25, p.7415-7427, 2009.

MIRANDA-DE LA LAMA, G.C.; RIVERO, L.; CHACON, G.; GARCIA-BELENQUER, S.; VILLARROEL, M.; MARIA, G.A. Effect of the pre-slaughter logistic chain on some indicators of welfare in lambs. **Livestock Science**, v.128, p.52-59, 2010.

MIRANDA-DE LA LAMA, G.C.; VILLARROEL, M.; MARÍA, G.A. Livestock transport from the perspective of the pre-slaughter logistic chain: A review. **Meat Science**, v.98, p.9–20, 2014.

MIRANDA-DE LA LAMA, G.C.; MONGE, P.; VILLARROEL, M.; OLLETA, J.L.; GARCÍA-BELENQUER, S.; MARÍA, G.A. Effects of road type during transport on lamb welfare and meat quality in dry hot climates. **Tropical Animal Health and Production**, v.43, p.915-922, 2011.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.67-74, 2002.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Integração e regulação hormonal do metabolismo dos mamíferos. In: _____. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014. cap.23, p.682-710.

NETO, A.P.; ZANCO, N.; LOLATTO, D.C.J.; MOREIRA, P.S.A.; DROMBOSKI, T. Perdas econômicas ocasionadas por lesões em carcaças de bovinos abatidos em matadouro-frigorífico do norte de Mato Grosso. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.4, p.324-328, 2015.

NGOKERE, A.A.; CHOJI, T.P.P.; OGENYI, S.I.; KUMBISH, P.R.; MOSES, G.D.; AHMED, J.S.; SULEIMAN, I.; ZAMFARA, R.I.; BUKAR, S.M.; GWONG, V.D. Periodic Acid Schiff Reactions and General Tissue Morphology of Conventionally-processed versus Two Rapid Microwave-processed Tissues. **British Journal of Applied Science & Technology**, v.12, n.2, p.1-14, 2016.

NJISANE, Y.Z.; MUCHENJE, V. Pre-slaughter effects on bleed-out times and some behavioural and physiological responses of Nguni and non-descript steers. **South African Journal of Animal Science**, v.47, n.1, p.79-90, 2017.

PELLETIER, J.; BELLOT, G.; POUYSSÉGUR, J.; MAZURE, N.M. Biochemical Titration of Glycogen In vitro. **Journal of Visualized Experiments**, v.81, p.1-10, 2013.

PHILLIPS, C.J.C.; SANTURTUN, E. The welfare of livestock transported by ship. **The Veterinary Journal**, v.196, p.309-314, 2013.

PIGHIN, D.G.; DAVIES, P.; GRIGIONI, G.; PAZOS, A.A.; CECONI, I.; MENDEZ, D.; BUFFARINI, M.; SANCHO, A.; GONZALEZ, C.B. Effect of slaughter handling conditions and animal temperament on bovine meat quality markers. **Archivos de zootecnia**, v.62, n.239, p.399-409, 2013.

RAMOS, E.M.; GOMIDE, L.A.M. Caracterização do *rigor mortis*. In: _____. **Avaliação da Qualidade de Carnes: Fundamentos e Metodologia**. Viçosa: UFV, 2007. chap.3, p.53-88.

ROÇA, R. O. Abate Humanitário de Bovinos. **I Conferência Virtual Global Sobre produção Orgânica de bovinos de Corte** - Via Internet, Setembro de 2002 Universidade do Contestado, Concordia Brasil, 2002.

ROÇA, R.O. Modificações pós-morte da carne. Disponível em: <<http://www.fca.unesp.br>>. Acesso em: 7 fev. 2014.

ROMERO, M.H.; URIBE-VELÁSQUEZ, L.F.; SÁNCHEZ, J.A. Physiological profiles of Zebu steers during transport and pre-slaughter. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.27, p.282-289, 2014.

ROMERO, M.H.; URIBE-VELÁSQUEZ, L.F.; SÁNCHEZ, J.A.; MIRANDA-DE LA LAMA, G.C. Risk factors influencing bruising and high muscle pH in Colombian cattle carcasses due to transport and pre-slaughter operations. **Meat Science**, v.95, p.256-263, 2013.

ROMERO, M.H.; URIBE-VELÁSQUEZ, L.F.; SÁNCHEZ, J.A.; RAYAS-AMOR, A.A.; MIRANDA-DE LA LAMA, G.C. Conventional versus modern abattoirs in Colombia: Impacts on welfare indicators and risk factors for high muscle pH in commercial Zebu young bulls. **Meat Science**, v.123, p.173-181, 2017.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K.S.; FAUCITANO, L.; DADGAR, S.; SHAND, P.; GONZÁLEZ, L.A.; CROWE, T.G. Road transport of cattle, swine and poultry in North America and its impact on animal welfare, carcass and meat quality: A review. **Meat Science**, v.92, p.227-243, 2012.

SGAI, M.G.F.G.; PIZZUTTO, C.S.; GUIMARÃES, M.A.B. Estresse, esterotipias e enriquecimento ambiental em animais selvagens cativos: revisão. **Clínica Veterinária**, v.88, p.88-98, 2010.

SIMMONS, N.J.; DALY, C.C.; CUMMINGS, T.L.; MORGAN, S.K.; JOHNSON, N.V.; LOMBARD, A. Reassessing the principles of electrical stimulation. **Meat Science**, v.80, p.110-122, 2008.

SRIKANDAKUMAR, A.; JOHNSON, E.H. Effect of heat stress on milk production, rectal temperature, respiratory rate and blood chemistry in Holstein, Jersey and Australian Milking Zebu cows. **Tropical Animal Health and Production**, v.36, p.685-692, 2004.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Enzimas. In: _____. **Fundamentos da patologia clínica veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. chap.12, p. 533-561.

STRAPPINI, A.C.; FRANKENA, K.; METZ, J.H.M.; GALLO, B.; KEMP, B. Prevalence and risk factors for bruises in Chilean bovine carcasses. **Meat Science**, v.86, p.859-864, 2010.

STRYDOM, P.E; FRYLINCK, L. Minimal electrical stimulation is effective in low stressed and well fed cattle. **Meat Science**, v.96, p.790-798, 2014.

TADICH, N.; GALLO, C.; BUSTAMANTE, H.; SCHWERTER, M.; SCHAİK, G.V. Effects of transport and lairage time on some blood constituents of Friesian-cross steers in Chile. **Livestock Production Science**, v.93, p.223-233, 2005.

TARRANT, P.V., KENNY, F.J., HARRINGTON D. The effect of stocking density during 4 hour transport to slaughter on behaviour, blood constituents and carcass bruising in Friesian steers. **Meat Science**, v.24, n.3, p.209-222, 1988.

VALDES, A. **Efectos de dos densidades de carga y dos tiempos de transporte sobre el peso vivo, rendimiento de la canal y presencia de contusiones en novillos destinados al faenamiento**. Memoria de Título. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile, 2002.

VALENTINE, B.A.; MCGAVIN, M.D. Músculo esquelético. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. (Eds.). **Bases da Patologia em Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. chap.15, p.973-1040.

- VEČEREK, V.; BARTOSEK, B.; KOZÁK, A.; CHLOUPEK, P.; PISTEKOVÁ, V. Emergency slaughter of cattle in the Czech Republic: the most frequent causes and their occurrence in the period of 1997–2002. **Acta Veterinary Brno**, v.72, p. 445-452, 2003.
- VEČEREK, V.; MALENA, M.; MALENA, M jr.; VOŠLÁROVÁ, E.; CHLOUPEK, P. The impact of the transport distance and season on losses of fattened pigs during transport to the slaughterhouse in the Czech Republic in the period from 1997 to 2004. **Veterinární Medicína**, v. 51, p. 21-28, 2006a.
- VILLARROEL, M.; MARIA, G. A.; SIERRA, I.; SANUDO, C.; GARCIA-BELENGUER, S.; GEBRESENBET, G. Critical points in the transport of cattle to slaughter in Spain that may compromise the animals' welfare. **Veterinary Record**, v.149, p.173-176. 2001.
- VOISINET, B.D.; GRANDIN, T.; O'CONNOR, S.F.; TATUM, J.D.; DEESING, M.J. Bos indicus-cross feedlot cattle with excitable temperaments have tougher meat and a higher incidence of borderline dark cutters. **Meat Science**, v.46, n.4, p.367-377, 1997.
- WERNER, M.; HEPP, C.; SOTO, C.; GALLARDO, P.; BUSTAMANTE, H.; GALLO, C. Effects of a long distance transport and subsequent recovery in recently weaned crossbred beef calves in Southern Chile. **Livestock Science**, v.152, p.42-46, 2013.
- WINGFIELD, J.C.; RAMENOFSKY, M. Hormones and the behavioral ecology of stress. In: BALM, P.H.M. (Ed.). **Stress physiology in animals**. Sheffield: Academic Press, 1999. p.1-51.
- WULF, D.M.; EMNETT, R.S.; LEHESKA, J.M.; MOELLER, S.J. Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm and dry) beef, and cooked beef palatability. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1895-1903, 2002.

Capítulo 2. Parâmetros hematobioquímicos e qualidade físico-química da carne de bovinos transportados ao frigorífico

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes distâncias de transporte ao frigorífico sobre o bem-estar de bovinos machos e fêmeas durante a época de chuva e seca, a partir da análise dos indicadores hematobioquímicos e físico-químicos da carcaça. Foram utilizados 297 bovinos anelados e mestiços, sendo 147 fêmeas e 150 machos não-castrados, com médias de peso de 187,5 e 277,5 kg e idade de 24 e 32 meses, respectivamente, provenientes de fazendas do Estado do Tocantins. Os animais foram alocados em diferentes grupos de acordo com a condição sexual, época do ano e distância percorrida durante o transporte ao frigorífico: <50 km, 100-200 km, 201-300 km e >300 km. Foram coletadas amostras de sangue para análises hematobioquímicas e o pH da carcaça foi medido após 24 horas de resfriamento (pH final= pH_u). O transporte por longas distâncias causa aumento do hematócrito e das concentrações de ureia, creatinina e lactato. Ainda, propicia o aumento da atividade sérica da creatina quinase (CK), aspartato aminotransferase (AST) e do pH_u da carcaça. Alguns parâmetros hematobioquímicos foram influenciados pela condição sexual, assim, podemos destacar que os machos apresentaram aumento da creatinina, maiores atividades séricas de CK e AST e maior pH_u da carcaça. As fêmeas apresentaram aumento do hematócrito, elevação dos valores da ureia, glicose e lactato. Os animais transportados durante a época de seca tiveram elevação nas concentrações de albumina, creatinina, glicose e aumento na atividade sérica da CK e AST. Já os animais transportados na época de chuva tiveram aumento da ureia sérica. As proteínas totais, hematócrito, lactato e pH_u foram afetados por ambas as épocas. Nesse caso, algumas variáveis como qualidade das estradas, percentual de transporte percorrido em estrada não pavimentada, duração total da viagem, distância de transporte e a capacidade de adaptação individual dos animais também tiveram influência sobre suas concentrações sanguíneas, prejudicando o bem-estar. De acordo com os resultados, o transporte por longas distâncias interfere no bem-estar, causando desidratação e estresse físico, resultando em aumento do pH_u da carcaça, contribuindo para formação de uma carne DFD. A condição sexual influenciou de forma direta o bem-estar dos animais; os machos foram mais sensíveis ao estresse físico e apresentaram maior ocorrência de lesões musculares. Já as fêmeas apresentaram maior reatividade aos efeitos do estresse e menor capacidade de adaptação aos agentes estressores. Os animais transportados durante a época de seca apresentaram desidratação e maior estresse emocional e físico. Já os animais transportados na época de chuva tiveram maiores efeitos do estresse sobre a degradação proteica.

Palavras-chave: Indicadores fisiológicos, Bem-estar, Clima, Condição sexual

Chapter 2. Hemato-biochemical profile and physico-chemical quality of meat in cattle transported to slaughterhouse

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of transport distance on the welfare of male and female cattle transported to the slaughterhouse during rainy and dry season, from the hematological parameters and physicochemical analysis of the carcass. A total of 297 bovines Nelore and crossbred, being 147 females and 150 non-castrated males, with average weight of 187.5 and 277.5 kg and 24 and 32 months of age, respectively, coming from Tocantins farms. The animals were allocated in groups according to sex and distance traveled to the slaughterhouse: <50 km, 100-200 km, 201-300 km and > 300 km. Blood samples were collected during exsanguination for hemato-biochemical and the pH was measured in carcass after 24 hours of cooling (final pH = pH_u). Transport over long distances cause increase in hematocrit and urea, creatinine and lactate concentrations. Also increase of the serum activity of creatine kinase (CK), aspartate aminotransferase (AST) and the pH_u of the carcass. Sex interferes in some hemato-biochemical parameters and males had increased creatinine, higher serum activities of CK and AST and higher pH_u of the carcass. Females had increased in hematocrit, urea, glucose and lactate values. The animals transported during the dry season had increase in albumin, creatinine, glucose, and high serum activity of CK and AST. The animals transported in the rainy season had increase in serum urea. The total proteins, hematocrit, lactate and pH_u were affected both by dry and rainy season. In this case, some variables such as road quality, percentage of transport in unpaved road, total travel time, transport distance and the individual adaptability of the animals also had influence on their blood concentrations, impairing well-being. According to our results, transport over long distances interferes with well-being, causing dehydration and physical stress, resulting in increased pH_u of the carcass, contributing to DFD meat. Sex also interferes with well-being and males were more sensitive to physical stress and muscle injuries. Females showed greater reactivity to effects of stress and less capacity to adapt to stressors. Animals transported during the dry season presented dehydration and increased emotional and physical stress. However, the animals transported in the rainy season had greater stress effects on protein breakdown.

Keywords: Physiological parameters, Sexual condition, Weather, Welfare

2.1 INTRODUÇÃO

O transporte rodoviário por caminhões é a maneira mais comum de condução dos bovinos aos abatedouros (TARRANT, KENNY e HARRINGTON, 1988), no entanto, é considerada causa mais importante de estresse, prejudicando o bem-estar e a saúde animal (BULITA, ARADOM e GEBRESENBET, 2015).

O embarque, desembarque, confinamento com ou sem movimentação, vibrações, fatores emocionais como reagrupamento social, ambientes desconhecidos, variáveis climáticas, privação de água e alimentos são importantes potenciais estressores (MIRANDA-DE LA LAMA, VILLARROEL e MARÍA, 2014). Durante o transporte, os animais podem ficar expostos às chuvas e oscilações de umidade e temperatura, visto que os caminhões não oferecem proteção contra as variáveis climáticas (FRIMPONG *et al.*, 2014).

Esses fatores podem alterar a homeostase na tentativa do organismo em se adaptar à nova situação e buscar novamente o equilíbrio, porém, sob essas condições, os animais podem manifestar medo, desidratação, fome, aumento da atividade física, fadiga e lesões musculoesqueléticas (FERGUSON e WARNER, 2008). Não obstante, as respostas fisiológicas dos animais diante de eventos estressantes podem reduzir rendimento de carcaça e qualidade físico-química da carne (ADZITEY, 2011).

Transportes prolongados ou percorridos em longas distâncias (CHULAYO, BRADLEY e MUCHENJE, 2016), modelo ou tipo de veículo, densidade da carga e qualidade das estradas e rodovias (HARTUNG, 2003) também são capazes de influenciar o bem-estar animal. Além disso, a condição sexual também pode interferir no bem-estar durante o transporte, visto que Adzitey (2011) relata que as fêmeas geralmente são mais reativas ao estresse, possivelmente devido sua oscilação hormonal mais acentuada em comparação aos machos (HARD e HANSEN, 1985). Entretanto, outros pesquisadores mostram que os machos tendem a manifestar comportamento mais agressivo e serem mais sensíveis ao estresse que as fêmeas durante o transporte (MOTA-ROJAS *et al.*, 2006; MPAKAMA, CHULAYO e MUCHENJE, 2014).

Os efeitos do estresse durante o transporte sobre a homeostase podem ser verificados e quantificados por meio de parâmetros sanguíneos (CROOKSHANK *et al.*, 1979), frequentemente utilizados como indicadores de bem-estar (AVERÓS *et*

al., 2008). Alguns indicadores são usados para avaliar quadros de desidratação, como as proteínas totais (PT) e albumina (KNOWLES e WARRISS, 2000), enquanto que a ureia e creatinina são utilizadas na análise dos efeitos do estresse físico em bovinos (DAS *et al.*, 2012).

Atividade sérica das enzimas creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) são usadas para avaliação de lesão muscular (VALENTINE e McGAVIN, 2009; ALLISON, 2012) e o lactato pode ser utilizado como parâmetro de atividade física (KNOWLES, WARRISS e VOGEL, 2014).

A glicemia também pode ser avaliada como indicador de bem-estar, visto que durante exposição ao estresse físico e psicológico existe aumento dos níveis de catecolaminas e glicocorticoides (ERIKSEN *et al.*, 2013) que alteram o metabolismo energético, incluindo a lipólise, glicogenólise muscular, gliconeogênese (KUCHEL, 1991) e glicogenólise hepática, elevando a concentração de glicose plasmática (KNOWLES, WARRISS e VOGEL, 2014).

O aumento significativo da atividade física, agitação, maus tratos e transporte por longas distâncias podem causar a depleção das reservas de glicogênio muscular (GUÀRDIA *et al.*, 2005), resultando em elevação do pH final da carne, permanecendo entre 5,8 a 6,2; devido à menor concentração de ácido láctico (JIMENEZ FILHO, 2012).

Essa alteração produz uma carne conhecida como DFD (*Dark, Firm, Dry*), que se apresenta com maior grau de firmeza, (JIMENEZ FILHO, 2012), cortes mais escuros (MAGANHINI *et al.*, 2007) e com menor suculência (GUÀRDIA *et al.*, 2005) e que pode ter dificuldade de comercialização, visto que os consumidores podem associá-la à carnes com maior tempo de prateleira ou com problemas de armazenamento (SOTELO *et al.*, 2008).

As avaliações dos efeitos do estresse em bovinos de corte são importantes, visto que os consumidores estão cada vez mais preocupados com a maneira de produção da carne, que inclui condições ideais de bem-estar e abate (GRANDIN, 2014; ALVES *et al.*, 2016), além daquelas relacionadas ao manejo e sugerem necessidade de melhorias no ambiente de produção (VERBEKE, 2009). Porém, na maioria dos casos, as opiniões dos consumidores sobre questões de bem-estar raramente são levados em consideração (CHULAYO e MUCHENJE, 2015).

Pelo exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de diferentes distâncias de transporte ao frigorífico sobre o bem-estar de bovinos

machos e fêmeas durante a época de chuva e seca, a partir da análise dos indicadores hematobioquímicos, como albumina, PT, hematócrito, ureia, creatinina, CK, AST, lactato enzimático e glicose, e análise físico-químico da carcaça através do pH_u.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Animais e tratamento

A pesquisa foi previamente aprovada pelo comitê de ética-CEUA-UFT (Nº do processo: 23101.000666/2017-81).

Foram utilizados 297 bovinos anelorados e mestiços, sendo 147 fêmeas e 150 machos não-castrados, com médias de peso de 12,5 e 18,5 arrobas e idade de 24 e 32 meses, respectivamente, provenientes de fazendas localizadas no interior Estado do Tocantins.

Os animais foram transportados por rodovias em datas distintas ao frigorífico, localizado na região de Araguaína-TO (7º11'28" de latitude, 48º12' 26" de longitude) e que se encontra sob Inspeção Federal.

A seleção dos lotes utilizados no experimento foi realizada entre Abril de 2017 e Agosto de 2018, sempre baseada na distância percorrida da fazenda de origem até o abatedouro, na condição sexual e na época do ano. O percentual percorrido em estradas não pavimentadas foi calculado por regra de três simples, utilizando os valores da quilometragem total da viagem e daquela percorrida somente em estradas não pavimentadas (Tabela 1).

Os dados climáticos dos períodos de transporte e abates foram obtidos da Estação Climatológica Principal de Araguaína, localizada na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia-EMVZ da Universidade Federal do Tocantins-UFT (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Informações sobre temperatura (mínima e máxima), umidade, tempo de transporte, quilometragem e percentual percorrido em estrada não pavimentada, e quantidade de bovinos utilizados de acordo com a condição sexual, época do ano e distância percorrida no transporte ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.

Condição sexual	Época	Temp. mín.(°C)	Temp. máx.(°C)	Umidade (%)	Número de animais	Distância (km)	Tempo (h)	Distância (km) em estrada não pavimentada	% estrada não pavimentada
Machos	Chuva	21,8	32,1	87	20	<50	*	*	*
		21,8	31,9	86	18	100-200	4:00	30,0	28,57
		23,2	30,1	86	18	201-300	5:30	3,0	1,06
		23,5	30,5	77	18	>300	6:00	10,0	2,50
	Médias	22,6	31,2	84					
	Seca	17,4	32,8	55	20	<50	0:50	20,0	57,14
		18,7	32,5	68	20	100-200	2:00	3,0	2,43
		15,4	33,5	57	18	201-300	7:00	3,0	1,05
		20,7	33,7	68	18	>300	6:40	4,0	1,25
	Médias	18,1	33,2	62					
Fêmeas	Chuva	25,3	29,6	85	18	<50	1:00	10,0	27,77
		23,0	34,1	77	20	100-200	2:30	10,0	6,25
		23,7	30,0	90	20	201-300	*	*	*
		22,3	31,2	81	14	>300 km	7:30	10,0	3,22
	Médias	23,6	31,2	83					
	Seca	25,7	33,7	47	18	<50	0:50	0,3	0,78
		18,8	31,7	55	20	100-200	2:30	0,0	0,00
		33,0	33,4	57	18	201-300	3:30	2,0	0,90
		17,9	36,5	53	19	>300	5:00	0,0	0,00
	Médias	23,9	34,0	53					

* Dados não informados pelo frigorífico.

Quanto à raça, não havia padronização por carregamento, ou seja, um caminhão poderia transportar somente bovinos anelados ou mestiços e, ainda, anelados e mestiços. Os animais foram alocados em diferentes grupos de acordo com a condição sexual e distância percorrida durante o transporte ao frigorífico: <50 km, 100-200 km, 201-300 km e >300 km.

O tempo de descanso, jejum e dieta hídrica no período que antecedeu o abate foi de aproximadamente 12 horas. No momento do abate, os animais de todos os grupos foram insensibilizados com pistola pneumática ou de dardo cativo e abatidos de acordo com o fluxo normal do abatedouro (BRASIL, 2000).

2.2.2 Colheita das amostras de sangue

O volume de 4 mL de sangue foi obtido individualmente durante a exsanguinação, utilizando tubos BD Vacutainer® identificados, contendo EDTA K2 (BD, NJ, EUA) para avaliação do hematócrito, tubos com fluoreto de sódio e EDTA, para determinação da glicemia e lactato enzimático, e um volume individual de 10 mL em tubos sem anticoagulante e com ativador de coágulo para obtenção de soro destinado as análises de PT, albumina, ureia, creatinina, CK, AST. Posteriormente, os tubos foram acondicionados em isopor com gelo reciclável e remetidos ao

Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (LPCV) da EMVZ-UFT, campus de Araguaína, para o processamento no mesmo dia.

2.2.3 Análises hematobioquímicas

Plasma e soro foram obtidos a partir da centrifugação das amostras (Centrífuga Centribio 80-2B) durante 10 minutos a 3.605 G, servindo para as análises hematobioquímicas em espectrofotômetro semiautomático BIOPLUS S[®] (Bioplus, SP, Brasil) utilizando Kits Comerciais Labtest[®] (Labtest Diagnóstica S.A., MG, Brasil).

Para avaliação do hematócrito foi preenchido um tubo capilar com sangue dos tubos com EDTA K2 até $\frac{3}{4}$ da sua altura e depois fechando uma das extremidades com massa de modelar. Os tubos capilares foram colocados numa centrífuga de microhematócrito (Centrífuga de Microhematócrito Centribio H240) durante 5 minutos a 12175.02 G. Após, os resultados foram determinados por uma régua de leitura específica para hematócrito.

2.2.4 Medida do pH muscular

A medição do pH foi feita no músculo *Longissimus lumborum*, área que corresponde ao espaço entre a 11^a e 13^a costelas, dentro da câmara fria, 24 horas após o abate e que corresponde ao pH final (pH_u), utilizando o pHmetro portátil pH Classic Akso[®] (Akso, São Leopoldo, BR).

2.2.5 Análises estatísticas

O delineamento estatístico utilizado para todos os parâmetros relacionados ao ensaio foi o delineamento inteiramente casualizado, com parcelas subdivididas, sendo o fator parcela um arranjo fatorial (4x2 – distância e condição sexual) e o fator subparcela as épocas do ano com 18 ou 20 repetições por tratamento, sendo as comparações das médias feitas pelo teste de *t* a 5% de probabilidade. Seguindo o modelo estatístico adotado:

$$Y_{ijkl} = \mu + D_i + S_j + DS_{ij} + \varepsilon_{(a)ij} + E_k + ED_{ik} + ES_{jk} + EDS_{ijk} + \varepsilon_{(b)ijkl}$$

em que:

“ μ ” é a média geral;

“ D_i ” é o efeito da distância de transporte *i*, *i* = 1, 2, 3, 4;

“ S_j ” é o efeito da condição sexual *j*, *j* = 1, 2;

“DS_{ij}” é o efeito da interação entre distância de transporte e condição sexual;

“ $\varepsilon_{(a)_{ij}}$ ” é o erro a referente a variação aleatória da parcela;

“E_k” é o efeito da época do ano k, k = 1, 2;

“ED_{jk}” é o efeito da interação entre distância de transporte e época do ano;

“ES_{ik}” é o efeito da interação entre época do ano e condição sexual;

“EDS_{ijk}” é o efeito da interação entre época do ano, distância de transporte e condição sexual;

“ $\varepsilon_{(b)_{ijkl}}$ ” é o erro a referente a variação aleatória da subparcela;

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A albumina é um marcador da homeostase proteica, presente em concentrações elevadas nos casos de desidratação (EARLEY *et al.*, 2012). Isso ocorre devido à perda de água do plasma, resultando em hemoconcentração e hiperalbuminemia relativa (ALLISON, 2012). A análise da albumina não mostrou interação entre condição sexual e distância (P= 0,2688). Também não foram observadas diferenças nas concentrações de albumina entre machos e fêmeas, em relação às distâncias de transporte (Tabela 2.2), revelando que a albumina em ambas as condições sexuais não é influenciada pela distância.

Resultados semelhantes foram encontrados por Earley, Murray e Prendiville (2010), os quais relatam que a albumina não se alterou em animais transportados por distâncias que variaram entre 280 e 1192 km.

Tabela 2.2. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre a albumina em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.

Albumina (2,1-3,6 g/dL)**									
C.S	Distâncias (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		C.S***	Distância	C.S x Dist.	
Fêmea	2,98	2,93	2,99	2,99	2,93A	0,2409	0,7783	0,2688	
Macho	2,87	3,00	2,94	2,91	2,97A				
Médias	2,92a	2,97a	2,96a	2,95a	2,95				
Época	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		Época	Distância	Época x Dist.	
Chuva	2,68bB	2,81bB	2,82bB	3,04aA	2,83	<0,0001	0,7783	<0,0001	11,04
Seca	3,17aA	3,11aA	3,12aA	2,87bB	3,07				
Médias	2,92	2,97	2,96	2,95	2,95				
Época	C.S		Médias	P*			CV (%)		
	Fêmea	Macho		Época	C.S	Época x C.S			
Chuva	2,87	2,79	2,83B	<0,0001	0,2409	0,4268			
Seca	3,07	3,06	3,07A						
Médias	2,97a	2,93a	2,95						

Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem a 5% de probabilidade de erro tipo 1 pelo teste t-Student.

* probabilidade de erro tipo 1 pelo teste F.

** valores de referência para a espécie bovina (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Maiores concentrações séricas de albumina foram verificadas em ambos as condições sexuais durante o período de seca (Tabela 2.2), quando as médias de temperatura e umidade relativa do ar foram de 33,6 °C e 58% (Tabela 2.1), respectivamente. Assim, o clima seco e com temperaturas elevadas durante o percurso causam estresse e desidratação (MIRANDA-DE LA LAMA *et al.*, 2010), o que pode levar a uma hemoconcentração, aumentando as concentrações de albumina.

Houve interação da concentração de albumina somente entre época do ano e distância de transporte ($P < 0,0001$). Durante o período das chuvas, maiores valores de albumina foram verificados nos animais transportados por >300 km (Tabela 2.2), provavelmente devido ao estresse (KRIZANOVIC *et al.*, 2008) e/ou desidratação. Burns (2014) e Averós *et al.* (2008) também verificaram hiperalbuminemia por desidratação, devido à restrição hídrica durante o transporte por longas distâncias. Entretanto, no período de seca não foi observado efeito de maiores distâncias de transporte sobre os resultados da albumina (EARLEY, MURRAY e PRENDIVILLE, 2010).

Animais transportados por <50 , entre 100-200 e 201-300 km, tiveram maiores concentrações de albumina durante a seca (Tabela 2.2), com maior desidratação devido às altas temperaturas e baixa umidade (MIRANDA-DE LA LAMA *et al.*, 2010).

No entanto, os bovinos transportados por >300 km apresentaram albumina elevada durante a época de chuva (Tabela 2.2), provavelmente por estresse e desidratação mais significativos devido ao maior tempo de viagem e percentual de transporte em estrada não pavimentada (06h45 – 2,86%) em relação ao grupo de animais transportados durante a época de seca (05h30 – 0,62%).

Vale ressaltar que a albumina é considerada um importante agente antioxidante, atuando na proteção celular pela eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e, por isso, a hiperalbuminemia em animais submetidos ao transporte também pode sugerir resposta do organismo ao estresse (KRIZANOVIC *et al.*, 2008). Dessa maneira, considerando que os animais estejam desidratados, o aumento da albumina é relativo e não absoluto envolvendo uma resposta ativa do organismo frente ao estresse.

Na avaliação das PT não foi observada interação entre condição sexual e distância de transporte ($P = 0,3715$) e, assim como nas concentrações de albumina, não houve diferença entre machos e fêmeas (Tabela 2.3). Portanto, pode-se inferir

que as PT e a albumina permaneceram estáveis em ambas as condições sexuais, independentemente da distância percorrida.

Tabela 2.3. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre as proteínas totais (PT) em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.

PT (6,74-7,46 g/dL)**									
C.S	Distâncias (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		C.S	Distância	C.S x Dist.	
Fêmea	8,21	8,04	8,70	8,36	8,33A	0,3620	<0,0001	0,3715	
Macho	8,36	7,90	8,49	8,28	8,26A				
Médias	8,29b	7,97c	8,60a	8,32b	8,29				
Época	Distâncias (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		Época	Distância	Época x Dist.	
Chuva	7,82bB	7,89bA	8,42aB	8,59aA	8,16	<0,0001	<0,0001	<0,0001	6,85
Seca	8,77aA	8,05bA	8,79aA	8,08bB	8,42				
Médias	8,29	7,97	8,60	8,32	8,29				
Época	C.S		Médias	P*					
	Fêmea	Macho		Época	C.S	Época x C.S			
Chuva	8,35aA	7,98bB	8,16	<0,0001	0,3620	<0,0001			
Seca	8,31bA	8,52aA	8,42						
Médias	8,33	8,26	8,29						

Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem a 5% de probabilidade de erro tipo 1 pelo teste t-Student.

* probabilidade de erro tipo 1 pelo teste F.

** valores de referência para a espécie bovina (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Em relação às distâncias, as PT aumentaram significativamente durante o transporte entre 201-300 km (Tabela 2.3), mostrando que os animais desse grupo exibiram mais intensamente os efeitos da privação de água e alimentos (FERREIRA *et al.*, 2009) desenvolvendo desidratação (EARLEY *et al.*, 2012). As maiores distâncias de transporte (>300 km) não influenciaram as concentrações de PT (Tabela 2.3) corroborando com Ishiwata *et al.* (2008), que também não verificaram alteração nas PT após transporte por 1013,1 km, em relação aos valores obtidos no pré-embarque.

No processo de desidratação lenta que pode ocorrer durante o transporte, a perda hídrica se dá inicialmente do líquido extracelular (LEC), o que teria um efeito no aumento das PT. Após algum tempo, há uma tentativa de equilíbrio do organismo transferindo líquido intracelular para o LEC (REECE, 2017; STEPHENSON, 2014) causando uma discreta redução na concentração sérica de proteínas, o que explicaria os valores não tão altos de PT no grupo transportados por >300 km.

Foi verificada interação entre distância de transporte e época do ano ($P < 0,0001$). Durante o período das chuvas constatou-se aumento das PT entre 201-300 e >300 km (Tabela 2.3), provavelmente pelo maior estresse do transporte, associado a altas temperaturas (médias de 30,1 e 30,8 °C), umidade elevada

(médias de 88 e 79%) e restrição hídrica, levando à desidratação (WERNER *et al.*, 2013).

Estudos demonstram que maiores concentrações de PT podem estar associados à maior duração do transporte (EARLEY, MURRAY e PRENDIVILLE, 2010), visto que o tempo de viagem dos animais transportados por 201-300 km (05h30) e >300 km (06h45) foi superior ao transporte por <50 km (01h00) e 100-200 km (3h15). Os animais transportados por >300 km apresentaram aumento da concentração de PT durante a época de chuva (Tabela 2.3), assim como a albumina, devido ao maior tempo de restrição hídrica por viagem longa e maior percentual de deslocamento em estrada não pavimentada.

Entretanto, na época de seca a concentração sérica de PT foi maior no transporte por <50 e entre 201-300 km (Tabela 2.3), possivelmente devido ao efeito do maior percentual de deslocamento em estrada não pavimentada (média de 15%) em comparação às distâncias de 100-200 e >300 km (média de 0,92%) associado a altas temperaturas e baixa umidade principalmente no interior dos caminhões, favorecendo o desenvolvimento do quadro de desidratação (MIRANDA-DE LA LAMA *et al.*, 2010).

Nesta pesquisa foi observada interação entre época do ano e condição sexual ($P < 0,0001$). No período de chuva, as fêmeas apresentaram maiores valores de concentração de PT, enquanto que no período de seca houve aumento nos machos (Tabela 2.3). Estes resultados demonstram que as fêmeas foram mais sensíveis ao estresse por calor causado pelas altas temperaturas e umidade (CINCOVIĆ *et al.*, 2017) tornando-as susceptíveis à desidratação resultante da perda de líquidos por mecanismos evaporativos de dissipação de calor, como respiração e sudorese (SOUZA, SALLES e ARAÚJO, 2012).

Já os machos desenvolveram maior susceptibilidade à desidratação em épocas de baixa umidade e altas temperaturas (Tabela 2.3), portanto, fora da zona de termoneutralidade, causando estresse pelo calor. Nessa situação, a evaporação torna-se o principal processo de perda de calor (FERREIRA *et al.*, 2006) contribuindo para a desidratação.

Nas fêmeas, as concentrações séricas das PT não diferiram entre os períodos de chuva e seca. Entretanto, machos transportados na época de seca apresentaram aumento da concentração das PT em relação ao período de chuva (Tabela 2.3), provavelmente devido à maior desidratação associada ao calor e baixa umidade

relativa do ar. Além disso, nesse período seco houve também maior percentual de viagens percorridas em estradas não pavimentadas (Tabela 2.1).

Na avaliação do hematócrito foi observada interação entre condição sexual e distância ($P= 0,0428$). Nas fêmeas, maiores valores do hematócrito ocorreram durante o transporte por longas distâncias (201-300 e >300 km) (Tabela 2.4), podendo estar relacionado aos mecanismos de estresse, com liberação de catecolaminas que estimulam o baço a liberar maior quantidade de hemácias na circulação (PIGHIN *et al.*, 2013). A elevação do hematócrito também pode ter ocorrido por desidratação, devido à restrição hídrica e alimentar ou por perdas evaporativas (FERREIRA *et al.*, 2009), situações bastante comuns durante o transporte ao frigorífico.

Tabela 2.4. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre o hematócrito em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.

Hematócrito (24-46%)**									
C.S	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		C.S	Distância	C.S x Dist.	
Fêmea	35,98cA	38,22bA	40,19aA	38,50abA	38,24	<0,0001	<0,0001	0,0428	
Macho	36,16aA	36,77aA	36,73aB	36,74aB	36,59				
Médias	36,07	37,51	38,51	37,58	37,41				
Época	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		Época	Distância	Época x Dist.	
Chuva	37,05bA	35,66bB	40,22aA	37,21bA	37,55	0,4676	<0,0001	<0,0001	8,71
Seca	35,09cB	39,27aA	36,71bB	37,90abA	37,27				
Médias	36,07	37,51	38,51	37,58	37,41				
Época	C.S		Médias	P*					
	Fêmea	Macho		Época	C.S	Época x C.S			
Chuva	38,88aA		37,55	0,4676	<0,0001	0,0120			
Seca	37,63aB		37,27						
Médias	38,24	36,59	37,41						

Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem a 5% de probabilidade de erro tipo 1 pelo teste t-Student.

* probabilidade de erro tipo 1 pelo teste F.

** valores de referência para a espécie bovina (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Por outro lado, os valores do hematócrito nos machos mantiveram-se inalterados independentemente das distâncias de transporte (Tabela 2.4). Em relação às distâncias, o hematócrito diferiu entre as condições sexuais somente em longas distâncias de transporte, entre 201-300 e >300 km, sendo os resultados maiores nas fêmeas em comparação aos machos (Tabela 2.4). Esses dados destacam que fêmeas são mais sensíveis aos efeitos do estresse e/ou desidratação, quando percorrem longos trajetos ao frigorífico.

Houve interação entre distância de transporte e época do ano ($P<0,0001$). Durante a época das chuvas, maiores resultados do hematócrito ocorreram nos animais transportados por 201-300 km, enquanto que no período de seca o hematócrito aumentou no transporte em distância menor (100-200 km) (Tabela 2.4).

Esses resultados expressam que o hematócrito é um parâmetro que pode oscilar de maneira relevante em diferentes distâncias, visto que Warriss *et al.* (1995), descreveram que o aumento do hematócrito durante a viagem é rapidamente revertido quando os animais têm acesso à água, na chegada ao destino final. Entretanto, Werner *et al.* (2013), observaram que o hematócrito permaneceu elevado por até 3 semanas após o desembarque devido ao estresse crônico associado ao transporte e privação de água durante 63 horas. Além disso, mesmo a água estando disponível após o desembarque, os animais podem não ter ingerido imediatamente devido ao novo ambiente, visto que só tinham acesso à água dos córregos e não estavam habituados a bebedouros.

Ainda, apesar de não terem sido avaliadas características comportamentais neste trabalho, é possível que esses animais tenham manifestado comportamento agressivo e agitado durante o transporte, refletindo diretamente em maior estresse e aumento do hematócrito (PIGHIN *et al.*, 2013).

Na região geográfica deste estudo, a principal forma de criação é extensiva e pode haver dificuldade em familiarizar os animais com os seres humanos devido o manejo ser esporádico (HUERTAS *et al.*, 2010; ARANTES *et al.*, 2013). Além disso, 83 % dos animais produzidos e abatidos têm predominância zebuína (ANUALPEC, 2014), os quais podem manifestar comportamento agitado quando confrontados com diferentes ambientes e interações humanas (HEMSWORTH *et al.*, 2011),

Em relação às distâncias, os bovinos transportados por <50 e 201-300 km apresentaram elevação do hematócrito no período de chuva (Tabela 2.4), provavelmente devido ao maior estresse e/ou desidratação, associados aos efeitos das altas temperaturas e umidade.

Houve interação entre condição sexual e época do ano ($P= 0,0120$), com o período de chuva resultando em maiores valores do hematócrito nas fêmeas (Tabela 2.4). Isto pode ter ocorrido por maior percentual de deslocamento das fêmeas em estrada não pavimentada (12,41%) em relação aos machos (10,71%), já que nessa época a sua qualidade é bastante comprometida, podendo causar mais incômodo e estresse aos animais durante a viagem (MIRANDA-DE LA LAMA *et al.*, 2011). Por outro lado, no período de seca as altas temperaturas e baixa umidade não tiveram influência sobre o hematócrito em ambas as condições sexuais.

As fêmeas apresentaram aumento do hematócrito durante a seca (Tabela 2.4), quando a umidade está baixa (54%), em comparação ao período chuvoso (84%) manifestando maior desidratação e/ou estresse.

Porém, os machos não demonstraram efeitos da época de seca ou chuva sobre os valores do hematócrito (Tabela 2.4), corroborando com os resultados obtidos por Farooq *et al.* (2017), que também não observaram alteração do hematócrito em bovinos avaliados em clima quente/úmido e quente/seco, devido ao mecanismo adaptativo em resposta ao estresse por calor.

A creatinina é um indicador frequentemente utilizado na avaliação dos efeitos do estresse físico ou função da atividade renal em bovinos (DAS *et al.*, 2012), sendo um produto nitrogenado não proteico, que tem origem no metabolismo muscular da creatina ou fosfocreatina (GREGORY *et al.*, 2004).

Foi verificada interação da creatinina entre condição sexual e distância ($P < 0,0001$). Nas fêmeas, as maiores concentrações plasmáticas de creatinina ocorreram no transporte por >300 km (Tabela 2.5).

Esse resultado pode ter ocorrido por aumento da degradação não enzimática da creatina muscular durante o estresse físico (PIGHIN *et al.*, 2013) ou por desidratação, visto que esses animais passaram por maior período de restrição hídrica/alimentar, levando à queda na perfusão renal e diminuição da sua depuração pelos rins (SRIKANDAKUMAR e JOHNSON, 2004).

Tabela 2.5. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre a creatinina em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.

Creatinina (1-2 mg/dL)**									
C.S	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		C.S	Dist.	C.S x Dist.	
Fêmea	1,57cB	1,71abB	1,69bcB	1,84aA	1,70	<0,0001	0,0801	<0,0001	
Macho	2,07abA	2,16aA	1,94bcA	1,86cA	2,01				
Médias	1,83	1,93	1,81	1,85	1,86				
Época	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		Época	Dist.	Época x Dist.	
Chuva	1,79aA	1,78aB	1,64bB	1,77abB	1,74	<0,0001	0,0801	0,0358	15,69
Seca	1,87bA	2,07aA	1,99abA	1,92bA	1,96				
Médias	1,83	1,93	1,81	1,85	1,86				
Época	C.S		Médias	P*			CV (%)		
	Fêmea	Macho		Época	C.S	Época x C.S			
Chuva	1,60	1,89	1,74B	<0,0001	<0,0001	0,3503			
Seca	1,80	2,13	1,96A						
Médias	1,70b	2,01a	1,86						

Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem a 5% de probabilidade de erro tipo 1 pelo teste t-Student.

* probabilidade de erro tipo 1 pelo teste F.

** valores de referência para a espécie bovina (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Os machos demonstraram aumento da creatinina nos transportes por <50 e entre 100-200 km (Tabela 2.5), provavelmente por maior estresse físico relacionado ao maior percentual de estrada não pavimentada percorrido, com 28,57 e 15,5%, respectivamente, em relação aos machos transportados por 201-300 e >300 km.

Em relação às distâncias, foi observado que nos transportes por <50, entre 100-200 e 201-300 km, houve aumento da creatinina nos machos, em relação às fêmeas (Tabela 2.5). Esse resultado também pode ter ocorrido por maior tempo de viagem e percentual de transporte em estrada não pavimentada (28,57, 15,5 e 1,1%, respectivamente), causando mais estresse físico.

Entretanto, durante o transporte por >300 km não houve diferença nas concentrações de creatinina entre machos e fêmeas (Tabela 2.5), provavelmente por terem sido submetidos a um tempo de vigem e percentual de estradas não pavimentadas similares durante o trajeto.

Foi constatada interação entre época do ano e distância de transporte ($P=0,0358$). No período de chuva, maiores concentrações de creatinina foram observadas no transporte por <50 e entre 100-200 km (Tabela 2.5), sendo que nessas distâncias os animais possivelmente desenvolveram maior estresse físico por serem transportados por maior percentual em estrada não pavimentada (27,77 e 17,41%, respectivamente), em relação ao transporte entre 201-300 e >300 km (1,06 e 2,86%, respectivamente).

Contudo, durante a época de seca o aumento da concentração de creatinina foi observado somente no transporte entre 100-200 km (Tabela 2.5), provavelmente tendo com a principal causa a desidratação, visto que o hematócrito e a albumina também apresentaram maiores valores nessa mesma distância e época do ano.

A avaliação da concentração de creatinina não revelou interação entre condição sexual e época do ano ($P=0,3503$). Maiores valores de creatinina ocorreram no período de seca (Tabela 2.5), assim como a albumina, indicando algum grau de desidratação nos animais transportados nas épocas quentes e com baixa umidade (PHILLIPS e SANTURTUN, 2013).

Em relação à condição sexual, os machos apresentaram aumento na concentração plasmática da creatinina, influenciado provavelmente pelo maior desenvolvimento da musculatura (SERDAR *et al.*, 2001). Isso ocorre pela ligação da testosterona aos receptores musculares, agregando maior quantidade de

aminoácidos em proteínas e, conseqüentemente, promovendo o aumento da massa muscular (DAYTON e WHITE, 2008).

Na análise da concentração sérica de ureia foi constatada interação entre condição sexual e distância de transporte ($P < 0,0001$). Fêmeas e machos apresentaram elevação da ureia plasmática, quando percorrem maiores distâncias (Tabela 2.6).

Tabela 2.6. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre a ureia em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.

Ureia (6-27 mg/dL)**									
C.S	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		C.S	Dist.	C.S x Dist.	
Fêmea	34,71bA	30,70cA	36,96bA	44,21aA	36,33	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
Macho	30,65cB	31,55bcA	34,07abB	35,73aB	32,92				
Médias	32,57	31,11	35,56	39,79	34,61				
Época	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		Época	Dist.	Época x Dist.	
Chuva	33,15cA	31,71cA	38,76bA	45,26aA	36,89	<0,0001	<0,0001	<0,0001	16,13
Seca	31,99bA	30,55bA	32,18bB	35,05aB	32,40				
Médias	32,57	31,11	35,56	37,79	34,61				
Época	C.S		Médias	P*			CV (%)		
	Fêmea	Macho		Época	C.S	Época x C.S			
Chuva	38,45	35,37	36,89A	<0,0001	<0,0001	0,4668			
Seca	34,30	30,53	32,40B						
Médias	36,33a	32,92b	34,61						

Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem a 5% de probabilidade de erro tipo 1 pelo teste t-Student.

* probabilidade de erro tipo 1 pelo teste F.

** valores de referência para a espécie bovina (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Elevações nas concentrações ocorrem em razão de qualquer processo que aumente o catabolismo proteico, como a hipercortisolemia decorrente do estresse ou por restrição alimentar durante o transporte (KNOWLES, WARRISS e VOGEL, 2014). Também pode ocorrer em casos de desidratação, quando há menor taxa de filtração glomerular e, conseqüentemente, maior reabsorção da ureia nos túbulos proximais, causando azotemia pré-renal (MEUTEN, 2012).

Em relação às distâncias, tanto em curtas (<50 km) quanto em longas viagens (entre 201-300 e >300 km) as fêmeas apresentaram maiores concentrações de ureia plasmática (Tabela 2.6), provavelmente por maior reatividade ao estresse (ADZITEY, 2011), relacionada à oscilação hormonal, mais acentuada nas fêmeas (HARD e HANSEN, 1985), principalmente pela ação do estrógeno que tem efeito importante sobre o comportamento agitado e agressivo (LAREDO e TRAINOR, 2012). As fêmeas também tiveram aumento do hematócrito em longas distâncias, refletindo maior sensibilidade ao estresse do transporte.

A avaliação das concentrações séricas da ureia também demonstrou interação entre distância de transporte e época do ano ($P < 0,0001$). Em ambas as

épocas do ano, maiores valores da ureia foram verificados durante o transporte por longas distâncias (Tabela 2.6). Assim, animais que percorrem maior trajeto ao frigorífico passaram por mais tempo sob restrição hídrica refletindo num quadro de desidratação (MEUTEN, 2012) e também exibiram maiores efeitos do estresse e da restrição alimentar sobre a degradação de proteínas (KNOWLES, WARRISS e VOGEL, 2014), independentemente se o período foi seco (calor e baixa umidade) ou chuvoso (calor e alta umidade).

Entretanto, a concentração plasmática da ureia foi mais elevada nos animais transportados por maiores distâncias (entre 200-300 e >300 km) na época chuvosa. Nesse caso, pode-se inferir que viagens longas, onde há maior período de restrição alimentar, e em períodos de calor e umidade alta causam mais estresse e afetam de maneira mais significativa a degradação proteica, em relação à época de seca.

Os valores reduzidos de ureia também podem ser indicativos de estresse psicológico, visto que existem situações em que o estresse severo causa hipercortisolemia, estimulando a diurese (PARKER *et al.*, 2003). Isso provoca perda de água e eletrólitos e, associado ao efeito da hiperglicemia sobre o aumento da taxa de filtração glomerular, há um maior fluxo tubular nos néfrons, aumentando a excreção da ureia, com redução de sua concentração sérica (MORGAN, RYAN e BARRATT, 1987). Tal fato demonstra que animal transportado, independente da distância, sofre algum tipo de estresse que reflete em alterações nas concentrações de ureia.

No presente trabalho, os resultados da ureia foram superiores aos valores de referência (KANEKO, HARVEY e BRUSS, 2008) em todos os animais. Assim, podemos inferir que o efeito do estresse sobre a degradação de proteínas e/ou surgimento de um quadro de desidratação podem ocorrer em ambos as condições sexuais transportados por curtas ou longas distâncias nas diferentes épocas do ano.

Nas avaliações da atividade sérica da CK, foi verificada interação entre condição sexual e distância de transporte ($P < 0,0001$). Nas fêmeas, a atividade sérica da CK foi maior no transporte entre 100-200 km, apresentando redução em trajetos mais longos, entre 201-300 e >300 km (Tabela 2.7).

Tabela 2.7. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre a creatina quinase (CK) em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.

CK (35-280 U/L)**									
C.S	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		C.S	Dist.	C.S X Dist.	
Fêmea	589bB	1424aA	628bA	846bB	884	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
Macho	1091bA	1247abA	494cA	1410aA	1064				
Médias	853	1338	563	1141	975				
Época	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		Época	Dist.	Época x Dist.	
Chuva	946aA	871aB	401bB	683aB	727	<0,0001	<0,0001	<0,0001	62,88
Seca	760bA	1782aA	733bA	1537aA	1215				
Médias	853	1338	563	1141	975				
Época	C.S		Médias	P*			CV (%)		
	Fêmea	Macho		Época	C.S	Época x C.S			
Chuva	578	872	727B	<0,0001	<0,0001	0,1130			
Seca	1178	1251	1215A						
Médias	884b	1064a	975						

Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem a 5% de probabilidade de erro tipo 1 pelo teste t-Student.

* probabilidade de erro tipo 1 pelo teste F.

** valores de referência para a espécie bovina (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Alta atividade de CK no sangue é indicativa de estresse físico e lesão muscular (MPAKAMA, CHULAYO e MUCHENJE, 2014). O aumento da atividade da CK nos grupos que percorreram distâncias curtas (100-200 km), pode ter ocorrido por estresse físico adicional durante o período de repouso, após a chegada ao frigorífico (MARENČIĆ *et al.*, 2009) pois nesse momento, os animais são misturados novamente em um mesmo curral (KENNY e TARRANT, 1987) podendo causar perturbação e atividade física intensa (PRICE e TENNESSEN, 1981).

Por outro lado, menor atividade sérica de CK em longas distâncias (201-300 km e >300 km), pode estar relacionada ao manejo adequado, com animais sendo bem tratados durante o período pré-abate, reduzindo os efeitos do estresse físico (BROOM, 2005). Ainda, este dado pode indicar a observância de um tempo ideal de descanso nos currais de espera pelo frigorífico, depois de serem descarregados, importante para animais que percorrem longos percursos (MARENČIĆ *et al.*, 2009).

Nos machos, a maior atividade sérica da CK ocorreu durante o transporte por >300 km (Tabela 2.7), corroborando com Chulayo e Muchenje (2017), que referem aumento da CK em animais transportados por longas distâncias. Essa alteração ocorre por lesão muscular, com ruptura da membrana celular durante o transporte (BAIRD *et al.*, 2012). Aumento da atividade sérica de CK é um indicativo de estresse relacionado ao manejo e distância percorrida ao frigorífico (MINKA e AYO, 2010). A restrição alimentar e o tempo de espera para o abate são fatores que também podem contribuir para elevar os níveis de CK na circulação (TEKE *et al.*, 2014).

Em relação às distâncias, machos transportados por <50 km e >300 km apresentaram maiores valores de CK, em comparação às fêmeas (Tabela 2.7). Dessa forma, a condição sexual pode interferir na resposta ao estresse e na atividade sérica da CK, visto que os machos tendem a manifestar comportamento mais agressivo e serem mais sensíveis ao estresse físico que as fêmeas durante o transporte (MOTA-ROJAS *et al.*, 2006; MPAKAMA, CHULAYO e MUCHENJE, 2014). Os machos utilizados não eram castrados e, por isso, poderiam ser mais reativos em ambientes instáveis devido ao reagrupamento social durante o período pré-abate, aumentando a agressividade e a probabilidade de lesões (MOUNIER *et al.*, 2006).

O comportamento agressivo é bastante complexo e pode ser influenciado por fatores genéticos, fisiológicos, sociais e ambientais (TRAINOR, KYOMEN e MARLER, 2006), sendo controlado por mecanismos neuroendócrinos (GOODSON, 2005). Nesse caso, a testosterona é responsável pela ativação de regiões cerebrais (hipotalâmicas e límbicas) que desencadeiam a agressividade nos machos (TRAINOR, KYOMEN e MARLER, 2006).

Entretanto, nas distâncias intermediárias, entre 100-200 e 201-300 km, não houve diferença nas atividades séricas da CK entre as condições sexuais (Tabela 2.7). Nesse caso, ou as fêmeas e machos passaram por condições semelhantes de estresse físico e/ou lesões musculares, ou os machos foram submetidos a melhores condições de manejo durante o período pré-abate e transporte (BROOM, 2005) e descanso no frigorífico (MARENČIĆ *et al.*, 2009), minimizando os efeitos comportamentais sobre os níveis da CK.

Foi observada interação da atividade da CK entre distância e época do ano ($P < 0,0001$). Na época de chuva, maiores valores de CK foram observados nos animais transportados por <50, entre 100-200 e >300 km (Tabela 2.7) possivelmente por terem sido transportados por maior percentual em estrada não pavimentada (<50 km: 27,8%, 100-200 km: 17,41%, >300 km: 2,86%) em relação ao transporte por 200-300 km (1%).

Nesse período, as estradas não pavimentadas ficam em condições mais precárias devido às chuvas, podendo causar mais vibrações, desconforto, desequilíbrio e estresse (MIRANDA-DE LA LAMA *et al.*, 2011). Dessa forma, há dificuldade para os animais manterem a postura corporal no veículo em movimento, sendo exigidos fisicamente o suficiente para causar fadiga e exaustão (LAMBERT,

ST CLAIR GIBSON e NOAKES, 2005). Essas situações podem propiciar lesões musculares e/ou estresse físico, aumentando a atividade sérica da CK (MPAKAMA, CHULAYO e MUCHENJE, 2014).

Na época de seca, a atividade da CK, bem como da AST, aumentou durante o transporte entre 100-200 e >300 km (Tabela 2.7), mostrando que esses animais possivelmente desenvolveram mais lesões musculares e/ou estresse físico, em comparação aos animais transportados por <50 e entre 201-300 km.

Em relação às distâncias, animais que percorreram curtos trajetos ao frigorífico (<50 km) não demonstraram influência da época do ano sobre os valores da CK (Tabela 2.7). Entretanto, bovinos transportados entre 100-200, 201-300 e >300 km, apresentaram aumento da atividade de CK na época de seca (33,3 °C e 58,5% de umidade) em relação à época de chuva (31,3 °C e 84% de umidade).

Nesse caso, o transporte em períodos com temperaturas elevadas e baixa umidade estão associados a diferentes fatores de estresse que afetam a saúde dos animais (MINKA e AYO, 2007), resultando em estresse físico e, conseqüentemente, elevação da atividade sérica da CK (MIRANDA-DE LA LAMA *et al.*, 2011).

Não houve interação da atividade da CK entre época do ano e condição sexual ($P= 0,1130$). Como previamente descrito, os resultados da atividade sérica da CK indicam que o trajeto percorrido ao frigorífico em períodos quentes e secos, causa maior estresse físico (fadiga, exaustão). No que se refere à condição sexual, maiores valores de CK foram observados nos machos, decorrentes provavelmente do comportamento mais agitado e agressivo, comparado às fêmeas (MPAKAMA, CHULAYO e MUCHENJE, 2014).

Atividade sérica da CK estava acima dos valores de referência (KANEKO, HARVEY e BRUSS, 2008) em todos os animais deste experimento, ou seja independentemente da distância de transporte, época do ano e condição sexual, os animais sofreram algum tipo de lesão muscular.

Os resultados da avaliação da atividade sérica da AST revelam não haver interação entre condição sexual e distância de transporte ($P= 0,0780$). A AST é uma enzima presente em concentrações elevadas nos hepatócitos e células musculares (ALLISON, 2012), responsável por catalisar a transaminação do L-aspartato e 2-oxoglutarato à oxaloacetato e glutamato (HOFFMANN e SOLTER, 2008), de extrema importância no metabolismo de aminoácidos.

Nas situações em que existe algum dano na membrana plasmática da miofibrila ou necrose das fibras musculares, a AST pode extravasar das células e ser captada pela corrente sanguínea. Dessa forma, a atividade sérica da AST é usada como indicador de lesão muscular (VALENTINE e McGAVIN, 2009).

Do mesmo modo que a CK, a atividade sérica da AST também foi maior nos machos em relação às fêmeas (Tabela 2.8), evidenciando o efeito da condição sexual sobre o estresse físico e/ou danos musculares.

Tabela 2.8. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre a aspartato aminotransferase (AST) em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.

AST (78-132 U/L)**									
C.S	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		C.S	Dist.	C.S x Dist.	
Fêmea	97,90	128,43	98,18	110,22	109,05B	<0,0001	<0,0001	0,0780	
Macho	117,22	148,68	97,78	136,07	125,05A				
Médias	108,07c	138,30a	97,98c	123,71b	117,13				
Época	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		Época	Dist.	Época x Trat.	
Chuva	102,60abA	116,01aB	91,65bA	104,02abB	103,55	<0,0001	<0,0001	0,0153	28,96
Seca	113,54cA	159,47aA	104,66cA	140,73bA	130,25				
Médias	108,07	138,30	97,98	123,71	117,13				
Época	C.S		Médias	P*					
	Fêmea	Macho		Época	C.S	Época x C.S			
Chuva	93,30	113,53	103,55B	<0,0001	<0,0001	0,2626			
Seca	124,16	136,26	130,25A						
Médias	109,05b	125,05a	117,13						

Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem a 5% de probabilidade de erro tipo 1 pelo teste t-Student.

* probabilidade de erro tipo 1 pelo teste F.

** valores de referência para a espécie bovina (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Em relação às distâncias, maiores valores da AST ocorreram no transporte entre 100-200 e >300 km (Tabela 2.8), assim como os valores médios da CK, indicando que os animais que percorreram essas distâncias apresentaram maior estresse físico e lesão muscular.

A AST também pode aumentar por baixa perfusão sanguínea no tecido muscular, redução na dissipação do calor, hipóxia e fadiga, ocasionados pelo estresse durante o embarque e transporte (TADICH *et al.*, 2005; LOPEZ *et al.*, 2006). De acordo com Averós *et al.* (2008), esses fatos se tornam mais evidentes quando os animais são manejados incorretamente durante o manejo pré- e pós-transporte.

A interação da atividade da AST foi significativa para distância de transporte e época do ano (P= 0,0153). Durante o período chuvoso, a maior atividade sérica da AST foi observada nos animais transportados entre 100-200 km (Tabela 2.8),

revelando que em épocas de calor e umidade elevada não há efeito de trajetos percorridos por maiores distâncias sobre a atividade da AST.

Esses resultados corroboram com Ishiwata *et al.* (2008), que reportam que animais transportados por longas distâncias (1013 km) não exibiram alteração na atividade sérica de AST, provavelmente por condições apropriadas de transporte, como baixa densidade de carga, tempo de descanso adequado e fornecimento de água e alimento, minimizando os efeitos estressores da viagem.

De forma semelhante à atividade sérica da CK, na época de seca, maior atividade da AST foi verificada no transporte entre 100-200 e >300 km. Assim, podemos concluir que esses animais foram submetidos a situações de maior fadiga/exaustão e danos musculares.

Não foi observada interação entre época do ano e condição sexual ($P=0,2626$). Em relação a época do ano, maior atividade sérica da AST e também da CK foi constatada na época de seca em relação ao período chuvoso (Tabela 8). Desta maneira, pode-se inferir que ambientes com baixa umidade e alta temperatura causam maior estresse térmico, refletindo em maior atividade física ou danos musculares.

O lactato é utilizado como indicador de atividade física e tem sua produção elevada tanto no músculo quanto no plasma de animais submetidos a exercícios intensos e extenuantes, como resultado de um aumento no metabolismo anaeróbico da glicose (KNOWLES, WARRISS e VOGEL, 2014).

A análise das concentrações plasmáticas do lactato demonstrou interação entre condição sexual e distância de transporte ($P<0,0001$). As fêmeas apresentaram elevação do lactato à medida que aumentou a distância de transporte (Tabela 2.9). Por outro lado, os machos apresentaram maiores valores de lactato no transporte por <50 km, enquanto nos transportes acima de 100 km a concentração do lactato se manteve estável em níveis mais baixos (Tabela 2.9).

Tabela 2.9. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre o lactato enzimático em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.

Lactato enzimático (5-20 mg/dL)**									
C.S	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		C.S	Dist.	C.S x Dist.	
Fêmea	91,56cB	110,07bA	123,31aA	116,95abA	110,50	<0,0001	0,2533	<0,0001	
Macho	104,62aA	86,08bB	86,86bB	80,94bB	89,98				
Médias	98,43	98,38	105,58	98,16	100,14				
Época	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		Época	Dist.	Época x Dist.	
Chuva	106,07aA	104,02aA	113,82aA	89,78bB	103,98	0,0255	0,2533	0,0032	28,83
Seca	90,79bB	93,02abA	96,88abB	105,41aA	96,42				
Médias	98,43	98,38	105,58	98,16	100,14				
Época	C.S		Médias	P*					
	Fêmea	Macho		Época	C.S	Época x C.S			
Chuva	118,89aA	89,48bA	103,98	0,0255	<0,0001	0,0099			
Seca	102,46aB	90,45bA	96,42						
Médias	110,50	89,98	100,14						

Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem a 5% de probabilidade de erro tipo 1 pelo teste t-Student.

* probabilidade de erro tipo 1 pelo teste F.

** valores de referência para a espécie bovina (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Resultados semelhantes foram descritos por Bulitta, Aradom e Gebresenbet (2015) que verificaram crescimento linear das concentrações de lactato em vacas, associado a maiores distâncias e tempos de transporte, devido às atividades musculares extenuantes e prolongadas.

Alguns fatores devem ser levados em consideração ao analisarmos os níveis de lactato plasmático. Dentre estes, animais transportados em boas condições físicas e nutricionais, com reservas adequadas de glicogênio muscular, podem minimizar a síntese de lactato em resposta aos agentes estressores (MIRANDA-DE LA LAMA *et al.*, 2010). Dessa forma, as vacas eliminadas do rebanho de cria (vacas de descarte), por serem consideradas uma categoria de baixa eficiência alimentar no sistema produtivo de corte, normalmente são terminadas em pastagens com variações qualitativas e quantitativas durante o ano (MOURA *et al.*, 2013), fato que pode refletir em condição nutricional inferior aos machos e, conseqüentemente, em maior susceptibilidade das fêmeas apresentarem elevação da concentração plasmática do lactato.

Outro fator importante é a capacidade de adaptação dos animais durante o transporte. Isso pode acontecer por redução do efeito da distância na síntese de lactato, devido à adaptação às condições adversas, expressando menor estresse. Assim, há menor liberação de catecolaminas e redução na quebra do glicogênio muscular (CHACON *et al.*, 2005). Esses dados podem explicar o fato dos machos transportados por maiores distâncias não terem apresentado efeito significativo na produção de lactato.

Em relação às distâncias, no transporte por <50 km maiores níveis de lactato foram verificados nos machos enquanto que nas demais distâncias o lactato aumentou nas fêmeas (Tabela 2.9). Isso mostra que, em curtas distâncias os machos são mais susceptíveis aos efeitos do estresse sobre a síntese de lactato que as fêmeas.

Houve efeito significativo da interação entre distância e época do ano nas concentrações do lactato ($P= 0,0032$). Na época de chuva, maiores concentrações de lactato ocorreram no transporte por <50, entre 100-200 e 201-300 km, reduzindo no transporte por >300 km (Tabela 2.9). Assim, pode-se inferir que nos períodos de calor e alta umidade (31,2 °C e 83%), os animais transportados por longas distâncias (>300 km) manifestaram menos os efeitos do estresse sobre a produção de lactato.

Trabalhos constataram redução do lactato após o transporte por 300 km, em comparação com valores obtidos antes da viagem, provavelmente por maior atividade e estresse físico durante o embarque (CAFAZZO *et al.*, 2012).

Por outro lado, na época de seca a produção de lactato foi maior nos animais transportados por >300 km. Dessa forma, o transporte percorrido por trajetos maiores ao frigorífico, nos períodos de temperaturas elevadas e baixa umidade (33,3 °C e 58,5%), causa maior estresse físico, resultando em aumento da concentração de lactato plasmático. Os resultados do estudo corroboram com Uetake *et al.* (2009), que descrevem elevação do lactato em bovinos após serem transportados por longas distâncias (média de 306,9km).

Houve interação do lactato entre época do ano e condição sexual ($P= 0,0099$). As fêmeas apresentaram maiores valores de concentração de lactato em comparação aos machos, tanto na época de chuva quanto na de seca (Tabela 2.9), provavelmente por serem mais reativas ao estresse (ADZITEY, 2011) devido às maiores variações hormonal (HARD e HANSEN, 1985), independente da época do ano. O baixo valor comercial das fêmeas em relação aos machos (VAZ *et al.*, 2014), pode torná-las mais susceptíveis ao manejo inadequado por parte dos vaqueiros (ROMERO, GUTIÉRREZ e SÁNCHEZ, 2012), colaborando para o estabelecimento do estresse físico e aumento na síntese de lactato.

Na comparação entre as fêmeas transportadas nas distintas épocas do ano, verificou-se aumento do lactato durante a época de chuva (Tabela 2.9),

provavelmente por terem sido transportadas por maior percentual em estrada não pavimentada (12,41%) que na época de seca (0,84%).

Outras pesquisas descrevem aumento significativo do lactato em animais transportados por estrada não pavimentada, possivelmente por maior exigência energética necessária para adaptação às vibrações e solavancos, gerando mais estresse (TADICH *et al.*, 2009). Nessas condições, há maior liberação de adrenalina e, conseqüentemente, aumento na degradação do glicogênio muscular e na síntese de lactato (BOND, CAN e WARNER, 2004).

O lactato não diferiu nos machos durante as épocas de chuva e seca (Tabela 2.9). Resultados semelhantes foram encontrados por Ishiwata *et al.* (2008), com bovinos machos transportados durante o verão e inverno, apresentando concentrações similares de lactato, indicando que não há efeito dos diferentes períodos do ano sobre a quebra do glicogênio muscular e síntese do lactato.

Em relação às concentrações plasmáticas de glicose, foi observada interação entre condição sexual e distância de transporte ($P < 0,0001$). Nos machos, maiores concentrações de glicose ocorreram no transporte por < 50 km, enquanto que nas fêmeas isso foi observado no transporte por < 50 , entre 100-200 e 201-300 km, reduzindo quando foram transportadas por > 300 km (Tabela 2.10).

Tabela 2.10. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre a glicose em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.

Glicose (45-75 mg/dL)**									
C.S	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		C.S	Dist.	C.S x Dist.	
Fêmea	209,06aA	206,83aA	216,68aA	154,15bA	198,10				
Macho	185,23aA	156,60bB	157,75bB	163,19abA	166,09	<0,0001	<0,0001	<0,0001	
Médias	196,52	182,36	188,01	158,87	181,93				
Época	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		Época	Dist.	Época x Dist.	
Chuva	188,76aA	190,76aA	157,92bB	134,90bB	169,45				
Seca	204,27aA	174,38bA	219,77aA	179,59bA	194,01	<0,0001	<0,0001	<0,0001	28,07
Médias	196,52	182,36	188,01	158,87	181,93				
Época	C.S		Médias	P*					
	Fêmea	Macho		Época	C.S	Época x C.S			
Chuva	165,86aB	172,94aA	169,45						
Seca	229,05aA	159,42bA	194,01	<0,0001	<0,0001	<0,0001			
Médias	198,10	166,09	181,93						

Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem a 5% de probabilidade de erro tipo 1 pelo teste t-Student.

* probabilidade de erro tipo 1 pelo teste F.

** valores de referência para a espécie bovina (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

A hiperglicemia provavelmente está relacionada à resposta inicial durante o estresse do transporte, pelo aumento na liberação de catecolaminas (adrenalina/noradrenalina) e glicocorticoides (cortisol) na circulação. Estes

hormônios estimulam glicogenólise hepática, elevando a glicose plasmática (KNOWLES, WARRISS e VOGEL, 2014). A hiperglicemia também pode ocorrer por inibição da insulina e liberação do glucagon durante a restrição alimentar. Conseqüentemente, há ativação da gliconeogênese e glicogenólise hepáticas, inibição da síntese de glicogênio e da oxidação da glicose pela glicólise no fígado (NELSON e COX, 2014).

Resultados semelhantes foram encontrados por Chulayo, Bradley e Muchenje (2016), que relatam aumento da glicose plasmática nos animais transportados por <200 km e redução naqueles transportados entre 200-400 e 400-800 km.

Esta variação ocorre porque nos estágios iniciais do transporte, a glicose tende a permanecer alta. Contudo, após viagem mais distante (200-400 e 400-800 km), os animais apresentam redução da glicose plasmática devido ao estresse ambiental e esgotamento físico (CHULAYO, BRADLEY e MUCHENJE, 2016).

Em relação às distâncias de transporte, não houve diferença na concentração plasmática da glicose entre machos e fêmeas transportados por curtas (<50 km) e longas (>300 km) distâncias. No entanto, nos transportes por distâncias intermediárias (100-200 e 201-300 km), as fêmeas apresentaram aumento da glicose plasmática em relação aos machos (Tabela 2.10).

Nesses casos, pode ter havido influência do tempo de transporte sobre a glicemia. Os machos e fêmeas transportados por <50 km (fêmeas = 55 min. e machos = 50 min.) e >300 km (fêmeas = 06h15 e machos = 06h20) tiveram tempo de viagem semelhante (Tabela 2.1) e, por isso, os efeitos do estresse do transporte sobre a glicemia foram similares.

Por outro lado, o tempo de transporte das fêmeas que percorreram entre 100-200 km (02h30) e 201-300 km (03h30) foi menor que dos machos (03h00 e 06h15, respectivamente). Assim, o maior período de tempo que os machos permaneceram em viagem pode ter sido suficiente para desencadear aumento na utilização da glicose como fonte de energia e, conseqüentemente, redução da glicemia (SHAW e TUME, 1992).

Houve interação entre época do ano e distância de transporte na avaliação da glicose ($P < 0,0001$). Durante a época de chuva, a concentração de glicose plasmática foi maior no transporte por <50 e entre 100-200 km, reduzindo entre 201-300 e >300 km (Tabela 2.10), indicando que o aumento da glicemia devido ao

estresse ocorre em distâncias mais curtas, com redução em longas distâncias por exaustão física (CHULAYO, BRADLEY e MUCHENJE, 2016).

Animais transportados por <50 e entre 100-200 km, percorreram maior percentual em estrada não pavimentada (27,77% e 17,41%, respectivamente) em relação ao transporte entre 201-300 e >300 km (1,06% e 2,86%, respectivamente).

Na época de seca, houve oscilação da glicemia entre as diferentes distâncias. Maiores valores da glicose foram verificados nos animais transportados por <50 e entre 201-300 km devido ao estresse (KNOWLES, WARRISS e VOGEL, 2014) e sua redução no transporte entre 100-200 e >300 km, provavelmente por maior exaustão (CHULAYO, BRADLEY e MUCHENJE, 2016) e requerimento da glicose como substrato energético (SHAW e TUME, 1992). Diferentes tipos e gravidades do estresse aos quais os animais são submetidos têm efeito significativo na oscilação da glicemia (RAMIN, 1995).

A glicemia observada no presente trabalho está acima dos valores de referência (KANEKO, HARVEY e BRUSS, 2008), em todos os grupos. Isso revela que, independente da distância, os animais sofrem efeitos significativos do estresse no metabolismo de carboidratos.

Em relação às distâncias, no transporte por <50 e entre 100-200 km a concentração de glicose foi similar na época de chuva e seca (Tabela 2.10), ou seja, em viagens mais curtas os animais não sofrem influência da época do ano sobre a glicemia. Entretanto, nos transportes entre 201-300 e >300 km maiores níveis de glicose ocorreram durante a época de seca, que tem como características temperaturas elevadas e baixa umidade. De acordo com Minka e Ayo (2007), o transporte de bovinos durante período quente e seco foi uma atividade incomum para os animais, causando mais estresse e, conseqüentemente, prejudicando a saúde e a produtividade, e que podem ter contribuído para o aumento da glicemia nesses animais.

Houve interação significativa entre condição sexual e época do ano ($P < 0,0001$). Durante a época de chuva, a glicose não diferiu entre machos e fêmeas (Tabela 2.10), corroborando com Chulayo, Bradley e Muchenje (2016).

Entretanto, na época de seca, maiores valores da glicose ocorreram nas fêmeas, possivelmente por serem mais susceptíveis ao estresse (ADZITEY, 2011) em período quente/seco. Ainda, a redução da glicose plasmática nos machos, nesse mesmo período, pode estar associada à exaustão física (CHULAYO, BRADLEY e

MUCHENJE, 2016), pois percorreram a distância em maior tempo (04h10) que as fêmeas (03h00).

Em relação à condição sexual, não houve diferença na glicemia entre os machos transportados na época de chuva e seca. Esses dados concordam com Scharf *et al.* (2010), que relatam não haver efeito da época do ano no nível de glicose em bovinos *Bos indicus* submetidos ao estresse por calor, sugerindo um equilíbrio calórico em raças termicamente adaptadas.

Foi observada interação do pH_u entre condição sexual e distância (P<0,0001). Nas fêmeas, o pH_u aumentou significativamente durante distâncias curtas (<50 km) e intermediárias (201-300 km) (Tabela 2.11).

Tabela 2.11. Efeito de diferentes distâncias de transporte, condição sexual (C.S) e época do ano sobre o pH final (pH_u) da carcaça em bovinos transportados ao frigorífico localizado em Araguaína-TO, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018.

pH _u									
C.S	Distância (km)				Médias	P*			CV (%)
	<50	100-200	201-300	>300		C.S	Dist.	C.S x Dist.	
Fêmea	5,83aA	5,68bB	5,84aA	5,77abB	5,78	0,0069	0,4726	<0,0001	
Macho	5,78bA	5,98aA	5,73bB	5,90aA	5,85				
Médias	5,80	5,82	5,78	5,84	5,81				
Época	Distância (km)				Médias	P*			3,56
	<50	100-200	201-300	>300		Época	Dist.	Época x Dist.	
Chuva	5,71bB	5,83aA	5,83aA	5,66bB	5,76	<0,0001	0,4726	<0,0001	
Seca	5,89bA	5,82bcA	5,73cB	5,99aA	5,86				
Médias	5,80	5,82	5,78	5,84	5,81				
Época	C.S		Médias	P*					
	Fêmea	Macho		Época	C.S	Época x C.S			
Chuva	5,76aA	5,76aB	5,76	<0,0001	0,0069	0,0023			
Seca	5,79bA	5,93aA	5,86						
Médias	5,78	5,85	5,81						

Médias seguidas por letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas diferem a 5% de probabilidade de erro tipo 1 pelo teste t-Student.

* probabilidade de erro tipo 1 pelo teste F.

A mensuração do pH final (pH_u) é utilizada para avaliar a qualidade da carne em nível comercial (VILLARROEL *et al.*, 2001), sendo considerado pH_u normal (5,4-5,79), pH_u intermediário (5,8-6,19) e pH_u elevado (>6,2) (WULF *et al.*, 2002). O limite de pH_u para a classificação de carne “Dark, Firm, Dry” (DFD) é acima de 6,0; no entanto, alguns autores consideram DFD a carne com pH a partir de 5,8 (ENGLAND *et al.*, 2016).

Durante as operações pré-abate, os animais são expostos a uma série de potenciais estressores que podem comprometer o bem-estar, saúde e desempenho (MIRANDA-DE LA LAMA, VILLARROEL e MARÍA, 2014). Nesse ponto, inicia-se uma cascata de reações no organismo, com ativação do sistema simpático adrenomedular e do eixo hipotálamo pituitária adrenal, aumentando os níveis de

catecolaminas e glicocorticoides (ERIKSEN *et al.*, 2013) que alteram o metabolismo energético, incluindo a lipólise, glicogenólise muscular e a gliconeogênese (KUCHEL, 1991).

Portanto, fêmeas transportadas por <50 e entre 201-300 km, apresentaram maior degradação do glicogênio no músculo (GUÀRDIA *et al.*, 2005) e a glicólise *post-mortem* produziu menores concentrações de ácido láctico, elevando o pH_u da carne (JIMENEZ FILHO, 2012).

Maiores resultados do pH_u em animais que percorreram trajetos mais curtos, podem estar relacionados ao menor tempo de adaptação às novas condições durante o transporte, fazendo com que os animais cheguem ao frigorífico com baixas reservas de glicogênio (SANZ *et al.*, 1996).

As fêmeas transportadas por longas distâncias (>300 km) (Tabela 2.11) exibiram pH_u dentro dos valores considerados normais (WULF *et al.*, 2002), corroborando com Morais *et al.* (2015), que também não encontraram impacto de maiores distâncias de transporte sobre o pH_u de fêmeas bovinas. Esses dados mostram que o nível de estresse relacionado ao transporte é variável e depende das situações que prevalecem durante a viagem (TARRANT, 1990).

Segundo Tarrant e Grandin (1993), existem outros fatores associados ao transporte e a distância pode não ser necessariamente o fator mais importante em relação ao bem-estar animal. Viagens curtas em condições precárias podem prejudicar mais os animais do que trajetos longos em rodovias com boas condições de transporte.

Nos machos, houve aumento do pH_u no transporte por 100-200 e >300 km (Tabela 2.11). Esses resultados concordam com Romero *et al.* (2017), que relatam maior pH_u associado com transportes por longos períodos (\cong 300 km, entre 8 e 9 h de viagem).

Maiores distâncias de transporte e jejum prolongado podem causar depleção das reservas de glicogênio muscular antes do abate (STRAPPINI *et al.*, 2010) e, conseqüentemente, menores concentrações de ácido láctico, mantendo o pH_u da carne acima de 5,8 (COOMBES *et al.*, 2014).

Em relação às distâncias, o pH_u não diferiu entre a condição sexual no transporte por <50 km (Tabela 2.11), revelando que o gênero não interfere nos valores de pH em curtas distâncias. Resultados semelhantes foram relatados por

Chulayo, Bradley e Muchenje (2016), que não observaram diferença do pH_u entre bovinos machos e fêmeas durante o transporte ao frigorífico.

Entretanto, em longas distâncias de transporte (>300 km) os machos apresentaram maiores valores do pH_u (Tabela 2.11), provavelmente por apresentarem comportamento mais agitado que as fêmeas (KREIKEMEIER, UNRUH e ECK, 1998), levando à fadiga muscular e redução das reservas de energia por degradação do glicogênio muscular antes do abate (MINKA e AYO, 2010).

Outros estudos revelam maiores valores do pH_u em machos em relação às fêmeas (MARENČIĆ *et al.*, 2012), associados aos níveis hormonais, diferenças no temperamento e reatividade frente ao estresse pré-abate (TATUM, GRUBER e SCHNEIDER, 2007).

Também observamos interação do pH_u entre distância e época do ano (P<0,0001). No decorrer da época de chuva, caracterizada por umidade e temperaturas elevadas (médias de 84,1% e 31,3°C), foi constatado que o pH_u aumentou em distâncias intermediárias (100-200 e 201-300 km) em relação às curtas (<50 km) e longas distâncias (>300 km).

Nesse mesmo contexto, estudo realizado por Mach *et al.* (2008), descrevem que maiores distâncias de transporte não interferem no pH_u, sugerindo que o estresse físico e psicológico não foi intenso o suficiente para afetar negativamente a quebra do glicogênio muscular e o pH_u.

Assim, podemos inferir que animais transportados por <50 km e >300 km sofrem menos efeitos dos períodos quentes e úmidos sobre as reservas de glicogênio muscular e, conseqüentemente, sobre o pH_u da carne.

Entretanto, na época de seca o pH_u foi maior nos animais transportados por >300 km (Tabela 2.11), indicando maior estresse no transporte em longas distâncias sob temperaturas elevadas e baixa umidade (médias de 33,3°C e 58,5%), associado ao maior período de restrição alimentar e exaustão física (quebra do glicogênio muscular) (STRAPPINI *et al.*, 2010).

Esses resultados concordam com Marenčić *et al.* (2012), os quais reportam que animais transportados por longas distâncias (\cong 300 km) sob altas temperaturas e baixa umidade (médias de 23°C e 62,54%), apresentaram maiores valores de pH_u em decorrência de maior exigência física.

Em relação às distâncias, não houve diferença significativa nos resultados do pH_u entre época de chuva e seca no transporte por 100-200 km (Tabela 2.11). Não

obstante, os animais transportados por 201-300 km são mais susceptíveis aos efeitos do período quente/úmido, aumentando a degradação das reservas musculares de glicogênio e do pH_u , enquanto que os animais transportados por <50 e >300 km sofreram mais estresse físico (exaustão muscular) no período quente/seco, refletindo na incidência de carne DFD.

Foi verificada interação significativa entre época do ano e condição sexual ($P = 0,0023$). Na época de chuva, não houve diferença nos resultados do pH_u entre as condições sexuais (Tabela 2.11), permanecendo dentro dos valores considerados normais.

Porém, na época de seca o pH_u foi maior nos machos em relação às fêmeas, e também, aos machos transportados na época de chuva, indicando maior sensibilidade às alterações comportamentais e reação ao estresse (TATUM, GRUBER e SCHNEIDER, 2007) durante o transporte no período quente/seco, causando maior fadiga e consumo do glicogênio muscular (MINKA e AYO, 2010), tendo como resultado pH_u (ENGLAND *et al.*, 2016).

Em relação à condição sexual, os valores do pH_u foram similares nas fêmeas transportadas na época de chuva e seca. Dessa maneira, sugere-se que o período quente/seco e quente/úmido não interfere nos efeitos do estresse do transporte sobre a glicogenólise muscular, produzindo uma carne com pH_u considerado normal (WULF *et al.*, 2002).

2.4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o transporte por longas distâncias interfere no bem-estar, causando maior desidratação e estresse físico que contribui para o surgimento de lesões musculares, além causar maior depleção do glicogênio muscular resultando em aumento do pH_u da carcaça, contribuindo para formação de uma carne DFD.

A condição sexual também interfere no bem-estar e os machos, por terem comportamento mais agitado, foram mais sensíveis ao estresse físico e às lesões musculares. Já as fêmeas apresentaram maior reatividade aos efeitos do estresse e menor capacidade de adaptação aos agentes estressores psicológicos.

Os animais transportados durante a época de seca, sob altas temperaturas e baixa umidade, apresentaram desidratação e também demonstraram maior estresse emocional e físico.

Alguns indicadores hematobioquímicos foram afetados tanto pela época de seca quanto pela época de chuva. Nesse caso, variáveis como qualidade das estradas, percentual de transporte percorrido em estrada não pavimentada, duração total da viagem, distância de transporte e a capacidade de adaptação individual dos animais também tiveram influência sobre o bem-estar.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstram a necessidade de aprimorar as condições de transporte principalmente em viagens distantes e de longa duração. Isso pode ser feito através de capacitação dos condutores em boas práticas de bem-estar no transporte de bovinos, melhorias nas condições das rodovias, principalmente as não pavimentadas durante épocas de chuva, maiores cuidados no manejo durante o transporte com os animais, sobretudo os machos, pois se mostraram mais sensíveis ao estresse físico.

Apesar de não ter sido avaliada infraestrutura e o manejo dos animais nas fazendas e frigoríficos, sempre são necessárias melhorias nas instalações (currais, rampas de embarque e desembarque) e aprimorar o treinamento de vaqueiros, pois as instalações em condições precárias e manejo inadequado podem refletir negativamente no bem-estar dos animais e na qualidade da carne, gerando prejuízos econômicos. Assim, essas orientações têm por objetivo minimizar os efeitos do estresse e manter o bem-estar até o momento do abate, colaborando para produção de carnes de melhor qualidade.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADZITEY, F. Effect of pre-slaughter animal handling on carcass and meat quality. **International Food Research Journal**, v.18, p.486-491, 2011.

ALLISON, R.W. Laboratory detection of muscle injury. In: THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL T.W. (Eds.). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Ames: Wiley-Blackwell, 2012. chap.30, p.476-479.

ALVES, R.A.; FIGUEIREDO JÚNIOR, J.P.; SANTANA, M.H.M.; ANDRADE, M.V.M.; LIMA, J.B.A.; PINTO, L.S.; RIBEIRO, L.M. Efeito do estresse sobre a qualidade de produtos de origem animal. **Pubvet**, v.10, n.6, p.448-459, 2016.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2014.

ARANTES, A.O.; AQUINO, B.R.; URMAN, F.L.; FRANCELINO, P.E.; BARBOSA, T.C.; BERBER, R.C.A. Efeitos da condição de estresse em bovinos de corte. **Scientific Electronic Archives**, v.3, p.63-72, 2013.

AVERÓS, X.; MARTIN, S.; RIU, M.; SERRATOSA, J.; GOSÁLVES, L.F. Stress response of extensively reared young bulls being transported to growing-finishing farms under Spanish summer commercial conditions. **Livestock Science**, v.119, p.174-182, 2008.

BAIRD, M.F.; GRAHAM, S.M.; BAKER, J.S.; BICKERSTAFF, G.E. Creatine kinase and exercise related muscle damage implications for muscle performance and recovery. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v.2012, p.1-13, 2012.

BOND, J.J.; CAN, L.A.; WARNER, R.D. The effect of exercise stress, adrenaline injection and electrical stimulation on changes in quality attributes and proteins in Semimembranosus muscle of lamb. **Meat Science**, v.68, p.469-477, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 3. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000.

BROOM, D.M. The effects of land transport on animal welfare. **Scientific and Technical Review OIE**, v.24, p.683-691, 2005.

BULITTA, F.S.; ARADOM, S.; GEBRESENBET, G. Effect of transport time of up to 12 hours on welfare of cows and bulls. **Journal of Service Science and Management**, v.8, p.161-182, 2015.

BURNS, L.V. **Determinação do nível de estresse em bovinos com lesões graves e causa da morte durante o transporte ao frigorífico**. 2014. 83 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Tocantins, Araguaína, 2014.

CAFAZZO, S.; MAGNANI, D.; CALÀ, P.; RAZZUOLI, E.; GERARDI, G.; BERNARDINI, D.; AMADORI, M.; COSTA, L.N. Effect of short road journeys on behaviour and some blood variables related to welfare in young bulls. **Applied Animal Behaviour Science**, v.139, p.26-34, 2012.

CHACON, G.; GARCIA-BELENGUER, S.; VILLARROEL, M.; MARIA, G. A. Effect of transport stress on physiological responses of male bovines. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.112, p.465-469, 2005.

CHULAYO, A.Y.; BRADLEY, G.; MUCHENJE, V. Effects of transport distance, lairage time and stunning efficiency on cortisol, glucose, HSPA1A and how they relate with meat quality in cattle. **Meat Science**, v.117, p.89-96, 2016.

CHULAYO, A.Y.; MUCHENJE, V. A balanced perspective on animal welfare for improved meat and meat products: A review. **South African Journal of Animal Science**, v.45, n.5, p.452-469, 2015.

CHULAYO, A.Y.; MUCHENJE, V. Activities of some stress enzymes as indicators of slaughter cattle welfare and their relationship with physico-chemical characteristics of beef. **Animal**, v.11, n.9, p.1645-1652, 2017.

CINCOVIĆ, M.R.; MAJKIĆ, M.; BELIĆ, B.; PLAVŠA, N.; LAKIĆ, I.; RADINOVIĆ, M. Thermal comfort of cows and temperature-humidity index in period of 2005-2016 in Vojvodina region (Serbia). **Acta Agriculturae Serbica**, v.22, n.44, p.133-145, 2017.

COOMBES, S.V.; GARDNER, G.E.; PETHICK, D.W.; MCGILCHRIST, P. The impact of beef cattle temperament assessed using flight speed on muscle glycogen, muscle lactate and plasma lactate concentrations at slaughter. **Meat Science**, v.98, p.815-821, 2014.

CROOKSHANK, H.R.; ELISSALDE, M.H.; WHITE, R.G.; CLANTON, D.C.; SMALLEY, H.E. Effect of transportation and handling of calves upon blood serum composition. **Journal of Animal Science**, v.48, p.430-435, 1979.

DAS, T.K.; MANI, V.; KAUR, H.; KEWALRAMANI, N.; AGARWAL, A. Effect of vitamin E supplementation on hematological and plasma biochemical parameters during long term exposure of arsenic in goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.25, n.9, p.1262-1268, 2012.

DAYTON, W.R.; WHITE, M.E. Cellular and molecular regulation of muscle growth and development in meat animals. **Journal of Animal Science**, v.86, p.217-225, 2008.

EARLEY, B.; MURRAY, M.; PRENDIVILLE, D.J. Effect of road transport for up to 24 hours followed by twenty-four hour recovery on live weight and physiological responses of bulls. **BMC Veterinary Research**, v.6, n.38, p.1-13, 2010.

EARLEY, B.; MURRAY, M.; PRENDIVILLE, D.J.; PINTADO, B.; BORQUE, C.; CANALI, E. The effect of transport by road and sea on physiology, immunity and behaviour of beef cattle. **Research in Veterinary Science**, v.92, p.531-541, 2012.

ENGLAND, E.M.; MATARNEH, S.K.; OLIVER, E.M.; APAOBLAZA, A.; SCHEFFLER, T.L.; SHI, H.; GERRARD, D.E. Excess glycogen does not resolve high ultimate pH of oxidative muscle. **Meat Science**, v.114, p.95-102, 2016.

ERIKSEN, M.S.; RØDBOTTEN, R.; GRØNDAHL, A.M.; FRIESTAD, M.; ANDERSEN, I.L.; MEJDELL, C.M. Mobile abattoir versus conventional slaughterhouse-Impact on stress parameters and meat quality characteristics in Norwegian lambs. **Applied Animal Behaviour Science**, v.149, p.21-29, 2013.

FAROOQ, U.; AHMAD, N.; AHMAD, I.; MAHMOOD, S.A.; ANDRABI, S.M.H.; IDRIS, M. Effect of seasonal variations on the haematochemical profile of Cholistani service bulls. **Journal of Applied Animal Research**, v.45, n.1, p.85-89, 2017.

FERGUSON D.M.; WARNER R.D. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? **Meat Science**, v.80, n.1, p.12-19, 2008.

FERREIRA, F.; CAMPOS, W.E.; CARVALHO, A.U.; PIRES, M.F.A.; MARTINEZ, M.L.; SILVA, M.V.G.B.; VERNEQUE, R.S.; SILVA, P.F. Parâmetros clínicos, hematológicos, bioquímicos e hormonais de bovinos submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.4, p.769-776, 2009.

FERREIRA, F.; PIRES, M.F.A.; MARTINEZ, M.L.; COELHO, S.G.; CARVALHO, A.U.; FERREIRA, P.M.; FACURY FILHO, E.J.; CAMPO, W.E. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.732-738, 2006.

FRANCO, D.; MATO, A.; SALGADO, F.J.; LÓPEZ-PEDROUSO, M.; CARRERA, M.; BRAVO, S.; ZAPATA, C. Tackling proteome changes in the longissimus thoracis bovine muscle in response to pre-slaughter stress. **Journal of Proteomics**, v.122, p.73-85, 2015.

FRIMPONG, S.; GEBRESENBET, G.; BOBOBEE, E.; AKLAKU, E.D.; HAMDU, I. Effect of transportation and pre-slaughter handling on welfare and meat quality of cattle: Case study of Kumasi abattoir, Ghana. **Veterinary Sciences**, v.1, p.174-191, 2014.

GOODSON, J.L. The vertebrate social behavior network:evolutionary themes and variations. **Hormones and Behavior**, v.48, p.11-22, 2005.

GRANDIN, T. Animal welfare and society concerns finding the missing link. **Meat Science**, v.98, p.461-469, 2014.

GREGORY, L.; BIRGEL JUNIOR, E.H.; D'ANGELINO, J.L.; BENESI, F.J.; DE ARAÚJO, W.P.; BIRGEL, E.H. Valores de referência dos teores séricos da ureia e creatinina em bovinos da raça Jersey criados no estado de São Paulo. Influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.3, p.339-345, 2004.

GUÀRDIA, M.D.; ESTANY, J.; BALASCH, S.; OLIVER, M.A.; GISPERT, M.; DIESTRE, A. Risk assessment of DFD meat due to pre-slaughter conditions in pigs. **Meat Science**, v.70, n.4, p.709-716, 2005.

HARD, E.; HANSEN, S. Reduced fearfulness in the lactating rat. **Physiology & Behavior**, v.35, p.641-643, 1985.

HARTUNG, J. Effects of transport on health of farm animals. **Veterinary Research Communications**, v.27, p.525-527, 2003.

HEMSWORTH, P.H.; RICE, M.; KARLEN, M.G.; CALLEJA, L.; BARNETT, J.L.; NASH, J.; COLEMAN, G.J. Human-animal interactions at abattoirs: Relationships between handling and animal stress in sheep and cattle. **Applied Animal Behaviour Science**, v.135, p.24-33, 2011.

HOFFMANN, W.E.; SOLTER, P.F. Diagnostic enzymology of domestic animals. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (Eds.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. Cambridge: Academic Press, 2008. chap. 12, p.351-378.

HUERTAS, S.M.; GIL, A.D.; PIAGGIO, J.M.; VAN EERDENBURG, F.J.C.M. Transportation of beef cattle to slaughterhouses and how this relates to animal welfare and carcass bruising in an extensive production system. **Animal Welfare**, v.19, p.281-285, 2010.

ISHIWATA, T.; UETAKE, K.; EGUCHI, Y.; TANAKA, T. Steer stress levels during long distance transport throughout the year in Japan. **Journal of Animal Science**, v. 79, p.510-517, 2008.

JIMENEZ FILHO, D.L. Efeitos do transporte sobre a qualidade da carne – revisão. **Medicina Veterinária**, v.6, n.4, p.26-31, 2012.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.; BRUSS, M. Appendixes. In:_____. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, 2008. pp.873-904.

KENNY F.J.; TARRANT P.V. The reaction of young bulls to short-haul road transport. **Applied Animal Behaviour Science**, v.17, p.209-227, 1987.

KNOWLES, T.G.; WARRISS, P.D. Stress physiology of animals during transport. In: GRANDIN, T. (Ed.). **Livestock Handling and Transport**. Wallingford: CAB International, 2000. p.385-407.

KNOWLES, T.G.; WARRISS, P.D.; VOGEL, K. Stress physiology of animals during transport. In: GRANDIN, T. (Ed.). **Livestock Handling and Transport**. Wallingford: CAB International, 2014. chap.21, p.399-420.

KREIKEMEIER, K.K.; UNRUH, J.A.; ECK, T.P. Factors affecting the occurrence of dark-cutting beef and selected carcass traits in finished beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.76, p.388-395, 1998.

KRIZANOVIC, D.; SUSIC, V.; BOZIC, P.; STOKOVIC, I.; EKERT-KABALIN, A. Changes of bovine lipid peroxides and some antioxidants in the cause of growth. **Veterinarski Arhiv**, v.78, p.269-278, 2008.

KUCHEL, O. Stress and catecholamines. In: JASMIN, G.; CANTIN, M. **Neuroendocrinology of Stress**. Basel: Karger, 1991, p.80-103.

LAMBERT, E.V.; ST CLAIR GIBSON, A.; NOAKES, T.D. Complex systems model of fatigue: integrative homeostatic control of peripheral physiological systems during exercise in humans. **British Journal Sports Medicine**, v.39, p.52-62, 2005.

LAREDO, S.A.; TRAINOR, B.C. Photoperiodic regulation of estrogen-dependent aggression. In: BALTHAZART, J.; BALL, G.F. (Eds.). **Brain Aromatase Estrogens and Behavior**. New York: Oxford University Press, 2012.

LOPEZ, O.; MARCO, I.; MONTANE, J.; LAVIN, S. Transport stress in Southern chamois (*Rupicapra pyrenaica*) and its modulation by acepromazine. **Veterinary Journal**, v.1720, p.347-355, 2006.

MACH, N.; BACH, A.; VELARDE, A.; DEVANT, M. Association between animal, transportation, slaughterhouse practices, and meat pH in beef. **Meat Science**, v. 78, p. 232-238, 2008.

MAGANHINI, M.B.; MARIANO, B.; SOARES, A.L.; GUARNIERI, P.D.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.I. Carnes PSE (Pale, Soft, Exudative) e DFD (Dark, Firm, Dry) em lombo suíno numa linha de abate industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.69-72, 2007.

MARENČIĆ, D.; IVANKOVIĆ, A.; PINTIĆ, V.; HORVAT-MARKOVIĆ, R.; HORVAT, M.; KONJAČIĆ, M.; KELAVA, N. Effects different transport period and mixing of groups on meat quality of Simmental bulls. **Stočarstvo**, n.63, p.251-261, 2009.

MARENČIĆ, D.; IVANKOVIĆ, A.; PINTIĆ, V.; KELAVA, N.; JAKOPOVIĆ, T. Effect of the transport duration time and season on some physicochemical properties of beef meat. **Archiv Tierzucht**, v.55, n.2, p.123-131, 2012.

MEUTEN, D. Laboratory evaluation and interpretation of the urinary system. In: THRALL, M.A. (Ed.). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Ames: Wiley-Blackwell, 2012. chap 23, p.323-377.

MINKA, N.S.; AYO, J.O. Effects of loading behaviour and road transport stress on traumatic injuries in cattle transported by road during the hot-dry season. **Livestock Science**, v.107, p.91-95, 2007.

MINKA, N.S.; AYO, J.O. Physiological response of food animals to road transportation stress. **African Journal of Biotechnology**, v.9, p.6601-6613, 2010.

MIRANDA-DE LA LAMA, G.C.; MONGE, P.; VILLARROEL, M.; OLLETA, J.L.; GARCÍA-BELENQUER, S.; MARÍA, G.A. Effects of road type during transport on lamb welfare and meat quality in dry hot climates. **Tropical Animal Health and Production**, v.43, p.915-922, 2011.

MIRANDA-DE LA LAMA, G.C.; RIVERO, L.; CHACON, G.; GARCIA-BELENQUER, S.; VILLARROEL, M.; MARIA, G.A. Effect of the pre-slaughter logistic chain on some indicators of welfare in lambs. **Livestock Science**, v.128, p.52-59, 2010.

MIRANDA-DE LA LAMA, G.C.; VILLARROEL, M.; MARÍA, G.A. Livestock transport from the perspective of the pre-slaughter logistic chain: A review. **Meat Science**, v.98, p.9-20, 2014.

MORAIS, H.R.; NASCIMENTO, M.R.B.M.; SILVA, N.A.M.; COSTA, H.C.O.; FRASÃO, B.S. Contusões e pH de carcaças de bovinos transportados por diferentes distâncias no verão e inverno. **Bioscience Journal**, v.31, n.6, p.1792-1800, 2015.

MORGAN, T.O.; RYAN, G.B.; BARRATT, L.F. Renal anatomy and physiology. In: WHITWORTH, J.A.; LAWRENCE, J.R. (Eds.). **Textbook of renal disease**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1987. chap 1, p.3-32.

MOTA-ROJAS, D.; BECERRIL, M.; LEMUS, C.; SÁNCHEZ, P.; GONZÁLEZ, M.; OLMOS, S.A.; RAMÍREZ, R.; ALONSO-SPILSBURY, M. Effects of mid-summer transport duration on pre and post-slaughter performance and pork quality in Mexico. **Meat Science**, v.73, p.404-412, 2006.

MOUNIER, L.; DUBROEUCQ, H.; ANDANSON, S.; VEISSIER, L. Variations in meat pH of beef bulls in relation to conditions of transfer to slaughter and previous history of the animals. **Journal of Animal Science**, v.84, p.1567-1576, 2006.

MOURA, I.C.F.; KUSS, F.; MOLETTA, J.L.; PEROTTO, D.; STRACK, M.G.; MENEZES, L.F.G. Terminação em confinamento de vacas de descarte recebendo dietas com diferentes teores de concentrado. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.1, p.399-408, 2013.

MPAKAMA, T.; CHULAYO, A. Y.; MUCHENJE, V. Bruising in slaughter cattle and its relationship with creatine kinase levels and beef quality as affected by animal related factors. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.27, p.717-725, 2014.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Integração e regulação hormonal do metabolismo dos mamíferos. In:_____. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014. chap.23, p.682-710.

PAES, P.R.O.; GONÇALVES, R.C.; BARIONI, G.; LEME, F.O.P.; MELO, M.M.; CRUZ, M.L. O leucograma como indicador de estresse no desmame e no transporte rodoviário de bovinos da raça Nelore. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.1, p.305-312, 2012.

PARKER, A.J.; HAMLIN, G.P.; COLEMAN, C.J.; FITZPATRICK, L.A. Quantitative analysis of acid-base balance in *Bos indicus* steers subjected to transportation of long duration. **Journal of Animal Science**, v.81, p.1434-1439, 2003.

PHILLIPS, C.J.C.; SANTURTUN, E. The welfare of livestock transported by ship. **The Veterinary Journal**, v.196, p.309-314, 2013.

PIGHIN, D.G.; DAVIES, P.; GRIGIONI, G.; PAZOS, A.A.; CECONI, I.; MENDEZ, D.; BUFFARINI, M.; SANCHO, A.; GONZALEZ, C.B. Effect of slaughter handling conditions and animal temperament on bovine meat quality markers. **Archivos de zootecnia**, v.62, n.239, p.399-409, 2013.

PRICE, M.A. TENNESSEN, T. Preslaughter management and dark-cutting in the carcasses of young bulls. **Journal of Animal Science**, v.61, p.205-208, 1981.

RAMIN, A.G. **Physiological response tests and blood profiles in replacement dairy heifers and their relationship to growth rates and health parameters.**

Thesis, The University of Queensland 1995, pp. 23-33.

REECE, W.O. Líquidos corporais e homeostasia. In: REECE, W.O. (Ed.). **Dukes-Fisiologia dos animais domésticos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. chap.2, p.97-150.

ROMERO, M.H.; GUTIÉRREZ, C.; SÁNCHEZ, J.A. Evaluación de contusiones como un indicador de bienestar animal durante el pre-sacrificio de bovinos. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.25, p.267-275, 2012.

ROMERO, M.H.; URIBE-VELÁSQUEZ, L.F.; SÁNCHEZ, J.A.; RAYAS-AMOR, A.A.; MIRANDA-DE LA LAMA, G.C. Conventional versus modern abattoirs in Colombia: Impacts on welfare indicators and risk factors for high muscle pH in commercial Zebu young bulls. **Meat Science**, v.123, p.173-181, 2017.

SANZ, M.C.; VERDE, M.T.; SAEZ, T.; SANUDO, C. Effect of breed on the muscle glycogen content and dark cutting incidence in stressed young bulls. **Meat Science**, v.43, p.37-42, 1996.

SCHARF, B.; CARROLL, J.A.; RILEY, D.G.; CHASE, C.C.J.R.; COLEMAN, S.W.; KEISLER, D.H.; WEABER, R.L.; SPIERS, D.E. Evaluation of physiological and blood serum differences in heat tolerant (Romosinuano) and heat tolerant susceptible (Angus) *Bos taurus* cattle during controlled heat challenge. **Journal of Animal Science**, v.88, p.2321-2336, 2010.

SERDAR, M.A.; KURT, I.; OZCELIK, F.; URHAN, M.; ILGAN, S.; YENICESU, M.; KENAR, L.; KUTLUAY, T. A practical approach to glomerular filtration rate measurements: creatinine clearance estimation using cimetidine. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v.31, p.265-273, 2001.

SHAW, F.D.; TUME, R.K. The assessment of pre-slaughter and slaughter treatments of livestock by measurement of plasma constituents. A review of recent work. **Meat Science**, v.32, p.311-329, 1992.

SOTELO, A.; PÉREZ, C.; FIGUEROA, F.; BARRERAS, A.; SÁNCHEZ, E. Evaluation of changes in management practices on frequency of DFD meat in cattle. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.7, p.330-332, 2008.

SOUZA, P.T.; SALLES, M.G.F.; ARAÚJO, A.A. Impacto do estresse térmico sobre a fisiologia, reprodução e produção de caprinos. **Ciência Rural**, v.42, n.10, p.1888-1895, 2012.

SRIKANDAKUMAR, A.; JOHNSON, E.H. Effect of heat stress on milk production, rectal temperature, respiratory rate and blood chemistry in Holstein, Jersey and Australian Milking Zebu cows. **Tropical Animal Health and Production**, v.36, p.685-692, 2004.

STEPHENSON, R.B. Fisiologia cardiovascular. In: KLEIN, B.G. (Ed.). **Cunningham Tratado de Fisiologia Veterinária.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. chap.3, p.158-262.

- STRAPPINI, A.C.; FRANKENA, K.; METZ, J.H.M.; GALLO, B.; KEMP, B. Prevalence and risk factors for bruises in Chilean bovine carcasses. **Meat Science**, v.86, p.859-864, 2010.
- TADICH, N.; GALLO, C.; BRITO, M.L.; BROOM, D.M. Effects of weaning and 48 h transport by road and ferry on some blood indicators of welfare in lambs. **Livestock Science**, v.121, p.132-136, 2009.
- TADICH, N.; GALLO, C.; BUSTAMANTE, H.; SCHWERTER, M.; SCHAİK, G.V. Effects of transport and lairage time on some blood constituents of Friesian-cross steers in Chile. **Livestock Production Science**, v.93, p.223-233, 2005.
- TARRANT, P.V. Transportation of cattle by road. **Applied Animal Behaviour Science**, v.28, p.153-170, 1990.
- TARRANT, P.V.; GRANDIN, T. Cattle transport. In: Grandin, T. (Ed.). **Livestock Handling and Transport**. Wallingford: Cabi International, 1993. p.109-126.
- TARRANT, P.V., KENNY, F.J., HARRINGTON, D. The effect of stocking density during 4 hour transport to slaughter on behaviour, blood constituents and carcass bruising in Friesian steers. **Meat Science**, v.24, n.3, p.209-222, 1988.
- TATUM, J.D.; GRUBER, S.L.; SCHNEIDER, B.A.: Pre-Harvest Factors Affecting Beef Tenderness in Heifers. **Executive Summary**. Department of Animal Science, Colorado State University, p.1-18, 2007.
- TEKE, B.; AKDAG, F.; EKIZ, B.; UGURLU, M. Effects of different lairage times after long distance transportation on carcass and meat quality characteristics of Hungarian Simmental bulls. **Meat Science**, v.96, p.24-229, 2014.
- TRAINOR, B.C.; KYOMEN, H.H.; MARLER, C.A. Estrogenic encounters: How interactions between aromatase and the environment modulate aggression. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.27, p.170-179, 2006.
- UETAKE, K.; ISHIWATA, T.; TANAKA, T.; SATO, S. Physiological responses of young cross-bred calves immediately after long-haul road transportation and after one week of habituation. **Animal Science Journal**, v.80, p.705-708, 2009.
- VALENTINE, B.A.; MCGAVIN, M.D. Músculo esquelético. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. (Eds.). **Bases da Patologia em Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. chap15, p.973-1040.
- VAZ, F.N.; PASCOAL, L.L.; PACHECO, P.P.; VAZ, R.Z.; VARGAS, F.V.; SOCCAL, D.C.; MAYSONNAVE, G.S. Fatness beef cattle purchase transaction study in a abattoir firm in the Rio Grande Do Sul State. **American International Journal of Contemporary Research**, v.4, p.165-171, 2014.
- VERBEKE, W. Stakeholder, citizen and consumer interests in farm animal welfare. **Animal Welfare**, v.18, p.325-333, 2009.

VILLARROEL, M.; MARIA, G. A.; SIERRA, I.; SANUDO, C.; GARCIA-BELENGUER, S.; GEBRESENBET, G. Critical points in the transport of cattle to slaughter in Spain that may compromise the animals' welfare. **Veterinary Record**, v.149, p.73-176, 2001.

WARRISS, P.D.; BROWN, S.N.; KNOWLES, T.G.; KESTIN, S.C.; EDWARDS, J.E.; DOLAN, S.K.; PHILLIPS, A.J. Effects on cattle of transport by road for up to 15 hours. **Veterinary Record**, v.1, p.319-323, 1995.

WERNER, M.; HEPP, C.; SOTO, C.; GALLARDO, P.; BUSTAMANTE, H.; GALLO, C. Effects of a long distance transport and subsequent recovery in recently weaned crossbred beef calves in Southern Chile. **Livestock Science**, v.152, p.42-46, 2013.

WULF, D. M.; EMNETT, R. S.; LEHESKA, J. M.; MOELLER, S. J. Relationships among glycolytic potential, dark cutting (dark, firm and dry) beef, and cooked beef palatability. **Journal of Animal Science**, v.80, p.1895-1903, 2002.

Capítulo 3. Métodos de mensuração do glicogênio hepático em bovinos: análise de correlação

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estabelecer correlação entre a técnica colorimétrica e o método de coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS) para quantificação do glicogênio, possibilitando a utilização de ambas as técnicas na mensuração do glicogênio hepático. Foram utilizados 297 bovinos, sendo 147 fêmeas e 150 machos não-castrados, anelados e mestiços, provenientes de fazendas localizadas no interior do Estado do Tocantins. Os animais foram transportados por rodovias em datas distintas ao frigorífico, localizado na região de Araguaína. Foram coletadas amostras de 5 cm² de fígado após a evisceração na linha de abate, embaladas em saco plástico, devidamente identificadas e refrigeradas logo após a coleta. Posteriormente, amostras de 1 cm² do fígado foram fixadas em formol 10% tamponado para análise histoquímica e o restante foi congelado em freezer a -20°C para determinação bioquímica do glicogênio. Para análise histoquímica do glicogênio foi feita a coloração do tecido pelo ácido periódico de Schiff (PAS) enquanto que para a avaliação bioquímica foi utilizado método colorimétrico segundo metodologia de Dubois *et al.* (1956). Para comparação dos resultados do conteúdo de glicogênio obtidos pelo método colorimétrico e o método de coloração pelo PAS, foi realizada uma análise de correlação simples. O nível de significância considerado foi de 95%. Os resultados demonstram não haver correlação significativa ($R^2 = 0,29$) entre o método colorimétrico e a coloração de PAS para quantificação do glicogênio hepático. Assim, pode-se concluir que a análise bioquímica pelo método colorimétrico, por se tratar de um método quantitativo, deve ser a metodologia de escolha a ser aplicada para quantificação do glicogênio hepático na rotina laboratorial.

Palavras-chave: Análise bioquímica, Método colorimétrico, PAS, Quantificação

Chapter 3. Methods to measure the liver glycogen in cattle: correlation analysis

ABSTRACT

The aim of this study was to establish correlation between the colorimetric technique and the periodic-acid Schiff (PAS) staining method for quantification of glycogen, allowing the use of both techniques in the measurement of liver glycogen. A total of 297 bovines Nelore and crossbred, being 147 females and 150 non-castrated males, coming from Tocantins farms. The animals were transported by road on different dates to slaughterhouse of the Araguaína. Samples of 5 cm² of liver were collected after evisceration in slaughter line, packed in plastic bag, identified and refrigerated immediately after collection. Then, 1 cm² samples of liver were fixed in 10% buffered formalin for histochemical analysis and the remainder frozen in a freezer at -20 °C for biochemical analysis of glycogen. For the histochemical analysis, the tissue was stained by periodic-acid Schiff (PAS) while to biochemical evaluation was used colorimetric method according to Dubois *et al.* (1956). A simple correlation analysis was performed to compare the glycogen content results obtained by the colorimetric and the PAS staining method. The significance level considered was 95%. Our results show no significant correlation ($R^2 = 0.29$) between the colorimetric method and the PAS staining for liver glycogen quantification. Thus, it can be concluded that the biochemical analysis by the colorimetric method, because it is a quantitative method, should be the methodology of choice to be applied for quantification of hepatic glycogen in the laboratory routine.

Keywords: Biochemical analysis, Colorimetric method, PAS, Quantification

3.1 INTRODUÇÃO

O glicogênio é um polímero de glicose altamente ramificado presente em grandes concentrações no fígado (SULLIVAN *et al.*, 2015) e no músculo esquelético (GOFF, 2017). No fígado, o glicogênio é constituído por unidades de glicose que formam uma cadeia linear através das ligações α -(1 \rightarrow 4). Estas cadeias estão conectadas através de pontos de ramificação em ligações α -(1 \rightarrow 6) para formar partículas “ β ” de glicogênio bastante ramificadas (20 nm de diâmetro) e que podem se ligar e formar partículas ainda maiores (100-200 nm) (SULLIVAN *et al.*, 2014).

Além do tecido hepático e muscular, o glicogênio está presente também no coração (BESFORD *et al.*, 2012), cérebro (BROWN, 2004) e tecido adiposo (JURCZAK *et al.*, 2007), servindo como fonte de armazenamento de energia (SULLIVAN *et al.*, 2015), e sua quantidade no fígado depende de diferentes estados hormonais, metabólicos e fisiológicos (SHOKRI-AFRA, OSTOVAR-RAVARI e RASOULI, 2016), podendo ser rapidamente mobilizado em resposta à hipoglicemia (SULLIVAN *et al.*, 2015), estresse (KNOWLES, WARRISS e VOGEL, 2014) e exercícios físicos (MINKA e AYO, 2009).

Alterações nas concentrações de glicogênio também podem ocorrer em diversas condições patológicas, como na doença do armazenamento de glicogênio, adenocarcinoma, doença de Paget mamária e sarcoma alveolar (NGOKERE *et al.*, 2016). Por isso, é importante quantificar o glicogênio em amostras biológicas para se obter melhor entendimento sobre a importância do metabolismo do glicogênio em todo o corpo e em nível celular (PELLETIER *et al.*, 2013).

Diversos métodos têm sido descritos para mensurar a quantidade de glicogênio presente nos tecidos. Entre eles podemos destacar o método químico através do reagente fenol-ácido sulfúrico que quantifica os açúcares dos polissacarídeos, glicoproteínas, proteoglicanos e glicolipídeos (DUBOIS *et al.*, 1956).

A técnica é simples e sensível para avaliar pequenas quantidades de açúcares e seus derivados que foram separados por cromatografia (RASOULI, OSTOVAR-RAVARI e SHOKRI-AFRA, 2014) e, ainda, pode ser usada para mensurar o total de açúcares em misturas ou amostras biológicas (SAHA e BREWER, 1994).

As amostras de fígado podem ser utilizadas para análise logo após a coleta (GHAFOURI e RASOULI, 2016) ou podem ser congeladas e analisadas posteriormente (SHOKRI-AFRA, OSTOVAR-RAVARI e RASOULI, 2016).

Em todos os métodos para quantificação do glicogênio o tecido sofre um processo de digestão por calor em meio ácido ou alcalino (VIES, 1954) promovendo a hidrólise do glicogênio em glicose (ALONSO *et al.*, 1995). Entretanto, existem algumas alterações teciduais que podem dificultar a análise do glicogênio, as quais se podem destacar a autólise, ligação às proteínas, precipitação e contaminação de frações (SHOKRI-AFRA, OSTOVAR-RAVARI e RASOULI, 2016).

Além dos métodos quantitativos supracitados, existe também a técnica semiquantitativa de análise do glicogênio e que foi descrita previamente por McManus (1946). Consiste no método de coloração do tecido pelo ácido periódico de Schiff (PAS) que marca polissacarídeos e mucosubstâncias como glicoproteínas; glicolipídeos e mucinas nos tecidos (McMANUS, 1946; NGOKERE *et al.*, 2016).

O PAS promove a oxidação da glicose pelo ácido periódico produzindo aldeídos, os quais reagem com o reagente de Schiff resultando em uma cor púrpura-magenta em tecidos previamente fixados em solução de formalina tamponada a 10% ou Bouin (NGOKERE *et al.*, 2016). Além do PAS, outras colorações podem ser empregadas para marcação do glicogênio como Prata Hexamina e Carmim de Best (ZAKOUT, SALIH e AHMED, 2010).

Análise comparativa entre as técnicas de avaliação de glicogênio tem por objetivo verificar a precisão da estimativa histológica do teor de glicogênio a partir das análises químicas (GRAFFLIN, MARBLE e SMITH, 1941).

Ainda na década de 60, alguns trabalhos buscaram investigar correlação entre diferentes técnicas de avaliação de glicogênio em tecidos como na placenta (PADYKULA e RICHARDSON, 1963), cérebro (GUTH e WATSON, 1968) e fígado de ratos (LESKE e MAYERSBACH, 1969). Contudo, são escassas as publicações sobre o referido assunto, principalmente na espécie bovina.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer correlação entre a técnica colorimétrica e o método de coloração por PAS para quantificação do glicogênio hepático, possibilitando a utilização de ambas a técnicas na rotina laboratorial.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais e tratamento

A pesquisa foi previamente aprovada pelo comitê de ética-CEUA-UFT (N° do

processo: 23101.000666/2017-81). Foram utilizados 297 bovinos, sendo 147 fêmeas e 150 machos não-castrados, anelados e mestiços, provenientes de fazendas localizadas no interior Estado do Tocantins. Os animais foram transportados por rodovias em datas distintas ao frigorífico, localizado na região de Araguaína-TO, (7°11'28" de latitude, 48°12'26" de longitude) e que se encontra sob Inspeção Federal.

A seleção dos lotes utilizados no experimento foi realizada, entre Abril de 2017 e Agosto de 2018, identificada pela data de chegada do lote e abate, e a quantidade de animais transportados por caminhão.

O tempo de descanso, jejum e dieta hídrica, no período que antecedeu o abate, foi de aproximadamente 12 horas. No momento do abate, animais de todos os grupos foram insensibilizados com pistola pneumática ou de dardo cativo e abatidos de acordo com o fluxo normal do abatedouro (BRASIL, 2000).

3.2.2 Coleta e acondicionamento das amostras de fígado

Foram coletadas amostras de 5 cm² de fígado, após a evisceração na linha de abate, embaladas em saco plástico devidamente identificados e refrigerados em seguida. Posteriormente, 1cm² das amostras foram fixadas em formol 10% tamponado para análise do glicogênio pela coloração do PAS e o restante foi congelado em freezer a -20°C para determinação do glicogênio pelo método colorimétrico (DUBOIS *et al.*, 1956). As análises foram feitas no Laboratório de Morfo-fisiologia e Bioquímica de Peixes Neotropicais-UFT-EMVZ.

3.2.3 Coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS)

3.2.3.1 Processamento das amostras

As amostras de fígado fixadas em formol 10% tamponado foram clivadas em 2-3 mm e colocadas em cassetes histológicos. Logo após, iniciou-se a bateria de processamento pela desidratação tecidual em álcool (70%, 80%, 90%, absoluto I e II), seguida pela clarificação ou diafanização no xilol (xilol I e II) e infiltração em parafina na estufa a 60 °C (parafina I e II), finalizando pela inclusão dos tecidos em parafina para confecção dos blocos histológicos.

Em seguida, os blocos foram seccionados em micrótomo Leica RM 2235[®] (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça) numa espessura de 3 µm, colocados em

banho-maria (em torno de 40 °C) para promover a distensão dos cortes, e coletados com lâmina de vidro. As lâminas com o corte foram colocadas em placa aquecedora por alguns minutos e levadas à estufa a 60 °C para remoção da parafina e melhorar a adesão do corte a lâmina.

3.2.3.2 Protocolo de coloração

As lâminas, colocadas em berço para coloração, passaram pelo processo de desparafinização em xilol I (15') e II (5') e hidratação em concentrações decrescentes de álcool: absoluto (1'), 95% (30''), 80% (30''), 70% (1'). Em seguida, as lâminas ficaram por 1 minuto em água corrente.

Na primeira etapa da coloração, as lâminas permaneceram por 15 minutos no ácido periódico e lavadas em água corrente. Já na segunda etapa, as lâminas foram colocadas no reagente de Schiff por 45 minutos e na água corrente por 2 minutos.

Por fim, após a secagem na estufa a 60 °C, as lâminas passaram pelo processo de clarificação no xilol, onde permaneceram até o momento da montagem ou selagem.

3.2.3.3 Quantificação do glicogênio

Para quantificação do glicogênio foi utilizado o software livre ImageJ e lâminas histológicas de fígado coradas em ácido periódico de Schiff (PAS), para evidenciação do glicogênio. De cada lâmina histológica foram feitas 5 imagens aleatórias, totalizando 1485 imagens, captadas pelo programa computacional LAS EZ[®] acoplado ao microscópio óptico Leica DM500[®] (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suíça) em objetiva de 40x.

No ImageJ utilizou-se da função Color Threshold para delimitar a matiz, a saturação e o brilho das imagens buscando isolar o glicogênio positivo em PAS de coloração magenta dentro da amplitude demonstrada abaixo:

- Hue (Matiz): mínimo 0 \ máximo 215
- Saturation (Saturação): mínimo 100 \ máximo 255
- Brightness (Brilho): mínimo 0 \ máximo 187

Assim o programa cria uma máscara em preto e branco delimitando as regiões positivas na amplitude estabelecida, dessa forma eliminando os outros componentes da imagem, restando apenas o glicogênio.

Em seguida foi utilizada a função “*measure*” (medir) para computar em pixels a quantidade de glicogênio e os valores de cada imagem foram lançados em uma planilha de Excel para análise. Para automatizar o trabalho foi utilizada a função macro do próprio programa, rodando todas as imagens de forma simultânea.

3.2.4 Análise do glicogênio hepático pelo método colorimétrico

3.2.4.1 Digestão do tecido hepático

Para o preparo do padrão foi necessário dissolver 1,8 g de glicose anidra em 100 mL de água destilada, dos quais 100 µL foram transferidos para 3 tubos com o objetivo de se obter os resultados do padrão em triplicata.

Das amostras de fígado congeladas foram retiradas 100 mg de tecido e colocados em tubos com 1 mL de hidróxido de potássio (KHO) e levados ao banho-maria com água fervente (100 °C) durante 10 minutos, juntamente com os padrões.

3.2.4.2 Extração pelo etanol

Logo após a digestão do tecido hepático, 200 µL de cada amostra/padrão foram transferidos para tubos contendo 3 mL de etanol 70% e misturados no vórtex por 5 segundos em alta velocidade. Após, 100 µL de sulfato de potássio (K₂SO₄) foram adicionados aos tubos, posteriormente homogenizados, mantidos em repouso por 5 minutos até ocorrer a floculação e misturados no vórtex em alta velocidade.

Na sequência, os tubos foram centrifugados (Centrífuga Centribio 80-2B) durante 3 minutos a 3.605 G. Ao final da centrifugação, foi desprezado o sobrenadante (fração líquida), permanecendo apenas o material precipitado (fração sólida) na forma de grânulos aderidos à parede dos tubos. Foram adicionados 2 mL de água destilada aos tubos e levados ao vórtex para homogenização.

3.2.4.3 Método colorimétrico utilizando reagente fenol-ácido sulfúrico

De acordo com a metodologia descrita por Dubois *et al.* (1956), logo após a homogenização, 500 µL de fenol a 4,1% e 2 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) foram acrescentados aos tubos, previamente colocados em banho de gelo, e homogenizados no vórtex, produzindo uma solução de cor amarelo-laranja. Ao final, foram transferidos 380 µL da solução numa microplaca com 96 poços para leitura em 480 nm no espectrofotômetro Biochrom[®] Asys UVM340 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK)

significativa ($R^2 = 0,29$) entre o método colorimétrico e a coloração pelo PAS para quantificação do glicogênio hepático (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Resultado da análise de correlação e dos valores médios da quantificação do glicogênio hepático pelo método colorimétrico, expresso em $\mu\text{mol/g}$, e pela coloração em ácido periódico de Schiff (PAS), através da análise das imagens pelo software ImageJ, com resultados expresso em pixels.

	Glicogênio hepático		Correlação*
	Método colorimétrico ($\mu\text{mol/g}$)	Coloração pelo PAS (Pixels)	
Médias	90,26	66855,91	$R^2 = 0,29$

* Análise de correlação simples, com nível de significância considerado de 95%.

Assim, o ponto inicial de discussão deve abordar as peculiaridades de cada técnica. O método colorimétrico, utilizando reagente fenol-ácido sulfúrico, é sensível para determinar quantidade de açúcares e derivados por cromatografia e também é usado para medir o teor total do glicogênio em amostras biológicas (SAHA e BREWER, 1994). Para realização dessa análise, o tecido passou primeiramente por um processo de digestão e posterior extração do glicogênio.

A digestão do tecido hepático foi feita com KOH em água fervente, pois se obtém concentrações totais de glicogênio (RASOULI e LEHNER, 2004) ao contrário de outras técnicas, como a digestão por ácido tricloroacético ou por água quente ou fria, que não conseguem determinar completamente o glicogênio do tecido, visto que parte do glicogênio permanece na fração proteica desnaturada e não consegue ser recuperado, mesmo após vários processos de digestão (BLOOM *et al.*, 1951).

Para a extração do glicogênio foi utilizado etanol que atua rapidamente na precipitação e purificação do glicogênio em amostras de tecido que sofreram digestão pelo KOH (KERLY, 1930; GOOD, KRAMER e SOMOGYI, 1933). Essas informações revelam que a metodologia de análise quantitativa escolhida fornece resultados confiáveis das concentrações de glicogênio hepático.

Já a utilização da coloração pelo PAS para análise microscópica do tecido hepático, opostamente ao método colorimétrico, revela informações sobre a distribuição de glicogênio no hepatócito, que pode estar difundido ou concentrado em uma determinada parte da célula. Assim, apesar da coloração pelo PAS estimar diferenças no acúmulo de glicogênio, ela não é considerada uma análise quantitativa (DRURY, 1981; PELLETIER *et al.*, 2013).

Trabalhos anteriores empregaram a coloração pelo PAS com intuito de analisar somente a distribuição do glicogênio hepático, por região metabólica e área

circulatória, através de uma técnica utilizando grade de estudo morfológico aplicando aumento original de 200x (SOARES FILHO, KANAAN e GUZMAN-SILVA, 2011). Entretanto, no presente estudo, a proposta não foi analisar a área de distribuição do glicogênio e sim a utilização de uma metodologia que pudesse permitir estimativa da quantidade total de glicogênio por análise de imagens obtidas de lâminas de tecido hepático, coradas por PAS em aumento original de 400x, utilizando o software ImageJ.

Esse software cria uma máscara em preto e branco que elimina outros componentes da imagem, restando apenas o glicogênio (Figura 1). Por fim, o programa computa a quantidade de glicogênio expressa em pixels por imagem.

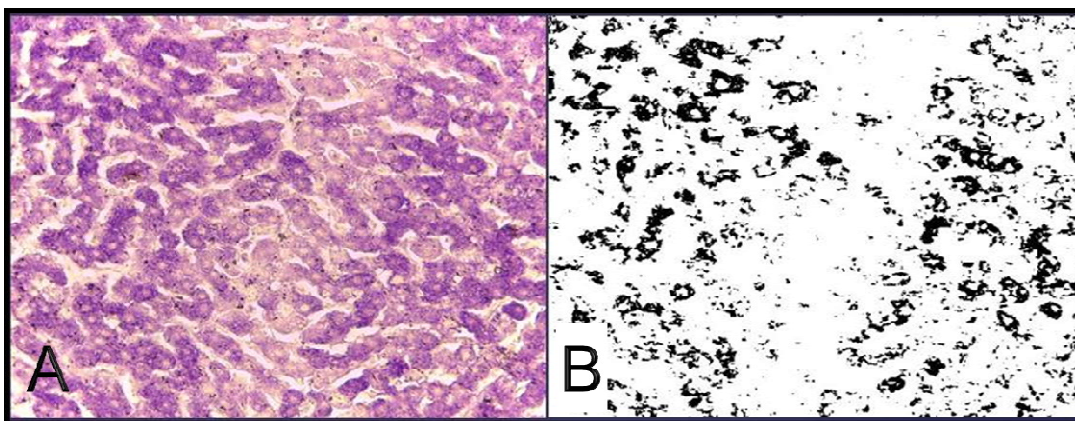


Figura 3.1. Avaliação do glicogênio hepático de bovinos. (A) Bovino, fígado, coloração pelo ácido periódico de Schiff com marcação dos grânulos de glicogênio no citoplasma dos hepatócitos em cor púrpura-magenta, PAS, 40X. (B) Bovino, fígado, imagem do fígado corado pelo ácido periódico de Schiff (PAS) após a análise pelo software ImageJ, criando uma máscara em preto e branco que elimina outros componentes da imagem, restando apenas o glicogênio. O programa computa a quantidade de glicogênio expressa em pixels por imagem, PAS, 40X.

Em relação à comparação das técnicas de determinação do glicogênio, pesquisas anteriores buscaram demonstrar correlação entre técnicas quantitativa e semi-quantitativa, porém, não obtiveram sucesso. Os pesquisadores relatam que a estimativa histológica do conteúdo de glicogênio no fígado em comparação à determinação química foi aproximada e não totalmente confiável (GRAFFLIN, MARBLE e SMITH, 1941).

Os resultados deste trabalho discordam de Leske e Mayersbach (1969), Cardell, Lerner e Babcock (1973) e Hammad, Striffler e Cardell (1982) que verificaram uma boa correlação entre o método colorimétrico (processo de digestão tecidual por KOH e extração pelo etanol) e o método histoquímico (coloração pelo

PAS) na avaliação do glicogênio hepático em ratos e/ou camundongos submetidos a um esquema de alimentação controlada.

No entanto, alguns fatores devem ser levados em consideração nessa discussão. Entre eles, podemos destacar que a correlação foi determinada apenas pela comparação dos resultados obtidos em percentual de glicogênio hepático pelo método colorimétrico com a observação visual da presença de grânulos de glicogênio intensamente marcados nos hepatócitos pelo método histoquímico (LESKE e MAYERSBACH, 1969; CARDELL, LARNER e BABCOCK, 1973; HAMMAD, STRIFFLER e CARDELL, 1982). Entretanto, no presente trabalho, foi utilizada análise estatística para comparar os resultados do método colorimétrico ($\mu\text{mol/g}$ de tecido hepático) e da coloração pelo PAS (quantidade de pixels por imagem) e, por isso, podem ter sido mais confiáveis.

O número de repetições é outro fator importante no delineamento experimental e, em nosso estudo foram utilizados 297 animais, enquanto nos apanhados da literatura, os autores utilizaram apenas 48 (LESKE e MAYERSBACH, 1969) e 52 ratos (CARDELL, LARNER e BABCOCK, 1973) e 85 camundongos (HAMMAD, STRIFFLER e CARDELL, 1982). Além disso, para análise de glicogênio, através da coloração pelo PAS, foram feitas 5 imagens de cada lâmina histológica referente à uma repetição, totalizando 1485 imagens, sendo uma quantidade de imagens analisadas muito superior aos trabalhos supracitados que utilizaram uma imagem por amostra.

As repetições têm por objetivo estimar os efeitos das causas aleatórias e aprimorar as estimativas dos efeitos dos tratamentos, e melhorar a estimativa das médias. Assim, quanto maior o número de repetições, mais exatas serão as estimativas (PIMENTEL GOMES, 2009). Essas informações sustentam o fato de que a precisão dos resultados obtidos neste trabalho pode ser mais significativo que aqueles alcançados pelos demais pesquisadores (LESKE e MAYERSBACH, 1969; CARDELL, LARNER e BABCOCK, 1973; HAMMAD, STRIFFLER e CARDELL, 1982).

A conservação das amostras utilizadas em nosso estudo, os fragmentos de fígado para análise quantitativa do glicogênio (método colorimétrico) foram coletados na linha de abate e imediatamente colocados em uma caixa térmica com gelo e encaminhados ao laboratório onde foram congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise, segundo metodologia descrita por Dreiling *et al.* (1987). Essa temperatura

de congelamento, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, mantém o conteúdo de glicogênio estável no tecido hepático por até 3 meses (SHOKRI-AFRA, OSTOVAR-RAVARI e RASOULI, 2016).

Essa forma de conservação difere em alguns pontos dos métodos utilizados por Leske e Mayersbach (1969), Cardell, Larner e Babcock (1973) e Hammad, Striffler e Cardell (1982), os quais primeiramente congelaram as amostras de fígado rapidamente em gelo seco ou nitrogênio líquido logo após a coleta e, posteriormente armazenavam-na a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A análise semi-quantitativa do glicogênio realizada neste trabalho (análise histoquímica através da coloração pelo PAS, utilizou fragmentos de fígado fixados em formol 10% tamponado, diferindo das técnicas de fixação utilizadas por Leske e Mayersbach (1969) que empregaram o ácido tricloroacético e solução de Carnoy, e Cardell, Larner e Babcock (1973) e Hammad, Striffler e Cardell (1982) que utilizaram o método de fixação por substituição de congelamento utilizando o fluido de Rossman, de acordo com a modificação de Peyrot da técnica de Lison para análise de glicogênio (PEARSE, 1968).

Portanto, há grande variedade de metodologias para fixação de amostras de fígado, porém, alguns fixadores apresentam maior capacidade de preservação tecidual para determinação do glicogênio.

De acordo com Kugler e Wilkinson (1964), as soluções de Carnoy e Rossman apresentam inconsistência na preservação das amostras, e Leske e Mayersbach (1969) relatam redução na demonstração histoquímica de glicogênio em amostras fixadas pela solução de Carnoy. No entanto, Ngokere *et al.* (2016) sugere, para avaliação do conteúdo de glicogênio hepático pelo PAS, fixar as amostras com formol 10% tamponado.

Esse método de fixação para coloração pelo PAS já foi utilizada em várias outras pesquisas para análise do glicogênio hepático, tanto em humanos (LAKE, 1970) quanto em ratos (HAYNES, HALL e CLARK, 1983; SOARES FILHO, KANAAN e GUZMAN-SILVA, 2011), coelhos (NGOKERE *et al.*, 2016), dromedários (SIDDIG, ABDALLA e ISMAIL, 2015) e bovinos (BURNS *et al.*, 2014), com o objetivo de manter preservados os tecidos em um estado mais próximo possível da sua condição real (WARMINGTON, WILKINSON e RILEY, 2000).

Para demonstração do glicogênio, a fixação adequada do tecido é de suma importância, pois irá determinar a qualidade da sua marcação pelo corante. Estudos mais recentes relataram que a fixação do fígado em formol 10% revelam bons

resultados para marcação de glicogênio através da coloração pelo PAS e isso pode ser explicado pela ótima atividade do formol, nessa concentração, em fixar o glicogênio associado às proteínas (ZAKOUT, SALIH e AHMED, 2010).

O processo de fixação ocorre pela formação de ligações cruzadas entre o formol e a lisina, impedindo a alteração do tecido e a perda de atividade química celular (HOPWOOD, 1996).

A escolha pela fixação das amostras por formol 10% tamponado neste estudo foi pela melhor conservação e, conseqüentemente, maior exatidão nas análises e resultados de glicogênio hepático.

O modelo estatístico empregado para análise de comparação dos resultados, número de repetições e método de conservação das amostras, foram importantes para inferirmos que os resultados obtidos no presente estudo possam ter sido mais precisos e confiáveis em comparação aos de Leske e Mayersbach (1969), Cardell, Lerner e Babcock (1973) e Hammad, Striffler e Cardell (1982) para quantificação do glicogênio hepático.

A comparação do método colorimétrico com o de coloração pelo PAS nessa investigação permitiu evidenciar ausência de correlação significativa para a quantificação do glicogênio hepático, portanto, uma metodologia não pode ser realizada em detrimento da outra. Assim, o método colorimétrico fornece uma concentração média de glicogênio para um grande número hepatócitos, enquanto na coloração pelo PAS a marcação do glicogênio se concentra em uma determinada região do lóbulo hepático, sendo menos representativa da concentração total de glicogênio (PELLETIER *et al.*, 2013).

3.4 CONCLUSÕES

É importante quantificar o glicogênio em amostras biológicas para entender melhor a importância do metabolismo do glicogênio em todo o corpo e no nível celular. De acordo com os resultados, a análise bioquímica pelo método colorimétrico, por se tratar de um método quantitativo, deve ser a metodologia de escolha a ser aplicada para quantificação do glicogênio hepático na rotina laboratorial.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, M.D.; LOMAKO, J.; LOMAKO, W.M.; WHELAN, W.J. Catalytic activities of glycogenin additional to autocatalytic self-glycosylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.25, p.15315-15319, 1995.

BESFORD, Q.A.; SULLIVAN, M.A.; ZHENG, L.; GILBERT, R.G.; STAPLETON, D.; GRAY-WEALE, A. The structure of cardiac glycogen in healthy mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.51, n.5, p.887891, 2012.

BLOOM, W.L.; LEWIS, G.L.; SCHUMPERT, M.Z.; SHEN, T.M. Glycogen fractions of liver and muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v.188, p.631-636, 1951.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 3. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000.

BROWN, A. M. Brain glycogen re-awakened. **Journal of Neurochemistry**, v.89, n.3, p.537-552, 2004.

BURNS, L.V.; MORON, S.E.; CORDOVA, F.M.; SOUSA, L.F.; VEIGA, A.P.M.; BARBOSA, S.M.; CANDIDO, F.R.; CRUZ, O.M.; PRATA, D.M.; FEITOSA, A.C.F.; STEFANINE, N.R.; MONTEIRO, K.B.; SILVA, A.K.; ZIMERMANN, F.C.; RAMOS, A.T. Deaths of cows during long distance transportation to the slaughterhouse. Changes on histopathological examination, muscle and liver glycogen storage and muscle pH. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.7, p.07-13, 2014.

CARDELL, R.R.; LARNER, J.; BABCOCK, M.B. Correlation between Structure and Glycogen Content of Livers from Rats on a Controlled Feeding Schedule. **The Anatomical Record**, v.177, n.1, p.23-37, 1973.

DREILING, C.E.; BROWN, D.E.; CASALE, L.; KELLY, L. Muscle glycogen: comparison on iodine binding and enzyme digestion assays and application to meat samples. **Meat Science**, v.20, p.167-177, 1987.

DRURY, R.A.B. Theory and practice of histotechnology. **Journal of Clinical Pathology**, v.34, n.12, p.1406, 1981.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

GHAFOURI, Z.; RASOULI, M. Extraction of glycogen on mild condition lacks AIG fraction. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.20, p. 4918-4921, 2016.

GOFF, J.P. Distúrbios do metabolismo dos carboidratos e lipídios. In: REECE, W.O. (Ed.). **Dukes-Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. chap.7, p.522-531.

GOOD, C.A.; KRAMER, H.; SOMOGYI, M. The Determination of glycogen. **The Journal of Biological Chemistry**, v.100, p.485- 491, 1933.

GRAFFLIN, A.L.; MARBLE, A.; SMITH, R.M. Note on histological estimation versus chemical analysis of liver glycogen. **The Anatomical Record**, v.81, p.495-497, 1941.

GUTH, L.; WATSON, P.K. A correlated cerebral histochemical glycogen after and quantitative brain injury study in the rat. **Experimental Neurology**, v.22, p.550-602, 1968.

HAMMAD, E.F.; STRIFFLER, J.S.; CARDELL, R.R. Morphological and biochemical observations on hepatic glycogen metabolism in mice on a controlled feeding schedule I. Normal Mice. **Digestive Diseases and Sciences**, v.27, n. 8, p.680-691, 1982.

HAYNES, D.; HALL, P.; CLARK, D. A glycogen storage disease in rats. Morphological and Biochemical Investigations. **Virchows Archiv B**, v.42, p.289-301, 1983.

HOPWOOD, D. Fixation and fixatives. Techniques. In: BANCROFT, J.D e STEVENS, A. (Eds). **Theory and Practice of Histological**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1996. p.2345.

JURCZAK, M.J.; DANOS, A.M.; REHRMANN, V.R.; ALLISON, M.B.; GREENBERG, C.C.; BRADY, M.J. Transgenic overexpression of protein targeting to glycogen markedly increases adipocytic glycogen storage in mice. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v.292, n.3, p.952-963, 2007.

KERLY, M. The solubility of glycogen. **Biochemical Journal**, v.24, p.67-76, 1930.

KNOWLES, T.G.; WARRISS, P.D.; VOGEL, K. Stress physiology of animals during transport. In: GRANDIN, T. (Ed.). **Livestock Handling and Transport**. Wallingford: CAB International, 2014. chap. 21, p. 399-420.

KUGLER, J.H.; WILKINSON, W.J.C. Quantitative studies with the solutions used for the fixation of glycogen. **Acta Anatomica**, v.56, p.181-195, 1964.

LAKE, B.D. The histochemical evaluation of the glycogen storage diseases. A review of techniques and their limitations. **Histochemical Journal**, v.2, p.441-450, 1970

LESKE, R.; MAYERSBACH, H.V. The role of histochemical and biochemical preparation methods for the detection of glycogen. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.17, n.8, p.527-538, 1969.

McMANUS, J.F.A. Histological Demonstration of Mucin after Periodic Acid. **Nature**, n.158, p.158-202, 1946.

MINKA, N.S.; AYO, J.O. Physiological responses of food animals to road transportation stress. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.25, p.7415-7427, 2009.

NGOKERE, A.A.; CHOJI, T.P.P.; OGENYI, S.I.; KUMBISH, P.R.; MOSES, G.D.; AHMED, J.S.; SULEIMAN, I.; ZAMFARA, R.I.; BUKAR, S.M.; GWONG, V.D. Periodic acid Schiff reactions and general tissue morphology of conventionally-processed versus two rapid microwave-processed tissues. **British Journal of Applied Science & Technology**, v.12, n.2, p.1-14, 2016.

PADYKULA, H.A.; RICHARDSON, D. A Correlated histochemical and biochemical study of glycogen storage in the rat placenta. **American Journal of Anatomy**, v.112, p.215-41, 1963.

PEARSE, A.G.E. Histochemistry: Theoretical and Applied. 3rd Ed., p.89, Boston: Little, Brown & Co, 1968.

PELLETIER, J.; BELLOT, G.; POUYSSÉGUR, J.; MAZURE, N.M. biochemical titration of glycogen in vitro. **Journal of Visualized Experiments**, v.81, p.1-10, 2013.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 15ª Ed. Piracicaba: FEALQ, 451p., 2009.

RASOULI, M.; LEHNER, R. Anticalmodulin drugs due to the net effects cannot antagonize dibutyryl-cAMP mediated suppression of de novo synthesized lipids secretion in both cultured McArdle cells and rat hepatocytes. **Medical Journal of The Islamic Republic of Iran**, v.15, p.209-217, 2004.

RASOULI, M.; OSTOVAR-RAVARI, A.; SHOKRI-AFRA, H. Characterization and improvement of phenol-sulfuric acid microassay for glucose-based glycogen. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.18, p.2020-2024, 2014.

SAHA, S.K.; BREWER, C.F. Determination of the concentration of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoprotein using the phenol sulfuric acid method. **Carbohydrate Research**, v.254, p.157-167, 1994.

SIDDIG, R.S.A.; ABDALLA, A.B.; ISMAIL, H.I. Some Histochemical and Morphometric Observations on the liver of the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Global Journal of Animal Scientific Research**, v.3, n.2, p.503-511, 2015.

SHOKRI-AFRA, H.; OSTOVAR-RAVARI, A.; RASOULI, M. Improvement of the classical assay method for liver glycogen fractions: ASG is the main and metabolic active fraction. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.20, p.4328-4336, 2016.

SOARES FILHO, P.J.; KANAAN, S.; GUZMAN-SILVA, M.A. Avaliação do glicogênio hepático correlacionado com glicose sérica em ratas castradas sob tratamento com tibolona. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.47, n.5, p.561-568, 2011.

SULLIVAN, M. A.; LI, S.; ARONEY, S. T.; DENG, B.; LI, C.; ROURA, E., SCHULZ, B.L.; HARCOURTD, B.E.; FORBES, J.M.; GILBERT, R.G. A rapid extraction method for glycogen from formalin-fixed liver. **Carbohydrate Polymers**, v.118, p.9-15, 2015.

SULLIVAN, M.A.; ARONEY, S. T. N.; LI, S.; WARREN, F. J.; JOO, L.; MAK, K. S.; STAPLETON, D.I.; BELL-ANDERSON, K.S.; GILBERT, R.G. Changes in glycogen structure over feeding cycle sheds new light on blood-glucose control. **Biomacromolecules**, v.15, n.2, p.660-665, 2014.

VIES, J.V.D. Two methods for the determination of glycogen in liver. **Biochemical Journal**, v.57, n.3, 410-416, 1954.

WARMINGTON, A.R.; WILKINSON, J.M.; RILEY, C.B. Evaluation of ethanol-based fixatives as a substitute for formalin in diagnostic clinical laboratories. **The Journal of Histotechnology**, v.23, n.4, p.299-307, 2000.

ZAKOUT, Y.M.A.; SALIH, M.M.; AHMED, H.G. The effect of fixatives and temperature on the quality of glycogen demonstration. **Biotechnic & Histochemistry**, v.85, n.2, p.93-98, 2010