



**DANIEL DE SOUZA DIAS**

**USO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS NA ALIMENTAÇÃO DE GATOS SENIS  
FRENTE A DESAFIO POR ESTRESSE INDUZIDO**

**LAVRAS-MG**

**2021**

**DANIEL DE SOUZA DIAS**

**USO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS NA ALIMENTAÇÃO DE GATOS SENIS  
FRENTE A DESAFIO POR ESTRESSE INDUZIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia da Produção Animal, para obtenção do título de Mestre.

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad  
Orientadora

**LAVRAS-MG**

**2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Dias, Daniel de Souza.

Uso de antioxidantes naturais na alimentação de gatos senis  
frente a desafio por estresse induzido / Daniel de Souza Dias. -  
2021.

59 p.

Orientador(a): Flavia Maria de Oliveira Borges Saad.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de  
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Curcumina. 2. Cortisol. 3. Capacidade Antioxidante Total. I.  
Saad, Flavia Maria de Oliveira Borges. II. Título.

**DANIEL DE SOUZA DIAS**

**USO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS NA ALIMENTAÇÃO DE GATOS SENIS  
FRENTE A DESAFIO POR ESTRESSE INDUZIDO**

**USE OF NATURAL ANTIOXIDANTS IN THE DIETS OF SENIOR CATS EXPOSED  
TO AN INDUCED STRESS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia da Produção Animal, para obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 16 de setembro de 2021.

Dr.<sup>a</sup>. Karen Guttenkunst Lisenko ADM

Dr. Carlos Eduardo do Prado Saad UFLA



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad  
Orientadora

**LAVRAS-MG**

**2021**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Zootecnia (DZO), pela oportunidade.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, pelo conhecimento transmitido, permitindo que esse trabalho fosse realizado.

À professora Flávia Saad, pela orientação, disponibilidade e pela oportunidade para a realização desse trabalho.

Ao Olivier Capet, pela oportunidade e confiança na condução do experimento.

À empresa Archer Daniels Midland (ADM) pela confiança e oportunidade, pelo financiamento e por ter tornado esse trabalho possível.

À Moara Matos, por ter ajudado tão ativamente durante todas as etapas da condução do experimento, por todo apoio nas coletas e nas análises laboratoriais.

À Renata Rocha, pelos anos de amizade e pela ajuda com as análises estatísticas.

A todos os integrantes do Centro de Nutrição, por todo apoio, amizade e pela ajuda na execução deste experimento: Ariete Alves, Beatriz Crispim, Cleide Silva, Geraldo Silva, José Eustáquio, Sebastião Barbosa, Vítor Silva, Valério Teixeira e Tiago Silva.

Ao médico veterinário Fábio Menegucci Carvalho, por toda ajuda nas coletas.

À Waleska Silva, pela amizade, por todo o conhecimento transmitido, pela paciência e por toda ajuda nesse experimento, e por ter me incentivado a cursar o mestrado profissional.

Aos meus pais, Andrei e Denise, por todo apoio que sempre me deram, e que mesmo com toda a distância, estiveram sempre tão próximos. Aos meus irmãos Raphael e Marina pelo apoio, amizade e incentivo.

## RESUMO

Para gatos, situações do dia-a-dia são agentes potencialmente estressantes, como idas ao veterinário e a presença de pessoas estranhas e poluição sonora. Essas situações de estresse acarretam um aumento na produção de radicais livres, que são associados a diversas doenças. Antioxidantes de origem dietética possuem papel importante para contribuir na proteção do organismo contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Neste estudo foram avaliados os efeitos da adição de antioxidantes naturais em dietas para gatos. Foram utilizados 30 gatos senis (de 8 a 14 anos), que foram divididos em 5 grupos homogêneos, sendo 6 animais por grupo. As dietas experimentais foram: Controle (alimento seco extrusado *super premium*); XT - alimento *super premium* + curcumina e capsaicina; XTPP - alimento *super premium* + curcumina e capsaicina + *blend* de polifenóis; XTCB - alimento *super premium* + curcumina e capsaicina + extrato de *cranberry*; XTME - alimento *super premium* + curcumina e capsaicina + extrato de melão. O período experimental foi de 71 dias. Foram realizadas coletas de sangue e urina nos dias 0, 50, 61 e 71. No dia 60 e 61 os animais foram submetidos à um estresse induzido, por meio de uma visita ao recinto dos cães em caixas de transporte e barulhos de panelas (agentes estressantes potencialmente comuns para gatos domésticos). Os parâmetros avaliados foram: cortisol, TBARS, superóxido dismutase, catalase, óxido nítrico, capacidade antioxidante total, e parâmetros urinários. Não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros urinários ( $P > 0,05$ ). As dietas XTCB e XTME apresentaram maiores níveis de T-AOC ( $P < 0,05$ ), sendo que o XTME também apresentou maiores níveis de Catalase e maior redução nos níveis de TBARS após a indução ao estresse. A suplementação de antioxidantes naturais foi efetiva em melhorar o *status* oxidativo de gatos senis sob estresse induzido.

Palavras-chave: Capacidade Antioxidante Total, Cortisol, Curcumina, Felinos.

## ABSTRACT

For cats, everyday situations are potentially stressful agents, such as trips to the vet and the presence of strange people. These stressful situations lead to an increase in the production of free radicals, which are associated with several diseases. Dietary antioxidants play an important role in helping to protect the body against damage caused by oxidative stress. This study aimed to evaluate the effects of adding natural antioxidants to cats' diets. Thirty senile cats (from 8 to 14 years old) were used and were divided into 5 homogeneous groups, being 6 animals per group. The experimental diets were: Control (extruded super premium dry cat food); XT - super premium dry cat food + curcumin and capsaicin; XTPP - super premium dry cat food + curcumin and capsaicin + polyphenol blend; XTCB - super premium dry cat food + curcumin and capsaicin + cranberry extract; XTME - super premium dry cat food + curcumin and capsaicin + melon extract. The experimental period was 71 days. Blood and urine collections were carried out on days 0, 50, 61 and 71. On days 60 and 61, the animals were submitted to an induced stress, through a visit to the nearby dogs' kennel in transportation boxes, and pan noises (potential common stressors for domestic cats). The parameters obtained were: cortisol, TBARS, superoxide dismutase, catalase, nitric oxide, total antioxidant capacity, and urinary parameters. No significant differences were noticed in urinary parameters ( $P>0.05$ ). XTCB and XTME diets presented higher T-AOC levels ( $P<0.05$ ), and XTME also showed higher Catalase levels, and greater reduction in TBARS levels after the stress induction. The supplementation of natural antioxidants was effective in improving the oxidative status of senile cats under induced stress.

Keywords: Cortisol, Curcumin, Feline, Total Antioxidant Capacity.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE – REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Respostas globais ao estresse ..... 14

Figura 2 – Redução tetravalente do oxigênio molecular ( $O_2$ ) na mitocôndria até a formação de água ( $H_2O$ ). Várias ROS são formadas durante este processo, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH\bullet$ ). ..... 15

Figura 3 – Integração dos sistemas de defesa enzimáticos..... 17

Figura 4 – Mecanismo de ação proposto da SOD encapsulada em fibra alimentar no ambiente extracelular. .... 24

### SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Figura 5 – Representação gráfica dos valores médios dos parâmetros sanguíneos em cada tempo (dia)..... 46



## LISTA DE TABELAS

### PRIMEIRA PARTE – REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 – Composição nutricional da dieta padrão\* ..... 37

Tabela 2 – Inclusão dos ingredientes funcionais por tratamento experimental ..... 38

### SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Tabela 3 – Médias de consumo diário de água (ml/kg<sup>0,67</sup>) e alimento (Kcal/kg<sup>0,67</sup>) por grupo. .... 41

Tabela 4 – Médias de valores de parâmetros urinários (pH, densidade e volume) por grupo. .... 42

Tabela 5 – Médias de valores de parâmetros urinários (pH, densidade e volume) por tempo..... 42

Tabela 6 – Médias de valores de parâmetros sanguíneos, por grupo..... 43

Tabela 7 – Médias de valores de parâmetros sanguíneos, por tempo (dias). .... 43

Tabela 8 – Valores médios dos parâmetros sanguíneos e desdobramento do efeito do tempo para cada grupo (dieta)..... 44

Tabela 9 – Valores médios dos parâmetros sanguíneos e desdobramento do efeito da dieta para cada tempo (dia). .... 45

## LISTA DE SIGLAS

CAT	Catalase
Cu	Cobre
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe	Ferro
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidase
MDA	Malondialdeído
NRC	National Research Council
ON	Óxido Nítrico
Se	Selênio
SOD	Superóxido Dismutase
SISVAR	Sistema de Análise de Variância
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
T-AOC	Capacidade Antioxidante Total
Zn	Zinco

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	12
1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
2.	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1	<b>Estresse Fisiológico</b> .....	13
2.2	<b>Radicais livres</b> .....	14
2.3	<b>Antioxidantes enzimáticos</b> .....	16
2.4	<b>Estresse Oxidativo</b> .....	18
2.5	<b>Ingredientes fonte de Antioxidantes Naturais</b> .....	19
2.5.1	<b>Curcumina e capsaicina</b> .....	19
2.5.2	<b>Polifenóis</b> .....	21
2.5.3	<b>Extrato de Cranberry</b> .....	22
2.5.4	<b>Extrato de Melão</b> .....	23
2.6	<b>Parâmetros sanguíneos relacionados ao <i>status</i> oxidativo</b> .....	25
2.6	<b>Parâmetros urinários para gatos saudáveis</b> .....	26
4.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	27
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGO</b> .....	33
	<b>ANEXO A – ANÁLISES DE VARIÂNCIA DOS PARÂMETROS ESTUDADOS</b> .....	57

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1. INTRODUÇÃO**

A população de gatos no Brasil é de aproximadamente 24,7 milhões. De 2018 a 2019 o número de gatos domiciliados aumentou 3,0%, enquanto aumento o número de cães aumentou 1,7% no mesmo ano (ABINPET, 2019). Esse crescimento na população felina advém de diversos fatores, como: a boa adaptação ao estilo de vida dos grandes centros urbanos, maior independência em relação aos cães, por se adaptarem a pequenos espaços (como apartamentos) e por seu comportamento alimentar e higiene.

A intensa aproximação dos tutores com seus pets e a humanização dos animais de companhia implica em inúmeros benefícios aos animais, porém algumas atividades consideradas rotineiras como banhos, tratamentos estéticos, idas e veterinários, transporte, manipulação indesejada ou por pessoas desconhecidas, introdução de novos animais no ambiente, confinamento, solidão, poluição sonora, podem resultar em estresse fisiológico, especialmente para os gatos.

Essas situações de estresse são muitas vezes inevitáveis, e como a recuperação da homeostase depende altamente da capacidade individual do animal, são necessárias estratégias para que se possa manter a saúde dos animais. A dieta é um fator de grande importância nessa manutenção da saúde de animais sob estresse.

A utilização de ingredientes funcionais vem sendo bastante estudada em dietas de humanos e animais de companhia. Dentre estas substâncias se destacam os antioxidantes, que são capazes de neutralizar as espécies reativas ao oxigênio antes que as mesmas ataquem as estruturas celulares ou, ainda, no combate das reações em cadeia. Os antioxidantes mais estudados na nutrição são polifenóis, oligoelementos (cobre, zinco, selênio e manganês) e extratos vegetais.

O uso de extratos vegetais – fonte de antioxidantes naturais – em rações de animais de companhia tem se tornado uma tendência crescente no mercado brasileiro e mundial, uma vez que os tutores tem buscado cada vez mais produtos com um apelo natural, que proporcione benefícios aos seus pets.

Diversos estudos avaliaram o fornecimento de diferentes fontes de antioxidantes combinadas na dieta, e apesar de resultados variados, em geral estes estudos têm mostrado uma modulação da função imune e redução de marcadores do estresse oxidativo em animais que

consumiram dietas contendo dois ou mais ingredientes antioxidantes, sugerindo que a ação de diferentes antioxidantes ocorra de forma combinada ou sinérgica.

O objetivo deste trabalho foi avaliar um alimento seco e extrusado para gatos, com inclusão de diferentes ingredientes fontes de antioxidantes naturais, seus efeitos em parâmetros urinários e parâmetros sanguíneos marcadores do estresse oxidativo.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Estresse Fisiológico**

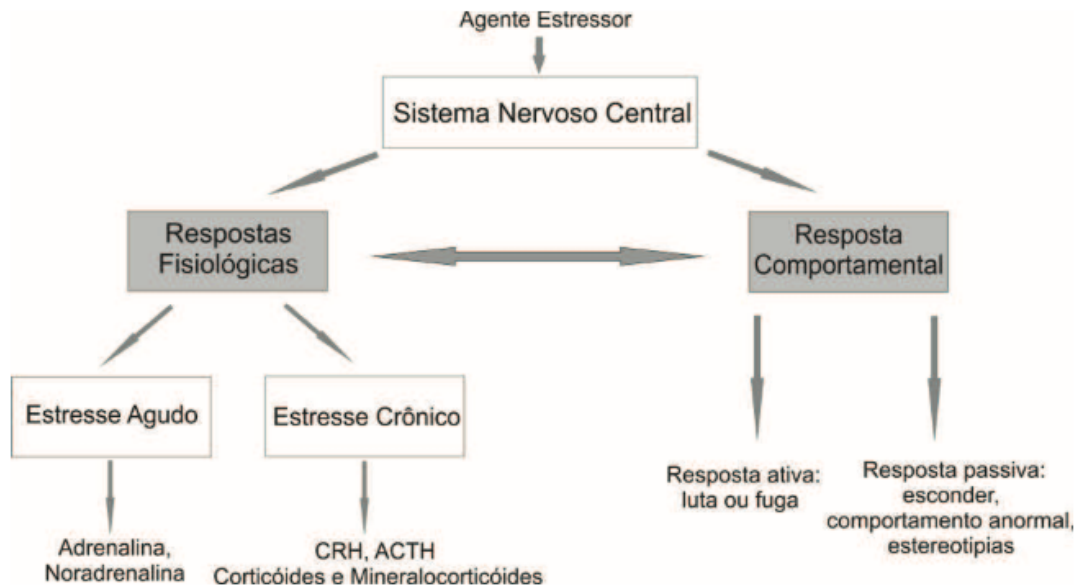
Estresse é a soma das reações biológicas a qualquer estímulo adverso, seja ele físico ou emocional, interno ou externo, que tende a perturbar a homeostase de um organismo. O ritmo de vida atual, com toda tecnologia e suas consequências, acaba gerando problemas não só para os homens como também para os animais. Eles passaram a viver de uma forma totalmente diferente do que seria natural e estão tendo que se adaptar a uma nova rotina que antes não existia. A poluição sonora e do ar, confinamento, solidão, manejo, transporte e muitas outras dificuldades agora fazem parte de sua rotina diária (CARRAMENHA; CARREGARO, 2012).

Quando um animal detecta um estressor, ele inicia uma resposta ao estresse. Os aspectos fisiológicos dessa resposta ao estresse são mediados por dois sistemas endócrinos. Os hormônios catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) são liberados da medula adrenal muito rapidamente e têm vários efeitos sobre o comportamento, o metabolismo e o sistema cardiovascular, como aumento da frequência cardíaca e força da contração do miocárdio, dilatação das pupilas e brônquios, e redução da atividade digestiva no organismo. Isso é comumente chamado de resposta de luta ou fuga (SQUIRES, 2003; SHARMA, 2018).

No segundo sistema, os hormônios glicocorticoides são liberados do córtex adrenal, como o cortisol e a corticosterona. Os glicocorticoides orquestram uma ampla gama de respostas ao estressor. Eles têm efeitos diretos no comportamento, metabolismo e reservas de energia, reprodução, crescimento e sistema imunológico. (SILVA et al., 2018).

A soma total dessas respostas é projetada para ajudar o animal a sobreviver a um estímulo estressante de curto prazo. No entanto, quando expostos a condições de estresse de longo prazo, os efeitos mediados por glicocorticoides tornam-se mal adaptativos e podem levar a doenças (SQUIRES, 2003).

Figura 1 – Respostas globais ao estresse



Fonte: (OGOSHI, 2014).

O cortisol requer um período relativamente longo para retornar aos valores normais após uma situação estressante. Segundo Lacerda Neto et al., 2004, depois de um procedimento cirúrgico, a concentração plasmática de cortisol fica aumentada 24 horas após a cirurgia e começa a diminuir progressivamente até retornar os níveis basais, 72 horas depois.

O cortisol promove alteração no metabolismo de nutrientes, como a gliconeogênese com base em aminoácidos, aumento da mobilização e oxidação de ácidos graxos, elevação dos níveis de colesterol e triacilglicerol plasmáticos e aumento da deposição de glicogênio no fígado. Ele também, interfere na distribuição de água e eletrólitos nos tecidos e, além disso, tem efeitos sobre imunidade e inflamação, provavelmente, pela iniciação da síntese de prostaglandinas (SQUIRES, 2003).

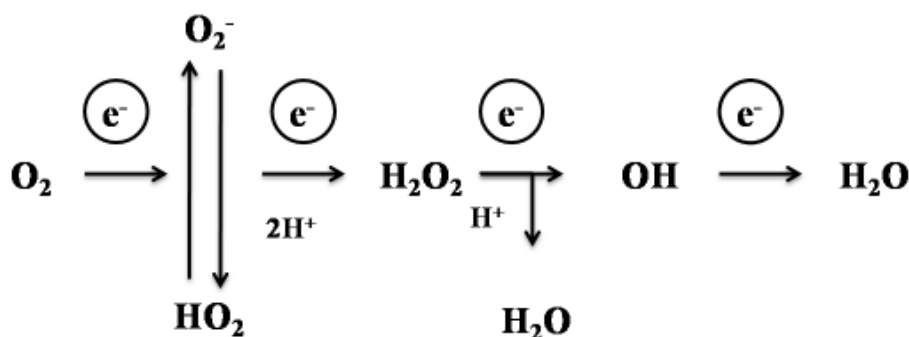
Por ser um hormônio envolvido em muitos processos metabólicos geradores de radicais livres, a elevação plasmática de cortisol também tem sido associada, também, com o aumento do estresse oxidativo no organismo (DIAZ et al., 2010).

## 2.2 Radicais livres

A oxidação é um fenômeno natural e necessário para células em que o oxigênio é utilizado na respiração e produção de energia. Em condições fisiológicas normais de 3% a 5% do oxigênio celular é transformado em radicais livres (SOHAL; WEINDRUCH, 1996), podendo aumentar drasticamente em condições estressantes. Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Tais mecanismos podem, especialmente, ser favorecidos pelos íons ferro e cobre. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres (BARBOSA et al., 2010).

Durante a respiração aeróbica, a conversão do  $O_2$  a  $H_2O$  resulta na formação de diversos compostos intermediários chamados de espécie reativas de oxigênio (EROs): radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, que são correspondentes aos passos de uma redução por um, dois ou três elétrons, respectivamente (JORDÃO Jr. et al., 1998).

Figura 2 – Redução tetravalente do oxigênio molecular ( $O_2$ ) na mitocôndria até a formação de água ( $H_2O$ ). Várias ROS são formadas durante este processo, como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ).



Fonte: (LUZ et al., 2011).

O radical superóxido ( $O_2^-$ ) é formado após a primeira redução do  $O_2$ . Ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), apesar de não ser um radical livre, pois não possui elétrons desemparelhados na última camada, apresenta poder oxidante indireto, participando da reação que produz o radical hidroxila (reações de Fenton e Harber-Weriss) e interagindo com o radical superóxido ( $O_2^-$ ). Nesse caso, ele possui ação potencialmente deletéria, além de ter vida longa e poder atravessar membranas celulares, sendo tóxico e podendo degradar qualquer célula (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; EATON, 1991, BARBOSA et. al., 2010).

O radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) é considerada a EROs mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida dessa molécula com metais ou outros radicais no próprio local onde foi produzido, confirma sua alta reatividade. Assim, se o  $\text{OH}\cdot$  for produzido próximo ao DNA e a este estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimidínicas, levando à inativação ou mutação do DNA. É frequentemente reconhecido como o mais importante por sua habilidade em iniciar a lipoperoxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A lipoperoxidação é a degradação oxidativa de lipídeos, normalmente iniciada por um mecanismo de ação em cadeia de um radical livre. A membrana das células e organelas celulares contém grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, tornando-as um dos componentes celulares mais atingidos pelas (EROs). A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia que consiste de três fases: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação ocorre o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado ( $\text{LH}\cdot$ ) da membrana celular, que pode ser realizado pelo  $\text{OH}\cdot$  ou pelo radical alcóxila ( $\text{LO}\cdot$ ), o que gera o radical lipídico ( $\text{L}\cdot$ ). Na primeira equação de propagação, o radical L reage rapidamente com o oxigênio ( $\text{O}_2$ ), resultando em radical peróxila ( $\text{LOO}\cdot$ ), que, por sua vez, sequestra um novo hidrogênio do  $\text{LH}\cdot$ , formando novamente o radical  $\text{L}\cdot$  na segunda equação, isto é na etapa de propagação. A reação não termina até os radicais  $\text{L}\cdot$  e  $\text{LOO}\cdot$  produzidos nas etapas anteriores se propagarem até se auto destruírem. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LUZ, 2011).

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Usualmente esse sistema é dividido em enzimático e não-enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética (BARBOSA et al., 2010).

### **2.3 Antioxidantes enzimáticos**

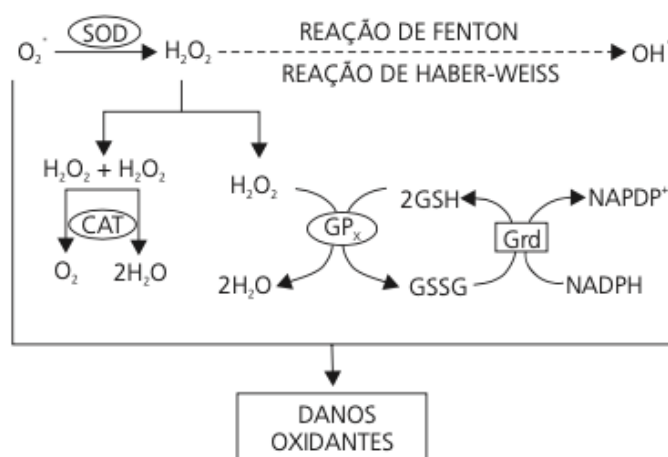
O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicaais, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (BARBOSA et al., 2010)



Dentre as enzimas antioxidantes envolvidas na remoção das EROs, a SOD é ativada para catalisar a dismutação do radical superóxido em  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Existem quatro isoenzimas da SOD que diferem pelo metal ligado ao seu sítio ativo, podendo ser o Cu/Zn (isoforma SOD 1, encontrada no citosol), o Mn (isoforma SOD 2, encontrada na mitocôndria), o Fe (isoforma SOD 4 encontrada em plantas, protozoários e cianobactérias), e a isoforma SOD 3, que também é complexada com Cu/Zn porém é liberada no meio extracelular, possui um peptídeo sinalizador presente no espaço extracelular de tecidos como endotélio vascular do músculo liso, células alveolares tipo III, córnea e esclerótica. A SOD 2 é considerada a principal SOD atuante na defesa contra o estresse oxidativo (VALDÍVIA et al, 2009).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado pela ação da SOD é mais estável que o  $\text{O}_2^-$ , mas ainda é tóxico e, então, precisa da ação de outras enzimas. Para que ele seja removido das células, são necessárias reações adicionais, que são realizadas pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (TUCKER, 2002). A GPx catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  às custas da conversão da Glutaciona Reduzida (GSH) a Glutaciona Oxidada (GSSG). Glutaciona Reduzida é o tiol mais abundante no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A Catalase (CAT) é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Uma vez que a GPx é encontrada em vários compartimentos celulares e a CAT é localizada principalmente nos peroxissomos, a eficácia de remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas células é maior com GPx. No entanto, na ocorrência de estresse oxidativo, a catalase é a enzima antioxidante mais adaptável, desempenhando um papel significativo na defesa das células contra danos oxidativos (OGOSHI, 2014).

Figura 3 – Integração dos sistemas de defesa enzimáticos



Fonte: (BARBOSA et al., 2010).

## 2.4 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Ou seja, quando existem Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em excesso em relação aos mecanismos de defesa antioxidante. Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos, como peroxidação lipídica das membranas celulares, destruição de organelas e de ácidos nucleicos (MCMICHAEL, 2007; BARBOSA et al., 2010).

As doenças e problemas relacionados com o desbalanço das EROs, entre outras, incluem: Envelhecimento, mutações, câncer, aterosclerose, lesão por toxicidade de O<sub>2</sub> em pulmão e retina, disfunção renal pós-transplante, artrite reumatoide, hemocromatose transfusional, doenças autoimunes, toxicidade decorrente da exposição a xenobióticos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997)

A inflamação é uma das manifestações do estresse oxidativo, e as vias que geram os mediadores da inflamação, como moléculas de adesão e interleucinas, são todas induzidas pelo estresse oxidativo (CARILLON et al., 2013).

Por outro lado, as células inflamatórias também produzem mediadores solúveis, como metabólitos do ácido araquidônico, citocinas e quimiocinas, que agem recrutando ainda mais células inflamatórias para o local do dano e produzindo mais EROs (REUTER et al., 2010). Durante a inflamação, mastócitos e leucócitos são recrutados para o local do dano, o que leva a uma "explosão respiratória" devido a um aumento da captação de oxigênio e, assim, um aumento da liberação e acúmulo de EROs no local do dano (DAY, 2010).

Devido à essa relação entre estresse oxidativo e inflamação, a teoria de envelhecimento baseada na oxidação-inflamatória (do inglês *oxidation-inflammatory theory of ageing*) foi proposta. A ativação do sistema imunológico induz um estado inflamatório que cria um círculo vicioso em que o estresse oxidativo crônico e a inflamação se alimentam e, consequentemente, aumentam as morbidades relacionadas ao envelhecimento. O envelhecimento, portanto, seria uma perda da homeostase devido a um estresse oxidativo crônico que afeta principalmente os sistemas reguladores, como os sistemas nervoso, endócrino e imunológico. (LIGUORI et al., 2018).

Além do sistema de defesa enzimático mencionado anteriormente, o sistema de defesa não-enzimático também contribui para inibir ou reduzir os danos causados pelas EROs. Esse

sistema inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno, precursores das vitaminas E e A, respectivamente, são compostos potencialmente antioxidantes (BARBOSA et al, 2010).

Portanto a dieta é, sem dúvida, um fator de grande importância na modulação do estresse oxidativo. Estudos em cães e gatos relatam efeitos benéficos quando fornecidas dietas com quantidades aumentadas de antioxidantes em marcadores de estado oxidativo, e estão começando a mostrar benefícios em certas doenças relacionadas ao estresse, bem como aumento da longevidade. Nesse contexto uma dieta rica em antioxidantes pode ser muito benéfica para gatos em processos de envelhecimento (LAFLAMME, 2014; BARBOSA et al, 2010).

## **2.5 Ingredientes fonte de Antioxidantes Naturais**

Existem muitos ingredientes que podem ser utilizados na alimentação de cães e gatos. A seguir serão expostos alguns de origem natural, fontes de antioxidantes.

### **2.5.1 Curcumina e capsaicina**

A cúrcuma (*Curcuma longa*) é uma especiaria que tem recebido muito interesse tanto do mundo médico / científico quanto da culinária. Ela é uma planta herbácea perene rizomatosa da família do gengibre (PRIYADARSINI, 2014).

Tradicionalmente, a cúrcuma é usada há muitos anos como aromatizante, corante e conservante, e também no tratamento de muitas doenças. A curcumina é o composto nutracêutico da cúrcuma e apresenta atividades antimutagênica, anti-inflamatória anticarcinogênica e antioxidante (SEHGAL et al., 2012; AK e GÜLÇİN, 2008).

Uma revisão sistemática e meta-análise de dados de controle randomizados relacionados à eficácia da suplementação com curcuminóides purificados nos parâmetros de estresse oxidativo indicou um efeito significativo da suplementação em todos os parâmetros investigados, incluindo atividades plasmáticas de SOD e catalase, também como concentrações séricas de glutathione peroxidase (GSH) e peróxidos lipídicos (MENON, 2007)

O efeito da curcumina nos radicais livres é realizado por vários mecanismos diferentes. Ela pode eliminar diferentes formas de radicais livres, como espécies reativas de oxigênio e

nitrogênio (MENON, 2007). Além disso, a curcumina é um composto lipofílico, o que a torna um limpador eficiente de radicais peroxila, portanto, assim como a vitamina E, a curcumina também é considerada um antioxidante de quebra de cadeia (PRIYADARSINI, 2014).

Em um trabalho realizado por Campigotto et al. 2020, o uso de curcumina na dieta de cães reduziu a peroxidação do alimento, melhorou o status oxidativo dos animais, especialmente na estimulação do sistema antioxidante, e também demonstrou níveis séricos mais baixos de proteína e globulina, podendo indicar um efeito anti-inflamatório.

No entanto, as propriedades farmacocinéticas da curcumina indicam que, após a administração oral, ela é pouco absorvida pelo organismo, enquanto a maior parte é excretada nas fezes (AMMON; WAHL, 1991). Um grande foco das pesquisas com curcumina tem sido focado na síntese de análogos da curcumina e formulações de nano partículas para aumentar sua biodisponibilidade. O uso de intensificadores de biodisponibilidade, incluindo outros produtos naturais, tem se mostrado promissores no aumento da absorção celular de curcuminoides (CORRI, 2016).

Os capsaicinoides são um grupo de compostos responsáveis pelo sabor picante e pungente da pimenta (*Capsicum annuum* e *Capsicum frutescens*) (ROLLYSON et al., 2014).

Durante as últimas décadas, os benefícios farmacológicos da capsaicina e seus mecanismos subjacentes foram examinados extensivamente. As principais eficácias biológicas da capsaicina são efeitos analgésicos, antioxidantes, antiinflamatórios, anticarcinogênicos, antiobesidade, cardioprotetores e de modulação metabólica (Lu et al. 2020).

Foi relatado efeito modulador de capsaicina no estresse oxidativo induzido por lipopolissacarídeo em órgãos de ratos. A capsaicina também protegeu a mucosa gástrica de ratos contra o estresse oxidativo induzido (PYUN et al., 2014).

O potencial antioxidante da curcumina e capsaicina foi documentado experimentalmente em sistemas *in vitro* e em alguns estudos *in vivo*. Também existem relatos de que a combinação de curcumina e capsaicina oferece maior efeito protetor na oxidação do LDL do que o cada composto individualmente (ROLLYSON et al., 2014).

Também foi observado que, embora a curcumina dietética e a capsaicina diminuíssem moderadamente a inflamações induzidas por carragenina em ratos, a combinação das duas especiarias foi mais eficaz (MANJUNATHA; SRINIVASAN, 2007).

### 2.5.2 Polifenóis

Os polifenóis representam uma grande família de fito químicos, incluindo flavonoides, isoflavonoides, ligninas, estilbenoides, curcuminoides e taninos e são muito comuns em alimentos vegetais (COLITTI et al., 2019). Eles possuem excelentes propriedades antioxidantes e de eliminação de radicais livres (ZEYUAN et al., 1998).

Os polifenóis dietéticos e seus metabólitos exercem um efeito benéfico por meio de uma combinação de mecanismos que podem incluir a redução da inflamação e do estresse oxidativo (PAN et al., 2010).

Os chás (preto, verde, branco e oolong) são bebidas amplamente consumidas e ricas em polifenóis, que tem atraído muita atenção nos últimos anos devido aos seus inúmeros benefícios à saúde, como propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas e antiarterioscleróticas (PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011). Esses chás são oriundos da mesma planta (*Camellia sinensis*), diferindo apenas no processo, sendo não fermentado (chá verde e chá branco), parcialmente fermentado (chá oolong) e completamente fermentado (chá preto) (DIAS et al., 2013).

Os polifenóis do chá, também conhecidos como catequinas, são a base de cerca de 30 tipos de compostos fenólicos, que incluem principalmente epigalocatequina-3-galato (EGCG), epigalocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG) e epicatequina (EC) (MAO et al., 2017).

Chás não fermentados são conhecidos por terem alto conteúdo de polifenóis em relação aos fermentados, sendo a epigalocatequina 3-galato (EGCG) o antioxidante mais abundante e poderoso (DIAS et al., 2013).

Estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que os polifenóis derivados desses chás podem ter a bioatividade de afetar a patogênese de várias doenças crônicas. Os efeitos positivos dos polifenóis do chá em auxiliar no tratamento de doenças foram parcialmente atribuídos à sua capacidade antioxidante (MAO et al., 2017).

Além disso, a capacidade das catequinas do chá verde de se ligarem ao componente de ferro da mioglobina, ajuda a retardar a oxidação dos lipídios ao reagir com os radicais livres (PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011). Alguns trabalhos sugerem que, apesar de possuírem processamento parecido, o chá branco possui níveis de antioxidantes mais altos do que o chá verde (DIAS et al., 2013).

Outro ingrediente que tem ganhado muita atenção devido a seus benefícios, é o extrato de semente de uva, um subproduto natural da indústria de vinho e sucos de uva, e que contém

proantocianidinas oligoméricas bioativas. Seus benefícios incluem atividade antioxidante, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobica (JOSHI et al., 2015).

Em um estudo *in vitro* realizado por El-Beltagi et al. (2016), a mistura de extrato de chá verde e extrato de semente de uva foi considerada um antioxidante mais eficaz do que cada extrato separadamente. Pôde-se concluir que a mistura dos dois extratos atuou como um poderoso antioxidante diminuindo os efeitos nocivos dos radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) e, portanto, a peroxidação lipídica.

Além os exemplos citados acima, casca da maçã, além de ser um resíduo da indústria, também é uma fonte valiosa de fito químicos, particularmente polifenóis, que estão mais concentrados na casca do que em outras partes da fruta. Flavonoides, flavonóis, floridzina, procianidinas, ácido clorogênico e antocianina são alguns dos polifenóis contidos na maçã, cuja composição muda de acordo com a cultivar e as condições de cultivo (CASAZZA et al., 2020).

### 2.5.3 Extrato de *Cranberry*

O *cranberry* (*Vaccinium macrocarpon*) é uma fruta nativa da América do Norte e sua história remete a muitos anos. Desde os anos 1600, os nativos americanos misturavam carne de alce com uma pasta de *cranberry* para aumentar a conservação dos alimentos. Além disso, também era usada como tinta vermelha natural para tapeçaria e roupas. Também se acreditava que a fruta tinha propriedade antisséptica, sendo utilizada para auxiliar na cura de feridas causadas por flechas venenosas (OLSEWSKI et al., 2020; KHOO; FALK, 2014).

Atualmente, o *cranberry* se tornou uma fruta popular usada como lanche, bebida ou como ingrediente em produtos de panificação, barras, *smoothies*, misturas para trilhas e cereais (KHOO; FALK, 2014), e junto com o *blueberry*, ocupa o primeiro lugar no ranking de frutas que contem maior quantidade e qualidade de constituintes antioxidantes (CALDAS et al., 2018).

Os *cranberries* possuem uma composição distinta de compostos fenólicos, como três classes diferentes de flavonoides (flavonoides, antocianinas e proantocianidinas), catequinas e diferentes ácidos fenólicos que têm vários efeitos, como antioxidante, modulação da atividade enzimática e efeitos reguladores da expressão gênica (CALDAS et al., 2018).

As proantocianidinas são consideradas anti-inflamatórias, antialérgicas, vasodilatadoras, cardioprotetoras, imunoestimulantes, antivirais, inibidoras do estresse oxidativo e anticarcinogênico (DÉZIEL et al., 2010). Os antioxidantes do *cranberry* têm a capacidade de

se ligar à lipoproteína de baixa densidade (LDL) e protegê-los da oxidação, aumentar a capacidade antioxidante do plasma e aumentar os níveis de HDL (SCHIDFAR, 2012).

As proantocianidinas do Tipo A são as únicas encontradas no *cranberry*, e podem auxiliar a prevenir que determinadas bactérias nocivas se proliferem no organismo através da interferência na adesão bacteriana em diferentes tecidos. (OLSEWSKI et al., 2017). Apresentam capacidade de inibição da adesão bacteriana ao trato urinário reduzindo dessa forma o risco de infecção (RAZ et al., 2004).

Alguns estudos realizados em humanos também mostraram que a ingestão de *cranberry* ajuda a prevenir a aderência de *E. coli* nas células superficiais da bexiga. Em estudos realizados em porcos, observou-se que o *cranberry* foi capaz de reduzir o pH urinário, mas não foi eficiente no tratamento de ITU (infecção do trato urinário), não sendo eficaz como único tratamento para a doença (OLSEWSKI et al., 2017; MAZUTTI et al., 2012).

Embora o efeito antioxidante do *cranberry* esteja bem estabelecido, o mecanismo exato pelo qual seus polifenóis promovem esses benefícios ainda não foi totalmente elucidado. No entanto, independentemente da fonte, os polifenóis exibem mecanismos de ação semelhantes, portanto, embora estudos com *cranberry* não tentem investigar a fundo seus mecanismos de ação antioxidante, seus polifenóis agem de forma semelhante aos polifenóis extraídos de outras frutas. Dois mecanismos de ação têm sido amplamente descritos na literatura - um direto, onde os polifenóis atuam na eliminação do radical superóxido ( $O_2^-$ ) e outras espécies reativas de oxigênio do organismo; e um indireto, onde os polifenóis podem estimular a defesa antioxidante endógena, estimulando o fator de transcrição NF-E2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), responsável por regular a expressão de enzimas antioxidantes, como a catalase e a glutathione peroxidase (JOSEPH et al., 2016, apud CALDAS et al., 2018).

#### 2.5.4 Extrato de Melão

Desde 2000, o extrato de melão naturalmente enriquecido com SOD foi desenvolvido para uso como suplemento dietético, e existem alguns estudos indicando que o melão SOD combinado com gliadina pode ter um efeito auxiliar em patologias que são impulsionadas pelo estresse oxidativo (ROMAO, 2015).

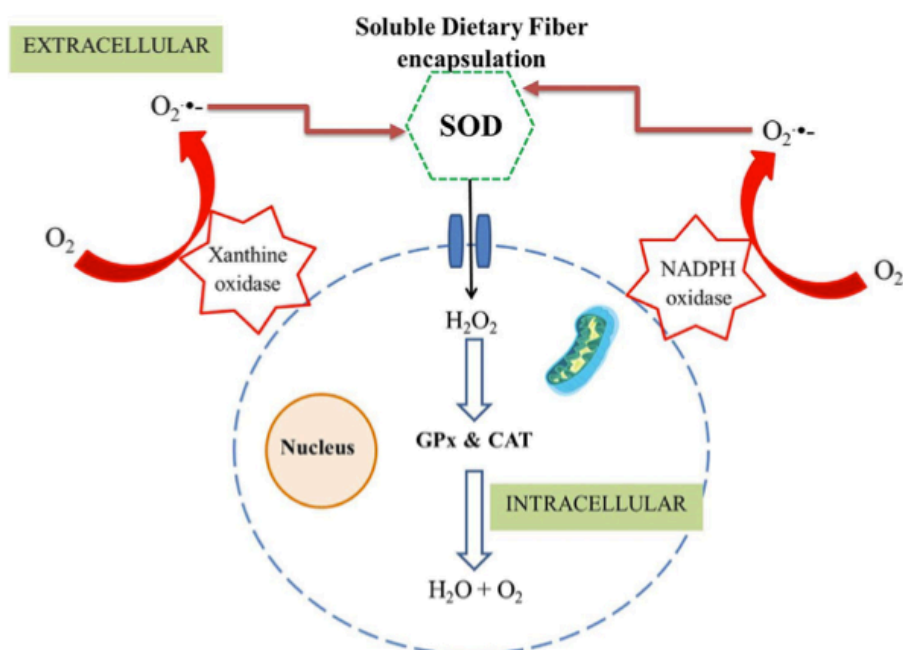
A SOD catalisa a conversão do radical  $O_2^-$  (formado naturalmente a partir do  $O_2$  durante a respiração mitocondrial) em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Ela está presente em todos os organismos aeróbios, desde bactérias até humanos (ROMAO, 2015).  $H_2O_2$  ainda é nocivo, portanto, a atividade

isolada da SOD pode ser vista como pró-oxidante, e não antioxidante. No entanto, níveis mais elevados de  $H_2O_2$  estimulam maior ação de enzimas antioxidantes como CAT e GPx, portanto o benefício da ingestão de SOD seria como um estimulante para outras enzimas antioxidantes, dando sinais de estresse oxidativo (ROMAO, 2015). Nesse contexto, a suplementação de SOD parece ser vantajosa em relação aos antioxidantes não enzimáticos, uma vez que SOD não é consumida na desintoxicação de EROs (ROMAO, 2015).

A ingestão de SOD, no entanto, pode não ser muito eficiente devido à degradação das enzimas antes de alcançar o intestino. Encapsular SOD seria, portanto, uma melhoria útil para permitir que a enzima alcance a barreira intestinal. Diferentes métodos de encapsulação de SOD de fontes vegetais foram desenvolvidos, incluindo o uso de polímeros de gliadina de trigo, óleos vegetais, goma laca e goma arábica (CARILLON et al., 2013). Porém, mesmo que a quantidade de SOD que atinge a barreira intestinal aumente, uma grande limitação permanece: a SOD, que tem um alto peso molecular, pode não ser capaz de atravessar a barreira intestinal (CARILLON, 2013).

Existe um mecanismo de ação proposto por Stephanie, et al. (2020), onde é sugerido que a SOD encapsulada com fibras dietéticas solúveis atrai os ânions superóxido (que são constantemente produzidos pelas enzimas xantina oxidase e NADPH oxidase). Os ânions superóxido são então convertidos à  $H_2O_2$  pela SOD encapsulada e transportados através da membrana celular, onde serão transformados em  $H_2O$  e  $O_2$  pelas enzimas CAT e GPx (Figura 4).

Figura 4 – Mecanismo de ação proposto da SOD encapsulada em fibra alimentar no ambiente extracelular.



Fonte: STEPHANIE et al., 2020.



Estudos com o uso de miméticos de enzimas antioxidantes ou o estudo de sua superexpressão mostram efeitos benéficos semelhantes aos obtidos após a suplementação com SOD. Esses resultados confirmam a hipótese de que a suplementação com SOD exógena pode atuar induzindo enzimas antioxidantes endógenas (CARILLON et al., 2013).

Embora este mecanismo não seja totalmente elucidado, os resultados de testes em animais e humanos consumindo SOD micro encapsulado foram comprovados como eficazes contra várias doenças, apresentando inclusive indícios de modulação da permeabilidade intestinal. Considerando a atividade antioxidante das fibras dietéticas solúveis, e o mecanismo proposto, pode-se sugerir que a administração oral de SOD-fibra dietética teria maior afinidade para atrair e ligar ânions superóxidos sem a necessidade de liberar SOD no ambiente extracelular. (STEPHAENIE et al., 2020).

## 2.6 Parâmetros sanguíneos relacionados ao *status* oxidativo

A detecção direta das EROs em sistemas biológicos é complicada, por suas concentrações extremamente baixas e por seu curto tempo de meia-vida. (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Assim, em vez de medir diretamente radicais livres em tecidos-alvo, uma variedade de métodos laboratoriais foi desenvolvida para medir moléculas, biologicamente estáveis, produzidas no metabolismo dos radicais livres (OGOSHI, 2014).

Os métodos mais utilizados para aferição indireta das EROs, para se mensurar as lesões oxidativas, são os que medem a atividade enzimática (SOD, catalase, Glutathione Peroxidase e Glutathione Redutase) e/ou a concentração de tripeptídeos (GSH, GSSG) e aldeídos (MDA) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A superóxido dismutase é a enzima responsável por catalisar a conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que é então reduzido em água pela enzima glutathione peroxidase. Isso evita que o radical livre ataque os lipídios da membrana, evitando a produção de outros compostos, como o malondialdeído (MDA) (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

Catalase é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução de  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$ . É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rins e fígado (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A catalase é a enzima antioxidante mais adaptável no estresse oxidativo e desempenha um papel significativo na defesa das células contra o dano oxidativo (MATÉS et al., 1999).

Os subprodutos da peroxidação lipídica podem ser mensurados pelo método TBARS (do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*: Substâncias Reativas ao Ácido

Tiobarbitúrico) ou malondialdeído (MDA). O MDA é um dos vários produtos finais formados pela decomposição dos produtos da peroxidação lipídica. O método TBARS não é específico para MDA, pois outros produtos de decomposição derivados de peróxidos graxos, além do MDA, são positivos para o Ácido Tiobarbitúrico (TBA). Em geral, a reatividade MDA / TBA é um estimador confiável da peroxidação lipídica (CATALÁN, 2018). Estas medidas podem ser realizadas em sangue e outros fluidos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O óxido nítrico (ON) é uma molécula de gás simples e altamente reativa que desempenha várias funções fisiológicas importantes, como relaxamento do endotélio, regulação da pressão arterial basal, neurotransmissão e citotoxicidade mediada por macrófagos (BOGDAN, 2001).

Ele também desempenha um papel importante no sistema imunológico. Está envolvida na patogênese e controle de doenças infecciosas, tumores, processos autoimunes e doenças crônico-degenerativas (BOGDAN, 2001).

Além dessas medidas, também vem sendo utilizado a análise da capacidade antioxidante total (T-AOC, do inglês *Total Antioxidant Capacity*) que é um parâmetro bioquímico adequado para avaliar o estado antioxidante geral do plasma e dos fluidos corporais resultantes da ingestão ou produção de antioxidantes e seu consumo por quantidades normais ou aumentadas de produção de EROs (GHISELLI, 1999).

O grande número de diferentes antioxidantes no plasma, sangue, urina ou qualquer outra amostra biológica torna difícil a mensuração de cada antioxidante individualmente (PRIOR, 2000). Portanto, a capacidade antioxidante total pode fornecer informações biologicamente mais relevantes do que seriam obtidas com a mensuração de antioxidantes individuais. (GHISELLI, 1999). A capacidade de antioxidantes conhecidos e desconhecidos e sua interação sinérgica, portanto, são avaliados, dando uma visão sobre o delicado equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes *in vivo* (PRIOR, 2000).

## 2.6 Parâmetros urinários para gatos saudáveis

Gatos necessitam de atenção especial quanto à respeito à parâmetros urinários, uma vez que as doenças do trato urinário inferior dos felinos apresentam grande incidência na clínica de pequenos animais, destacando-se as urolitíases. Urólitos de diversas composições podem ser formados em decorrência de uma série de fatores. A dieta representa importante papel quanto aos ingredientes utilizados na fabricação dos alimentos para felinos, pois podem afetar parâmetros urinários como volume, densidade e pH, que, quando em desequilíbrio, influenciam

no grau de saturação da urina, fazendo desta meio favorável à precipitação de urólitos (BARBOSA, 2014).

Gatos geralmente apresentam valores de pH urinário entre 6,0 e 6,5, exceto após as refeições (Case et al., 2011). Para todas as espécies, aproximadamente 4 horas após a refeição, ocorre o efeito chamado de onda alcalina pós-prandial. Para compensar a perda de ácido gástrico secretados durante a digestão, e manter o pH normal dos fluidos corporais, os rins excretam íons alcalinos, alcalinizando a urina (CASE et al., 2011; BARBOSA, 2014).

Felinos com pH urinário alto (básico) são mais propensos à formação de cálculos de estruvita, pois estes se formam quando a urina apresenta pH 7,0 ou superior, e são solúveis em pH 6,6 ou inferior. Apesar do pH alcalino ser necessário para a formação inicial de cálculos de estruvita, nem todo os gatos irão apresentar cálculos com uma urina constantemente alcalina. Em relação ao volume de urina, valores mais altos são preferidos para reduzir o risco de cálculos de estruvita (CASE et al., 2011).

Já os valores de densidade urinária para gatos saudáveis, segundo Chew e Dibartola (1998), podem variar de 1,001 a 1,080.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando em consideração os pontos levantados, chegou-se à conclusão de que os antioxidantes dietéticos de origem natural podem desempenhar papel importante na manutenção da saúde e longevidade dos animais, além do fato de que proprietários de cães e gatos estão cada vez mais dispostos a comprar produtos que visam esses benefícios, porém existem poucos trabalhos científicos realizados com animais de companhia. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de combinações de antioxidantes dietéticos comerciais à base de cúrcuma, capsaicina, extrato de *cranberry*, extrato de melão e polifenóis oriundos de chá verde, chá branco, semente de uva e casca de maçã em parâmetros urinários e parâmetros do estresse oxidativo em gatos senis submetidos à um desafio por estresse induzido.

### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. **ABINPET** Disponível em: <http://abinpet.org.br/mercado/>. Acesso em: 10 de jan. de 2021.

AMMON H.P., WAHL M.A. **Pharmacology of Curcuma Longa**. *Planta Med*, 57:1-7. 1991.

BANJI, D., BANJI, O. J. F.; DARAROJU, S.; CH, K. K. **Curcumin and piperine abrogate lipid and protein oxidation induced by D-galactose in rat brain.** Brain Research, 11p. 2013.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. **Estresse oxidativo: conceitos, implicações e fatores modulatórios.** Rev. Nutr., Campinas, 23(4):629-643, jul./ago., 2010.

BARBOSA, P. B. **Predição do pH urinário de gatos por meio do balanço cátion-aniônico dietético (BCAD).** 2014. 82 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2014.

BEAVER B.V. **Feline communicative behavior and Feline eliminative behavior.** p.100-126. In: Ibid. (Ed.), Feline Behavior: a guide for veterinarians. 2nd ed. Elsevier Science, USA. 2003.

BOGDAN, C. **Nitric oxide and the immune response.** Nat. Immunol.v.2, no.10, p.907-916, 2001.

CALDAS, A. P. S; COELHO, O. G. L.; BRESSAN, J. **Cranberry antioxidante power on oxidative stress, inflammation and mitochondrial damage.** International Journal of Food Properties, 21:1, 582-592. 2018.

CAMPIGOTTO, G.; ALBA, D. F.; FAVARETTO, F. A.; GEBERT, R.R.; SOUZA, C.F.; BALDISSERA M. D.; SILVA, A.D. **Intake of snacks containing curcumin stimulates erythropoiesis and antioxidant response in dogs.** Comp Clin Pathol 9p. 2020.

CARILLON, J.; ROUANET, J.M.; CRISTOL, J.P.; BRION, C. **Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: Several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action.** Pharm Res, 11p. 2013.

CARRAMENHA, C. P.; CARREGARO, A. B. **Estresse e morte súbita em medicina veterinária.** ARS veterinária, Jaboticabal, v.28, n.2, p.90-99. 2012.

CASAZZA, A. A.; PETTIANATO, M.; PEREGO, P. **Polyphenols from apple skins: a study on microwave-assisted extraction optimization and exhausted solid characterization.** Sep. Purif. Technol., 25p. 2020

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P. Interpretación del urianálisis canino y felino. **Wilmington: The Gloyd**, 85 p. 1998.

COLITTI, M.; STEFANON, B.; GABAI, G.; GELAIN, M. E.; BONSEMBIANTE, F. **Oxidative stress and nutraceuticals in the modulation of the immune function: Current knowledge in animals of veterinary interest.** Antioxidants. v.8, 28, 19p. 2019.

CORRI, B. L. **The effects of select plant extracts on canine neoplastic cell growth and signaling** 79 p. Dissertação de Mestrado (Master of Science) – Cornell University, Ithaca, Nova York, EUA. 2016.

DAY, M. J. **Ageing, Immunosenescence and Inflammaging in the Dog and Cat.** *Comp. Path.* Vol. 142, p. S60-S69. 2010.

DÉZIEL, B. A.; PATEL, K., NETO, C.; GOTTSCHALL-PASS, K.; HURTA, R. A. R. **Proanthocyanidins from the American Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) inhibit matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 activity in human prostate cancer cells via alterations in multiple cellular signalling pathways.** *J Cell Biochem.* Oct 15;111(3):742-54. 2010.

DIAS, T. R.; ALVES, M. G.; TOMAS, G. D.; SILVA, B. M.; OLIVEIRA, P. F. **White tea as a promising antioxidant medium additive for sperm storage at room temperature: a comparative study with green tea.** *J. Agric. Food Chem.* v.62, p.608–617. 2013.

DIAZ, E. et al. **Cell damage, antioxidant status, and cortisol levels related to nutrition in ski mountaineering during a two-day race.** *Journal of Sports Science and Medicine, Bursa,* v. 9, n. 2, p. 338-346, 2010.

EATON, J.W. **Catalases, peroxidases, glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary.** *Journal of Laboratory and Clinical Medicine, Amsterdam,* v. 118, n. 1, p. 3-4. 1991.

EL-BELTAGI, H. S.; EL-DESOUKY, W.; YOUSEF, R. S. **Synergistic antioxidant scavenging activities of grape seed and green tea extracts against oxidative stress.** *Not. Bot. Horti. Agrobi.,* 44(2), p. 367-374. 2016.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. **Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *Revista da Associação Médica Brasileira, São Paulo,* v. 43, n. 1, p. 61-68. 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK N. **Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.** *Nature,* Vol.408/9, 2000.

HARPER, J. **Feline Immunocompetence, Ageing and the Role of Antioxidants.** *World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings, United Kingdom.* 2001.

HEWLINGS, S. J.; KALMAN D. S. **Curcumin: A review of its effects on human health.** *Foods.* v.6, 92, 11p. 2017.

JORDÃO JÚNIOR, A. A.; CHIARELLO, P. G.; BERNARDES, M. S. M.; VANNUCCHI, H. **Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E.** *Medicina,* v. 31, p. 434- 449, 1998.

JOSHI, S. S.; SU, X.; D'SOUZA, D. H. **Antiviral effects of grape seed extract against feline calicivirus, murine norovirus, and hepatitis A virus in model food systems and under gastric conditions.** *Food Microbiology* v.52, p.1-10, 2015.

KHOO, C.; FALK, M. **Cranberry Polyphenols: Effects on Cardiovascular Risk Factors.** *Polyphenols in Human Health and Disease.* Elsevier, Capítulo 81, p.1049 – 1065. 2014.

LACERDA NETO, J. C. et al. **Effects of surgical stress on the secretion of luteinizing hormone, testosterone and cortisol in the domestic cat (*Felis catus*)**. *Ciência Animal Brasileira*. v. 5, n. 4, p. 211-214. 2004.

LAFLAMME, D.; GUN-MOORE, D. **Nutrition of Aging Cats**. *Vet Clin Small Anim*, n.44, p.761-774, 2014.

LIGUORI, I.; RUSSO, G.; CURCIO, F.; BULLI, G.; ALAN, L.; DELLA-MORTE, D.; GARGIULO, G.; TESTA, G.; CACCIATORE, F.; BONADUCE, D.; ABETE, P. **Oxidative stress, aging and diseases**. *Clin Interv Aging*, p. 757-772. 2018.

LU M.; CHEN C.; LAN Y.; XIAO J.; LI R.; HUANG J.; HUANG Q.; CAO Y.; HO C.T. **Capsaicin-the major bioactive ingredient of chili peppers: bio-efficacy and delivery systems**. *Food Funct*. 11(4): p.2848-2860. 2020.

LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. **Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões**. *Acta Scientiae Veterinariae*. 39(2): 956. 2011.

MACHADO, L. P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; SILVEIRA, V.F. da; YONEZAWA, L. A. **Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária**. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 8, n. 1, p. 84-94. 2009.

MANJUNATHA, H.; SRINIVASAN, K. **Hypolipidemic and Antioxidant Effects of Dietary Curcumin and Capsaicin in Induced Hypercholesterolemic Rats**. *Lipids* (2007) 42:1133–1142, 2007.

MATÉS, J. M.; PEREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I. N. **Antioxidant enzymes and human diseases**. *Clinical biochemistry*. 32. 595-603. 1999.

MENON, V.P.; SUDHEER, A.R. **Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin**. *Adv. Exp. Med. Biol*. v.595, p.105–125. 2007.

MAO X., GU C., CHEN D., YU B., HE J. **Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols**. *Oncotarget*. 8(46): 81649 – 81661. 2017.

MAZUTTI, K.; ALBERTON, G. C.; FERREIRA, F. M.; LUNARDON, I.; ZOTTI, E.; WEBER, S. **Efeito do extrato de oxicoco no tratamento de infecções do trato urinário em porcas**. *Archives of Veterinary Science*, v.17, n.2, p.1-9, 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington: National Academics. 398 p. 2006.

OGOSHI, R. C. S. **Avaliação de um Alimento Antioxidante Comercial (EconomasE®) em dietas para gatos adultos**. 105 p. Ph.D. Thesis (Nutrition of Non-Ruminant Animals) – Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2014.

OLSZEWSKI, V.R.; BASTOS, T. S.; KOMARCHEUSKI, A. S.; OLIVEIRA, S. G.; WARTH, J. F. G.; FELIX, A. P. **Cranberries (*Vaccinium macrocarpon* aiton) in dog nutrition: influence on diet digestibility and palatability and in the course of urinary tract infections**. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. vol.72 no.5. 2020.

PERUMALA, A. V. S.; HETTIARACHCHY, S. **Green tea and grape seed extracts – potential applications in food safety and quality.** *Int. Food Res. J.*, vol. 44, p.827-839. 2011.

PRIOR, R. L.; CAO, G. **Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review.** *J. AOAC Int.*, Vol. 83, No. 4, p. 950-956, 2000.

PRIYADARSINI, K.I. **The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent.** *Molecules*, 19, p. 20091–20112. 2014.

PYUN, C. W.; KIM, J. H.; HAN, K.H.; HONG, G. E.; LEE, C. H. ***In vivo* protective effects of curcumin and capsaicin against alcohol induced oxidative stress.** *IUMBM*, 7p, 2014.

RAZ, R.; CHAZAN, B.; DAN, M. **Cranberry Juice and Urinary Tract Infection.** *Clinical Infectious Diseases*, Volume 38, Issue 10, 15, p. 1413–1419. 2004.

REUTER, S.; GUPTAR, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. **Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked?** *Free Radic. Biol. Med.* 9 p. 1603–1616, 2010.

ROLLYSON, W. D.; STOVER, C. A.; BROWN, K. C.; PERRY, H. E.; STEVENSON, C. D.; MCNESS, C. A.; BALL, J. G.; VALENTOVIC, M. A. DASGUPTA, P. **Bioavailability of capsaicin and its implications for drug delivery.** *J Control Release*. Vol.28:0 p.96–105. 2014

ROMAO S., **Therapeutic value of oral supplementation with melon superoxide dismutase and wheat gliadin combination.** *Elsevier, Nutrition* 31, p. 430-436, 2015.

ROSSI, R.; PASTORELLI, G.; CORINO, C. **Application of KRL test to asses total antioxidant capacity in pigs: Sensitivity to dietary antioxidants.** *Research in Veterinary Science* 94, p.372–377. 2013.

SCHIDFAR, F. **The effects of cranberry juice on serum glucose, apoB, apoA-I, Lp (a), and Paraoxonase-1 activity in type 2 diabetic male patients.** *J. Res. Med. Sci.*, v.17, n.4, p.355-360, 2012.

SOHAL, R.S.; WEINDRUCH, R. **Oxidative stress, caloric restriction, and aging.** *Science*, 273, 59-63. 1996.

SILVA, R.M.; GOULART, C.T.; GUIDO, L.A. **Evolução histórica do conceito de estresse.** *Rev. Cient. Sena Aires*. 2018; 7(2): 148-56.

SQUIRES, E. J. **Applied animal endocrinology.** Massachusetts. CAB International, 2003.

STEPHANIE, S.; CHANG, Y.P.; GNANASEKARAN, A.; ESA, N. M. **An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement.** *J. Funct. Foods*, 10p. 2020.

TUCKER, L; KINGDOM, U.. **The importance of antioxidant protection : demonstrating and branding benefits in pet food.** *Alltech UK*. 509–516. 2002.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Oxford, v. 39, n. 1, p. 44-84. 2007.

VALDÍVIA, A.; PEREZ-ALVAREZ, S.; AROCA-AGUILAR, J. D.; IKUTA, I.; JORDÁN, J. **Superoxide dismutase: a physicalpharmacological update.** Journal of Physiology and Biochemistry, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 195-208. 2009.

YU, B. P. **Cellular defenses against damage from reactive oxygen species.** Physiol. Rev., Washington, v.74, p.139-161. 1994.

ZEYUAN D.; BINGYIN, T.; XIAOLIN, L.; JINMING H.; YIFENG, C. **Effect of Green Tea and Black Tea on the Blood Glucose, the Blood Triglycerides, and Antioxidation in Aged Rats.** J. Agric. Food Chem. V. 46, 10. p.3875–3878. 1998.



**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

**USO DE ANTIOXIDANTES NATURAIS NA ALIMENTAÇÃO DE GATOS SENIS  
FRENTE A DESAFIO POR ESTRESSE INDUZIDO**

## Resumo

As células aeróbias naturalmente geram radicais livres, que são denominados de espécies reativas de oxigênio. O desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o sistema de defesa antioxidante do organismo é chamado de estresse oxidativo, que pode ocorrer durante toda a vida do animal. A recuperação da homeostase após um estresse fisiológico é individual, e uma como situações estressantes são inevitáveis, tornam-se necessárias estratégias para a manutenção da saúde dos gatos. Antioxidantes dietéticos possuem papel importante na contribuição contras os danos causados pelo estresse oxidativo. Neste estudo foram avaliados os efeitos da adição de antioxidantes naturais em dietas para gatos. Foram utilizados 30 gatos senis (de 8 a 14 anos), que por apresentar maior desafio, nos permite uma melhor visualização do efeito positivo dos antioxidantes. Os animais foram divididos em 5 grupos homogêneos, sendo 6 gatos por grupo. As dietas experimentais serão: Controle (alimento seco extrusado *super premium*); XT - alimento *super premium* + curcumina e capsaicina; XTPP - alimento *super premium* + curcumina e capsaicina + *blend* de polifenóis; XTCB - alimento *super premium* + curcumina e capsaicina + extrato de *cranberry*; XTME - alimento *super premium* + curcumina e capsaicina + extrato de melão. O período experimental foi de 71 dias. Foram realizadas coletas de sangue e urina nos dias 0, 50, 61 e 71. Os parâmetros avaliados foram: cortisol, TBARS, superóxido dismutase, catalase, óxido nítrico, capacidade antioxidante total e pH, volume e densidade urinária. Nos dias 60 e 61, todos os gatos foram submetidos a um desafio por um estresse induzido, que foi realizado por meio de uma visita dos gatos a um canil utilizando caixas de transporte e presença de barulhos estressantes (barulho de panelas). Houve aumento da Capacidade Antioxidante Total para os grupos consumindo as dietas com antioxidantes, sendo que o grupo XTME apresentou maiores níveis de T-AOC, Catalase e melhoria nos níveis de TBARS. Não houve diferença significativa nos parâmetros urinários e de consumo de alimento e água. Conclui-se que a adição de curcumina e capsaicina melhora os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo, e que a combinação com outros antioxidantes de diferentes fontes pode potencializar esse efeito positivo em gatos.

Palavras-chave: Capacidade Antioxidante Total, Cortisol, Curcumina, Felinos.

## INTRODUÇÃO

Com o ritmo de vida atual, os gatos passaram a viver de uma forma totalmente diferente do que seria natural e tiveram que se adaptar na nova rotina humana, que antes não existia para sua espécie. A poluição sonora e do ar, confinamento, solidão, manejo, transporte e muitas outras situações agora fazem parte da rotina diária dos animais (CARRAMENHA; CARREGARO, 2012).

A exposição a um agente estressor por longo prazo irá estimular a secreção de glucocorticoides, como o cortisol, pelo córtex das adrenais, através do eixo o hipotálamo-hipófise-adrenal (GRIFFIN; HUME, 2006). Níveis mais altos de cortisol estão relacionados à níveis mais baixos de atividade antioxidante, e conseqüentemente ao aumento do estresse oxidativo (DIAZ et al., 2010).

O estresse oxidativo é definido quando existem Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) em excesso em relação aos mecanismos de defesa antioxidante. O estresse oxidativo pode resultar de um excesso de EROs, uma redução nos antioxidantes ou ambos. Danos atribuídos ao estresse oxidativo são generalizados, e este é reconhecido como característica proeminente em vários processos de doenças (MCMICHAEL, 2007).

As células do sistema imune são particularmente afetadas pelos radicais livres devido as suas altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados e porque alguns mecanismos do sistema imune são expostos diretamente à oxidação. Além disso, os radicais livres são considerados o principal fator na formação do câncer e do próprio envelhecimento (DZANIS, 2008). Espécies reativas de oxigênio ou radicais livres são produzidos de maneira endógena e exógena, e elaborados mecanismos de defesa antioxidante foram desenvolvidos em organismos aeróbicos para limitar os danos causados pelas EROs, sendo eles enzimático e não enzimático (MCMICHAEL, 2007).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx), e o sistema de defesa não-enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas (tocoferóis, ácido ascórbico), minerais (Cu, Zn, Se e Mn) e compostos fenólicos (BARBOSA et. al, 2015).

Antioxidantes são amplamente utilizados nas dietas para prevenir a oxidação dos alimentos, também apresentando fator chave para manter a saúde dos animais, e oferecendo ótimas oportunidades para marketing (TUCKER, 2002).

No mercado brasileiro, os antioxidantes naturais, oriundos de extratos vegetais, têm substituído cada vez mais os antioxidantes sintéticos em rações, seguindo tendências mundiais, principalmente nos Estados Unidos e na Comunidade Europeia (JUNIOR, et al., 2021).

Contínuos avanços na nutrição humana e pet aumentam a evidência de que a utilização de antioxidantes combinados é mais efetiva do que quando isolados, principalmente, em virtude da ação sinérgica que alguns podem apresentar (Ogoshi, 2014).

Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo verificar o efeito da suplementação de diferentes ingredientes fontes de antioxidantes naturais nos níveis de marcadores do estresse oxidativo em gatos senis submetidos a um desafio por estresse induzido.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local e Instalações**

O experimento foi conduzido no Centro de Nutrição da ADM (Archer Daniels Midland), em Três Corações, MG e foi aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Archer Daniels Midland Company (protocolo nº 01/20 de 19/03/2020).

Durante o período experimental, os animais foram alojados em baias individuais, com dimensões de 1,0m de largura x 1,0m de altura x 1,2m de comprimento, uma cama de madeira, com um comedouro de aço inoxidável e uma garrafa de água suspensa com o bico do tipo *nipple*. Cada baia possui um comedouro e um bebedouro individual.

As análises dos kits ELISA foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

### **Animais utilizados e dietas experimentais**

Foram utilizados 30 gatos sem raça definida, machos e fêmeas, com idades variando de 8 a 14 anos e peso médio de  $3,85 \text{ kg} \pm 0,88 \text{ kg}$ .

Foi realizando um período pré-experimental, onde todos os animais receberam o mesmo alimento (completo, *super premium*) durante 14 dias. Os animais foram pesados e passaram por avaliação veterinária, para serem avaliados quanto sua saúde geral, antes do início do estudo.

Durante os 71 dias de período experimental, os animais receberam quantidade de alimento calculada de acordo com sua necessidade energética, seguindo a equação de predição de energia:  $100x(PV)^{0,67}$  (NRC, 2006). Os animais foram alimentados uma vez ao dia às 11 horas da manhã, e a vasilha de alimento ficou disponível até o dia seguinte. A quantidade de água oferecida foi de 500ml/gato/dia. O consumo de água e alimento foi mensurado diariamente.

Foi utilizado como dieta padrão um produto comercial *super premium* para gatos, disponível no mercado brasileiro (Tabela 1). As dietas experimentais consistiram na adição de ingredientes antioxidantes à dieta padrão, que foram misturados ao palatabilizante e aplicados na cobertura, ao final do processo. Os ingredientes antioxidantes consistiram em um antioxidante comercial (Xtract®, Pancosma, Brasil), que contém uma mistura de extrato de cúrcuma e capsaicina; um *blend* comercial de polifenóis composto de uma mistura de extrato de casca de maçã, semente de uva, chá branco e chá verde; um extrato comercial de *Cranberry* e um extrato comercial de suco de melão liofilizado. As inclusões dos ingredientes antioxidantes foram realizadas de acordo com a quantidade recomendada pelos fabricantes (Tabela 2). As dietas experimentais foram:

Controle: Dieta padrão (Ração seca extrusada *super premium* para gatos)

XT: Dieta padrão + Xtract®;

XTPP: Dieta padrão + Xtract® + *Blend* de Polifenóis

XTCB: Dieta padrão + Xtract® + Extrato de *Cranberry*;

XTME: Dieta padrão + Xtract® + Extrato de Melão.

Tabela 1 – Composição nutricional da dieta padrão\*

Níveis Nutricionais	Ração Seca (%)
Umidade	6,94
Proteína Bruta	33,85
Matéria Mineral	6,27
Fibra Bruta	1,55
Extrato Etéreo	18,35
Energia Metabolizável (kcal/kg)	4124

\*Composição básica: Farinha de vísceras de aves, arroz quebrado, farinha de peixe, carne mecanicamente separada de frango, milho integral moído, farelo de glúten de milho 60, celulose em pó (2,5%), levedura seca de cervejaria, fígado de frango, linhaça integral moída, ovo desidratado, gordura de frango, óleo de peixe refinado, polpa de beterraba, inulina, fosfato bicálcico, cloreto de colina, DL-metionina, taurina, cloreto de sódio (sal comum), mannanoligossacarídeos, aditivo probiótico, bissulfato de sódio (0,6%), óleo mineral (1%), *psyllium*, cloreto de potássio, extrato de *Yucca*

*Schidigera*, hexametáfosfato de sódio (0,3%), ácido fólico, ácido pantotênico, vitamina A, vitamina B1, vitamina B12, vitamina B2, vitamina B6, vitamina D, vitamina H, vitamina K, vitamina PP, vitamina E, vitamina C, cobre quelatado, ferro quelatado, manganês quelatado, levedura enriquecida com selênio, zinco quelatado, iodato de cálcio, aditivo palatável à base de frango, aditivo antioxidante (tocoferol e essência de alecrim).

Tabela 2 – Inclusão dos ingredientes funcionais por tratamento experimental

	Controle (%)	XT (%)	XTPP (%)	XTCB (%)	XTME (%)
Xtract®	-	0,024	0,024	0,024	0,024
Blend de Polifenóis	-	-	0,024	-	-
Extrato de <i>Cranberry</i>	-	-	-	0,15	-
Extrato de Melão	-	-	-	-	0,006

## Procedimento Experimental

### Coleta de Sangue

Foram realizadas coletas de sangue nos dias 0, 50, 61 e 71 em todos os animais. A coleta foi realizada com os gatos em jejum, e o sangue coletado na veia braquiocefálica após assepsia com algodão embebido em álcool 70%. Em cada tempo foram coletados 10mL de sangue de cada animal, em tubo coletor contendo EDTA como anticoagulante. O sangue foi imediatamente centrifugado para obtenção do plasma, e transportado em isopor com gelo para o Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG, onde ficou armazenado no *ultrafreezer* a -80°C até o momento da análise. As análises a seguir foram procedidas por meio de *kits* analíticos da marca BT Lab (*Bioessay Technology Laboratory - Shanghai Korain Biotech Co Ltd*): Cortisol (Cortisol ELISA kit), TBARS (*Thiobarbituric acid reactants (TBARS) Colorimetric Assay Kit*), superóxido dismutase (Superoxide Dismutase ELISA Kit), Catalase (Catalase ELISA Kit), óxido nítrico (*nitric oxide [NO] Colorimetric Assay Kit*), capacidade antioxidante total (*Total antioxidant capacity (T-AOC) Colorimetric Assay kit*).

### Coleta de Urina

Nos dias 0, 50, 61 e 71 também foi coletada urina dos animais para mensuração de pH, densidade e volume urinários. Para a coleta, foram utilizadas duas bandejas plásticas, uma em cima da outra, sendo a de cima furada, permitindo coletar a urina sem contaminação pelas fezes.

Na bandeja de baixo foi adicionado o conservante timol. O volume foi medido em uma proveta de vidro graduada, e então armazenada em potes plásticos para a análise de pH e densidade urinária. A leitura do pH foi realizada utilizando um pHmetro digital de bancada (modelo Q400MT, da marca QUIMIS), e a densidade foi mensurada utilizando-se um refratômetro portátil (modelo RTP - 20ATC, da marca Instrutherm). As amostras de urina foram descartadas após as análises.

### **Estresse Induzido**

Nos dias 60 e 61, os animais foram expostos à estresse intencional para criar um desafio e permitir avaliar os possíveis efeitos dos aditivos incluídos na dieta sobre o estresse oxidativo. O intuito foi simular possíveis situações cotidianas que são potenciais agentes estressantes, como barulhos de panelas e visita ao médico veterinário. O estresse foi dividido em dois dias. O primeiro dia consistiu de uma ida dos gatos ao canil próximo ao gatil, onde foi levado por vez um animal de cada grupo. Foi feita apenas uma volta com os gatos utilizando uma caixa de transporte, e os mesmos não permaneceram no canil por tempo prolongado. No segundo dia foi feito um barulho de panelas dentro do gatil, por um curto período de tempo.

A escolha de gatos senis para compor o experimento se deve ao fato de que esses animais, por terem maior dificuldade de manter a homeostase, são mais susceptíveis ao estresse oxidativo, o que apresenta um desafio adicional. Animais jovens poderiam apresentar respostas acentuadas mesmo consumindo a dieta controle, que por ser *super premium*, já continha ingredientes como Selênio orgânico em sua composição, o que poderia dificultar a avaliação dos ingredientes estudados.

### **Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento foi constituído de cinco tratamentos (grupos) em um delineamento inteiramente casualizado, sendo seis repetições por grupo, totalizando trinta unidades experimentais. Os animais foram divididos em grupos homogêneos, considerando idade, sexo e peso. Foi aplicado delineamento inteiramente casualizado com esquema em parcela subdividida no tempo, com o tratamento na parcela e o tempo na subparcela, para as variáveis resposta TBARS, Catalase, Cortisol, SOD, Capacidade Antioxidante Total, Óxido Nítrico, pH urinário, volume urinário e densidade urinária. Para as variáveis resposta consumo de alimento e consumo de água, foi aplicado delineamento inteiramente casualizado.

O modelo estatístico utilizado para as variáveis TBARS, Catalase, Cortisol, SOD, Capacidade Antioxidante Total, Óxido Nítrico, pH urinário, volume urinário e densidade urinária foi:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \tau_j + \alpha\tau_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Onde:

$y_{ijk}$  = é o valor observado na parcela experimental que recebeu o nível  $i$  do fator  $\alpha$  e o nível  $j$  do fator na repetição  $k$ ;

$\mu$  = média geral associada a todas as observações;

$\alpha_i$  = efeito do nível  $i$  do fator  $\alpha$ ;

$\tau_j$  = efeito do nível  $j$  do fator  $\tau$ ;

$\alpha\tau_{ij}$  = efeito da interação entre o nível  $i$  do fator  $\alpha$  e o nível  $j$  do fator  $\tau$ ;

$\varepsilon_{ijk}$  = erro experimental.

O modelo estatístico utilizado para as variáveis consumo de alimento e consumo de água foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Onde:

$Y_{ij}$  = vetor das variáveis dependentes;

$\mu$  = média geral;

$T_i$  = efeito fixo de tratamento (grupo)

$e_{ij}$  = erro residual.

Após a confirmação da normalidade, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando diferenças significativas foram encontradas, as médias dos tratamentos, dos tempos, e seus desdobramentos, foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Foi realizada a análise de covariância para a variável Cortisol, que apresentou valores estatisticamente diferentes no início do experimento, sendo considerado o dia 0 como covariável. As análises foram realizadas utilizando o *software* estatístico SISVAR.



## RESULTADOS

### Consumo de alimento e água

Os valores médios de consumo diário de água e alimento, em função do peso metabólico, estão apresentados abaixo, na Tabela 3.

Tabela 3 – Médias de consumo diário de água ( $\text{ml/kg}^{0,67}$ ) e alimento ( $\text{Kcal/kg}^{0,67}$ ) por grupo.

	Consumo - Água ( $\text{ml/Kg}^{0,67}/\text{dia}$ )	Consumo - Alimento ( $\text{kcal/kg}^{0,67}/\text{dia}$ )
Controle	32,84 a	89,39 a
XT	37,77 a	95,18 a
XTPP	33,82 a	90,40 a
XTCB	34,32 a	98,26 a
XTME	31,85 a	85,01 a
CV (%)	20,8	9,64
Valor de P	0,6645	0,1396

As médias seguidas de letras iguais **na coluna** não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $\alpha=5\%$

Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os grupos para consumo de alimento e consumo de água, ou seja, a inclusão dos ingredientes antioxidantes não influenciou na palatabilidade das dietas e na ingestão hídrica pelos gatos.

### Parâmetros urinários

Os valores médios encontrados para as variáveis pH, densidade e volume urinário, são mostrados a seguir (Tabela 4). Não foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos ( $P>0,05$ ) e não foi encontrada interação significativa entre tratamento e tempo ( $P>0,05$ ) para nenhuma das três variáveis.

Tabela 4 – Médias de valores de parâmetros urinários (pH, densidade e volume) por grupo.

	pH	Densidade	Volume (ml/dia)
Controle	6,35 a	1,048 a	24,8 a
XT	6,48 a	1,046 a	32,6 a
XTCB	6,65 a	1,045 a	27,7 a
XTPP	6,56 a	1,055 a	27,1 a
XTME	6,37 a	1,045 a	23,6 a
CV (%)	6,04	1,36	41,95
Valor de P	0,4405	0,1668	0,6915

As médias seguidas de letras iguais **na coluna** não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $\alpha=5\%$

Foi, no entanto, observado efeito do tempo ( $P<0,05$ ) apenas para a variável densidade urinária (Tabela 5).

Tabela 5 – Médias de valores de parâmetros urinários (pH, densidade e volume) por tempo.

	pH	Densidade	Volume (ml/dia)
Dia 0	6,55 a	1,031 a	26,0 a
Dia 51	6,50 a	1,048 b	28,8 a
Dia 61	6,48 a	1,053 bc	26,4 a
Dia 71	6,41 a	1,059 c	27,5 a
CV (%)	6,04	1,36	41,95
Valor de P	0,5555	<0,001	0,2949

As médias seguidas de letras iguais **na coluna** não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $\alpha=5\%$

Independentemente do tratamento, todos os grupos apresentaram valores de parâmetros urinários dentro da normalidade para a espécie.

### Parâmetros Sanguíneos

As diferenças entre as médias de cada dieta para cada uma das variáveis estudadas estão demonstradas na Tabela 6, e as diferenças das médias de cada tempo (dia) estão demonstradas na Tabela 7.

Tabela 6 – Médias de valores de parâmetros sanguíneos, por grupo (dieta).

	Corstiol (ng/mL)	TBARS (ng/mL)	SOD (ng/mL)	Catalase (ng/mL)	ON (ng/mL)	T-AOC (mM Trolox)
Controle	395,700 ab	3,216 a	5,325 ab	15,348 a	18,842 a	0,585 a
XT	341,525 a	2,794 a	5,709 ab	21,105 b	21,969 a	0,634 ab
XTPP	363,125 ab	2,758 a	5,839 ab	20,318 ab	15,820 a	0,696 abc
XTCB	312,975 a	4,010 a	4,620 a	19,170 ab	18,153 a	0,757 bc
XTME	458,135 b	2,408 a	6,034 b	26,650 c	11,651 a	0,806 c
Valor de P	0,004	0,189	0,049	<0,001	0,449	<0,001

As médias seguidas por letras iguais **na coluna** não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $\alpha=5\%$ . SOD: Superóxido Dismutase; TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico; ON: Óxido Nítrico; T-AOC: Capacidade Antioxidante Total.

Tabela 7 – Médias de valores de parâmetros sanguíneos, por tempo (dias).

	Corstiol (ng/mL)	TBARS (ng/mL)	SOD (ng/mL)	Catalase (ng/mL)	ON (ng/mL)	T-AOC (mM Trolox)
dia 0	374,760 b	3,281 a	5,528 a	21,524 a	28,567 b	0,497 a
dia 51	244,360 a	3,037 ab	5,045 a	21,872 a	12,963 a	0,606 a
dia 61	434,360 b	2,866 ab	5,857 a	20,612 a	16,995 ab	0,819 b
dia 71	443,688 b	2,399 b	5,592 a	18,064 a	10,624 a	0,860 b
Valor de P	<0,001	0,027	0,334	0,084	0,005	<0,001

As médias seguidas por letras iguais **na coluna** não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey  $\alpha=5\%$ . SOD: Superóxido Dismutase; TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico; ON: Óxido Nítrico; T-AOC: Capacidade Antioxidante Total.

Houve diferença estatística ( $P<0,05$ ) entre as dietas para as variáveis Catalase, Cortisol, SOD e Capacidade Antioxidante Total (Tabela 5), e interação significativa ( $P<0,05$ ) entre os fatores dieta e tempo apenas para a variável Capacidade Antioxidante Total (Tabela 8). Houve também diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre os tempos para todos os parâmetros avaliados, com exceção da SOD e Catalase ( $P>0,05$ ).

Tabela 8 – Valores médios dos parâmetros sanguíneos e desdobramento do tempo para cada grupo (dieta).

Variável	Dieta	Tempo (dias)						Valor de P			CV		
		0		50		61		71	D	T		D x T	
Cortisol (ng/mL)	Controle	377,3	ab	217,8	a	511,1	b	476,6	b	0,004	<0,001	0,485	32,84
	XT	285,9	a	241,6	a	415,5	a	423,1	a				
	XTPP	323,2	a	256,0	a	450,3	a	423,0	a				
	XTCB	370,3	ab	190,4	a	269,8	ab	421,4	b				
	XTME	517,1	ab	316,0	a	525,1	b	474,3	ab				
TBARS (ng/mL)	Controle	3,624	a	3,216	a	3,400	a	2,444	a	0,189	0,027	0,059	35,90
	XT	3,700	b	2,794	ab	2,646	ab	1,952	a				
	XTPP	2,868	a	2,758	a	2,642	a	2,602	a				
	XTCB	2,856	ab	4,010	b	4,024	b	2,064	a				
	XTME	3,356	b	2,408	ab	1,618	a	2,932	ab				
SOD (ng/mL)	Controle	5,684	ab	3,722	a	6,386	b	5,508	ab	0,049	0,334	0,097	28,67
	XT	5,756	a	5,604	a	5,606	a	5,870	a				
	XTPP	4,862	a	5,980	ab	7,514	b	5,000	ab				
	XTCB	5,272	a	4,148	a	3,454	a	5,606	a				
	XTME	6,065	a	5,770	a	6,325	a	5,975	a				
Catalase (ng/mL)	Controle	18,49	a	15,62	a	15,70	a	11,58	a	<0,001	0,084	0,574	27,69
	XT	23,82	a	25,40	a	16,56	a	18,64	a				
	XTPP	18,72	a	20,97	a	22,06	a	19,52	a				
	XTCB	21,35	a	18,93	a	20,02	a	16,38	a				
	XTME	25,24	a	28,44	a	28,72	a	24,20	a				
Óxido Nítrico (ng/mL)	Controle	39,333	b	19,667	ab	8,977	a	7,390	a	0,449	0,005	0,177	79,25
	XT	26,723	a	21,967	a	25,130	a	14,06	a				
	XTPP	30,110	a	12,333	a	12,057	a	8,780	a				
	XTCB	39,833	b	9,000	a	10,667	ab	13,11	ab				
	XTME	6,8333	a	1,846	a	28,143	a	9,780	a				
T-AOC (mM Trolox)	Controle	0,490	a	0,558	ab	0,750	b	0,540	ab	<0,001	<0,001	0,011	21,92
	XT	0,450	a	0,622	ab	0,652	ab	0,812	b				
	XTPP	0,538	a	0,518	a	0,870	b	0,856	b				
	XTCB	0,506	a	0,592	a	0,868	b	1,060	b				
	XTME	0,500	a	0,740	ab	0,954	bc	1,030	c				

Médias seguidas de letras minúsculas iguais **na linha** não diferiram estatisticamente ao nível de 5% pelo Teste de Tukey. D= Dieta, T= Tempo, D x T= Interação Dieta\*Tempo; CV: Coeficiente de Variação. TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico; SOD: Superóxido Dismutase, T-AOC: Capacidade Antioxidante Total.

As diferenças observadas para cada grupo, e seu desdobramento dentro de cada nível de tempo, para cada variável estudada, podem ser observadas a seguir na Tabela 9.

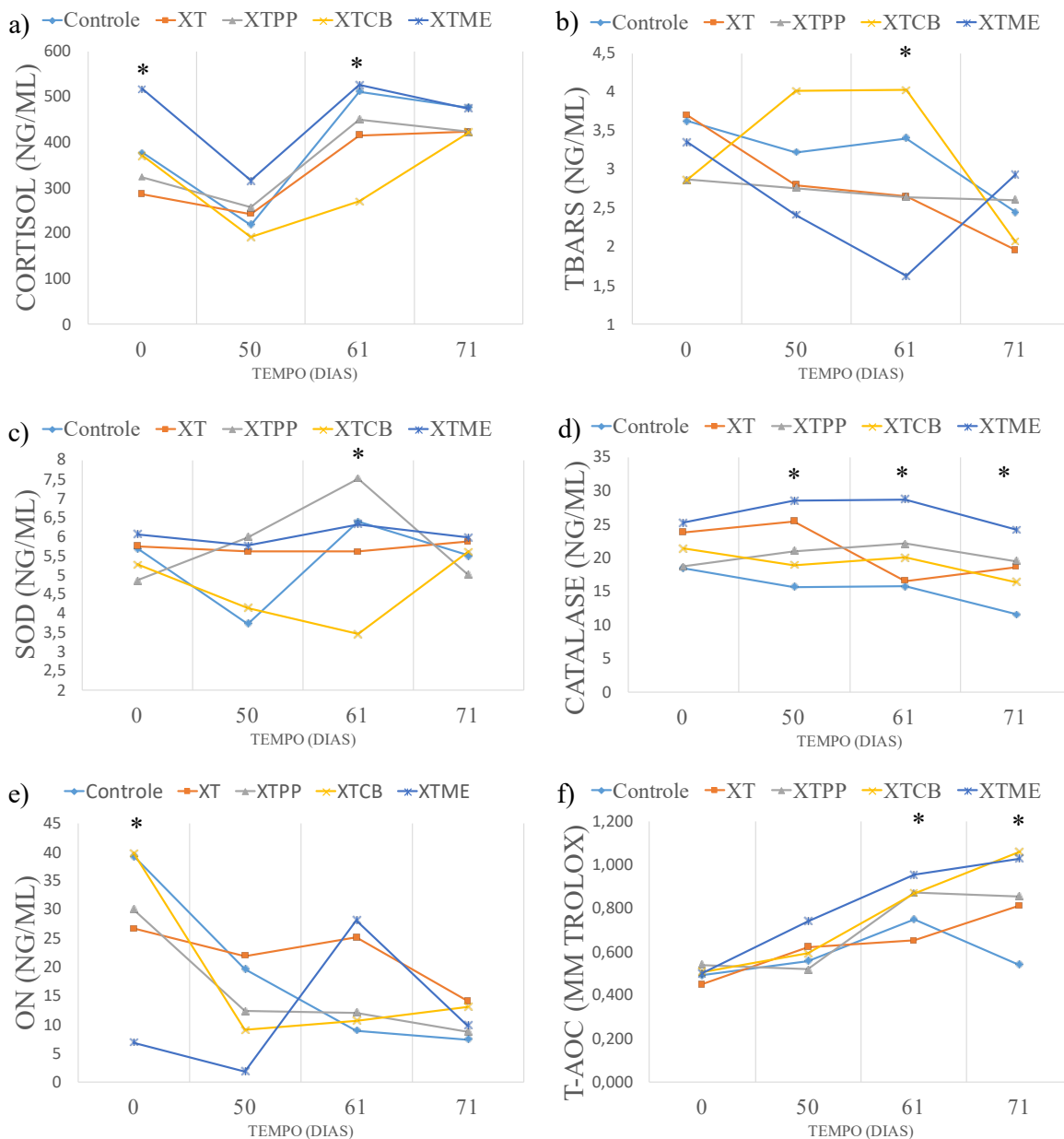
Tabela 9 – Valores médios dos parâmetros sanguíneos e desdobramento da dieta para cada tempo (dia).

Variável	Dieta	Tempo (dias)				Valor de P			CV				
		0	50	61	71	D	T	D x T					
Cortisol (ng/mL)	Controle	377,3	ab	217,8	a	511,1	b	476,6	a	0,004	<0,001	0,485	32,84
	XT	285,9	a	241,6	a	415,5	ab	423,1	a				
	XTPP	323,2	ab	256,0	a	450,3	ab	423,0	a				
	XTCB	370,3	ab	190,4	a	269,8	a	421,4	a				
	XTME	517,1	b	316,0	a	525,1	b	474,3	a				
TBARS (ng/mL)	Controle	3,624	a	3,216	a	3,400	ab	2,444	a	0,189	0,027	0,059	35,9
	XT	3,700	a	2,794	a	2,646	ab	1,952	a				
	XTPP	2,868	a	2,758	a	2,642	ab	2,602	a				
	XTCB	2,856	a	4,010	a	4,024	b	2,064	a				
	XTME	3,356	a	2,408	a	1,618	a	2,932	a				
SOD (ng/mL)	Controle	5,684	a	3,722	a	6,386	b	5,508	a	0,049	0,334	0,097	28,67
	XT	5,756	a	5,604	a	5,606	ab	5,870	a				
	XTPP	4,862	a	5,980	a	7,514	b	5,000	a				
	XTCB	5,272	a	4,148	a	3,454	a	5,606	a				
	XTME	6,065	a	5,770	a	6,325	b	5,975	a				
Catalase (ng/mL)	Controle	18,49	a	15,62	a	15,70	a	11,58	a	<0,001	0,084	0,574	27,69
	XT	23,82	a	25,40	ab	16,56	a	18,64	ab				
	XTPP	18,72	a	20,97	ab	22,06	ab	19,52	ab				
	XTCB	21,35	a	18,93	ab	20,02	ab	16,38	ab				
	XTME	25,24	a	28,44	b	28,72	b	24,20	b				
Óxido Nítrico (ng/mL)	Controle	39,333	b	19,667	a	8,977	a	7,390	a	0,449	0,005	0,177	79,25
	XT	26,723	ab	21,967	a	25,130	a	14,057	a				
	XTPP	30,110	ab	12,333	a	12,057	a	8,780	a				
	XTCB	39,833	b	9,000	a	10,667	a	13,113	a				
	XTME	6,833	a	1,846	a	28,143	a	9,780	a				
T-AOC (mM Trolox)	Controle	0,490	a	0,558	a	0,750	ab	0,540	a	<0,001	<0,001	0,011	21,92
	XT	0,450	a	0,622	a	0,652	a	0,812	b				
	XTPP	0,538	a	0,518	a	0,870	ab	0,856	b				
	XTCB	0,506	a	0,592	a	0,868	ab	1,060	b				
	XTME	0,500	a	0,740	a	0,954	b	1,030	b				

Médias seguidas de letras minúsculas iguais **na coluna** não diferiram estatisticamente ao nível de 5% pelo Teste de Tukey. D= Dieta, T= Tempo, D x T= Interação Dieta\*Tempo; CV: Coeficiente de Variação. TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico; SOD: Superóxido Dismutase, T-AOC: Capacidade Antioxidante Total.

A representação gráfica dos resultados pode ser observada a seguir, na figura 5.

Figura 5 – Representação gráfica dos valores médios dos parâmetros sanguíneos em cada tempo (dia).



Os asteriscos (\*) em de cada tempo indicam diferença significativa entre os tratamentos ao nível de 5% de significância. TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico; SOD: Superóxido Dismutase, T-AOC: Capacidade Antioxidante Total, ON: Óxido Nítrico.

Os níveis de Cortisol no início do experimento (dia 0) foram maiores ( $P < 0,05$ ) para o tratamento XTME. Embora os resultados de cortisol no dia 0 tenham sido diferentes entre os tratamentos, análises de covariância considerando o dia 0 como covariável mostraram que os resultados deste tempo não influenciam no efeito do tratamento.

No dia 50, todos os animais apresentaram valores iguais de cortisol ( $P > 0,05$ ). No dia 61 (1 dias após o estresse induzido), todos os grupos apresentaram resposta ao estresse, com

aumento dos níveis de cortisol ( $P < 0,05$ ), com exceção das dietas XT e XTPP. Na última coleta (dia 71) todos os grupos apresentaram níveis de Cortisol iguais ( $P > 0,05$ ) (Tabela 9).

Não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos para os níveis de TBARS ( $P > 0,05$ ). No entanto houve diferença nos tempos. Os grupos XT, XTCB e XTME responderam com uma diminuição do TBARS, enquanto não houve resposta para os grupos Controle e XTPP.

Os níveis de Catalase apresentaram diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre os tratamentos nos tempos 50, 61 e 71, sendo que o grupo que consumiu a dieta XTME apresentou as maiores concentrações séricas dessa enzima, enquanto os níveis de todos os outros grupos foram mais baixos e estatisticamente iguais, com exceção da dieta controle, que apresentou níveis mais baixos (Tabela 9). Não houve diferença significativa entre os tempos para a enzima Catalase ( $P > 0,05$ ).

A resposta da SOD foi igual para todos os tratamentos no início do experimento (dia 0), e a enzima apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) apenas no dia 61, onde foi observado o menor valor para a dieta XTCB. No dia 71, todas as respostas foram novamente estatisticamente iguais. Houve resposta em função do tempo apenas para as dietas Controle e XTPP.

A Capacidade Antioxidante Total apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) no dia 61, onde a dieta contendo melão (XTME) apresentou maiores níveis do parâmetros, e no dia 71, onde apenas a dieta Controle apresentou níveis estatisticamente mais baixos ( $P < 0,05$ ) (Tabela 6). Avaliando os desdobramentos do tempo dentro de cada tratamento, é possível verificar que a dieta XTME foi que apresentou maior aumento da Capacidade antioxidante total em comparação com o dia 0 (Tabela 8).

Não houve diferença significativa entre os tratamentos para a variável Óxido Nítrico ( $P > 0,05$ ), porém houve efeito do tempo ( $P < 0,05$ ), sendo que as dietas Controle e XTCB apresentaram redução nos níveis de ON ao longo do experimento.

## **DISCUSSÃO**

Foram encontrados poucos trabalhos que avaliaram o efeito de antioxidantes naturais dietéticos em parâmetros de estresse oxidativo em gatos sob desafio por um estresse induzido. Sendo assim, o presente estudo foi realizado para avaliar parâmetros de consumo de alimento e água, parâmetros urinários e parâmetros do estresse oxidativo em gatos senis consumindo

dieta suplementada com Xtract® (extrato de curcumina + capsaicina), um *blend* de polifenóis, extrato de cranberry, e extrato de melão, e submetidos a um desafio por estresse induzido.

Não foi observada redução na ingestão de alimento ou de água em nenhuma das dietas experimentais. Olszewski, 2017, observou uma redução da palatabilidade em cães que consumiram dietas com inclusão de 0,4% de *cranberry*, quando realizado teste de palatabilidade versus rações sem a adição da fruta. Porém, quando oferecido somente o alimento com *cranberry*, o mesmo foi consumido na totalidade. No presente estudo não foi observada redução de consumo em gatos que se alimentaram da dieta contendo 0,15% de extrato de *cranberry*.

Segundo Case et al. (2011), a relação entre ingestão de água (em mililitros) e ingestão calórica, em gatos, deve ser 0,6 para 1, medida que tende a superestimar um pouco as necessidades para gatos. Nesse contexto, o consumo de água, apesar de ter sido estatisticamente igual entre todos os tratamentos, foi relativamente baixo. Foram utilizadas bebedouros com bicos do tipo *nipple*, o que pode não ter sido um grande estímulo para o consumo de água. Grant, 2010, observou um aumento do consumo de água em gatos quando a mesma foi fornecida em fontes, em relação à água fornecida em vasilhas, o que sugere que o consumo pode ser significativamente influenciado pelo método de fornecimento de água e preferências individuais, não apenas a dieta.

Os parâmetros urinários observados no experimento também não sofreram impacto da dieta ou do estresse causado. Um gato saudável normalmente possui valores de pH entre 6,0 e 6,5, exceto após refeições. Cálculos de estruvita se formam quando os valores de pH urinário são iguais 7,0 ou superior, e são solúveis em pH 6,6 ou inferior (CASE et al., 2011). No presente estudo, todos os tratamentos apresentaram valores de pH estatisticamente iguais, e dentro da normalidade para gatos saudáveis.

Os valores normais de densidade urinária, por sua vez, podem estar na faixa de 1.001 a 1.080 para felinos domésticos, segundo demonstrado em estudos feitos por Chew e Dibartola (1998). Esses valores devem ser interpretados em cada situação, pois dependem de circunstâncias individuais do animal, além de fatores como o efeito da dieta. Nesse contexto, todos os valores de densidade urinária encontrados foram estatisticamente iguais ( $P > 0,05$ ), e, mesmo com a diferença observada entre os tempos, podem ser considerados normais. Os valores de densidade urinária encontrado neste experimento foram similares aos encontrados no trabalho realizado por Grant (2010), em que a densidade urinária variou de 1.044 a 1.060 para gatos alimentados com diferentes rações comerciais.



O volume urinário observado também foi estatisticamente igual entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). Todos os gatos, porém, apresentaram volume urinário consideravelmente mais baixo do que o valor proposto para a espécie. Esses valores, no entanto, condizem com a baixa ingestão hídrica apresentada no experimento. De acordo com Case et al. (2011), a baixa ingestão de água observada na espécie, e a habilidade dos gatos domésticos de concentrar urina para economizar água, é atribuída a sua evolução, pois os ancestrais dos gatos domésticos costumavam habitar ambientes desérticos, e precisaram se adaptar para sobreviver às difíceis condições de seca.

Em relação aos parâmetros séricos e do estresse oxidativo estudados, foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.

A mensuração do cortisol é a medida utilizada para avaliar a resposta ao estresse em humanos e animais (MCCOBB, et al., 2005). Gatos são susceptíveis ao estresse, e mudanças no ambiente, contenção física, presença de animais ou pessoas estranhas, e exposição a sons de alta frequência são potenciais agentes estressores (BEAVER, 2003).

Especialmente para gatos, coletas de sangue, por serem invasivas, podem por si só criar uma situação de estresse que aumente os níveis de cortisol (MCCOBB, et al., 2005). Isso foi observado no experimento, onde os níveis de cortisol no dia 0 foram mais altos do que no dia 51. Apesar dos animais utilizados no experimento estarem acostumados com a manipulação por parte dos funcionários, (para pentear, realizar pesagens, etc.), a primeira coleta de sangue (dia 0) foi uma experiência nova e potencialmente estressante para os animais. No dia 51 os animais, provavelmente por já ter tido a experiência anterior, apresentaram menor resposta.

Todos os grupos, com exceção dos grupos XT e XTPP, apresentaram aumento significativo dos níveis séricos de cortisol em função do estresse induzido. Houve, no entanto, uma tendência de aumento para esses dois grupos – XT ( $p=0,056$ ) e XTPP ( $p=0,053$ ). O grupo XTME apresentou uma redução da resposta 10 dias após o estresse (dia 71), enquanto o grupo XTCE apresentou uma resposta mais tardia, apenas na última coleta (Figura 5). Somente a dieta Controle foi incapaz de retardar o aumento de cortisol, ou retornar esse aumento a valores mais baixos. Esses dados indicam que o estresse induzido foi eficiente para induzir um estresse fisiológico nos gatos, e que os grupos contendo antioxidantes naturais foram mais eficientes em manter os níveis de Cortisol sob controle.

Em estudo realizado por Peixoto et al. (2017) foi encontrada redução da corticosterona plasmática em ratos obesos consumindo uma dieta hiperlipídica contendo extrato de *cranberry*, em comparação ao grupo controle. Segundo estes autores, deve-se considerar a hipótese de que o extrato de *cranberry* atue no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, sendo capaz de reduzir a

liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), corrigindo o nível de glicocorticoides no plasma dos animais.

Resultados semelhantes foram encontrados utilizando outros ingredientes fontes de antioxidantes em gatos submetidos a um estresse fisiológico (Ogoshi, 2014), onde ocorreu uma supressão dos níveis séricos de cortisol nos grupos que consumiram uma dieta contendo um antioxidante comercial à base de algas. O mesmo efeito também foi observado por Girao et al. (2012), em tilápias confinadas consumindo uma dieta rica em licopeno.

O estresse fisiológico, que resulta no aumento dos níveis de cortisol, está relacionado também com o aumento da produção de radicais livres, portanto pode ser considerado como um dos fatores causadores do estresse oxidativo (WANG et al, 2006).

Uma das consequências do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, e os TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) são formados como um subproduto dessa lipoperoxidação. O método TBARS quantifica os produtos de decomposição derivados de peróxidos que são positivos para o Ácido Tiobarbitúrico (TBA), e são estimadores confiáveis da peroxidação lipídica (CATALÁN, 2018).

No presente estudo, os níveis de TBARS foram altos no dia 0, e foram abaixando ao longo do experimento, independente do estresse realizado. Foi observada uma redução nos níveis de TBARS para as dietas XT, XTCB e XTME, e não houve resposta para o Controle e XTPP.

A dieta contendo *cranberry* (XTCB) apresentou uma redução do TBARS mais tardia, ocorrendo apenas no dia 71. Essa diminuição tardia no grupo XTCB pode estar relacionada com o aumento dos níveis da enzima SOD, que no dia 71 foi estatisticamente igual aos outros grupos. Já para o grupo que consumiu Extrato de Melão (XTME), essa redução dos níveis de TBARS pode estar relacionada aos níveis de Catalase, pois esse grupo foi o que apresentou os maiores níveis de Catalase durante todo o experimento, e os menores níveis de TBARS no dia 61 (após o estresse). Corroborando com esse resultado, Vijayakumar et al. (2004) encontraram redução dos níveis de TBARS e manutenção dos níveis de CAT e SOD em ratos suplementados com antioxidantes naturais. Resultado similar também foi encontrado por Ogoshi (2014) em gatos.

Nesse contexto, a dieta XTME foi a mais eficiente em diminuir os níveis dos marcadores da peroxidação lipídica, enquanto o grupo XTCB não foi eficiente em evitar o aumento da peroxidação, o que pode ser explicado pelos baixos níveis de SOD apresentados após o estresse, porém uma vez que ocorreu o aumento da peroxidação, foi capaz de estimular a produção de enzimas antioxidantes e retornando os níveis de TBARS à valores mais baixos.

A enzima Superóxido Dismutase faz parte da primeira linha de defesa antioxidante enzimática do organismo. Ela é capaz de catalisar a conversão do radical superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), diminuindo a presença do radical  $O_2^-$ , que é mais perigoso e reativo (Valdivia et al., 2009). A remoção dos radicais superóxido e hidroxila é provavelmente um dos mecanismos de defesa mais efetivos contra os danos oxidativos, portanto uma baixa atividade de SOD e CAT irá resultar em um aumento dos níveis de EROs, o que causará um aumento dos efeitos deletérios, como danos à integridade das membranas celulares, e maior acúmulo de catabólitos da peroxidação lipídica (VIYAYAKUMAR et al., 2004).

No presente estudo, apenas as dietas Controle e XTPP apresentaram resposta para a SOD em função do tempo. A curcumina, assim como a vitamina E, é considerada um antioxidante de quebra de cadeia, sendo um eficiente limpador de diferentes formas de radicais livres, como o radical superóxido, radical hidroxila e radical alcoxi (PRIYADARSINI, 2014). A reação da curcumina com radicais superóxido pode levar à degradação catalítica do radical, de forma que a curcumina atua de maneira similar à superóxido dismutase (MISHRA et al., 2004 apud PRIYADARSINI, 2014), o que poderia assim reduzir o substrato para a enzima SOD.

Em um estudo realizado por Sankar et al. (2012), com ratos sob estresse induzido por Cipermetrina, também foi encontrado valores mais altos de SOD no grupo consumindo a dieta controle, em relação ao grupo suplementado com curcumina.

Trabalhos que estudaram a suplementação de polifenóis oriundos de chá (*Camellia sinensis*) em ratos demonstraram um aumento dos níveis séricos de SOD (ZEYUAN, 1998; SKRZYDLEWSKA et al., 2002). Diversos trabalhos mostraram evidências de que as catequinas do chá, especialmente a EGCG, atuam como agentes moduladores da Nrf2 (TALEBI et al., 2021).

Com base nesses resultados, e analisando os níveis de T-AOC no presente estudo, é possível inferir que, mesmo sem aumento dos níveis de SOD, as dietas XT, XTCB e XTME apresentaram melhoria no *status* oxidativo, o que poderia confirmar a ação da curcumina na redução dos radicais livres, principalmente  $O_2^-$ . Também seria possível justificar os valores mais altos de SOD encontrados no grupo controle, que não recebeu a mistura de curcumina e capsaicina, e no grupo XTPP, que foi suplementado com polifenóis incluindo os oriundos do chá branco e chá verde.

Alguns autores mostraram um aumento na SOD endógena após a administração de SOD exógena em diversos tecidos animais, como no hipocampo de ratos (NAKAJIMA et al., 2009), eritrócitos de gatos (WEBB et al., 2008) e no plasma de suínos (LALLÉS et al., 2011), enquanto outros trabalhos, incluindo em humanos, demonstraram não apenas um aumento na

SOD, mas uma resposta global ao estresse, incluindo também aumento das enzimas CAT ou GPx endógena (CARILLON et al., 2013). Contrariando essa afirmação, em nosso trabalho não foi observado aumento da SOD endógena no grupo consumindo a dieta XTME, que possui extrato de melão enriquecido com SOD natural em sua composição, porém foi observado que o grupo XTME apresentou atividade da enzima CAT significativamente maior do que as outras dietas.

Apesar do mecanismo de ação da SOD suplementada na dieta ainda não estar muito elucidado, considerando o mecanismo proposto Stephanie et al. (2020), a suplementação de SOD de origem vegetal encapsulada com fibra dietética poderia catalisar o radical  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ , o que estimularia a produção das enzimas Catalase e Glutathione Peroxidase, sem a necessidade de liberar SOD no ambiente extracelular. Isso explicaria porque todos os tratamentos iniciaram o experimento com níveis estatisticamente iguais de Catalase, porém só o grupo XTME ter conseguido manter valores elevados até o final do experimento.

O grupo XT apresentou níveis de Catalase maiores que o grupo Controle, e iguais aos grupos XTPP e XTCB. Confirmando o achado, em um estudo realizado por Disilvestro et al. (2012, citado por HEWLINGS; KALMAN, 2017) com humanos saudáveis que consumiram uma dose diária de curcumina, também foi observado um aumento dos níveis séricos de Catalase, não havendo aumento dos níveis de SOD e GPx.

A Catalase é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução do  $H_2O_2$ , gerado pela ação da enzima SOD, em água e oxigênio molecular e atua na destoxificação de diferentes substratos como fenóis e álcoois. Além disso, reduz o risco de formação do radical hidroxila via reação de Fenton, reações de íons de metais de transição, como o ferro ( $Fe^{2+}$ ) com  $H_2O_2$  (LUZ et al., 2011).

Em relação aos níveis de Óxido Nítrico encontrados, foi observada uma redução no dia 50 para a dieta XTCB, mas não houve diferença entre as médias dos tratamentos.

O Óxido Nítrico é um composto que participa de vários fenômenos, dentre eles a citotoxicidade mediada por macrófagos, vasodilatação, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária. É o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune (HIBBS et al., 1987). Contudo, por possuir um elétron desemparelhado na camada de valência, é considerado um radical livre, e quando reage com o radical hidroxila, forma o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que é um poderoso agente oxidante (MENON, 2007). No presente estudo, os gatos iniciaram o experimento (dia 0) com níveis significativamente diferentes de Óxido Nítrico, porém os valores foram iguais

entre os grupos durante o resto do experimento (dias 50, 61 e 71). Com isso, pode-se inferir que não houve influência do estresse induzido nos níveis de Óxido Nítrico.

A Capacidade Antioxidante Total é uma medida que oferece uma “avaliação holística” dos antioxidantes. A análise é normalmente feita criando um desafio a substratos oxidáveis (ex.: sêmen, plasma, saliva) utilizando um agente oxidante, para avaliar o nível máximo de oxidação de cada amostra, na presença ou ausência do antioxidante avaliado (FRAGA et al., 2013). A capacidade de antioxidantes conhecidos e desconhecidos e sua interação sinérgica, portanto, são avaliados, dando uma visão sobre o delicado equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes *in vivo* (PRIOR, 2000).

No presente estudo, todos os animais recebendo dietas com inclusão de antioxidantes naturais apresentaram aumento da Capacidade Antioxidante Total, sendo que o grupo que apresentou maior aumento comparado com o dia 0 foram os animais consumindo a dieta XTME, seguidos pelos grupos consumindo XTCB, XTPP e XT. Esse resultado, levando em consideração os níveis das enzimas Catalase e SOD encontrados no experimento para os tratamentos que tiveram a inclusão dos ingredientes antioxidantes, principalmente 1 dia e 10 dias após o estresse induzido (dias 61 e 71), indica que a inclusão de Xtract pode ter auxiliado na redução das EROs, causando uma melhora no *status* oxidativo dos animais, e que, quando fornecido juntamente com outros ingredientes antioxidantes, apresentou resposta ainda melhor.

Segundo McMichel 2007, devido à enorme complexidade do estresse oxidativo, é improvável que o tratamento que abrange apenas um ingrediente produza resultados substanciais. Dessa forma, as melhores estratégias são, com toda a probabilidade, incluir uma combinação de tratamentos ou ingredientes que visam atuar em diferentes mecanismos na via do estresse oxidativo, melhorando o status oxidativo e reduzindo o dano causado pelas EROs.

## CONCLUSÃO

Com base em todos os resultados observados, o uso de antioxidantes naturais em dietas para gatos senis atuou de maneira positiva nos parâmetros do estresse oxidativo. O uso de curcumina + capsaicina foi eficiente em melhorar o *status* oxidativo dos animais, porém esse efeito foi potencializado quando combinado com outros antioxidantes. A melhor combinação observada foi Xtract® e extrato de melão, apresentando os níveis mais altos para os parâmetros CAT e T-AOC, e redução nos níveis de TBARS. Além disso, nenhum dos ingredientes testados influenciou na palatabilidade dos alimentos.

No entanto, são necessários mais estudos avaliando diferentes parâmetros do estresse oxidativo para que seja possível compreender os mecanismos de ação dos diferentes antioxidantes dietéticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARILLON, J.; ROUANET, J.M.; CRISTOL, J.P.; BRION, C. **Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: Several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action.** Pharm Res, 11p. 2013.

CARRAMENHA, C. P.; CARREGARO, A. B. **Estresse e morte súbita em medicina veterinária.** ARS veterinária, Jaboticabal, v.28, n.2, p.90-99. 2012.

CASE, L.; CAREY, D.; HIRAKAWA, D.; DARISTOTLE, L. **Canine and Feline Nutrition: A Resource for Companion Animal Professionals,** 562p. St. Louis, MO: Mosby. 3rd ed., 2011.

CASTANHO, V. S.; NAKAMURA, R. T.; PINTO-NETO, A. M.; FARIA, E. C. **Tratamento pós-menopausa reduz a atividade da catalase e atenua o risco cardiovascular.** Arq. Bras. Cardiol. v.99, p. 1008-1014. 2012.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P. **Interpretación del urianálisis canino y felino.** Wilmington: The Gloyd, 85 p. 1998.

DIAZ, E. et al. **Cell damage, antioxidant status, and cortisol levels related to nutrition in ski mountaineering during a two-day race.** Journal of Sports Science and Medicine, Bursa, v. 9, n. 2, p. 338-346, 2010.

DUNLAP, K. L.; REYNOLDS, A. J.; DUFFY, L. K. **Total antioxidant power in sled dogs supplemented with blueberries and the comparison of blood parameters associated with exercise.** Comp. Biochem. Physiol. B, part A, p.429-434, 2006.

DZANIS, DAVID A. **Necessidades nutricionais e manejo dietético.** In: HOSKINS, J. D. Geriatria e gerontologia do cão e do gato. 2. ed. São Paulo: Roca, p.21-32, 2008.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I.; GALLEANO, M. **In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity.** Biochim. Biophys. Acta, 4p. 2013

GIRAO, P. M.; SILVA, E. M. P; MELO, M. P. **Dietary lycopene supplementation on Nile Tilapia (Oreochromis niloticus) juveniles submitted to confinement: effects on cortisol level and antioxidante response.** Aquac. Res. Vol. 43, No. 5, p.789-798, 2012.

GRANT, D. C. **Effect of water source on intake and urine concentration in healthy cats.** J Feline Med Surg. v.12, p. 431-434. 2010

JUNIOR, C. M. R.; BERTECHINI, A. G.; TEIXEIRA, A. O.; MOREIRA, L. M.; BRIGHENTI, C. R. G.; SÁ-FORTES, C. M. L.; NUNES, C. A.; CORASSA, A. **Evaluation of antioxidants**

**on oxidative stability and fatty acid profile of poultry offal oil used in the pet food industry.** Ciênc. Agrár. Londrina, v. 42, n. 3, suplemento 1, p. 1813-1824, 2021

LUZ, H. K. M.; WANDERLEY, L. S.; FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. **Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões.** Acta Scientiae Veterinariae, 2011. 39(2): 956, 2011.

HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z. **Macrophage cytotoxicity: Role of L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite.** Science, n. 235 p. 473-476, 1987.

LALLÈS, J.P.; LACAN, D.; DAVID, J.C. **A melon pulp concentrate rich in superoxide dismutase reduces stress proteins along the gastroin- testinal tract of pigs.** Nutrition. 27: p. 358–363, 2011.

MCCOBB, E. C.; PATRONEK, G. J.; MARDER, A.; DINNAGE, J. D.; STONE, M. D. **Assessment of stress levels among cats in four animal shelters.** JAVMA, Vol 226, No. 4, 2005.

MCMICHAEL, M. A. **Oxidative stress, antioxidants, and assessment of oxidative stress in dogs and cats.** JAVMA, Vol 231, No. 5, p. 714-720. 2007.

MENON, V.P.; SUDHEER, A.R. **Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin.** Adv. Exp. Med. Biol. v.595, p.105–125. 2007.

NAKAJIMA, S.; OHSAWA, I.; NAGATA, K.; OHT, S.; OHNO, M.; IJICHI, T. **Oral supplementation with melon superoxide dismutase extract pro- motes antioxidant defences in the brain and prevents stress-induced impairment of spatial memory.** Behav Brain Res. 200(1): p.15–21, 2009.

OGOSHI, R. C. S. **Avaliação de um Alimento Antioxidante Comercial (EconomasE®) em dietas para gatos adultos.** 105 p. Ph.D. Thesis (Nutrition of Non-Ruminant Animals) – Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, 2014.

OLSZEWSKI, V.R.; BASTOS, T. S.; KOMARCHEUSKI, A. S.; OLIVEIRA, S. G.; WARTH, J. F. G.; FELIX, A. P. **Cranberries (*Vaccinium macrocarpon aiton*) in dog nutrition: influence on diet digestibility and palatability and in the course of urinary tract infections.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.72 no.5. 2020.

PEIXOTO, T. C.; MOURA, E. G.; OLIVEIRA, E.; SOARES, P. N.; GUARDA, D. S.; BERNARDINO, D. N.; AI, X. X.; RODRIGUES, V. S. T.; SOUZA, G. R.; SILVA, A. J. R.; FIGUEIREDO, M. S.; MANHÃES A. C.; LISBOA, P. C. C. **Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) extract treatment improves triglyceridemia, liver cholesterol, liver steatosis, oxidative damage and corticosteronomia in rats rendered obese by high fat diet.** Eur. J. Nutr., 16p. 2017.

PRIOR, R. L.; CAO, G. **Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity: a review.** J. AOAC Int., Vol. 83, No. 4, p. 950-956, 2000.

PRIYADARSINI, K.I. **The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent.** Molecules, 19, p. 20091–20112. 2014.

SANKAR, P.; TELANG, A. G. MANIMARAN, A. **Protective effect of curcumin on cypermethrin-induced oxidative stress in Wistar rats.** Toxicol. Pathol. Vol. 64, p.497-493, 2012.

SELBY-PHAM, S. N. B.; COTTRELL, J. J.; DUNSHEA, F. R.; NG, K.; BENMETT, L. E.; HOWELL, K. S. **Dietary phytochemicals promote health by enhancing antioxidant defense in a pig model.** Nutrients, 9, 16p., 2017.

SKRZYDLEWSKA, E.; OSTROWSKA, J.; FARBISZEWSKI, R.; MICHALAK, K. **Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain.** Phytomedicine. Vol.9, p.232–238. 2002.

STEPHANIE, S.; CHANG, Y.P.; GNANASEKARAN, A.; ESA, N. M. **An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement.** J. Funct. Foods, 10p. 2020.

VALDÍVIA, A.; PEREZ-ALVAREZ, S.; AROCA-AGUILAR, J. D.; IKUTA, I.; JORDÁN, J. **Superoxide dismutase: a physicalpharmacological update.** Journal of Physiology and Biochemistry, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 195-208. 2009.

VARONI, M. V.; PASCIU, V.; GADAU, S. D.; BARALLA, E.; SERRA, E.; PALOMBA, D.; DEMONTIS, M. P. **Possible antioxidant effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on hepatic cadmium-induced oxidative stress in rats.** Envirom. Sci. Pollut. Res. 10p., 2016.

WANG, L.; MUXIN, G.; NISHIDA, H.; SHIRAKAWA, C.; SATO, S. **Psychological stress-induced oxidative stress as a model of sub-healthy condition and the effect of TCM.** eCAM, 4(2), p.192-202. 2006.

WEBB, C.B.; LEHMAN, T.L.; MCCORD, K.W. **Effects of an oral super- oxide enzyme supplementation on indices of oxidative stress, proviral load, and CD4:CD8 ratios in asymptomatic FIV- infected cats.** J Feline Med Surg. 10:423–30. 2008.

ZEYUAN D.; BINGYIN, T.; XIAOLIN, L.; JINMING H.; YIFENG, C. **Effect of Green Tea and Black Tea on the Blood Glucose, the Blood Triglycerides, and Antioxidation in Aged Rats.** J. Agric. Food Chem. V. 46, 10. p.3875–3878. 1998.



## ANEXO A – ANÁLISES DE VARIÂNCIA DOS PARÂMETROS ESTUDADOS

Tabela 1A – Análise de variância para a variável resposta consumo de água (ml/kg<sup>0,67</sup>)

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	Valor-p
Tratamento	4	121,34	30,33	0,6	0,6645
Resíduos	24	1208,26	50,34		
CV (%)	20,8				

Tabela 2A – Análise de variância para a variável resposta consumo de alimento (Kcal/kg<sup>0,67</sup>).

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F	valor-p
Tratamento	4	596,56	149,14	1,9208	0,1396
Resíduos	24	1863,45	77,644		
CV (%)	9,64				

Tabela 3A – Análise de variância e coeficiente de variação da variável TBARS

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	4	6,814566	1,703642	1,577	0,1885
Tempo	3	10,402899	3,467633	3,209	0,0274
Tratamento*Tempo	12	23,599866	1,966656	1,82	0,0586
erro	80	86,43672	1,080459		
Total Corrigido	99	127,255051			
CV (%)	35,9				
Média Geral	2,8957		Nº de observações:	100	

Tabela 4A – Análise de variância e coeficiente de variação da variável Catalase

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	4	1330,77431	332,693579	10,304	0,0000
Tempo	3	221,981891	73,993964	2,292	0,0844
Tratamento*Tempo	12	339,410214	28,284185	0,876	0,5740
erro	80	2583,04184	32,288023		
Total Corrigido	99	4475,20826			
CV (%)	27,69				
Média Geral	20,5179		Nº de observações	100	

Tabela 5A – Análise de variância e coeficiente de variação da variável Cortisol.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	4	248922,076	62230,5189	4,119	0,0044
Tempo	3	632662,827	210887,609	13,96	0,0000
Tratamento*Tempo	12	175667,799	14638,9832	0,969	0,4951

erro	80	1208552,71	15106,9089
Total Corrigido	99	2265805,41	
CV (%)	32,85		
Média Geral	374,292		Nº de observações 100

Tabela 6A – Análise de covariância para a variável Corstisol, considerando o Dia 0 como covariável, para os tempos Dia 50, Dia 61 e Dia 71.

Variável Resposta: Dia 50

Fonte	GL	SQ tipo III	QM	Fc	Pr > F
Tratamento	4	13608,56	3402,13921	0,84	0,5148
Dia 0	1	3541,467	3541,46704	0,88	0,3603
Dia 0*Tratamento	4	12459,59	3114,89643	0,77	0,5568

Variável Resposta: Dia 61

Fonte	GL	SQ tipo III	QM	Fc	Pr > F
Tratamento	4	50429,66	12607,41444	0,73	0,5831
Dia 0	1	21168,67	21168,67245	1,22	0,2819
Dia 0*Tratamento	4	48009,57	12002,39137	0,69	0,6053

Variável Resposta: Dia 71

Fonte	GL	SQ tipo III	QM	Fc	Pr > F
Tratamento	4	120017,4	30004,3561	1,38	0,2762
Dia 0	1	26332,93	26332,9263	1,21	0,2841
Dia 0*Tratamento	4	131305,8	32826,4548	1,51	0,2370

Tabela 7A – Análise de variância e coeficiente de variação da enzima SOD.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	4	24,967459	6,241865	2,505	0,0486
Tempo	3	8,593541	2,864514	1,15	0,3343
Tratamento*Tempo	12	49,055853	4,087988	1,614	0,0969
erro	80	199,34266	2,491783		
Total Corrigido	99	281,959513			
CV (%)	28,67				
Média Geral	5,05053			Nº de observações	100

Tabela 8A – Análise de variância e coeficiente de variação da Atividade Antioxidante Total.

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	4	0,640686	0,160172	6,894	0,0001
Tempo	3	2,240587	0,746862	32,114	0,0000
Tratamento*Tempo	12	0,669218	0,055768	2,4	0,0105
erro	80	1,8588	0,023235		

Total Corrigido	99	5,409291		
CV (%)	21,92			
Média Geral	0,6953		Nº de observações	100

Tabela 9A – Análise de variância e coeficiente de variação do Óxido Nítrico

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamento	4	708,104043	177,026011	0,943	0,4490
Tempo	3	2856,1765	952,058833	5,073	0,0045
Tratamento*Tempo	12	3307,09558	275,591299	1,468	0,1769
erro	40	7507,24253	187,681063		
Total Corrigido	59	14378,6187			
CV (%)	79,25				
Média Geral	17,287		Nº de observações:	60	

Tabela 10A – Análise de variância e coeficiente de variação do pH urinário

Fonte de Variação	F	GL	GL. Res	Pr(>F)
Tratamento	0,9797	4	20,31	0,4405
Tempo	0,7209	3	14,488	0,5555
Tratamento*Tempo	1,0303	12	48,591	0,4375
CV (%)	6,04			

Tabela 11A – Análise de variância e coeficiente de variação da densidade urinária

Fonte de Variação	F	GL	GL. Res	Pr(>F)
Tratamento	1,8243	4	18,548	0,1668
Tempo	34,3432	3	14,536	0,0000
Tratamento*Tempo	1,4013	12	44,972	0,2008
CV (%)	1,36			

Tabela 12A – Análise de variância e coeficiente de variação do volume urinário

Fonte de Variação	F	GL	GL. Res	Pr(>F)
Tratamento	0,5785	4	20,561	0,6815
Tempo	1,3733	3	12,921	0,2949
Tratamento*Tempo	1,2995	12	43,1	0,2539
CV (%)	41,95			