



ROSANA CLAUDIO SILVA OGOSHI

**AVALIAÇÃO DE UM ANTIOXIDANTE
COMERCIAL (Economase[®]) EM DIETAS PARA
GATOS ADULTOS**

LAVRAS - MG

2014

ROSANA CLAUDIO SILVA OGOSHI

**AVALIAÇÃO DE UM ANTIOXIDANTE COMERCIAL (EconomasE®)
EM DIETAS PARA GATOS ADULTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não-Ruminantes, para a obtenção do título de Doutora.

Orientadora

Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad

Coorientadores

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Dra. Priscila Vieira Rosa

LAVRAS - MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Ogoshi, Rosana Claudio Silva.

Avaliação de um antioxidante comercial (EconomasE[®]) em dietas para gatos adultos / Rosana Claudio Silva Ogoshi. – Lavras : UFLA, 2014.

104 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Flávia Maria de Oliveira Borges Saad.

Bibliografia.

1. Equilíbrio ácido-básico. 2. Estresse. 3. Felinos. 4. Radicais livres. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.808557

ROSANA CLAUDIO SILVA OGOSHI

**AVALIAÇÃO DE UM ANTIOXIDANTE COMERCIAL (EconomasE®)
EM DIETAS PARA GATOS ADULTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Não-Ruminantes, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 12 de março de 2014.

Dra. Janine França	UFU
Dr. Leonardo Boscoli Lara	UFMG
Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo	UFLA
Dra. Priscila Vieira Rosa	UFLA
Dr. Raimundo Vicente Sousa	UFLA

Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad
Orientadora

LAVRAS – MG

2014

Ao meu amor maior, minha filha Helena Ogoshi, por ser um anjo em minha vida.

Ao meu marido, Cláudio Ogoshi, pelo amor, companheirismo e compreensão durante as fases mais difíceis.

À minha mãe, Mariangela Claudio Silva, por ter ficado comigo e ajudado imensamente nos cuidados com minha filha, contribuindo para que eu tivesse sucesso nesta etapa.

Ao meu pai, Delcides de Oliveira Silva, pela educação e suporte em tudo que precisei.

À minha avó, Joaquina Sanches (*in memoriam*) e ao meu irmão, Rogério Claudio Silva (*in memoriam*) por terem sido tão importantes na minha vida.

Às minhas amigas, Jéssica Santana dos Reis e Janine França, pelas contribuições técnicas e suporte em todos os momentos.

À minha irmã de coração, minha comadre Letícia de Oliveira Albuquerque Machado e ao compadre Fábio Machado, pela torcida e todo carinho de sempre,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora por todas as bênçãos despejadas sobre mim.

À minha orientadora, Dra. Flávia Maria de Oliveira Borges Saad, pela confiança, oportunidades e ensinamentos oferecidos ao longo de anos de orientação.

Ao meu coorientador, Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo, pela imensa contribuição científica e inesgotável paciência que tanto me auxiliaram na conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. Raimundo Vicente Sousa pelo suporte dado durante e após o experimento.

Aos professores, Dra. Priscila Vieira e Rosa e Dr. Leonardo Boscoli Lara, pela disposição e sugestões para aperfeiçoamento do trabalho.

Aos professores Tarcísio de Moraes Gonçalves (DZO/UFLA) e João Domingos Scalon (DEX/UFLA) e ao Adriano de Carvalho Costa (DZO/UFLA) pelas contribuições nas análises estatísticas.

Aos funcionários Márcio, Eliana e José Virgílio do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia (UFLA) e ao funcionário Willian do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária (UFLA).

À minha amiga Fernanda Sayuri Ebina pela ideia inicial do projeto.

A médica veterinária Mariana Porsani que realizou as colheitas de sangue com disposição.

A professora Dra. Monica Ferreira Machado (PUC Goiás) e ao pesquisador Pedro Martins Ribeiro Júnior pelas contribuições no início do experimento.

A todos integrantes do NENAC, antigos e atuais, mas em especial a Karen Lisenko, Thaianie Vieira da Silva, Maiara Rodrigues Duarte de Oliveira,

Adrielle de Paula Caetano, André Pires de Lima Miranda e Pedro Faria que participaram, ativamente, na execução deste trabalho.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras pela amizade e educação que tratam todos os alunos. Em especial ao Sr. Ednaldo pelo carinho que tem com os animais do CENAC.

Aos colegas de pós-graduação Raquel, Leandro e Renan pela companhia nos laboratórios de Histologia e de Enzimologia/DZO/UFLA.

Ao professor Dr. Marcos Neves (DZO/UFLA) e seus orientados, Naina e Ronaldo, pela contribuição na gasometria.

Ao professor Luiz Gonsaga de Carvalho (DEG/UFLA), responsável pela Estação Climatológica Principal de Lavras – Convênio UFLA/INMET

À empresa Alltech pelo financiamento do projeto e ao CNPQ pela concessão da bolsa de estudos.

À minha família, em especial aos meus primos, Lara e Lucas pelo apoio de sempre.

O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e
semeando, no fim terás o que colher (Cora Coralina).

RESUMO GERAL

Situações estressantes são inevitáveis para gatos e têm como resultado o aumento na produção de radicais livres os quais são associados às doenças. Dessa maneira, objetivou-se avaliar os níveis crescentes de suplementação de um *pool* de antioxidantes não enzimáticos (AOX) em dieta de gatos e seus efeitos sobre o estresse fisiológico, avaliação dos *status* oxidativo, bioquímica sérica, parâmetros do equilíbrio ácido-básico, fragilidade osmótica eritrocitária, parâmetros urinários e hemograma completo. Foram utilizados 24 gatos adultos, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com quatro níveis (0, 250, 500, 750 mg de AOX/kg de alimento na matéria seca) e seis repetições durante 80 dias. Coletou-se sangue dos gatos em jejum no dia 0 e a cada 20 dias (tempos - T). No 61º dia, os gatos foram submetidos a um estresse induzido por meio da presença de cães próximo ao recinto experimental (agente estressor; AE) que permaneceram até o final das avaliações. Observou-se que os efeitos estresse induzido foram controlados pela suplementação de AOX com manutenção dos níveis plasmáticos de cortisol e dialdeído malônico e consequente manutenção da atividade da enzima superóxido dismutase e redução da atividade da enzima catalase. Houve, ainda, o aumento do HDL-c conforme a aumento dos níveis de suplementação do AOX. Nos parâmetros do balanço ácido básico, houve aumento na pressão parcial de dióxido de carbono e do bicarbonato plasmáticos, conforme a aumento dos níveis de suplementação do AOX. Houve, ainda, aumento da concentração da hemoglobina nos gatos suplementado com os maiores níveis estudados. Não houve diferenças nas demais variáveis estudadas. Conclui-se que o AOX causa importante controle do estresse, sendo recomendado o nível de 750 mg/kg de matéria seca de dieta para gatos adultos.

Palavras-chave: Equilíbrio ácido-básico. Estresse. Felinos. Radicais livres.

GENERAL ABSTRACT

Stressful situations are inevitable for cats and result in the increase on the production of free radicals, which are associated to diseases. Thus, we aimed at evaluating the increasing levels of supplementation of a pool of non-enzymatic antioxidants (AOX) in cat diets and its effects over physiological stress, oxidative status evaluation, serum biochemistry, acid-base balance parameters, erythrocyte osmotic fragility, urinary parameters and complete blood count. Twenty-four adult cats were distributed in a completely randomized design with four levels (0, 250, 500, 750 mg of AOX/kg of feed in dry matter) and six replicates during 80 days. Blood was drawn from the cats at fasting in day 0 and at each 20 days (times – T). In the 61st day, the cats were submitted to stress induced by means of the presence of dogs near the experimental enclosure (stress agent; SA) which remained until the end of the evaluations. It was observed that the effects of the induced stress were controlled by the supplementation of AOX, maintaining the serum levels of cortisol and malonic dialdehyde and, consequently, the maintenance of the superoxide dismutase enzyme activity and the reduction of the catalase enzyme activity. There was also an increase of the HDL-c according to the increase on the levels of AOX supplementation. In the acid-base balance parameters there was an increase in the partial pressures of serum carbon dioxide and bicarbonate, according to the increase of the levels of AOX supplementation. There was also the increase of hemoglobin concentration in cats supplemented with the highest levels studied. There was no difference on the remaining variables studied. It is concluded that the AOX is responsible for an important stress control, recommending the level of 750 mg/kg of diet dry matter for adult cats.

Keywords: Acid-base balance. Stress. Felines. Free radicals.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Esquema das respostas globais ao estresse..... 17
- Figura 2 Processo de produção de biodiesel baseado na microalga e obtenção da farinha de algas25
- Figura 3 Hidrólise do ácido tânico, R₁ (galoil) e R₂ (digaloil)29
- Figura 4 Oxidação do ascorbato por meio da redução do radical tocoferoxil (reciclagem do tocoferol).....32

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 Alterações nas concentrações de cortisol (A), superóxido dismutase total (B) e catalase (C) no plasma de gatos dentro do tempo 80 dias de suplementação com AOX (farinha de algas marinhas, selênio levedura, ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*)/ kg de matéria seca da dieta. 58
- Figura 2 Alterações nas concentrações de TBARS (Dialdeído malônico-MDA) no plasma de gatos dentro do tempo 60 dias de experimentação (A) e 80 dias de experimentação (B) de suplementação com AOX (farinha de algas marinhas, selênio levedura, ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*)/ kg de MS na dieta..... 59
- Figura 3 Alterações nas concentrações de colesterol total (A) e HDL-c (B) no plasma de gatos dentro do tempo 80 dias de suplementação com AOX (farinha de algas marinhas, selênio levedura, ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*) mg/kg de matéria seca da dieta.....61

ARTIGO 2

- Figura 1 Alterações nas concentrações da pressão parcial de dióxido de carbono (A) e bicarbonato (B) no plasma de gatos dentro do tempo 80 dias de suplementação com AOX (farinha de algas marinhas, selênio levedura, ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*) mg/kg de matéria seca da dieta 80
- Figura 2 Curvas acumulativas (médias) da fragilidade osmótica eritrocitária de gatos após 80 dias da suplementação com AOX (farinha de algas marinhas, selênio levedura, ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*) / kg de MS na dieta ... 82

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1	Composição nutricional da dieta padrão*	52
Tabela 2	Resultados de variáveis referente ao estresse oxidativo no plasma de gatos durante o período de suplementação com AOX(mg/kg dieta na MS)	57
Tabela 4	Valores médios dos parâmetros de bioquímica sérica de gatos adultos aos 80 dias após suplementação com antioxidante AOX	60

ARTIGO 2

Tabela 1	Composição nutricional da dieta padrão ¹	75
Tabela 2	Valores médios dos parâmetros de gasometria de gatos adultos aos 80 dias após suplementação com antioxidante AOX	79
Tabela 3	Valores médios dos parâmetros hematológicos e parâmetros urinários de gatos adultos após suplementação com antioxidante AOX	81
Tabela 4	Valores médios (derivativos) das concentrações de solução salina (% NaCl) correspondentes a 5, 50 e 95% de hemólise em gatos adultos após 80 dias de suplementação com AOX (mg/kg MS)	83

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 14
2	REVISÃO DE LITERATURA 16
2.1	Estresse fisiológico em gatos 16
2.2	Oxidação, radicais livres e estresse oxidativo 19
2.3	Antioxidantes e suas combinações 22
2.4	Ingredientes que podem ser utilizados no aprimoramento do <i>status</i> antioxidante de gatos 24
2.4.1	Farinha de algas marinhas 24
2.4.2	Produto da Fermentação de <i>Aspergillus niger</i> 28
2.4.3	Selênio 30
2.4.4	Ácido ascórbico 31
2.5	Avaliações de antioxidantes dietéticos 33
2.5.1	Avaliação parâmetros sanguíneos 34
2.5.2	Mensuração da fragilidade osmótica eritrocitária 35
2.5.3	Gasometria 36
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS 39
	REFERÊNCIAS 40
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS 47
	ARTIGO 1 Suplementação com antioxidante comercial (Economase®) em alimento para gatos adultos sob estresse e seus efeitos sobre o <i>status</i> oxidativo 47
	ARTIGO 2 Uso de antioxidante comercial (Economase®) em alimento para gatos sob estresse: efeitos nos parâmetros do equilíbrio ácido-básico, urinários e fragilidade de eritrócitos 71
	ANEXOS 91

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Os problemas de saúde gerados atualmente pelo estilo de vida humano têm atingindo, também, os gatos domésticos em virtude da intensa relação existente entre tais espécies. Os gatos tiveram que se adaptar a uma rotina totalmente diferente da que tinham na natureza e, desse modo, as situações que parecem ser corriqueiras para humanos podem se tornar completamente estressantes para esses animais. Mesmo que pareçam inofensivas, as atividades como banhos, tratamentos de beleza, transporte, manipulação indesejada ou por pessoas desconhecidas, introdução de novos animais no ambiente, confinamento, solidão, poluição sonora, entre outros podem resultar em estresse fisiológico nesses animais.

A recuperação da homeostase, após um estresse fisiológico, depende intensamente da capacidade individual e, uma vez que as situações estressantes são inevitáveis em muitas ocasiões, tornam-se necessárias estratégias para a manutenção da saúde do gato. Nesse sentido, uma boa alimentação é uma importante aliada.

Por outro lado, em condições normais, ao exercerem suas funções, as células aeróbicas geram radicais livres que são denominados de espécies reativas de oxigênio (EROs). O organismo sadio possui sistemas de defesas endógenos e exógenos que o protege da ação das EROs. No entanto, qualquer fenômeno que gere desequilíbrio entre a remoção e formação das EROs resulta em danos destrutivos e irreversíveis para célula. Portanto, esse desequilíbrio, também, chamado de estresse oxidativo, tem sido atribuído como causa ou agravamento de diversas doenças como o câncer, distúrbios renais, cardíacos e degenerativos. O estresse oxidativo pode ocorrer por diferentes causas, em todas as faixas

etárias, mas pode ser intensificado nos animais em situações de estresse fisiológico.

Deste modo, a utilização de nutrientes funcionais conhecidos como nutracêuticos vem sendo bastante estudada em humanos e animais. Dentre estas substâncias se destacam os antioxidantes que são capazes de neutralizar as EROs antes que as mesmas ataquem as estruturas celulares ou, ainda, no combate das reações em cadeia. Os antioxidantes mais estudados na nutrição são os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, oligoelementos (cobre, zinco, selênio e manganês). No entanto, em estudos mostra-se que a utilização de antioxidantes em conjunto pode ser mais efetiva do que quando isolados, uma vez que a maioria deles atua de maneira complementar.

Em se tratando de gatos, os dados publicados a respeito da interferência dos antioxidantes sobre os parâmetros de avaliação do estresse oxidativo são limitados. A avaliação e descoberta de níveis ideais de uma mistura de antioxidantes utilizados na nutrição poderão auxiliar as indústrias *petfood* a terem maior segurança em recomendar a utilização desses produtos, já que, frequentemente, as quantidades adicionadas na dieta são extrapoladas da nutrição humana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estresse fisiológico em gatos

Com processo de domesticação, os gatos passaram a se adaptar a uma rotina totalmente diferente da que tinham na natureza (CARRAMENHA; CARREGARO, 2012). Situações corriqueiras para humanos, mesmo que pareçam inofensivas, podem se tornar completamente estressantes para os gatos.

Qualquer alteração ambiental que interrompa a homeostase pode ser considerada um agente estressor (AE) (SQUIRES, 2003). Banhos, tratamentos de beleza, transportes, manipulação indesejada ou por pessoas desconhecidas, introdução de novos animais no ambiente, poluição sonora e do ar, confinamento, solidão e outras várias situações, tais como agressões infecciosas, presença de endo e ecto parasitas, modificações na alimentação e estresse térmico são potenciais AE para gatos (BEAVER, 2003; CARRAMENHA; CARREGARO, 2012; LACERDA NETO et al., 2004).

A interação entre um AE e a resposta ao estímulo manifesta-se na forma da “síndrome de adaptação geral” no qual o organismo tenta reduzir os efeitos do AE (SQUIRES, 2003). A hiperestimulação fisiológica e psicológica que ocorrem em resposta ao estresse evoluiu como um mecanismo para lidar com ameaças à sobrevivência e contribui para ajustar vários sistemas em busca da homeostase. Assim, o estresse, até certo ponto, pode ser benéfico. Entretanto, quando estes ajustes não compensam o estresse ou quando a resposta ao estresse se dá de maneira excessiva, alterações patológicas e danos ao animal podem ocorrer (SQUIRES, 2003).

Dentre as manifestações de estresse mais comuns estão o medo, agressividade, problemas reprodutivos, metabólico e desvios de comportamento, podendo evoluir para o óbito em casos extremos (CARRAMENHA;

CARREGARO, 2012). Os sintomas do estresse são, muitas vezes, subjetivos e de natureza emocional (CARLSTEAD; BROWN; STRAWN, 1993).

Uma resposta imediata ao estresse agudo é denominada de luta ou fuga. Nela, por intermédio do sistema nervoso autônomo, há uma descarga de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) que é seguida de uma recuperação dos valores basais (ROMERO; BUTLER, 2007). Quando o estresse tem a duração superior a uma semana passa a ser denominado como estresse crônico onde há predomínio da liberação de hormônios glicocorticoides, como o cortisol e a corticosterona (ROMERO; BUTLER, 2007). Os efeitos do estresse crônico em animais são controlados ao nível de hipotálamo, mediados por mudanças no comportamento e efeitos neuroendócrinos por meio do sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo- hipófise-adrenal (SQUIRES, 2003). Estes efeitos encontram-se resumidos na Figura 1.

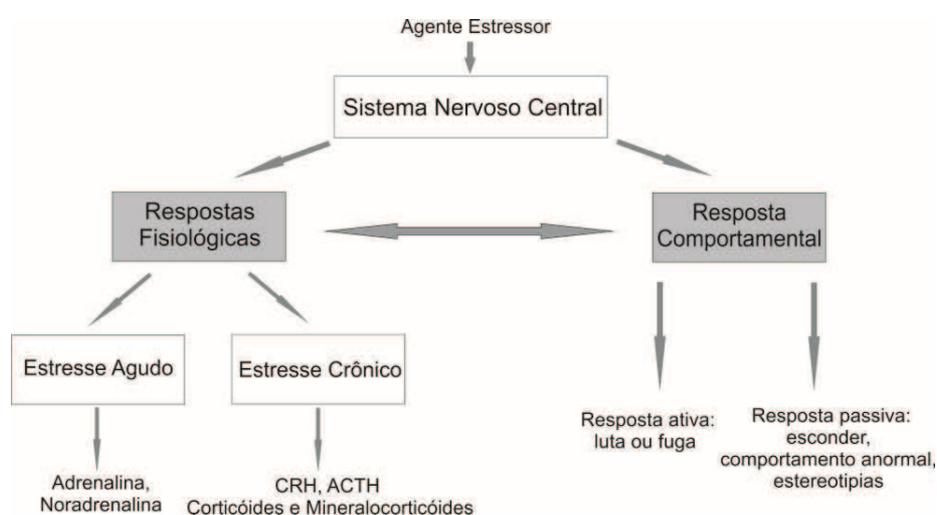


Figura 1 Esquema das respostas globais ao estresse

Fonte: Adaptado de Squires (2003).

Nota: CRH: hormônio liberador de corticotrofina; ACTH: hormônio adrenocorticotrófico.

O cortisol é o mais importante glicocorticoide em gatos (JOHSTON; MATHER, 1979) e sua mensuração no sangue tem sido uma medida eficiente para mensurar o grau de estresse, uma vez que apresenta correlação positiva com o estresse agudo ou crônico (BERDA et al., 1997; LACERDA NETO et al., 2004).

Foi demonstrado que o cortisol requer um período relativamente longo para retornar aos valores normais após um estresse em gatos. Depois de um procedimento cirúrgico, a concentração de cortisol no plasma de gatos aumentou 24 horas após a cirurgia e diminuiu progressivamente até retornar os níveis basais, 72 horas depois (LACERDA NETO et al., 2004). De acordo com Johnston e Mather (1979), a concentração de cortisol no plasma de gatos é considerada maior do que em outras espécies, pois neles a concentração do hormônio permanece em média menor que 4µg /dl de plasma sob condições normais.

O cortisol influencia no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas; promove a gliconeogênese com base em aminoácidos, aumenta a mobilização e oxidação de ácidos graxos, eleva os níveis de colesterol, triacilglicerol plasmáticos e aumenta a deposição de glicogênio no fígado. Esse glicocorticoide, também, interfere na distribuição de água e eletrólitos nos tecidos e, além disso, tem efeitos sobre imunidade e inflamação, provavelmente, pela inibição da síntese de prostaglandinas (SQUIRES, 2003). O cortisol é, portanto, um hormônio envolvido em muitos processos metabólicos geradores de radicais livres e sua elevação no plasma tem sido associado, também, com o aumento do estresse oxidativo no organismo (DIAZ et al., 2010). Altos níveis de cortisol podem esgotar as reservas antioxidantes como, por exemplo, a glutathiona celular que é um importante substrato na defesa antioxidante (MCANULTRY et al., 2007).

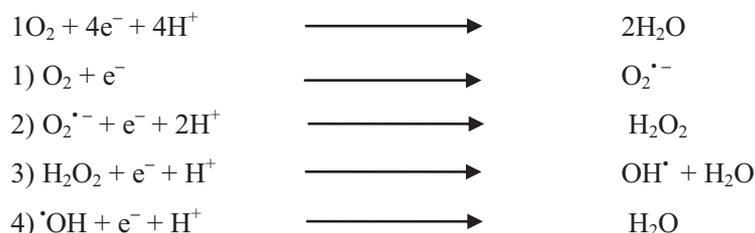
Nesse sentido, a suplementação com antioxidantes dietéticos contribui para que os mecanismos antioxidantes sejam repostos após uma situação de estresse. Além do mais, foi observado por alguns autores (CIVEN et al., 1980; WANG et al., 2003) que, em animais submetidos ao estresse fisiológico, ocorreu um efeito de redução nos níveis de cortisol, quando suplementados com antioxidantes (carotenoides, vitamina C, vitamina E, selênio, ou a combinação deles). Entretanto o mecanismo exato desse efeito é, ainda, desconhecido, principalmente, em gatos.

2.2 Oxidação, radicais livres e estresse oxidativo

A oxidação é um fenômeno necessário para células em que oxigênio é utilizado na respiração e produção de energia. Contudo, o oxigênio é altamente reativo e potencialmente tóxico e, assim, mecanismos fundamentais como a respiração resultam na produção de componentes oxidantes chamados de EROs (TUCKER, 2003). As EROs são capazes de reagir com qualquer biomolécula em razão da presença de elétrons desemparelhados (BIANCHI; ANTUNES, 1999). É importante ressaltar que, sob condições fisiológicas normais, entre 3% e 5% do oxigênio celular é transformado em radicais livres (SOHAL; WEINDRUCH, 1996), uma quantidade que aumenta drasticamente sob condições estressantes.

Durante a respiração aeróbica, a conversão do O_2 a H_2O resulta na formação de diversos compostos intermediários (EROs), uma vez que, ao receber um elétron, o oxigênio forma o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), consecutivamente, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) antes de chegar a sua forma final de molécula de água (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As equações de conversão do oxigênio à água são:



O $\text{O}_2^{\cdot-}$ ocorre em quase todas as células aeróbicas e sua produção é aumentada, durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque facilmente é convertido em OH^{\cdot} (Equação 3). O H_2O_2 é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe^{++} (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Já OH^{\cdot} é considerada a EROs mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida dessa molécula com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido, confirma sua alta reatividade. Assim, se o 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 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O OH^{\cdot} e/ou o radical alcóxila (LO^{\cdot}) iniciam a peroxidação lipídica. Esta consiste em uma reação em cadeia que ocorre em três estágios: fase de iniciação, fase de propagação e fase de terminação. Na fase de iniciação, radicais R^{\cdot} são produzidos da retirada de um próton do ácido graxo poliinsaturado. Na fase de propagação, esses radicais reagem, rapidamente, com o oxigênio molecular, formando o radical peróxil (ROO^{\cdot}), o qual, também, é capaz de atacar outra molécula de lipídeo poliinsaturado. Embora o radical peróxil inicial seja convertido a hidroperóxido (ROOH), esse processo produz um novo radical R^{\cdot} , o qual é, rapidamente, convertido em outro radical peróxil. O processo

propagativo continua e pode tornar-se um processo de fuga, consumindo gordura poliinsaturada e produzindo uma quantidade correspondente de hidroperóxido (ROOH). A reação em cadeia não para até que o peróxil (ROO•) encontre e combine com outro radical peróxil para formar produtos inativos (BURTON, 1990).

Há, ainda, os radicais derivados do nitrogênio, como, por exemplo, o óxido nítrico (NO•) e o peroxinitrito (ONOO•) e as espécies reativas do cloro. Todos esses radicais, também, requerem o oxigênio para serem formados (FANG; YANG; WU, 2002).

Deste modo, os organismos aeróbios são adaptados a conviverem em concentrações altas de O₂ e, nesse ponto, entra a importância das defesas antioxidantes.

O estresse oxidativo é a denominação dada ao desequilíbrio entre a produção de EROs e os sistemas de defesa antioxidante e pode resultar de um excesso de radicais livres e/ou uma diminuição nos níveis de antioxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Esse desequilíbrio pode ocorrer em função de diversos fatores que levam a processos como a peroxidação lipídica das membranas celulares, destruição de organelas e de ácidos nucleicos (BASKIN et al., 2000).

Por isso, as EROs vêm sendo associadas ao surgimento ou agravamento de doenças renais (KARGIN; FIDANCI, 2001), cardíacas (SUZUKI; KANEKO; CHAPMAN, 1991), câncer (LOPACZYSKI; ZEISEL, 2001) e diversas doenças degenerativas (ZICKER; WEDEKIND; JEWELL, 2006).

No entanto, abordagens dietéticas eficazes, para reduzir os efeitos do estresse oxidativo, não têm estado disponíveis.

2.3 Antioxidantes e suas combinações

Os antioxidantes agem interagindo com as EROs antes que esses possam reagir com as moléculas biológicas, evitando que ocorram as reações em cadeia ou prevenindo a ativação do oxigênio a produtos altamente reativos. Considerando essa função, o antioxidante pode preservar a integridade estrutural ou função de uma molécula biológica e, assim, preservar a sua ação na célula (ZICKER; WEDEKIND; JEWELL, 2006).

Dentre as enzimas antioxidantes envolvidas na remoção das EROs, a superóxido dismutase (SOD) é ativada para catalisar a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 . Existem quatro isoenzimas da SOD que diferem pelo metal ligado ao seu sítio ativo, podendo ser o cobre, o zinco, o manganês ou o ferro (VALKO et al., 2006).

A SOD 1 é a primeira isoenzima, sendo esta complexada ao cobre e zinco e está presente no citoplasma, núcleo e líquido extracelular. A SOD 2 é complexada por manganês e está presente no interior de mitocôndrias e corresponde à principal defesa antioxidante celular pelo alto consumo de oxigênio e liberação de radicais livres nesta organela (VALDÍVIA et al., 2009). A SOD 3, que é complexada ao cobre e zinco, possui um peptídeo sinalizador presente no espaço extracelular de tecidos como endotélio vascular do músculo liso, células alveolares tipo III, córnea e esclerótica. Existe, ainda, a SOD 4, complexada ao ferro, que é encontrada somente em bactérias, algas e vegetais superiores (VALDÍVIA et al., 2009).

O H_2O_2 formado pela ação da SOD é mais estável que o $O_2^{\cdot-}$, mas ainda é tóxico e, então, precisa da ação de outras enzimas. Para ser removido das células, precisa de reações adicionais, que são realizadas pela ação da glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) (TUCKER, 2003). Uma vez que a GPx é encontrada em vários compartimentos celulares e a CAT é localizada,

principalmente, nos peroxissomos, a eficácia de remoção de H_2O_2 nas células é maior com GPx. No entanto, na presença de estresse oxidativo, a catalase é a enzima antioxidante mais adaptável e desempenha um papel significativo na defesa nas células contra danos oxidativos (MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; CASTRO, 1999). A GPx possui em sua estrutura um resíduo de cisteína ligada a um selênio e a deficiência deste mineral decorre em redução na atividade desta enzima (ROVER JUNIOR; HÖEHR; VELLASCO, 2001). Assim, se as enzimas antioxidantes são metaloenzimas, os microminerais se tornam necessários em quantidades suficientes na dieta para assegurar a síntese enzimática nas organelas celulares e, conseqüentemente, para maximizar a eficiência do antioxidante (TUCKER, 2003).

Porém, a ação dos antioxidantes enzimáticos não é suficiente para impedir completamente a formação de radicais livres e da peroxidação lipídica. Há um segundo nível de defesa antioxidante, o que inclui os antioxidantes solúveis em gordura (vitaminas A, E, carotenoides e ubiquinona) e solúveis em água (por exemplo, ácido ascórbico, glutatona e ácido úrico). Estes antioxidantes são potentes compostos bloqueadores de cadeia que impedem a formação e propagação em cadeia dos radicais livres (TUCKER, 2003).

Desta maneira, o metabolismo de renovação das EROs é bastante complexo e, para que funcione corretamente, é necessário que haja à sua disposição todas as substâncias que auxiliem na atividade. Nesse ponto, entra a importância da suplementação, via dietética, de agentes que atuam contra a oxidação. O aumento dos níveis de antioxidantes na dieta auxilia no aumento dos níveis antioxidantes circulantes, sendo estes responsáveis pela redução de produtos finais da oxidação (JEWELL et al., 2000).

O fornecimento de antioxidantes via dieta pode ajudar em uma completa proteção ao animal, assim como auxilia para que os recursos antioxidantes sejam

utilizados de maneira eficiente como, por exemplo, a reciclagem eficiente de vitamina E na presença da vitamina C e selênio (TUCKER, 2003).

Entretanto, a necessidade de suplementação dietética com antioxidantes varia com a idade, raça, saúde, estado fisiológico e, também, em situações de estresse fisiológico. A exposição ao ar, doença, poluição (incluindo fumaça de cigarro), contribuem para o estresse oxidativo, tornando essencial o fornecimento adequado de níveis de compostos antioxidantes e precursores de SOD, GPx e CAT para auxiliar na sua formação (TUCKER, 2003).

2.4 Ingredientes que podem ser utilizados no aprimoramento do *status* antioxidante de gatos

São diversos os ingredientes possíveis de serem utilizados na nutrição de cães e gatos. A seguir serão expostos alguns capazes de fornecerem antioxidantes de diversas naturezas.

2.4.1 Farinha de algas marinhas

O termo alga refere-se a uma fração de plantas inferiores que contém clorofila nas células e que é típica habitante do ambiente aquático (KOVÁČ et al., 2013). As algas marinhas, de maneira geral, representam uma importante fonte de antioxidantes naturais, uma vez que têm sistemas de defesas antioxidantes bem desenvolvidos para suportar as variações ambientais como temperatura, pH e presença de poluentes (ROCHA, 2008). São ricas em polissacarídeos, minerais e algumas vitaminas, além de outros compostos como proteínas, lipídeos e antioxidantes que proporcionam as características antibacterianas, antifúngicas e antivirais (HOLDT; KRAAN, 2010).

Conforme suas dimensões, as algas podem ser divididas em macroalgas (algas macroscópicas) e microalgas (algas microscópicas) (KOVÁČ et al., 2013). Quanto ao crescimento, as microalgas, praticamente, dobram e até triplicam sua biomassa em 24 horas e em virtude desse rápido crescimento e, também, porque algumas espécies são ricas em óleo, as microalgas são fontes potenciais de biodiesel (ASHFORD et al., 2000). Nesse sentido, um coproduto provindo do processamento de algas para o biodiesel é denominado de farinha de algas (Figura 2). A farinha de algas do biodiesel, por conter óleo residual, proteínas e carboidratos vem se tornando importante fonte de nutrientes essenciais sob a forma de alimentos, principalmente, pela quantidade que vem sendo gerada. Em torno de três a quatro vezes mais farinha de algas é produzida por peso do que biodiesel provindo de algas (LOHREY, 2012).

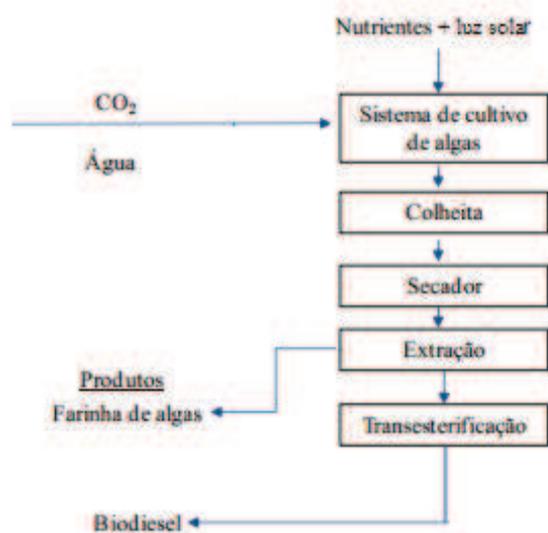


Figura 2 Processo de produção de biodiesel baseado na microalga e obtenção da farinha de algas

Fonte: Adaptado de Lohrey (2012).

Uma vez que muitos estudos de segurança comprovaram a adequação da biomassa algal como suplemento alimentar animal (FICHTALI; SENANAYAKE, 2010), as microalgas vêm sendo incorporadas em alimentos de uma variedade de animais e, de fato, 30% da produção mundial de algas são vendidas para aplicações em alimentação animal (FICHTALI; SENANAYAKE, 2010).

A microalga *Schizochytrium sp.* é utilizada para produção comercial do óleo rico em ômega-3, o ácido docosahexaenóico (DHA, C22: 6) e na forma seca, também, como fonte de DHA para alimentos e suplementos nutricionais (ASHFORD et al., 2000). Não foi encontrada toxicidade ou patogenicidade associada a essa alga *Schizochytrium sp.* (HAMMOND et al., 2001), a qual vem se tornando uma das mais populares microalgas como fonte de biomassa rica em proteína e componentes, especialmente, carotenoides, pigmentos, extratos antioxidantes e ácidos graxos essenciais (HAKIM, 2012). Nessa alga, cerca de 50-77% do peso corresponde à quantidade de lipídeos (KOVAČ et al., 2013) e 25-45% dos ácidos graxos nos triacilgliceróis são do tipo DHA (ASHFORD et al., 2000).

O conteúdo de óleo na farinha de algas varia de acordo com o processamento utilizado para a extração. O método por prensa para extração de óleo em algas, por exemplo, produz o óleo bruto e uma farinha oleosa de alga contendo, aproximadamente, de 10-12% de resíduos de óleo rico em DHA (LOHREY, 2012). Dentre outros métodos inclui a extração por solventes, os quais podem ser empregados o benzeno, o éter etílico e o hexano, que, quando combinados com a prensagem, reduz o resíduo de óleo para 5% na farinha de algas (KOWALSKI, 2010).

Fontes de DHA são importantes para cães e gatos por serem espécies ineficientes na conversão de ácido α linoleico em cadeias maiores de ácidos graxos ômega-3. Nesse sentido, o Nacional Research Council (2006) atualizou

os requerimentos de DHA em cães e gatos para condicionalmente essencial nas fases fisiológicas de maior demanda, como crescimento e reprodução. Assim, inúmeros produtos *pet food* no mercado têm sido suplementados com ácidos graxos ômega-3. Para gatos adultos o DHA é recomendado, porém o requerimento não está estabelecido (NACIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006).

Em um estudo conduzido por Li et al. (2007), para avaliar o potencial de fontes de antioxidantes de diversas microalgas, a alga *Schizochytrium* sp. apresentou, relativamente, alto conteúdo em compostos fenólicos. Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 2012).

Os carotenoides estão envolvidos na restrição da propagação de EROs e remove o excesso de EROs (TUCKER, 2003). O beta caroteno foi o principal carotenoide presente no óleo bruto oriundo de *Schizochytrium* sp. (SENANAYAKE; FICHTALI, 2006). Gatos não conseguem sintetizar vitamina A por beta caroteno, porém são capazes de absorver carotenoides dietéticos que são incorporados nas membranas de organelas, especialmente, nas mitocôndrias e nos linfócitos (CAVE, 2008). Por serem de fácil absorção e em decorrência da capacidade de estabilizar os radicais livres, aliados ao fato de se localizarem nas mitocôndrias, tornam os carotenoides antioxidantes muito eficazes na proteção das células contra os agentes oxidantes (CAVE, 2008).

Embora as algas sejam consideradas como ricas em antioxidantes, há pouca informação sobre atividade antioxidante das microalgas (LI et al., 2007). Isto aumenta a necessidade de mais estudos sobre elas. Além do mais, em face da grande produção de biodiesel, há necessidade de utilização desses resíduos que são fontes de antioxidantes naturais, obtidos de processos controlados em

biorreatores, de modo que eles não contêm herbicidas e pesticidas, ou quaisquer outras substâncias tóxicas (LI et al., 2001).

Os extratos de alga apresentam melhores resultados quando em sinergia com o α -tocoferol ou ácido ascórbico e atuam neutralizando radicais 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH) e hidroxila (\bullet OH) (ROCHA, 2008).

2.4.2 Produto da Fermentação de *Aspergillus niger*

O fungo *Aspergillus niger* sob fermentação a uma temperatura de 28°C é utilizado para a produção em escala da enzima tanino acil hidrolase (EC 3.1.1.20) ou mais conhecida como tanase (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004; RENOVATO et al., 2010).

Os taninos são metabólitos secundários presentes em plantas, utilizadas na nutrição animal, por exemplo, o sorgo, e são considerados um fator antinutricional capaz de interferir no aproveitamento de nutrientes para gatos (CARCIOFI, 2008). Geralmente, são divididos em dois tipos: hidrolisáveis (galotaninos, elagitaninos) e condensados (não hidrolisáveis) formados por polímeros de proantocianidinas. A tanase catalisa a hidrólise de ésteres e ligações laterais de taninos hidrolisáveis, produzindo ácido gálico e glicose e, portanto, é usada, principalmente, na produção industrial de ácido gálico com base em fontes vegetais com alto teor de tanino (BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO, 2004) (Figura 3).

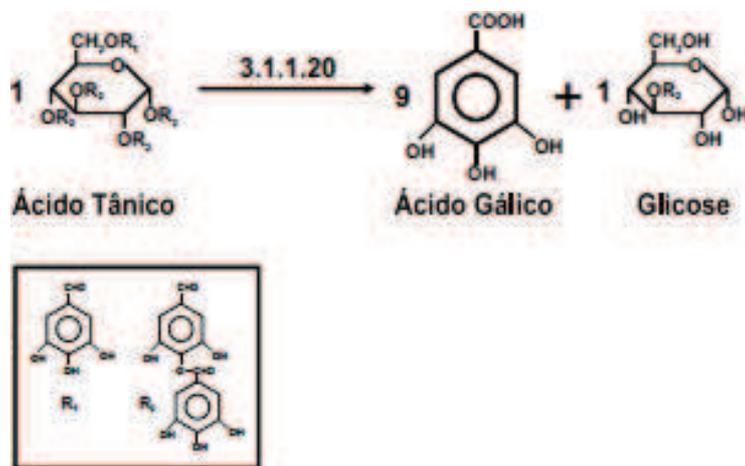


Figura 3 Hidrólise do ácido tânico, R₁ (galoil) e R₂ (digaloil)

Fonte: BATTESTIN; MATSUDA; MACEDO (2004).

O ácido gálico e seus derivados são ácidos fenólicos que apresentam uma grande variedade de ações biológicas. O ácido gálico tem apresentado atividade antiviral frente ao vírus calicivírus felino (FCV) (CUETO et al., 2011) e é um potente agente no combate das EROs como superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, 2012; PEYRAT-MAILLARD et al., 2000). Em estudos epidemiológicos indica-se que esses compostos fenólicos encontrados na dieta reduzem muito os riscos a patologias como a aterosclerose, doenças neurodegenerativas, tumores entre outras (CARVALHO; LOCATELLI, 2009).

Hsu e Yen (2007), ao avaliarem o efeito do uso oral do ácido gálico em ratos com obesidade induzida, observaram a diminuição do peso e da esteatose hepática, melhora nos parâmetros séricos (colesterol total, LDL-c, insulina e leptina) e diminuição do estresse oxidativo. De maneira semelhante, Li et al. (2005) mostraram que o tratamento com ácido gálico resultou em redução do nível da peroxidação lipídica em ratos idosos.

Deste modo, a tanase tem tido várias aplicações importantes em alimentos, rações, indústrias químicas e farmacêuticas (RENOVATO et al., 2010).

2.4.3 Selênio

Em 1973 foi descoberto que o selênio (Se) é um componente da GPx. Descobertas subsequentes revelaram outras selenoproteínas (três iodotironina 59-desiodases (tipos I, II e III), duas tioredoxina redutases e quatro outras selenoproteínas distribuídas no plasma, músculo, fígado e próstata (ZICKER; WEDEKIND; JEWELL, 2006), todas envolvidas direta ou indiretamente no metabolismo das EROs.

Outra função importante do Se, como antioxidante dietético, deve-se à estreita interrelação com a vitamina E que é um poderoso antioxidante capaz de prevenir a oxidação das gorduras e conseqüente formação de peróxidos (TUCKER, 2003). Por sua vez, o Se destrói os peróxidos que conseguem formar-se, apesar da ação dos antioxidantes e da vitamina E, deste modo, o selênio poupa a vitamina E e reduz as suas necessidades para um animal (CASE et al., 2011; NACIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006).

Os alimentos completos e industrializados para gatos utilizam fontes ricas em Se (grãos de cereais, carne e peixes), sendo, portanto, um elemento abundante no alimento pronto e distúrbios relacionados à deficiência não é um problema comum em cães e gatos (CASE et al., 2011).

Quanto à fonte a ser utilizada na suplementação, a fonte orgânica de selênio demonstrou uma maior taxa de retenção no organismo de gatos em relação à fonte inorgânica e sua absorção, também, ocorre de forma mais rápida (SILVA JUNIOR; SAAD; LIMA, 2008).

A atividade da GPx tem sido correlacionada com o *status* de selênio no organismo (NACIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006). Gatos filhotes que ingeriram uma dieta com baixo teor de Se (0,02 mg/kg) apresentaram redução da GPx quando comparados aos que ingeriram um teor médio (0,40 mg/kg) (YU et al., 2002).

2.4.4 Ácido ascórbico

Vitamina C é um termo genérico para descrever, qualitativamente, compostos com atividade biológica do ácido ascórbico, descoberto como essencial ao metabolismo, após desvendamento da origem da doença escorbuto, em humanos (COMBS; VITAMIN, 2008). Enquanto algumas espécies não sintetizam a vitamina C, cães e gatos são capazes de sintetizá-la em quantidades suficientes para a manutenção do metabolismo normal (NACIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006). As deficiências de vitamina C nessas espécies podem ocorrer como resultado do metabolismo inadequado da glicose e o aumento nas necessidades podem ocorrer em alguns estágios fisiológicos do animal, mas também por em algumas condições como temperaturas elevadas e altas umidades, doenças e estresse. E uma vez que a vitamina C pode melhorar a estabilidade de outros nutrientes e, também, proteger contra danos oxidativos, ela vem sendo suplementada para cães e gatos (NACIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006).

A vitamina C é tida como doadora de elétrons, portanto, um agente redutor, impedindo que outros compostos sejam oxidados, muito embora ela própria seja oxidada no processo (Figura 4). Dentre os vários tipos de espécies reativas que recebem elétrons e são reduzidos pela vitamina C, destaca-se o mecanismo de recuperação do α -tocoferol, em que o radical tocoferoxil pode ser

reduzido pelo ascorbato retomando sua forma original, o α -tocoferol (PADAYATTY et al., 2003).

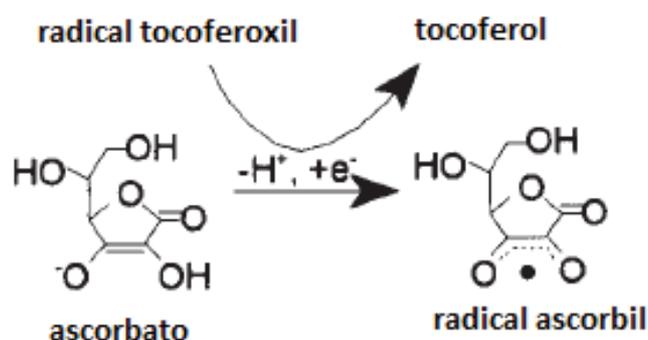


Figura 4 Oxidação do ascorbato por meio da redução do radical tocoferoxil (reciclagem do tocoferol)

A função antioxidante do ácido ascórbico se deve ao fato dele remover os radicais livres que estão envolvidos no dano oxidativo, tais como radicais superóxido e hidropéroxido, oxigênio molecular excitado, ozônio, peroxinitrito, radical nítróxido e ácido hipercloroso (CHAO et al., 2002; NACIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006). Combs e Vitamin (2008) reforçam que o ácido ascórbico é o mais efetivo antioxidante no plasma, líquido intersticial e fases hidrosolúveis das células, ao citarem suas atuações como agente na prevenção de peroxidação lipídica (associação com a vitamina E), na prevenção da oxidação de proteínas, na prevenção da oxidação do DNA e na prevenção da oxidação do óxido nítrico (NO).

Diferentemente da vitamina E, a vitamina C tem sido menos estudada em cães e gatos (ZICKER; WEKIND; JEWELL, 2006) e nos poucos trabalhos existentes os resultados se apresentam contraditórios. Apenas a vitamina C não

foi o suficiente para alterar o TBARS em cães atletas (MARSHALL et al., 2002). A suplementação de vitamina C não induziu uma mudança clara no *status* antioxidante medido (vitamina E, A, estearato de retinol e palmitato, TBARS e ácido úrico) e parâmetros imunológicos em cães adultos saudáveis em repouso (HESTA et al., 2009). Entretanto, em ratos, a adição de 1500 mg de vitamina C/kg de alimento (com base na matéria seca) mostrou-se efetiva por diminuir a fragilidade dos eritrócitos, quando a vitamina E está perto do requerimento mínimo na dieta (CHEN, 1981), em função do efeito reciclador que a vitamina C promove na vitamina E.

O efeito da vitamina C pode ocorrer quando combinada com outros antioxidantes. A suplementação dietética de vitamina E, vitamina C e β -caroteno reduziu o estresse oxidativo em gatos com insuficiência renal (YU; PAETAU-ROBINSON, 2006).

2.5 Avaliações de antioxidantes dietéticos

Os dados de referência de parâmetros de estresse oxidativo publicados em cães e gatos são limitados e contraditórios (FREEMAN; BROWN; RUSHL, 1999). Isto porque os estudos de suplementos antioxidantes são de difícil interpretação, uma vez que os efeitos biológicos de antioxidantes podem ser resultado de múltiplas vias divergentes ou convergentes, tão grande é a complexidade metabólica. Além disso, os efeitos de radicais livres demoram a serem notados, visto que a maioria dos experimentos é de curta duração, fato que se torna um desafio.

Os efeitos da suplementação de antioxidantes podem ser avaliados de três maneiras, de acordo com Fang, Yang e Wu (2002): 1) determinação de níveis endógenos de antioxidantes; 2) mensuração de produtos de macromoléculas oxidadas; 3) detecção direta dos radicais livres. Dentre os

meios de avaliação, a detecção direta das EROs é a mais complicada, uma vez que os radicais livres possuem curto tempo de meia-vida. 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. Desse modo, se estes marcadores aumentarem no sangue ou tecido, presume-se que existem mais radicais livres sendo produzidos, e, portanto, mais danos. Caso o contrário aconteça, acredita-se que a produção de radicais livres foi diminuída (FREEMAN; BROWN; RUSHI, 1999).

Estes marcadores são específicos para biomoléculas diferentes, tais como o DNA (8-oxo-2'-deoxiguanosina), lipídeos (dialdeído malônico [MDA] ou, também, denominado de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico [TBARS]), prostaglandinas (isoprostanos), proteína (por exemplo, nitrotirosina e carbonilos de proteína) e produtos da glicação avançada (AGE) (FREEMAN; BROWN; RUSHI, 1999). Uma vez que em animais de companhia, muitas vezes, há a restrição de técnicas invasivas em decorrência da ética experimental, fato que limita avaliações em tecidos alvos, as determinações indiretas, citadas anteriormente, são as mais utilizadas. A lipoperoxidação de membranas e estresse oxidativo são habitualmente monitorados pelo método TBARS e ou por avaliação das atividades enzimáticas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Estas medidas podem ser realizadas em sangue e outros fluidos.

2.5.1 Avaliação parâmetros sanguíneos

As avaliações dos componentes do sangue auxiliam na determinação da influência de condições fisiopatológicas que possam afetar a homeostase, colaborando, assim, para compreensão da relação entre as características sanguíneas e a saúde dos gatos.

No diagnóstico de possíveis distúrbios metabólicos, é importante avaliar o perfil bioquímico sérico, pois ele indica anormalidades nas concentrações substâncias indicadoras de mau funcionamento hepático, renal, digestivo, assim como no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (MEYER; COLES; RICH, 1995), os quais podem sofrer interferências conforme a intensidade do estresse.

Os antioxidantes evitam que ocorra a peroxidação lipídica (LI et al., 2005) e têm demonstrado efeito modulador dos parâmetros séricos, principalmente, relacionados ao metabolismo lipídico (AVIRAM et al., 2000; HSU; YEN, 2007).

2.5.2 Mensuração da fragilidade osmótica eritrocitária

Os eritrócitos são altamente predispostos ao estresse oxidativo, porque neles há altas tensões de oxigênio, alto teor de ácidos graxos poliinsaturados em suas membranas e, ainda, apresentam uma quantidade elevada de ferro ligado à hemoglobina (KOLANJIAPPAN; MANOHARAN; KAYALVIZHI, 2002).

O acúmulo de produto de MDA que ocorre em situações de estresse pode atrapalhar a organização da fosfatidilserina e da fosfatidiletanolamina na membrana bilateral dos eritrócitos (JAIN, 1984). Deste modo, o estresse oxidativo diminui a fluidez celular e provoca aumento na fragilidade osmótica eritrocitária (FOE) (HEBBEL, 1986).

A variação da resistência dos eritrócitos pode ser medida pelo teste de FOE, por meio da avaliação da hemólise, quando essas células são expostas à ação de soluções salinas hipotônicas (JAIN, 1973). Para melhor avaliação da FOE, os resultados podem ser representados em gráficos, nos quais a porcentagem de hemólise distribui-se no eixo das ordenadas, e as concentrações das soluções hipotônicas de NaCl no eixo das abscissas, resultando numa curva

sigmoide que representa a distribuição da frequência acumulativa da FOE, numa população de células normais (SANT'ANA et al., 2001).

A comparação dos resultados pode, também, ser feita pelos valores numéricos, representando a concentração da solução salina em que houve a hemólise mínima (5%), hemólise máxima (95%) ou a FOE média, momento em que ocorre hemólise de 50% dessas células (SANT'ANA et al., 2001).

Porém em felinos, a FOE é uma técnica pouco empregada, com poucas referências quanto aos seus valores em condições normais e nas diferentes afecções. Nessa espécie, a mesma pode estar aumentada em situações de estresse oxidativo como nas anemias hemolíticas e doenças de modo geral (JAIN, 1973).

Quanto aos antioxidantes, a suplementação de vitamina E induziu a mudanças na peroxidação lipídica e, conseqüentemente, reduziu a FOE de ratos induzidos ao estresse oxidativo (AMBALI et al., 2010).

2.5.3 Gasometria

A gasometria sanguínea consiste na medição do pH e dos gases dissolvidos que contribuem para o equilíbrio ácido-básico consistindo num exame que determina o estado metabólico assim como a eficiência das trocas gasosas cardiopulmonares (DETHIOUX; GOY-THOLLOT, 2007). Há a formação de grandes quantidades de CO₂, resultantes do metabolismo para obtenção de energia das gorduras, carboidratos e proteínas, que é transformado e um ácido fraco, o ácido carbônico (H₂CO₃), que é revertido nos pulmões em CO₂ que é eliminado rapidamente (MEYER; COLES; RICH, 1995).

O pH normal do sangue venoso em gatos se mantém entre 7,28-7,41 (DIBARTOLA, 2006) e sua regulação é feita por diversos sistemas de tampão. Dentre os tampões, o tampão bicarbonato/ácido carbônico é o mais importante pela rapidez com que o CO₂ pode ser eliminado pelos pulmões após a conversão

do H_2CO_3 (MEYER; COLES; RICH, 1995). Deste modo, o pH sanguíneo anormal surge, quando a proporção de HCO_3^- (metabólico)/ pCO_2 (respiratório) afasta-se de 20:1 (baseado na equação de Henderson-Hasselbalch) (MEYER; COLES; RICH, 1995).

A taxa de eliminação do CO_2 depende do ritmo e profundidade da respiração (MEYER; COLES; RICH, 1995). Em situações de estresse e ansiedade pode ocorrer hiperventilação pulmonar, ou seja, a expiração do dióxido de carbono pode exceder a sua taxa de produção o que caracteriza por baixa de pCO_2 e, conseqüentemente, alcalose respiratória (DIBARTOLA, 2006).

O controle pulmonar do pH sanguíneo, como já mencionado, pode ocorrer rapidamente (horas) às alterações pela expiração do CO_2 , ao passo que os rins levam de 12 a 24 horas para responder e dias para completar a compensação metabólica (MEYER; COLES; RICH, 1995). O excesso de base é uma mensuração utilizada para investigar alterações metabólicas, uma vez que quando positivo (HCO_3^- aumentado) indica uma alcalose metabólica. Um excesso de base negativo (HCO_3^- diminuído) indica uma deficiência de base (acidose metabólica). Por outro lado, um aumento na pCO_2 que, na verdade causa um aumento na concentração de H_2CO_3 , é conhecido com acidose respiratória e uma diminuição é chamada de alcalose respiratória (MEYER; COLES; RICH, 1995).

Desde que o organismo esteja bem provido com sistemas tampão, a compensação (uma tentativa em corrigir o desequilíbrio ácido-básico) é vista clinicamente. Deste modo, é incomum uma acidose/alcalose metabólica/respiratória pura (MEYER; COLES; RICH, 1995).

As respostas ao estresse estão intimamente envolvidas com o balanço ácido básico e, de acordo com Sivakumar, Singh e Varshney (2010) a suplementação com antioxidantes (vitamina C, vitamina E e selênio) contribui

para o restabelecimento do equilíbrio. Porém, não foram encontradas pesquisas em gatos.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a pesquisa realizada, observou-se que os antioxidantes dietéticos assumem fundamental importância na manutenção da saúde, no entanto, há poucos trabalhos científicos em gatos publicados até o momento. Deste modo, objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos da suplementação dietética com níveis crescentes de um antioxidante comercial (AOX) à base de algas marinhas, selênio, vitamina C e produto de fermentação de *Aspergillus niger* para gatos submetidos a um agente estressor.

REFERÊNCIAS

- AMBALI, S. F. et al. Vitamin E protects rats from chlorpyrifos-induced increased erythrocyte osmotic fragility in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, New York, v. 48, n. 12, p. 3477–3480, Dec. 2010.
- ASHFORD, A. et al. Electron microscopy may reveal structure of docosahexaenoic acid-rich oil within *Schizochytrium sp.* **Lipids**, Berlin, v. 35, n. 12, p. 1377-1387, Dec. 2000.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. **Manual do programa integrado de qualidade pet**. São Paulo: ABINPET, 2012.
- AVIRAM, M. et al. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. **American Society for Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 71, n. 5, p. 1062–1076, May 2000.
- BASKIN, C. R. et al. Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage and resistance to oxidative damage during prolonged exercise in sled dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 61, n. 8, p. 886-891, Aug. 2000.
- BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.
- BEAVER, B. V. Feline social behavior. In: _____. **Feline behavior: a guide for veterinarians**. 2. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2003, p. 247-273.
- BERDA, B. et al. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, Philadelphia, v. 52, n. 3-4, p. 307-319, Apr. 1997.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago. 1999.
- BURTON, G. W. Vitamin E: Antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v.10, p. 357-382, July 1990.

CARCIOFI, A. C. Fontes de proteína e carboidratos para cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, nesp., p. 28-41, jul. 2008.

CARLSTEAD, K.; BROWN, J. L.; STRAWN, W. Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. **Applied Animal Behaviour Science**, Philadelphia, v. 38, n. 2, p. 143-158, Nov. 1993.

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

CARVALHO, D. R.; LOCATELLI, C. Avaliação da atividade antitumoral in vitro e antimetastática in vivo do tetradecil galato. **Ágora**, Mafra, v. 16, n. 2, p. 424-432, June 2009.

CASE, L. P. et al. **Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professionals**. 3. ed. Saint Louis: Mosby Elsevier, 2011.

CAVE, N. J. Nutrition and immunity. In: PIBOT, P.; BOURGE, V.; ELLIOTT, D. (Ed.). **Encyclopedia of feline clinical nutrition**. Paris: Aniwa SAS on behalf of Royal Canin, 2008. p. 480-509.

CHAO, J. C. et al. Effects of B-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 13, n. 7, p. 427-434, July 2002.

CHEN, L. H. An increase in vitamin E requirements induced by high supplementation of vitamin C in rats. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 34, n. 6, p. 1036-1041, June 1981.

CIVEN, M. et al. Effects of dietary ascorbic acid and vitamin E deficiency on rat adrenal cholesterol ester metabolism and corticosteroidogenesis. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v. 50, n. 1, p. 70-78, 1980.

COMBS, G. F. J.; VITAMIN, C. In: _____. **The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 235-263.

CUETO, A. P. et al. Atividade antiviral de própolis contra o calicivirus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1800-1806, out. 2011.

DETHIOUX, F.; GOY-THOLLOT, I. Desequilíbrios eletrolíticos e ácido-básicos. In: _____. **Guia prático de medicina de emergências no cão e no gato**. Aimargues: Royal Canin France, 2007. p. 118-138.

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, July 2010.

DIBARTOLA, S. P. Introduction to acid-base disorders. In: _____. **Fluid, electrolyte and acid-base disorders in small animal practice**. 3. ed. Missouri: Elsevier, 2006.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, Burbank, v. 18, n. 10, p. 872-879, Oct. 2002.

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, jan./mar. 1997.

FICHTALI, J.; SENANAYAKE, N. Development and commercialization of microalgae-based functional lipids. In: SMITH, J.; CHARTER, E. (Ed.). **Food product development**. Oxford: Blackwell Publishing, 2010. p. 206-224.

FREEMAN, L. M.; BROWN, D. J.; RUSHI, J. E. Assessment of degree of oxidative stress and antioxidant concentrations in dogs with idiopathic dilated cardiomyopathy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 215, n. 5, p. 644-646, Sept. 1999.

HAKIM, A. R. The potential of heterotrophic microalgae (*Schizochytrium sp.*) as a source of DHA. **Squalen**, Jakarta Pusat, v. 7, n. 1, p. 29-38, May 2012.

HAMMOND, B. G. et al. Safety assessment of DHA-rich microalgae from *Schizochytrium sp.* **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 33, n. 3, p. 352-362, June 2001.

HEBBEL, R. P. Erythrocytes antioxidants and membrane vulnerability. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 107, n. 5, p. 401-404, May 1986.

HESTA, M. et al. The effect of vitamin C supplementation in healthy dogs on antioxidative capacity and immune parameters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 93, n. 1, p. 26-34, Feb. 2009.

HOLDT, S. V.; KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. **Journal of Applied Psychology**, Washington, v. 23, n. 3, p. 543-597, June 2010.

HSU, C. L.; YEN, G. C. Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. **Journal of Nutrition**, Springfield, v. 98, n. 4, p. 727-735, May 2007.

JAIN, N. C. Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 63, n. 3, p. 411-423, June 1973.

JAIN, S. K. The accumulation of malonyldialdehyde, a product of fatty acid peroxidation, can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 259, n. 6, p. 3391-3394, Mar. 1984.

JEWELL, D. E. et al. Effect of increasing dietary antioxidants on concentrations of vitamin E and total alkenals in serum of dogs and cats. **Veterinary Therapeutics**, Yardley, v. 1, n. 4, p. 264-272, 2000.

JOHNSTON, S. D.; MATHER, E. C. Feline plasma cortisol (hydrocortisone) measured by radioimmunoassay. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 40, n. 2, p. 190-192, Feb. 1979.

KARGIN, F.; FIDANCI, U. R. Kidney diseases and antioxidative metabolism in dogs. **Turkish Journal Veterinary and Animal Sciences**, Türkiye, v. 25, n. 4, p. 607-613, 2001.

KOLANJIAPPAN, K.; MANOHARAN, S.; KAYALVIZHI, M. Measurement of erythrocyte lipids, lipid peroxidation, antioxidants and osmotic fragility in cervical cancer patients. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 326, n. 1-2, p. 143-149, Dec. 2002.

KOVAČ, D. et al. Algae in food and feed. **Food and Feed Research**, Novi Sad, v. 40, n. 1, p. 21-31, June 2013.

KOWALSKI, S. C. **Análise da viabilidade técnica econômica do cultivo de microalgas para produção de biodiesel estudo de caso Paranaguá**. 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

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**, Goiás, v. 5, n. 4, p. 211-214, out./dez. 2004.

LI, H. B. et al. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. **Food Chemistry**, Whiteknights, v. 102, n. 3, p.771-776, 2007.

LI, H. B. et al. Preparative isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 905, n. 1-2, p. 151–155, Jan. 2001.

LI, L. et al. Antioxidant activity of gallic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 230-240, May 2005.

LOHREY, C. **Biodiesel production from microalgae**: co-location with sugar mills. 2012. 80 p. Thesis (Master of Science in Biological and Agricultural Engineering) - Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, Louisiana, 2012.

LOPACZYSKI, W.; ZEISEL, S. H. Antioxidants, programmed cell death and cancer. **Nutrition Research**, New York, v. 21, n. 1-2, p. 295-307, Jan./Feb. 2001.

MARSHALL, R. J. et al. Supplemental vitamin C appears to slow racing greyhounds. **Journal of Nutrition**, Springfield, v. 132, n. 6, p. 1616-1621, June 2002.

MATÉS, J. M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO, I. N. de. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 32, n. 8, p. 593–603, Nov. 1999.

MCANULTY, S. et al. Carbohydrate effect: hormone and oxidative changes. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, v. 28, n. 11, p. 921- 927, May 2007.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinário**: interpretação e diagnóstico. São Paulo: Roca, 1995.

NACIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington: National Academies Press, 2006.

PADAYATTY, S. J. et al. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 22, n. 1, p. 18-35, Feb. 2003.

PEYRAT-MAILLARD, M. N. et al. Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by colorimetric detection. **Talanta**, Amsterdam, v. 51, n. 4, p. 709-716, Apr. 2000.

RENOVATO, J. et al. Differential properties of aspergillus niger tannase produced under solid-state and submerged fermentations. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 165, n. 1, p. 382-395, Sept. 2010.

ROCHA, M. A. Biotecnologia na nutrição de cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, nesp., p. 42-48, jul. 2008.

ROMERO, M. L.; BUTLER, L. K. Endocrinology of stress. **Journal of Comparative Psychology**, New York, v. 20, n. 2, p. 89-95, 2007.

ROVER JUNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 112-119, jan./fev. 2001.

SANT'ANNA, V. A. C. et al. Fragilidade osmótica dos eritrócitos de bovinos das raças holandesa, girolando e gir, criados no estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 609-614, jul./ago. 2001.

SENANAYAKE, S. P. J. N.; FICHTALI, J. Single-cell oils as sources of nutraceutical and specialty lipids: processing technologies and applications. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Nutraceutical and specialty lipids and their co-products**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. p. 251-281.

SILVA JUNIOR, J. W.; SAAD, F. M. O. B.; LIMA, L. M. S. Fontes suplementares de selênio para gatos adultos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Ondina, v. 9, n. 3, p. 460-468, jul./set. 2008.

SIVAKUMAR, A. V. N.; SING, G.; VARSHNEY, V. P. Antioxidants supplementation on acid base balance during heat stress in goats. **Asian-Australasian Association of Animal Societies**, Seoul, v. 23, n. 11, p. 1462-1468, Nov. 2010.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, Washington, v. 273, n. 5271, p. 59-63, July 1996.

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

SUZUKI, S.; KANEKO, M.; CHAPMAN, D. C. Alterations in cardiac contractile proteins due to oxygen free radicals. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1074, n. 1, p. 95-100, May 1991.

TUCKER, L. The importance of antioxidant protection: demonstrating and branding benefits in pet food. In: INTERNATIONAL FEED INDUSTRY SYMPOSIUM, 20., 2003, Nottingham. **Proceeding...** Nottingham University Press, 2003. p. 509-516.

VALDÍVIA, A. et al. Superoxide dismutase: a physicalpharmacological update. **Journal of Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 195-208, July 2009.

VALKO, M. et al. Free radical, metal and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemical Biological Interactions**, Limerick, v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar. 2006.

WANG, S. L. et al. Effect of anti-hotstressors on serum biochemical indexes and immunity of finishing pigs. **Chinese Journal of Animal Science**, Pequim, v. 39, n. 1, p. 11-12, 2003.

YU, S. et al. A low selenium diet increases thyroxine and decreases 3.5.3'triiodothyronine in the plasma of kittens. **Journal Animal Physiology Animal Nutrition**, Berlin, v. 86, n. 1-2, p. 36-41, Feb. 2002.

YU, S.; PAETAU-ROBINSON, I. Dietary supplements of vitamins E and C and β -carotene reduce oxidative stress in cats with renal insufficiency. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 30, n. 4, p. 403-414, May 2006.

ZICKER, S. C.; WEDEKIND, K. J.; JEWELL, D. E. Antioxidants in veterinary nutrition. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 36, n. 6, p. 1183-1198, Nov. 2006.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 **Suplementação com antioxidante comercial (EconomasE[®])
em alimento para gatos adultos sob estresse e seus efeitos
sobre o *status* oxidativo**

Artigo formatado segundo as normas do *Journal of Animal Physiology and
Animal Nutrition*

Resumo

Os radicais livres (EROs) são produzidos continuamente durante a vida, porém em situações estressantes sua produção aumenta drasticamente. Objetivou-se avaliar o efeito de um composto comercial AOX (EconomasE, Alltech), à base de algas e outros antioxidantes não enzimáticos, em dietas para gatos induzidos ao estresse. Foram utilizados 24 gatos adultos, pesando $3,72 \pm 0,74$ kg, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com quatro níveis de AOX (0, 250, 500, 750 mg/kg de alimento na matéria seca) e seis repetições durante 80 dias. Coletou-se sangue dos gatos no dia 0 e a cada 20 dias para avaliação do *status* antioxidante. No 61º dia, os gatos foram induzidos a um estresse pela presença de cães próximos ao recinto experimental (agente estressor; AE) que permaneceram até o final das avaliações. Observou-se uma interação entre os fatores nível e tempo ($P < 0,05$) para o variável cortisol, dialdeído malônico (MDA) e atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Após ação do AE, os animais que receberam 750 mg de AOX/kg foram os únicos que não aumentaram os níveis de cortisol. Para o MDA e atividade de SOD, os valores não aumentaram para os gatos que ingeriram 500 e 750 mg de AOX/kg, visto que nesses mesmos níveis houve diminuição da atividade da CAT. A atividade da glutathiona peroxidase apresentou efeito para o fator tempo ($P < 0,05$), não diferindo conforme os níveis de AOX. No ultimo dia experimental, observou-se efeito linear ($P < 0,05$) crescente do HDL-c, conforme os níveis ingeridos. Conclui-se que o AOX apresenta efeito anti-estressor com alterações benéficas no *status* oxidativo e aumento do HDL-c em gatos, sendo recomendado o nível de 750 mg/kg de dieta. Este é o primeiro estudo avaliando AOX em gatos e os resultados aqui encontrados poderão servir de referências para estudos futuros.

Palavras-chave: cortisol, enzimas antioxidantes, felinos, peroxidação.

Introdução

Ao exercerem suas funções normais, as células aeróbicas geram radicais livres que são denominados como espécies reativas de oxigênio (EROs). Para se proteger, o organismo sadio possui sistemas enzimáticos ou não enzimáticos, endógenos ou exógenos, que contribuem para a homeostase.

Entretanto, qualquer fenômeno que promova desequilíbrio entre produção e remoção das EROs resulta em prejuízos às células (Lopaczyski and Zeisel, 2001). Nessa situação, também conhecida como estresse oxidativo, há ocorrência de danos irreversíveis que incluem a peroxidação lipídica das membranas e destruição de organelas e de ácidos nucleicos (Baskin et al., 2000). Por isso, as EROs vêm sendo associadas ao surgimento ou agravamento de doenças renais (Kargin and Fidanci, 2001), cardíacas (Suzuki et al., 1991), tumores (Lopaczyski and Zeisel, 2001) e diversas doenças degenerativas (Zicker et al., 2006).

O estresse em gatos pode ser induzido por manuseio indesejado, mudanças no ambiente, endo e ectoparasitismos, convivência com outros animais, contenção física e exposição contínua a sons de alta frequência (Beaver, 2003; Griffin and Humme, 2006). Deste modo, a elevação dos níveis de glicocorticoides no plasma que ocorrem em situações de estresse fisiológico tem sido associada com o aumento do estresse oxidativo (Diaz et al., 2010).

Por outro lado, o uso de nutrientes funcionais conhecidos como nutracêuticos têm sido extensamente estudados em humanos e *pets* com o propósito de garantir maior longevidade e qualidade de vida. Dentre eles, destacam-se os antioxidantes, que são substâncias capazes de agir de maneira direta na desativação das EROs ou indireta por participar de sistemas antioxidantes enzimáticos (Zicker et al., 2006).

As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) são consideradas a primeira linha de defesa antioxidante por

catalisarem reações de EROs (Zicker et al., 2006). Já os antioxidantes não enzimáticos mais estudados na nutrição são os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, oligoelementos (cobre, zinco, selênio e manganês), carotenoides e, ainda, ácidos graxos poliinsaturados (Fang et al., 2002). A utilização de antioxidantes combinados é mais efetiva do que quando isolados (Wedekind et al., 2002; Zicker et al., 2006), principalmente, em virtude da ação sinérgica que alguns podem apresentar. Nesse sentido, há sugestão de que a suplementação de um composto comercial, à base de farinha de algas (rica em compostos fenólicos e ácido docosaheptaenoico), selênio orgânico e outros antioxidantes não enzimáticos (AOX), apresenta funções fisiológicas redundantes à vitamina E e, também, proporciona aumento da capacidade antioxidante total quando suplementado em frangos de corte (Pierce et al., 2009; Xião et al., 2011). Porém, não há relatos da efetividade do composto em animais em que se busca a longevidade, como os *pets*.

O estudo e possível descoberta de níveis ótimos de antioxidantes usados na nutrição poderão contribuir para que as indústrias *petfood* obtenham maior segurança na utilização desses produtos, já que há escassez de trabalhos sobre o tema. Além do mais, uma vez que a nutrição *pet* apresenta os mesmos princípios da nutrição humana, é possível que, no futuro, os resultados possam ser base inicial para avaliação de produtos semelhantes, também, em humanos.

Sendo assim, buscou-se, com esse trabalho, verificar se a suplementação dietética com um produto comercial - AOX afeta os índices de *status* oxidativo e parâmetros bioquímicos de gatos adultos induzidos ao estresse fisiológico.

Material e métodos

Todos os procedimentos experimentais estiveram de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de

Animais da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil (Comissões/ Permanentes/PRP-UFLA- Protocolo nº 036/11).

O ensaio foi conduzido no Centro Experimental de Animais de Companhia (CENAC) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras. A temperatura média no período experimental foi de $20,50 \pm 2,48$ °C e umidade relativa de $75,60 \pm 8,64$ % (Fonte: Estação Climatológica Principal de Lavras – Convênio UFLA/INMET).

Animais utilizados e dietas experimentais

Foram utilizados 24 gatos, com idade de 3,5 anos, sem raça definida, machos e fêmeas, peso médio de $3,49 \pm 0,87$ kg, alojados, individualmente, em gaiolas metabólicas suspensas com dimensões de 0,8 x 0,8 x 1 m (altura x profundidade x largura). Os animais foram pesados e avaliados quanto à saúde geral antes do início do estudo e nos dias anteriores a cada coleta de sangue. Todos os animais receberam o mesmo alimento, completo e de boa qualidade, antes do período experimental.

Durante todo o período experimental, que correspondeu a 80 dias, os animais receberam água *ad libitum* e um alimento seco em quantidade suficiente para a manutenção de gatos adultos, calculado segundo a equação de predição das necessidades energéticas diárias do NRC (2006): $100 \text{ kcal} \times (\text{PC em kg})^{0,67}$. A dieta padrão utilizada foi um alimento comercial para gatos adultos presente no mercado brasileiro (Tabela 1).

O AOX consistiu num antioxidante comercial (Economase®, Alltech, Araucária, Brasil) que continha em sua composição farinha de algas marinhas (*Schizochytrium sp.*), levedura enriquecida com selênio (1500 mg de selênio/kg de produto), ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*. Esse composto foi fornecido nas seguintes proporções: 0, 250, 500 e 750 mg/kg da dieta padrão na matéria seca (MS). Para cada nível foram utilizados seis

gatos (repetições). Sequencialmente à ingestão completa e voluntária da dieta padrão, os animais receberam 2 mL de leite contendo AOX; exceto os que pertenciam ao nível 0 mg/kg de MS que receberam apenas o leite. A ingestão do leite foi feita de maneira rápida, voluntária e completa pelos gatos.

Tabela 1 Composição nutricional da dieta padrão*

Níveis Nutricionais	Ração seca (MN%)†	Ração seca (MS%)†
Umidade	5,39	-
Proteína Bruta	26,91	28,44
Extrato Etéreo	11,06	11,69
Matéria Fibrosa	2,83	2,99
Matéria Mineral	9,48	11,69
Extrato Não Nitrogenado	44,32	46,85
Energia metabolizável (kcal/kg) ‡	3329	3519

*Composição básica: Farinha de carne e ossos, farinha de vísceras, hidrolisado de frango, gordura animal estabilizada, farelo de trigo, milho integral moído, espinafre em pó (min. 0,5%-equivalente a 5% espinafre fresco), sementes de linhaça, cloreto de sódio (sal comum), taurina, ácido fosfórico (min. 0,04%), antioxidantes, corantes e premix vitamínico mineral. Eventuais substitutivos: farelo de arroz desengordurado, glúten de milho 60, arroz quebrado e farelo de soja.

†Análise realizada no Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

‡Calculada com base nos níveis nutricionais por meio da equação proposta pelo NRC (2006)

Estresse oxidativo

Foi avaliado considerando a mensuração da atividade enzimática da SOD (E.C. 1.15.1.1), GPx (E.C. 1.11.1.9), CAT (E.C. 1.11.1.6) e a quantificação de dialdeído malônico (MDA) e cortisol no sangue. Os gatos foram submetidos a cinco coletas de sangue da veia jugular correspondendo aos dias 0, 20, 40, 60 e 80 do experimento. Todas as coletas foram realizadas às 8 horas da manhã com

os animais em jejum. Com o objetivo de promover um desafio para melhor avaliar o AOX, o ambiente foi modificado, a partir do 61º dia de consumo das dietas, quando foram incluídos seis cães da raça labrador (agente estressor; AE) os quais eram desconhecidos dos gatos do experimento e foram alocados num ambiente próximo à sala de experimentação onde permaneceram até o término do experimento. As amostras sanguíneas dos gatos foram acondicionadas em tubos a vácuo, contendo heparina como anticoagulante e ficaram preservadas imersas no gelo até serem processadas em centrífuga a 1000 x g por 10 minutos a uma temperatura de 4°C (Laborzentrifugen, modelo 2K-15, Sigma, Osterode Am Harz, Alemanha). O plasma foi removido e, então, dividido em microtubos *eppendorfs* e congelado à temperatura de -80°C até a realização das análises, que ocorreu antes que se atingisse 30 dias corridos após a coleta.

As atividades da SOD, GPx e CAT foram mensuradas, utilizando-se os *kits* comerciais SOD Assay Kit, Glutathione peroxidase e Catalase (todos da empresa Cayman Chemical Company, Ann Arbor, EUA). Os protocolos adotados seguiram as recomendações do fabricante.

Para determinação do cortisol, foi utilizado o *kit* comercial de ensaio (Cortisol Enzyme Immunoassay DetectX, Arbor Assays, Ann Arbor, EUA), seguindo a metodologia descrita no mesmo e realizada a leitura a uma absorvância de 450 nm.

A peroxidação lipídica plasmática foi determinada pela quantificação de MDA, por meio do método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), utilizando *kit* comercial (Quanti Chrom™ TBARS, BioAssay Systems, Hayward, EUA). O protocolo adotado seguiu as recomendações do fabricante, que se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico-dialdeído malônico, sob altas temperaturas e baixo pH tornar-se colorimetricamente mensurável por espectrofotometria, no comprimento de onda de 530 nm.

Todas as análises foram realizadas em duplicatas. As leituras foram feitas por leitor automático de microplacas (Multiskan GO, Thermo Scientific Inc., Bremen, Alemanha).

Bioquímica sérica

Foram realizadas coletas de sangue em jejum (12 horas) no dia 0 e no 80º dia em todos os animais. Alíquotas de 4 mL desse material foram armazenadas em tubos sem anticoagulantes, acondicionadas em gelo e enviadas a laboratório especializado para realização das análises. Todas as análises a seguir foram procedidas por meio de *kits* da empresa Labtest Diagnóstica SA (Lagoa Santa, Brasil). A glicose foi mensurada pelo método da glicose oxidase (Ref.85), o colesterol pelo método enzimático colorimétrico (Trinder) da colesterol esterase/colesterol oxidase (Ref.76), a HDL-c pelo método colorimétrico com base no sobrenadante, obtido após centrifugação do sistema enzimático Colesterol Liquiform Labtest (metodologia Labtest) (Ref.76), a LDL-c e VLDL-c por meio de cálculos, em função do triglicérides (Ref.87), colesterol total e HDL-c, as proteínas totais pelo método do biureto (Ref.99), a albumina pelo método do verde de bromocresol (Ref.19), as globulinas por cálculo (albumina subtraída das proteínas totais), a ureia pelo método da diacetilmonoxima (Ref.104), a creatinina pela reação do picrato alcalino (Ref.127), a transaminase pirúvica (TGP) pelo método de Reitman e Frankel (Ref.108) e a gama-glutamil transferase pelo método colorimétrico enzimático (Ref.105).

Análises estatísticas

As variáveis do estresse oxidativo, quando necessário, foram transformadas (raiz quadrada) para atender a normalidade. Após a confirmação de distribuição normal, os dados foram submetidos à análise de variância, considerando um delineamento inteiramente casualizado em parcelas subdivididas no tempo. Para

as médias dentro de cada tempo foram ajustadas equações de regressão e as médias dentro de cada nível foram comparadas pelo teste de SNK a 5% de probabilidade do erro. Para os parâmetros sanguíneos e urinários, os dados foram submetidos à análise de covariância, sendo as medidas no T0 as covariáveis e, em seguida, à análise de regressão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System Institute (SAS, 2004).

Resultados

Estresse oxidativo

Houve interação ($P < 0,05$) entre os fatores nível e tempo para as variáveis cortisol, MDA, SOD e CAT (Tabela 2).

A concentração média de cortisol foi de $2,37 \pm 1,56$ $\mu\text{g/dL}$ de plasma. Constatou-se que em todos os níveis de AOX o cortisol se manteve nos animais até o T60, porém, após ação do AE, a partir do 61º dia, somente os animais que receberam o nível 750 mg AOX/kg de MS não apresentaram aumento. O T80 foi o único que apresentou efeito nos níveis ($P < 0,05$) (Figura 1), uma vez que houve redução linear da concentração plasmática de cortisol até o nível 750 mg AOX/kg de MS.

Já o MDA nos animais que ingeriram somente a dieta padrão, reduziu até o T60 e aumento no T80. Os animais que receberam 250 mg de AOX/kg de MS mantiveram a peroxidação lipídica até o T40, seguida de uma redução no T60 e aumento no T80. Entretanto, os que receberam o tratamento com 500 mg AOX/kg de MS tiveram redução no MDA no T20 que se manteve mesmo após o AE. Já os que receberam o nível 750 mg AOX/kg de MS não apresentaram alterações ($P > 0,05$) no MDA em nenhum dos tempos. Para o fator tempo, foi encontrado que o T60 e T80 diferiram dos demais (Figura 2), com os menores

valores de MDA encontrados nos animais dos níveis 200 e 475 mg AOX/kg de MS, respectivamente.

Para a atividade da SOD, observou-se que os animais de todos os níveis começaram com baixa atividade da enzima, com um aumento no T20, seguida de uma redução no T40 que se manteve até o T60. Entretanto, no T80 os níveis 0 e 250 mg aumentaram enquanto os que estavam nos níveis 500 e 750 mg AOX/kg de MS mantiveram constante a atividade enzimática. Foi encontrada diferença ($P<0,05$) entre os níveis de AOX apenas dentro do T80 e em animais que receberam os maiores níveis ocorreu uma redução na atividade da enzima até o nível de 750 mg AOX/kg de MS.

A atividade da CAT, para os animais que estavam nos níveis 0 e 250 mg AOX/kg de MS aumentou no T20 e depois reduziu no T40 mantendo-se constante até o T80. Já para os que estavam no nível de 500 mg, houve redução no T60 que se manteve até o T80 e os que estavam no nível de 750 mg AOX/kg de MS apresentaram redução apenas no T80. Para o fator tempo, assim como ocorreu para a SOD, foram encontradas diferenças ($P<0,05$) para a atividade da CAT apenas dentro do T80, com redução na atividade da enzima nos animais que receberam os maiores níveis .

Ocorreu um efeito para a GPx ($P<0,05$) somente referente ao tempo. Desta maneira, em todos os níveis de AOX, as atividades da GPx foram iguais até o final do estudo.

Tabela 2 Resultados de variáveis referente ao estresse oxidativo no plasma de gatos durante o período de suplementação com AOX(mg/kg dieta na MS)

Variável	AOX (mg)	Tempo (dias)						N	T	NxT	CV
		0	20	40	60	80	80				
Cortisol (µg/dL)	0	2,05 a	2,30 a	2,71 a	1,49 a	4,85 b†	0,05	<0,01	0,04	22,54	
	250	2,07 a	1,66 a	1,97 a	1,91 a	5,81 b					
	500	1,74 a	2,99 ab	1,42 a	1,53 a	3,39 b					
	750	1,92	1,86	1,61	1,79	2,41					
Dialdeído malônico (µM)	0	0,82 dc	0,67 bc	0,55 ba	0,42 a‡	1,04 d‡	0,02	<0,01	<0,01	13,48	
	250	0,80 b	0,66 b	0,61 b	0,27 a	0,63 b					
	500	0,84 b	0,67 ab	0,62 ab	0,50 a	0,66 ab					
	750	0,81	0,85	0,81	0,59	0,73					
SOD (U/mL)	0	0,89 a	2,87 c	1,67 b	1,67 b	3,16 c†	0,15	<0,01	<0,01	12,59	
	250	0,64 a	2,68 c	1,51 b	1,88 b	2,43 c					
	500	0,87 a	2,31 c	1,59 b	1,71 bc	1,89 bc					
	750	0,71 a	2,50 c	1,71 b	1,56 b	1,47 b					
Catalase (nmol/min/mL)	0	49,9 a	82,5 b	47,8 a	44,7 a	58,7 a†	0,02	<0,01	0,03	14,3	
	250	58,3 ab	66,4 b	40,4 a	40,1 a	52,4 ab					
	500	49,7 bc	57,8 c	39,3 abc	37,3 ab	26,9 a					
	750	48,0 b	50,7 b	36,0 b	36,9 b	22,1 a					
Glutaciona peroxidase (nmol/min/mL)	0	2687 a	2945 b	3369 bc	3810 dc	4299 d	0,12	<0,01	0,72	15,46	
	250	1268 a	2429 b	2987 bc	3348 dc	3772 d					
	500	2786 a	3448 b	3847 bc	3760 dc	4023 d					
	750	2298 a	3197 b	3359 bc	3586 dc	4217 d					

*Valores em uma mesma linha seguidos por letras minúsculas idênticas não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste de SNK; † Regressão linear na coluna (P<0,05); ‡ Regressão quadrática na coluna (P<0,05)

N: nível; T: tempo; NxT: interação entre nível e tempo; CV: coeficiente de variação; SOD: superóxido dismutase

AOX: farinha de algas marinhas, selênio levedura, ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*.

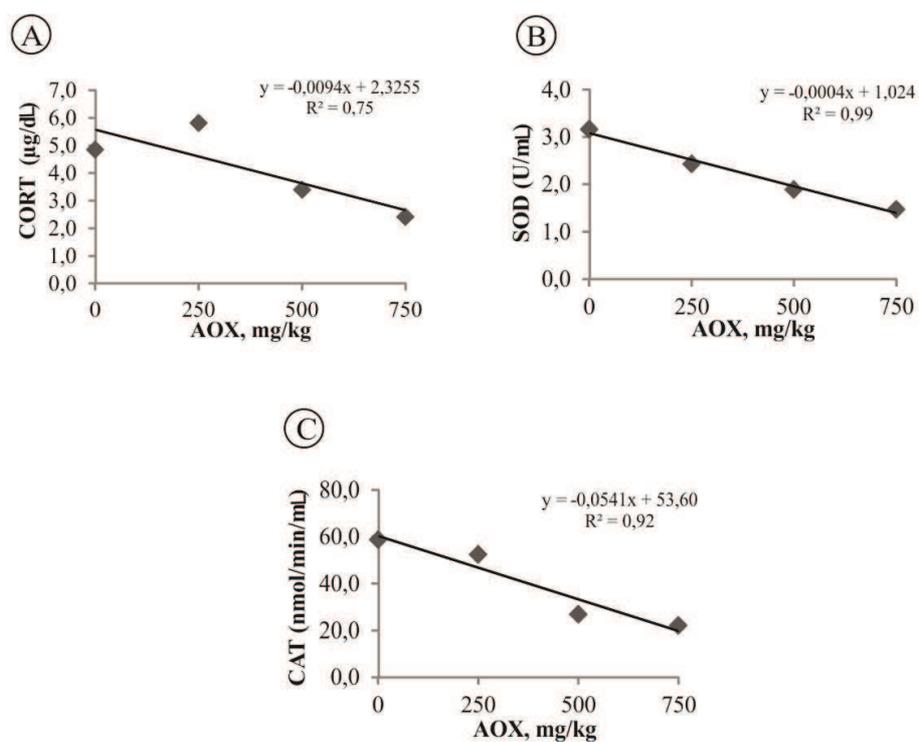


Figura 1 Alterações nas concentrações de cortisol (A), superóxido dismutase total (B) e catalase (C) no plasma de gatos dentro do tempo 80 dias de suplementação com AOX (farinha de algas marinhas, selênio levedura, ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*)/ kg de matéria seca da dieta.

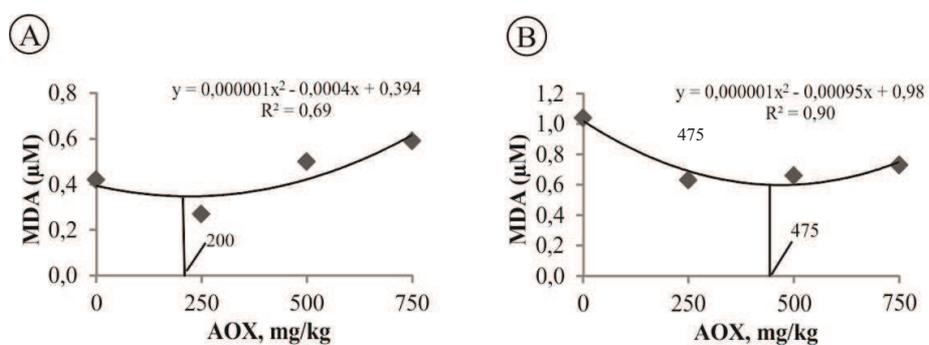


Figura 2 Alterações nas concentrações de TBARS (Dialdeído malônico-MDA) no plasma de gatos dentro do tempo 60 dias de experimentação (A) e 80 dias de experimentação (B) de suplementação com AOX (farinha de algas marinhas, selênio levedura, ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*) / kg de MS na dieta.

Bioquímica sérica

O resultado foi significativo ($P < 0,05$) apenas para as variáveis HDL-c e colesterol total, que apresentaram aumento proporcional ao aumento do nível de suplementação de AOX/kg MS (Tabela 4 e Figura 3). As demais variáveis não apresentaram diferenças ($P > 0,05$).

Tabela 4 Valores médios dos parâmetros de bioquímica sérica de gatos adultos aos 80 dias após suplementação com antioxidante AOX

Variável	AOX, mg/kg MS					CV (%)	P*
	0	250	500	750	500		
Glicemia (mg/dL)	75,17	86,00	70,00	71,17	70,00	11,14	0,06
Uréia (mg/dL)	39,67	46,33	45,50	46,83	45,50	19,68	0,48
Creatinina	1,25	1,47	1,36	1,26	1,36	10,78	0,06
CT (mg/dL)	78,83	100,40	122,00	119,75	122,00	4,93	0,04
TG1 (mg/dL)	32,83	43,67	39,00	27,50	39,00	9,72	0,12
HDL-c (mg/dL)	64,67	87,83	91,00	92,17	91,00	4,77	0,03
LDL-c (mg/dL)	14,17	22,67	22,17	20,50	22,17	13,91	0,28
VLDL-c (mg/dL)	6,57	8,73	7,80	5,50	7,80	17,93	0,12
Proteínas totais (g/dL)	7,60	7,78	7,75	7,43	7,75	5,02	0,39
Albumina (g/dL)	2,57	2,68	2,62	2,52	2,62	6,12	0,34
GGT (U/L)	2,17	1,53	1,52	1,23	1,52	50,02	0,26

* Regressão linear (P<0,05)

CT: Colesterol Total; TG1: Triglicerídeos; HDL-c: High Density Lipoproteins; LDL-c: Low Density Lipoproteins; VLDL-c: Low Density Lipoproteins + Very Low Density Lipoproteins; GGT: Gama-glutamil transferase;

AOX : farinha de algas marinhas, selênio levedura, ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*.

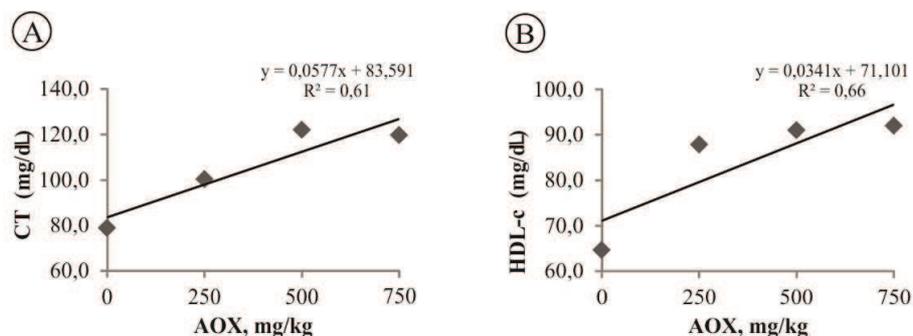


Figura 3 Alterações nas concentrações de colesterol total (A) e HDL-c (B) no plasma de gatos dentro do tempo 80 dias de suplementação com AOX (farinha de algas marinhas, selênio levedura, ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*) mg/kg de matéria seca da dieta.

Discussão

Este experimento foi o primeiro avaliando o AOX para gatos induzidos ao estresse fisiológico. O cortisol é o principal glicocorticoide em gatos (Johnston and Mather, 1979). Sua mensuração tem sido eficiente para avaliar o estresse fisiológico em animais, uma vez que apresenta correlação positiva com o estresse agudo ou crônico (Berda et al., 1997; Mori et al., 2001). A média geral de cortisol no experimento apresentou-se de acordo com Johnston and Mather (1979) que encontraram, na maioria dos gatos estudados, menos de 4 μg /dL de plasma. Gatos são animais muito susceptíveis ao estresse e a contenção física, mudanças no ambiente, introdução de novos animais e exposição contínua a sons de alta frequência constituem os mais potentes AE para eles (Beaver, 2003; Griffin and Humme, 2006). É provável que, por serem animais adaptados às condições experimentais, o cortisol permaneceu constante nos animais utilizados até antes da ação do AE para todos os níveis estudados. Após a ação do AE (T80), com exceção do nível de 750 mg AOX/kg de MS, todos os demais níveis

aumentaram o conteúdo de cortisol. Entretanto, quando avaliado dentro do T80 (Figura 2) observou-se uma efetividade de ambos os níveis 500 e 750 mg AOX/kg de MS na redução do conteúdo plasmático de cortisol.

Assim como observado no presente trabalho, foi encontrado em ratos (Civen et al., 1980), suínos (Wang et al., 2003) e cabras (Sivakumar et al., 2010), submetidos ao estresse fisiológico, um efeito de supressão nos níveis de cortisol quando suplementados com antioxidantes como a vitamina C, vitamina E e selênio, ou a combinação deles. O mesmo efeito foi observado com a suplementação com carotenoides realizado por Oliveira (2009) em tilápias. Este fato mostra a relevância da suplementação com antioxidantes diversos em animais submetidos a qualquer tipo de estresse. O mecanismo de ação dos agentes antioxidantes sobre o cortisol é desconhecido, mas acredita-se que seja por meio da redução da síntese e/ou secreção (Sivakumar et al., 2010), por possível ação, principalmente, da vitamina C, na glândula adrenal ou no eixo hipotalâmico-hipófise (Davison et al., 2007).

Quando há estresse oxidativo, a peroxidação de lipídeos resulta em alguns metabólitos secundários dentre os quais se destaca o MDA (Halliwell e Whiteman, 2004). A média de MDA encontrada no experimento foi próxima aos valores de $0,74 \pm 0,28 \mu\text{M}$, observado em cães saudáveis, praticando baixa atividade física (Harper, 1999). Após a ação do AE, os gatos que receberam os níveis 0 e 250 mg de AOX apresentaram aumento na peroxidação lipídica, no entanto os que ingeriram os níveis de 500 e 750 mg não apresentaram mudanças na peroxidação lipídica. Este fato reforça a efetividade da suplementação do AOX. Além das enzimas antioxidantes (SOD, GPx e CAT), as células possuem outros mecanismos de defesa antioxidantes. O sistema de defesa não-enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais co-fatores das enzimas antioxidantes e compostos fenólicos (Tucker, 2003). O AOX apresenta em sua composição básica selênio

orgânico, farinha de alga (*Schizochytrium sp.*), ácido ascórbico e produto de *Aspergillus niger*. A alga *Schizochytrium sp.* é rica em carotenoides, pigmentos, extratos antioxidantes e DHA. O produto de fermentação de *Aspergillus niger*, por sua vez, corresponde à produção industrial do ácido gálico, o qual é um potente antioxidante. Portanto, pressupõe-se que, no presente trabalho, o AOX quando incluído nas maiores doses, atuou fortalecendo a defesa não enzimática do sistema antioxidante que combateram os radicais livres produzidos após a ação do AE. Esses resultados discordam do achado por Marshall et al. (2002) onde apenas a suplementação com vitamina C não foi o suficiente para alterar o MDA em cães atletas. Entretanto, assim como no presente trabalho, a suplementação com antioxidantes em ratos (Chidambara Murthy et al., 2002) e peixes (Oliveira, 2009), submetidos ao estresse, promoveu a contenção da elevação da peroxidação lipídica.

A enzima SOD catalisa a transformação de dois ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 e O_2 e tem se demonstrado ser a primeira linha de defesa enzimática contra EROs (Michiels et al. 1994). Essa enzima possui três isoformas presentes no organismo animal que se diferem quanto ao local predominante de ocorrência e quanto ao mineral co-fator (Valdivea et al., 2009). No presente estudo, foram encontrados valores de atividade dessa enzima, com base em uma análise de SOD total no plasma de gatos. A média geral encontrada no presente trabalho foi semelhante ao valor de $3,48 \pm 1,36$ U/mL em humanos adultos saudáveis (Dave and Parakar, 2009). A atividade de SOD no plasma foi maior nos T20 e T80 e nos níveis 0 e 250 mg AOX/kg de MS e estes dados corroboram com Dave and Parakar (2009), que obtiveram maior atividade da enzima como uma resposta secundária à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Nesse sentido, todos os níveis (linhas) podem ter tido atividade elevada no T20, uma vez que os animais ainda estavam se adaptando às dietas e condições experimentais, uma vez que antes do início do experimento, todos os animais recebiam como um

alimento de qualidade superior ao alimento padrão utilizado no período experimental. Já no T80 o aumento pode ser em resposta à ação do AE (Tabela 2).

Em condições experimentais, a mensuração da SOD de várias espécies mostraram que a mesma está presente no plasma em níveis baixos, porém é altamente induzível sob estresse oxidativo (Maral et al., 1977). O AOX contém em sua composição o ácido ascórbico, um potente antioxidante que combate o ânion superóxido (Chao et al., 2002; NRC, 2006) além dos outros compostos oxidantes. Portanto, é provável que, no experimento, a suplementação de AOX nos níveis de 500 e 750 mg/kg MS proporcionaram maior combate aos radicais livres e dessa maneira, a atividade da enzima reduziu conforme a redução do substrato. Reforçando o achado, Xião et al. (2011) encontraram aumento da capacidade antioxidante total de frangos quando suplementados com o AOX.

O H_2O_2 , obtido após a ação da SOD, não é um radical livre, porém, necessita ser removido do organismo e, portanto, devem existir reações adicionais que são realizadas pela ação da GPx e CAT, uma vez que ambas o convertem em H_2O (Tucker, 2003). Embora desempenhem o mesmo papel, a CAT se difere da GPx no local de atuação, já que a primeira se localiza nos peroxissomos das células enquanto a outra em todos os compartimentos celulares (Michiels et al., 1994). A atividade média foi próxima ao valor de 38 nmol/min/mL para mulheres, encontrado por Castanho et al. (2012). Esses autores, também, correlacionaram o aumento da atividade da CAT em resposta ao aumento de reações oxidantes. A GPx apresenta uma eficácia maior na remoção do H_2O_2 , porém, quando há ocorrência do estresse oxidativo, a CAT, por ser mais adaptável, desempenha um papel significativo na defesa nas células contra danos oxidativos (Matés et al., 1999). A suplementação com antioxidante para peixes com estresse por contenção impediu o aumento da atividade da CAT no músculo (Oliveira, 2009) sendo este que foi considerado um efeito positivo.

Ainda, de acordo com Vázquez et al. (2006), uma dieta equilibrada que forneça antioxidantes de várias naturezas, pode aumentar a capacidade antioxidante do organismo e reduzir a atividade da CAT. Portanto, o efeito do AOX sobre a redução da CAT foi coerente ao encontrado para SOD, realçando um poder antioxidante do produto.

A GPx é uma selenoproteína que catalisa reações de redução de hidroperóxidos, lipídicos e não lipídicos assim como o H_2O_2 , enquanto oxida duas moléculas de glutathiona (GSH) (Michiels et al., 1994). O fato da GPx não ter tido sua atividade modificada mesmo após a ação do AE pode ser justificada por esta enzima ser menos adaptável ao estresse que a SOD e a CAT, mesmo sendo mais abundante (Maral et al., 1977; Mates et al., 1999). Por ser uma enzima que tem o selênio como cofator, a atividade da GPx tem sido associada à maior ingestão e ao nível desse elemento no sangue (NRC, 2006) e, dessa maneira, a suplementação de níveis crescentes de AOX, que contém quantidade considerável de Se orgânico, poderia ter interferido na atividade dessa enzima, o que não foi verificado. Esses resultados do presente trabalho estão de acordo com Silva Junior et al. (2008) que não acharam boa correlação entre ingestão do elemento e níveis plasmáticos de GPx com a ingestão suplementar de Se orgânico. Os autores justificaram a ausência de resultados por não terem utilizado uma dieta padrão com um nível do elemento abaixo do recomendado para gatos. Nesse sentido, os resultados do presente trabalho, também, propõem que o alimento comercial utilizado atendeu os requerimentos mínimos de selênio, o que impediu uma melhor visualização do efeito do AOX sobre a atividade de GPx.

A avaliação do perfil bioquímico sérico informa se há anormalidades nas concentrações de substâncias indicadoras de mau funcionamento hepático, renal, assim como metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (Meyer et al., 1995). Os valores médios de todas as variáveis do perfil bioquímico estiveram

dentro dos valores de referência da espécie (Meyer et al., 1995), demonstrando que o estresse sofrido pelos gatos não foi suficiente para afetar a bioquímica sérica dos animais ao longo dos 80 dias. No entanto, observou-se aumento do colesterol total e do HDL-c. O HDL-c realiza o transporte de colesterol no sentido inverso da LDL-c, ou seja, dos tecidos periféricos e dos vasos para o fígado, onde é metabolizado. Por isso, é considerado desejável, fisiologicamente, em relação ao LDL-c. Além do mais, o HDL-c apresenta-se mais resistente à peroxidação quando há agentes oxidantes do que o LDL-c (Parthasarathy et al., 1990). No experimento, os índices de HDL-c acompanharam os valores de colesterol total, ocorrendo um incremento até a dose de 750 mg/kg. Esse fato pode ter ocorrido pela menor peroxidação do HDL-c promovida pelo AOX, tornando-se benéfico fisiologicamente aos animais. Ao contrário do achado, Hesta et al. (2008) não encontraram diferenças nos parâmetros bioquímicos de cães saudáveis suplementados apenas com vitamina C.

Pelo presente estudo demonstrou-se que a combinação de antioxidantes atua, positivamente, sobre o *status* oxidativo em indivíduos, que como os humanos, sofrem por estresse e danos oxidativos por vários anos de vida. Quanto ao melhor nível, ainda que após o AE para o MDA o melhor nível foi próximo aos 500 mg de AOX/ kg de dieta, para as demais variáveis com efeito significativo os melhores efeitos foram no nível de 750 mg/kg de dieta. Por se tratar de um experimento pioneiro em AOX, recomendam-se mais estudos para se entender melhor os efeitos do AOX sobre o MDA.

Baseando-se nos dados obtidos, sugere-se que o AOX pode amenizar os danos provocados pelo estresse oxidativo com alterações benéficas no status oxidativo e aumentando o HDL-c, quando incluído em longo prazo nas dietas de gatos induzidos ao estresse, sendo indicado, nas condições estudadas, o nível de 750 mg/kg de ração na matéria seca.

Referências

- Baskin, C. R.; Hinchcliff, K.W.; DiSilvestro, R. A.; Reinhart, G. A.; Hayek, M. G.; Chew, B. P.; Burr, J. R.; Swenson, R. A. 2000: Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage and resistance to oxidative damage during prolonged exercise in sled dogs. *American Journal Veterinary Research*, **61**, 886-891.
- Beaver, B.V. 2003: Feline social behavior. In: Beaver B.V. (ed.), *Feline behavior: a guide for veterinarians*, 2nd edn. Saunders, Philadelphia, USA. 247-273.
- Berda, B.; Schilder, M. B. H; van Hoff, J. A. R. A. M; Vries, H. W. 1997: Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, **52**, 307-319.
- Castanho, V. S.; Nakamura, R. T.; Pinto-Neto, A. M.; Faria, E. C. 2012: Tratamento pós-menopausa reduz a atividade da catalase e atenua o risco cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, **99**, 1008-1014.
- Chao, J. C.; Huang, C. H.; Wu, S. J.; Yang, S. C.; Chang, N. C.; Shieh, M. J.; Lo, P. N. 2002: Effects of B-carotene, vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **13**, 427-434.
- Chidambara Murthy, K. N.; Jayaprakasha, G. K.; Singh, R. P. 2002: Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using in vivo models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4791-4795.
- Civen, M.; Leeb, J. E.; Wishnow, R. M.; Morin, R. J. 1980: Effects of dietary ascorbic acid and vitamin E deficiency on rat adrenal cholesterol ester metabolism and corticosteroidogenesis. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **50**, 70-78.
- Dave, B. N.; Paradkar, N. M. 2009: Total Superoxide Dismutase, Cu/Zn Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase in untreated hyperthyroidism and hypothyroidism. *JK Sciences*, **11**, 6-10.
- Davison, G.; Gleeson, M.; Phillips, S. 2007: Antioxidant supplementation and immunoendocrine responses to prolonged exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **39**, 645-652.

Diaz, E.; Ruiz, F.; Hoyos, I.; Zubero, J.; Leyre, G.; Javier, G.; Irazusta, J.; Gil, S. M. 2010: Cell damage, antioxidante status, and cortisol levels related to nutrition in ski mountaineering during a two-day race. *Journal of Sports Science and Medicine*, **9**, 338-346, 2010.

Fang, Y. Z.; Yang, S.; Wu, G. 2002: Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrion*, **18**, 872-879.

Griffin, B.; Hume, K. R. 2006: Recognitions and management of stress in housed cats. In: AUGUST, J. (ed), *Consultation in Feline Internal Medicine*, 5th edn, Saunders, St. Louis, USA, 717-734.

Halliwell, B.; Whiteman, M. 2004: Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal Pharmacology*, **142**, 231-255.

Harper, J. 1999: Dietary antioxidants in cat and dog nutrition. *Waltham Focus*, **9**, 32p.

Hesta, M.; Ottermans, C.; Krammer-Lukas, S.; Zentek, J.; Hellweq, P.; Buyse, J.; Janssens, G. P. 2009: The effect of vitamin C supplementation in healthy dogs on antioxidative capacity and imune parameters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **93**, 26-34.

Johnston, S.D.; Mather, E.C. 1979: Feline plasma cortisol (hydrocortisone) measured by radioimmunoassay. *American Journal Veterinary Research*, **40**, 190-192.

Kargin, F.; Fidanci, U.R. 2001: Kidney diseases and antioxidative metabolism in dogs. *Turkish Journal of Veterinary e Animal Sciences*, **25**, 607-613.

Lopaczyski, W.; Zeisel, S .H. 2001: Antioxidants, programmed cell death and cancer. *Nutrition Research*, **21**, 295-307.

Maral, J.; Puget, K.; Michelson, M. 1977: Comparative study of superoxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **77**, 1977.

Marshall, R. J.; Scott, K. C.; Hill, R. C.; Lewis, D. D.; Sundstrom, D.; Jones, G. L.; Harper, J. 2002: Supplemental vitamin C appears to slow racing greyhounds. *Journal of Nutrition*, **132**, 1616S-1621S.

- Matés, J. M.; Pérez-Gómez, C.; Núñez de Castro, I. 1999: Antioxidant enzymes and human disease. *Clinical Biochemistry*, **32**, n.8, 593–603.
- Meyer, D. J.; Coles, E. H.; Rich, L. J. 1995: Medicina de laboratório veterinário: interpretação e diagnóstico. Roca, São Paulo, Brasil
- Michiels, C.; Raes, M.; Toussaint, O.; Remacle, 1994: Importance of Se-Glutathione Peroxidase, Catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, **17**, 235-248.
- Mori, Y.; Ma, J.; Tanaka, S.; Kojima, K.; Mizobe, K.; Kubo, C.; Tashiro, N. 2001: Hypothalamically induced emotional behavior and immunological changes in the cat. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, **55**, 325-332.
- National Research Council (NRC). 2006: Nutrient Requirements of Dogs and Cats. National Academy of Science, Washington, USA.
- Oliveira, P. J. M. G. 2009: Licopeno no bem-estar de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*): Efeito sobre desempenho e parâmetros bioquímicos. Tese Doutorado, Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil. 103f.
- Parthasarathy, S.; Barnett, J.; Fong, L. G. 1990: High-density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1044**, 275-283.
- Pierce, J. L., AO, T.; Power, R. F.; Dawson, K. A.; Pescatore, A. J.; Cantor, A. H., Ford, M. J. 2009: Investigation of replacing vitamin E with EconomasE® in broiler diet. *Poultry Science*, **88**, Suppl. 1, 97 p.
- SAS Institute. 2004: **User's guide**. Stat. version 9.00. 4th.ed.
- Silva Junior, J.W.; Saad, F. M. O. B.; Lima, L. M. S. 2008: Fontes suplementares de selênio para gatos adultos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, **9**, 460-468.
- Sivakumar, A. V. N.; Sing, G.; Varshney, V. P. 2010: Antioxidants supplementation on acid base balance during heat stress in goats. *Asian-Australasian Association of Animal Societies*, **23**, 1462-1468.
- Suzuki, S.; Kaneko, M.; Chapman, D. C. 1991: Alterations in cardiac contractile proteins due to oxygen free radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1074**, 95–100.

Tucker, L. 2003: The importance of antioxidant protection: demonstrating and branding benefits in pet food. In: LYONS, T.P.; JAQUES, K.A. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, Proceeding of Alltech's 20th International Feed Industry Symposium. *Anais*, 509-516.

Valdivea, A.; Pérez-Álvares, S.; Aroca-Aguilar, J. D.; Ikuta, I; Jordán, J. 2009: Superoxide dismutase: a physicalpharmacological update. *Journal of Physiology and Biochemistry*, **65**, 195-208.

Vázquez, R. M.; El-Bachá, S. R.; Ordas, C. A.; Ribeiro, B. E.; Vicente, V. J. G.; Rodrigues, L. E. A. 2006: Dieta afro-bahiana, estrés oxidativo y ejercicio físico. *Revista de Nutrição*, **19**, 673-683.

Wang, S. L.; Lin, Y. C.; Zheng, L.; Jiang, Z. Y.; Jiang, S. Q. 2003: Effect of anti-hotstressors on serum biochemical indexes and immunity of finishing pigs. *Chinese Journal of Animal Science*, **39**, 11-12.

Wedekind, K. J.; Zicker, S.; Lowry, S.; Paetau-Robinson. 2002: Antioxidant status of adult beagles is affected by dietary antioxidant intake. *Journal of Nutrition*, **132**, 1658S-1660S.

Xião, R.; Power, R. F.; Mallone, D.; Crowdus, C.; Brennan, K. M.; Ao, T.; Pierce, J. L.; Dawson, K. A. 2011: A comparative transcriptomic study of vitamin E and an algae-based antioxidant as antioxidative agents: Investigation of replacing vitamin E with the algae-based antioxidant in broiler diets. *Poultry Science*, **90**, 136-146.

Zicker, S. C.; Wedekind, K. J.; Jewell, D. E. 2006: Antioxidants in veterinary nutrition. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, **36**, 1183-1198.

(VERSÃO PRELIMINAR)

ARTIGO 2 **Uso de antioxidante comercial (Economase[®]) em alimento para gatos sob estresse: efeitos nos parâmetros do equilíbrio ácido-básico, urinários e fragilidade de eritrócitos**

Resumo

O estresse pode ocasionar importantes alterações fisiológicas. Não é conhecido o efeito que a suplementação de antioxidantes pode ter sobre o reestabelecimento do equilíbrio ácido-básico, parâmetros hematológicos e fragilidade osmótica de eritrócitos (FOE) de gatos após o estresse. Deste modo objetivou-se avaliar o efeito da suplementação de um composto antioxidante comercial à base de algas, selênio e outros antioxidantes não enzimáticos (AOX) sobre esses parâmetros de gatos induzidos ao estresse. Foram utilizados 24 gatos adultos, pesando $3,72 \pm 0,74$ kg, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com quatro níveis (0, 250, 500, 750 mg de AOX/kg de alimento na matéria seca) e seis repetições durante 83 dias. Coletou-se sangue dos gatos em jejum no dia 0 e a 80 para avaliação. No 61º dia, os gatos foram induzidos ao estresse através da presença de cães próximo ao recinto experimental (agente estressor; AE) que permaneceram até o final das avaliações. Houve aumento linear crescente da pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$) e bicarbonato (HCO_3^-) ($P < 0,05$) conforme o aumento da ingestão de AOX. Houve diferenças para o dióxido de carbono total ($t\text{CO}_2$) com os maiores valores para os níveis de 500 e 750 mg AOX/kg de dieta. As variáveis hematológicas tiveram diferenças ($P < 0,05$) nas concentrações de hemoglobina que se apresentaram maiores nos níveis de 250 e 500 mg AOX/kg de dieta. Não foram observadas diferenças nos parâmetros urinários e nem para a FOE. Conclui-se que a suplementação com AOX apresenta efeitos benéficos apenas nos parâmetros relacionados ao equilíbrio ácido-básico e concentração de hemoglobina de gatos induzidos ao estresse.

Palavras-chave: farinha de algas, selênio, vitamina C, felinos.

Introdução

As concentrações de H^+ no organismo é um dos fatores mais dinamicamente regulados no sangue, uma vez que as estruturas proteicas, assim como as enzimas, são dependentes do pH (DIBARTOLA, 2006; WOJTAS et al., 2013). O pH sanguíneo depende diretamente da concentração de ácido carbônico e bicarbonato no sangue (COPPOCK et al., 1982), assim como de uma série de compostos produzidos diariamente após oxidação completa de carboidratos, proteínas e ácidos graxos (DIBARTOLA, 2006).

Deste modo, o equilíbrio ácido-básico é um processo fisiológico complexo regulado tanto por tampões intracelulares e extracelulares quanto pelos sistemas urinário e respiratório (MEYER; COLES, RICH, 1995). Por essa complexidade, o equilíbrio ácido-básico é passível de ser influenciado por uma série de fatores internos e externos, incluindo fatores inerentes ao metabolismo, à dieta e às condições ambientais (OLANREWAJU et al., 2010), muito embora o organismo sadio consiga compensar essas alterações.

A exposição dos animais a situações de estresse ativa o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e, conseqüentemente, aumenta a concentração sanguínea de hormônios do estresse (SIVAKUMAR et al., 2010). Quando isso acontece, distúrbios respiratórios e metabólicos podem ocorrer, e tem sido relatado em animais de diversas espécies que as respostas ao estresse estão envolvidas com o balanço ácido básico (AGUILERA-TEJERO et al., 2000; PARKER et al., 2003; WOJTAS et al., 2013), bem como com o aumento da demanda de oxigênio (O_2) (GARCIA et al., 2012).

Os gatos são animais altamente susceptíveis ao estresse fisiológico (BEAVER, 2003; GRIFFIN; HUMME, 2006). Sendo assim, muitas vezes é necessário lançar mão de estratégias para conter os efeitos colaterais resultantes do estresse fisiológico e, portanto, a suplementação com antioxidantes pode ser interessante. Os antioxidantes atuam no combate de EROs produzidas

excessivamente durante a situação de estresse fisiológico e estabiliza o *status* saudável do animal (ZICKER; WEDEKIND; JEWELL, 2006). De acordo com SIVAKUMAR et al. (2010) a suplementação com antioxidantes (vitamina C, vitamina E e selênio) pode resultar em melhora no equilíbrio ácido-básico.

Há relatos que um antioxidante comercial (AOX), composto por um *pool* de ingredientes contendo antioxidantes não enzimáticos, proporciona aprimoramento da capacidade antioxidante quando suplementado em dietas de animais de produção (PIERCE et al., 2009; XIÃO et al., 2011). Entretanto, não existem estudos de seus efeitos sobre o metabolismo de gatos, assim como há escassez na literatura de pesquisas que tenham avaliado as possíveis interferências no *status* ácido-básico após a suplementação com antioxidantes em dietas para gatos.

Sendo assim, visou-se com este trabalho avaliar as possíveis alterações nos parâmetros sanguíneos como hemogasometria, hemograma e fragilidade osmótica de eritrócitos (FOE) de gatos adultos induzidos ao estresse quando suplementados com níveis crescentes de AOX.

Material e Métodos

O ensaio foi conduzido no Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, no Centro Experimental de Animais de Companhia (CENAC). Todos os procedimentos experimentais estiveram de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões/ Permanentes/PRP-UFLA-Protocolo nº 036/11). A temperatura média no período foi de $20,50 \pm 2,48$ °C e umidade relativa de $75,60 \pm 8,64\%$ (Fonte: Estação Climatológica Principal de Lavras – Convênio UFLA/INMET).

Foram utilizados 24 gatos com idade de 3,5 anos, sem raça definida, machos e fêmeas, peso médio de $3,49 \pm 0,87$ kg, alojados individualmente em

gaiolas metabólicas suspensas com dimensões de 0,8 x 0,8 x 1 m (altura x profundidade x largura). Os animais foram pesados e avaliados quanto à saúde geral antes do início do estudo e nos dias anteriores a cada coleta de sangue.

Durante todo o período experimental, que correspondeu a 83 dias, os animais receberam água *ad libitum* e um alimento comercial para gatos adultos (dieta padrão) (tabela 1) em quantidade suficiente para a manutenção de gatos adultos, calculado segundo a equação de predição do NRC (2006): 100 kcal x (PC em kg)^{0,67}.

Tabela 1 Composição nutricional da dieta padrão¹

Níveis Nutricionais	Ração seca (MN%) ²	Ração seca (MS%) ²
Umidade	5,39	-
Proteína Bruta	26,91	28,44
Extrato Etéreo	11,06	11,69
Matéria Fibrosa	2,83	2,99
Matéria Mineral	9,48	11,69
Extrato Não Nitrogenado	44,32	46,85
Energia metabolizável (kcal/kg) ³	3329	3519

¹Composição básica: Farinha de carne e ossos, farinha de vísceras, hidrolisado de frango, gordura animal estabilizada, farelo de trigo, milho integral moído, espinafre em pó (min. 0,5%-equivalente a 5% espinafre fresco), sementes de linhaça, cloreto de sódio (sal comum), taurina, ácido fosfórico (min. 0,04%), antioxidantes, corantes e premix vitamínico mineral. Eventuais substitutivos: farelo de arroz desengordurado, glúten de milho 60, arroz quebrado e farelo de soja

²Análise realizada no Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

³Calculada a partir dos níveis nutricionais por meio da equação proposta pelo NRC (2006)

O AOX (Economase®, Alltech, Araucária, Brasil) contém em sua composição farinha de algas marinhas (*Schizochytrium sp.*), levedura enriquecida com selênio (1500 mg de selênio/kg de produto), ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*.

O aditivo foi fornecido nas seguintes proporções: 0, 250, 500 e 750 mg/kg da dieta padrão na matéria seca (MS). Para cada nível foram utilizados seis gatos (repetições). Sequencialmente à ingestão voluntária e completa da dieta padrão, os animais receberam 2 mL de leite contendo AOX; exceto os que pertenciam ao nível 0mg/kg de MS que receberam apenas o leite.

Para melhor visualizar as possíveis interferências da suplementação do AOX sobre os parâmetros relacionados ao equilíbrio ácido-básico, hemograma, parâmetros urinários e FOE, foi promovido um desafio pela modificação do ambiente experimental. Dessa maneira, a partir do 61º dia de consumo das dietas foram incluídos seis cães da raça labrador, desconhecidos para os gatos do experimento (agente estressor; AE) em um ambiente próximo à sala de experimentação onde permaneceram até o final do experimento.

As avaliações hemogasométricas foram realizadas em amostras de sangue venoso na quantidade 1,0 mL/animal, coletadas na veia jugular no dia 0 e no dia 80º. Em cada dia de observação houve uma coleta dos animais em jejum (às 8:00 horas da manhã) e outra após 6 horas de ingestão das dietas. As amostras foram acondicionadas em tubos a vácuo contendo heparina, refrigerados em temperatura de 4°C e transportados imediatamente ao Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil. As avaliações foram feitas antes de 1 hora após a coleta por meio de um analisador de pH e gases sanguíneos (Modelo AGS22; Drake Ltda; São Jose do Rio Preto, Brasil). As variáveis observadas foram pH, pressão parcial de dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$), concentração de

bicarbonato (HCO_3^-), total de dióxido de carbono (tCO_2) e excesso de bases (EB).

A avaliação do hemograma completo foi realizada a partir de uma coleta de 1,0 mL de sangue dos animais em jejum no dia 0 e outra no 80º dia após a ingestão das dietas. As amostras foram acondicionadas em tubo com anticoagulante EDTA e enviadas a laboratório especializado para realização das análises. Os parâmetros do hemograma foram analisados utilizando os reagentes hematológicos Dialyse - 3CF, Diascatter Pak, Diaton 3 e Diaclenz (Diagon, Belo Horizonte, MG, Brasil).

A densidade e o pH urinário foram avaliados no final do experimento, durante três dias consecutivos após a última coleta de sangue, com os animais ainda consumindo as dietas, seguindo o protocolo proposto por Carciofi (2007). O pH urinário foi mensurado usando um pHmetro digital (Modelo DM22; Digimed, São Paulo, Brasil) e a densidade foi determinada através de um refratômetro portátil (Modelo RTP-20ATC; Instrutherm, São Paulo, Brasil).

Amostras de 1,0 mL de sangue com heparina sódica foram obtidos dos gatos no 80º dia de experimento para avaliação da FOE, determinada de acordo com o método de MAEDE & HATA (1975) adaptado. Deste modo adicionou-se 0,05 mL de sangue a 5,0 mL de solução de NaCl com concentrações de 0,1 a 0,9%. O conteúdo foi homogeneizado por inversão (5 vezes) e deixado à temperatura ambiente por 30 minutos. Os tubos foram então centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos. O conteúdo de hemoglobina sobrenadante foi determinado por espectrofotometria a 540nm (Bel SPECTRO S05, Bel Engineering®, Monza, Itália), sendo que a solução contida no tubo de 0,9% foi considerada como branco, ou acerto do zero. A porcentagem de hemólise foi calculada com a solução de 0,1% NaCl como correspondente à 100% de hemólise e, desta maneira, a porcentagem hemólise nas demais concentrações foi calculada por relação diretamente proporcional entre as grandezas.

Os dados foram submetidos à análise de covariância, sendo as medidas no T0 as covariáveis e, em seguida, à análise de regressão. Entretanto, quando não houve ajuste, ou seja, um R^2 que não correspondeu adequadamente o comportamento dos dados, as médias foram comparadas pelo teste de SNK a 5%. A análise de fragilidade osmótica foi realizada no Probit (SAS, 2004) para calcular a FOE nas concentrações em que ocorreram as diferentes porcentagens de hemólise (5%, 50% e 95%), e foram representadas pelas curvas cumulativas, nesse caso foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Resultados

A ingestão das dietas ao longo do experimento não influenciaram nos valores de pH sanguíneo e excesso de bases (EB) ($P > 0,05$) independente do período de avaliação ser em jejum ou pós prandial. Para o tCO_2 , as maiores concentrações estiveram nos níveis de 500 e 750mg de AOX/kg de dieta ($P < 0,05$) na matéria seca (MS)(tabela 2).

As variáveis pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2) e bicarbonato (HCO_3^-) apresentaram aumento linear nas concentrações ($P < 0,05$) conforme a ingestão de AOX, porém somente do período de jejum (Figura 1).

Tabela 2 Valores médios dos parâmetros de gasometria de gatos adultos aos 80 dias após suplementação com antioxidante AOX

Parâmetro	Níveis de AOX (mg/kg de MS)							
	0	250	500	750	CV	P*	L	Q
pH jejum	7,26	7,23	7,21	7,25	0,57	0,23	-	-
pH pós-prandial	7,13	7,25	7,25	7,30	0,70	0,14	-	-
pCO ₂ (mmHg) jejum	24,81	25,13	29,57	28,15	10,86	0,04	0,01	0,50
pCO ₂ (mmHg) pós-prandial	21,15	22,77	22,85	21,65	10,46	0,52	-	-
HCO ₃ ⁻ (mmol/L) jejum	11,23	10,67	11,83	12,48	9,23	0,04	0,02	0,18
HCO ₃ ⁻ (mmol/L) pós-prandial	10,73	10,25	10,30	10,85	9,03	0,64	-	-
tCO ₂ (mmol/L) jejum	12,00 ^b	11,47 ^b	12,75 ^a	13,35 ^a	16,22	0,04 ¹	NS	NS
tCO ₂ (mmol/L) pós-prandial	11,37	10,98	11,03	11,48	11,21	0,78	-	-
EB (mEq/L) jejum	-13,63	-14,90	-14,60	-12,87	11,80	0,36	-	-
EB (mEq/L) pós-prandial	-12,58	-14,41	-14,47	-12,68	14,06	0,20	-	-

*Regressão polinomial (P<0,05)

pH: potencial de hidrogênio; pCO₂: pressão parcial de dióxido de carbono; HCO₃⁻: bicarbonato; tCO₂: dióxido de carbono total; EB: excesso de bases; CV: coeficiente de variação; L: linear; Q: quadrático

¹ Valores em uma mesma linha, seguidos por letras minúsculas idênticas não diferem entre si ao nível de 5 % pelo teste de SNK

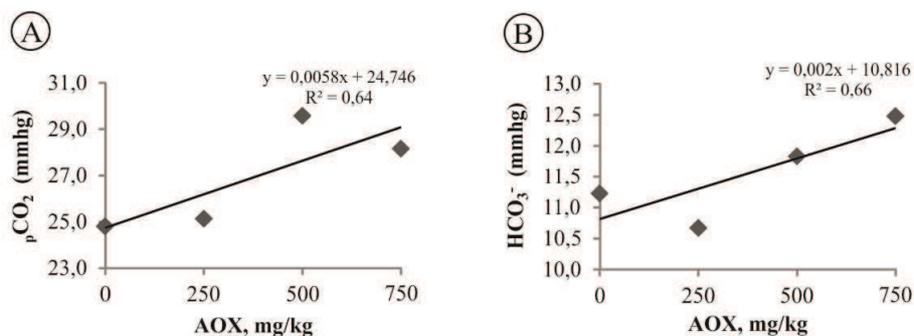


Figura 1 Alterações nas concentrações da pressão parcial de dióxido de carbono (A) e bicarbonato (B) no plasma de gatos dentro do tempo 80 dias de suplementação com AOX (farinha de algas marinhas, selênio levedura, ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*) mg/kg de matéria seca da dieta

Houve diferenças apenas para os níveis de hemoglobina ($P < 0,05$) (tabela 3) conforme a ingestão de AOX, em que os maiores valores estiveram nos animais suplementados com os níveis de 250 e 500 mg de AOX/kg de matéria seca e houve tendência ($P = 0,05$) para hematócrito e contagem de eritrócitos.

As médias de pH e densidade urinária não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) conforme a suplementação de AOX.

Tabela 3 Valores médios dos parâmetros hematológicos e parâmetros urinários de gatos adultos após suplementação com antioxidante AOX

Variável	AOX, mg/kg MS					CV (%)	P
	0	250	500	750			
Eritrócitos (milhões/dL)	8,29	9,53	9,12	8,47	8,52	0,05	
Hematócrito (%)	36,63	42,18	40,63	37,91	6,26	0,05	
Hemoglobina (g/dL)	11,98 ^b	13,77 ^a	13,53 ^a	12,40 ^b	8,16	<0,01	
V.C.M. (fL)	44,10	44,18	44,57	44,75	2,88	0,80	
C.H.C.M (%)	32,73	32,72	33,27	32,67	2,15	0,63	
H.C.M (pg)	14,43	14,45	14,82	14,62	3,16	0,46	
LT (mil/mm ³)	15,60	14,33	16,62	13,92	22,69	0,90	
Plaquetas (mil/mm ³)	580,17	552,17	689,33	567,83	21,90	0,32	
pH urina	7,90	7,40	7,70	7,40	6,99	0,24	
Densidade urina	1025	1027	1028	1021	0,84	0,54	

V.C.M.: Volume celular médio dos eritrócitos; C.H.C.M.: Concentração hemoglobínica corpuscular média; LT: Leucócitos totais; CV: Coeficiente de variação

As curvas acumulativas (médias) da FOE obtidas após 80 dias de suplementação com AOX de gatos foram semelhantes para todos os níveis (Figura 2).

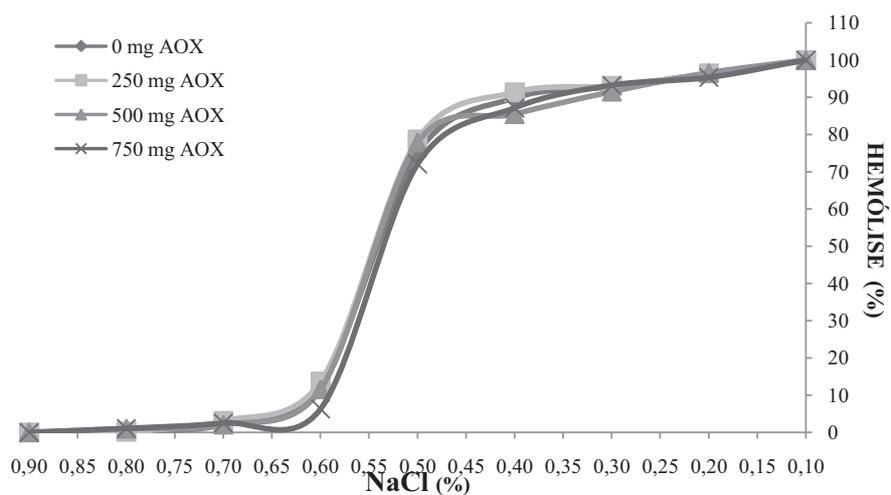


Figura 2 Curvas acumulativas (médias) da fragilidade osmótica eritrocitária de gatos após 80 dias da suplementação com AOX (farinha de algas marinhas, selênio levedura, ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*) / kg de MS na dieta

Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) na FOE quando avaliado os valores médios das concentrações de solução salina tamponada que corresponderam a 5, 50 e 95% de hemólise (tabela 4).

Tabela 4 Valores médios (derivativos) das concentrações de solução salina (% NaCl) correspondentes a 5, 50 e 95% de hemólise em gatos adultos após 80 dias de suplementação com AOX (mg/kg MS)

Hemólise	AOX				CV	P
	0	250	500	750		
5%	0,87	0,88	0,89	0,89	7,36	0,66
50%	0,51	0,53	0,52	0,52	5,74	0,64
95%	0,32	0,33	0,30	0,30	14,85	0,68

*Não significativo pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%

AOX: farinha de algas marinhas, selênio levedura, ácido ascórbico e produto de fermentação de *Aspergillus niger*)

Discussão

A metabolização de carboidratos, proteínas e lipídeos resulta em compostos que interferem no equilíbrio ácido-básico. Nesse sentido, para avaliar a influência dietética sobre a hemogasometria em gatos o período pós prandial tem sido estudado (JEREMIAS et al., 2013; PIRES et al., 2013). Porém, a suplementação com compostos antioxidantes tem apresentado efetividade dependente do tempo de ingestão deles (HEATON et al., 2002) do que da refeição. Portanto, as avaliações hemogasométricas realizadas no período pós prandial podem ter sido influenciadas pela composição da dieta controle o qual impediu uma melhor visualização dos efeitos do AOX nesse período. No entanto, quando observado em jejum, foram encontradas diferenças na $p\text{CO}_2$, HCO_3^- e $t\text{CO}_2$ demonstrando ação do AOX após 80 dias de suplementação.

Não foram considerados no presente trabalho os valores de pressão de oxigênio geralmente observados na hemogasometria, uma vez que quando se estuda o sangue venoso ao invés de sangue arterial (considerado ideal) são encontradas diferenças em função da oxigenação pelos pulmões e sua utilização pelos tecidos (ALMOSNY, 2003; DIBARTOLA, 2006). Amostra de sangue venoso tem sido utilizada por alguns autores que encontraram bons resultados ao avaliarem o balanço ácido-básico em gatos (KIENZLE; WILMS-EILERS, 1994; PIRES et al., 2013; JEREMIAS et al., 2013).

Todos os valores dos parâmetros hemogasométricos observados no presente trabalho estiveram abaixo dos valores de referência preconizados por DIBARTOLA (2006) e LEE; DROBATZ (2003) para sangue venoso, comprovando uma resposta de todos os animais ao agente estressor.

O pH sanguíneo é rapidamente controlado pelo sistema respiratório (horas) e pelos rins mais tardiamente (dias) (MEYER; COLES, RICH, 1995). Já o EB é uma mensuração utilizada para investigar alterações metabólicas, uma vez que quando negativo (HCO_3^- diminuído) indica uma deficiência de base que é caracterizado como acidose metabólica (DIBARTOLA, 2006). Assim, coerente aos dados de pH sanguíneo, os valores do EB e também do HCO_3^- (bicarbonato) estiveram abaixo dos valores de referência demonstrando que todos os animais utilizados no presente trabalho apresentaram, aos 80 dias do experimento, um estado de uma acidose metabólica independente de ingerirem ou não níveis de AOX.

Já a pCO_2 , no exame hemogasométrico, é o dado que informa sobre a compensação respiratória (MEYER; COLES, RICH, 1995). Em outros estudos (SIVAKUMAR et al., 2010; OLANREWAJU et al., 2010; WEST, 1999) foram observados que em animais sob situação de estresse, ansiedade ou medo pode haver mudanças na frequência e profundidade respiratória, com ocorrência de uma hiperventilação pulmonar. Esse estado ocorre devido ao fato da expiração do CO_2 exceder a sua taxa de produção, e conseqüentemente há a diminuição da pCO_2 . Quando isto acontece há um quadro de alcalose respiratória (DIBARTOLA, 2006).

O padrão de alterações no equilíbrio ácido-base depende dos efeitos dos agentes estressores sobre a condição e a taxa de metabolismo, a respiração e o mecanismo de H^+ , equivalente troca iônica. A interpretação de distúrbios do equilíbrio ácido-base, especialmente durante o estresse, é difícil pelo fato de muitas variáveis relevantes mudarem simultaneamente e, em muitos casos, em

sentidos opostos, dependendo as espécies, sexo, idade e do tipo de estressor (OLANREWAJU et al., 2010). Nesse sentido, desde que o organismo esteja sadio haverá compensação respiratória e/ou renal e, portanto dificilmente ocorrerá um distúrbio isolado no equilíbrio ácido-básico (MEYER; COLES, RICH, 1995). Em função disso, acredita-se que num primeiro momento os gatos do presente experimento apresentaram uma alcalose respiratória. Na tentativa de compensar esse distúrbio eles eliminaram base excessivamente o que resultou no estado de acidose metabólica para todas as dietas estudadas. Este fato é reforçado por SCHNEIDER et al. (1988) e WEST (1999) que encontraram resultados semelhantes quando estudaram animais submetidos ao estresse.

Até o momento não foram encontrados trabalhos que avaliassem valores hemogasométricos de gatos em situações de estresse quando suplementados com antioxidantes. Entretanto, os resultados do presente estudo corroboram com os dados encontrados por Sivakumar et al. (2010) os quais observaram maiores valores de HCO_3^- e pCO_2 em cabras estressadas recebendo suplemento antioxidante quando comparadas àquelas estressadas e não suplementadas. Os autores consideraram esse efeito como uma melhora no equilíbrio ácido-básico.

Os eritrócitos são importantes indicadores de estresse oxidativo (MACHADO et al., 2009) e em gatos, o principal alvo da lesão oxidativa em eritrócitos é a hemoglobina (CALDIN et al., 2005). As elevações nas concentrações da hemoglobina nos gatos suplementados com 250 e 500 mg de AOX/kg de MS podem ter algumas hipóteses fisiológicas. Uma delas pode ser devido ao fato que a hemoglobina corresponde por mais de 80% da capacidade tampão não bicarbonato presente no sangue (DIBARTOLA, 2006) e também podem ser reduzidas em situações de desequilíbrio ácido-básico (WEST, 1999) que aconteceu nos animais que ingeriram os níveis 0 e 750 mg de AOX/kg de MS. Outra hipótese pode ser pelo fato do estresse crônico em gatos resultar em importantes alterações fisiológicas (CARLSTEAD et al., 1993) e uma redução

de eritrócitos já foi associada a exaustão na capacidade de eritropoiese ocasionada por esse tipo de estresse (GARCIA et al., 2012). Isto pode ter ocorrido nos animais não suplementados com AOX e, de maneira inesperada, com os que ingeriram 750 mg de AOX/kg de MS que sugere um possível excesso do produto. Sivakumar et al. (2010) e Yousef et al. (2003) também encontraram elevações nas concentrações de hemoglobina em animais estressados suplementados com antioxidantes.

O pH urinário pode se tornar alcalino ou ácido a partir da compensação devido as alterações do pH sanguíneo, de maneira que os rins passam a excretar bases ou ácidos na urina (DIBARTOLA; BATERMAN, 2006). Deste modo, é provável que as alterações pela suplementação do AOX nas dietas dos gatos não foram suficientes para modificar o pH urinário.

Os valores (derivativos) das concentrações de solução salina (% NaCl) em que se observou 50% de hemólise se apresentaram de acordo com o valor médio de 0,54 para gatos sadios obtidos por Jain (1973). O aumento da peroxidação lipídica, que ocorre em situações de estresse oxidativo, provoca aumento na fragilidade osmótica e diminui a fluidez celular (Hebbel, 1986), uma vez que pode atrapalhar a organização dos fosfolípidios (fosfatidilserina e da fosfatidiletanolamina) da membrana bilateral de eritrócitos (Jain, 1984). No entanto, a inclusão de AOX não foi o suficiente para alterar a FOE.

Conclusão

Os resultados do presente trabalho sugerem que a suplementação de AOX em dietas apresenta efeitos benéficos nos parâmetros relacionados ao equilíbrio ácido-básico e na concentração de hemoglobina de gatos induzidos ao estresse.

Referências

- AGUILERA-TEJERO, E. et al. Quantitative analysis of acid-base balance in show jumpers before and after exercise. **Research in Veterinary Science**, London, v.68, n.2, p.103-108, abr, 2000.
- ALMOSNY, N. Equilíbrio ácido-básico em medicina veterinária. In: SIMPÓSIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA DA REGIÃO DO SUL DO BRASIL, 1., 2003, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003, p.5-16.
- BEAVER, B. V. **Feline behavior – a guide for veterinarians**. 2. ed. Elsevier Saunders: Missouri, 2003. 349p.
- CALDIN, M. et al. A retrospective study of 60 cases of eccentrocytosis in the dog. **Veterinary Clinical Pathology**, Botton Rouge, v.34, p.224-231, Sep, 2005.
- CARCIOFI, C. Métodos para estudo das respostas metabólicas de cães e gatos a diferentes alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, p.235-249, jul, 2007. Suplemento Especial.
- CARLSTEAD, K.; BROWN, J. L.; STRAWN, W. Behavior and physiological correlates of stress in laboratory cats. **Applied Animal Behaviour Science**, Philadelphia, v.38, n.2, p.143-158, Nov., 1993.
- COPPOCK, C. E. et al. Lactating dairy cow responses to dietary sodium, chloride, and bicarbonate during hot weather. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.65, n.4, p.566-76, Apr., 1982.
- DIBARTOLA, S. P. Introduction to acid-base disorders. In: _____. **Fluid, electrolyte and acid-base disorders in small animal practice**. 3.ed. Missouri: Elsevier, 2006, p.229-250.
- GARCIA, F. et al. Hematologia de tilapia-do-nilo alimentada com suplemento a base de algas frente a desafios de estresse agudo e crônico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.64, n.1, p.198-204, Feb., 2012.
- GRIFFIN, B.; HUME, K. R. Recognitions and management of stress in housed cats. In: AUGUST, J.R (ed.) **Consultation in Feline Internal Medicine**, St. Louis: Elsevier, 2006, p.717-727.

HEATON, P. R. et al. Role of dietary antioxidants to protect against DNA damage in adult dogs. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.132, n.6, p. 1720S-1724S, Jun., 2002.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, St. Louis, v.107, n.5, 401–404, May, 1986.

JAIN, N. C. Osmotic fragility of erythrocytes of dogs and cats in health and in certain hematologic disorders. **Cornell Veterinarian**, Ithaca, v.63, n.3, p.411-423, Jul., 1973.

JAIN, S. K. The accumulation of malonyldialdehyde, a product of fatty acid peroxidation, can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.259, n.6, p.3391–3394, Mar., 1984.

JEREMIAS, J. T. et al. Predictive formulas for food base excess and urine pH estimations of cats. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.182, n.1-4, p.82-92, June, 2013.

KIENZLE, E.; WILMS-EILERS, S. Struvite diet in cats: effect of ammonium chloride and carbonates on acid balance of cats. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.124, n.12, p.2652-2659, Dec. 1994.

LEE, J. A.; DROBATZ, K. J. Characterization of the clinical characteristics, electrolytes, acid-base, and renal parameters in male cats with urethral obstruction. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, San Antonio, v.13, n.4, p.227-233, Dec.2003.

MACHADO, L. P. et al. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na medicina veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.8, n.1, p.84-94, Jan-Jun, 2009.

MAEDE, Y; HATA, R. Studies on feline haemobartonellosis II. The Mechanism of anemia produced by infection with *Haemobartonella felis*. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v.37, n.1, p.49-54, Feb, 1975.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinário. Interpretação e diagnóstico**. São Paulo: Roca, 1995. 308p.

NACIONAL RESEARCH COUNCIL. – NRC. **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**. Washington: National Academies Press, 2006, 398p.

OLANREWaju, H. A. et al. Electrolyte diets, stress, and acid-base balance in broiler chickens. Physiology, endocrinology, and reproduction. **Poultry Science**, Champaign, v.86, n.7, p.1363-1371, July, 2007.

PARKER, A.J. et al. Quantitative analysis of acid-base balance in *Bos indicus* steers subjected to transportation of long duration. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.81, n.6, p.1434–1439, 2003.

PIERCE, J. L. et al. Investigation of replacing vitamin E with EconomasE® in broiler diet. **Poultry Science**, Champaign, v.88, Suppl. 1, p.97, Jan., 2009.

PIRES, C.P. et al. Urinary acidifier in diet with high excess base for adult cats. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.37, n.4, p.359-368, jul./ago., 2013.

SAS - SAS INSTITUTE. **User's guide**. 2004. Stat. version 9.00. 4.ed.

SCHNEIDER, P.L.; BEEDE, D.K.; WILCOX, C.J. Nycterohemeral patterns of acid-base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.66, n.1, p.112-125, Jan., 1988.

SIVAKUMAR, A. V. N.; SING, G.; VARSHNEY, V. P. Antioxidants supplementation on acid base balance during heat stress in goats. **Asian-Australasian Association of Animal Societies**, Seoul, v.23, n.11, p.1462-1468, Nov. 2010.

WEST, J. W. Nutritional strategies for managing the heat stressed dairy cow. **Journal Animal Science**, Savoy, v.77, supplement 2, p.21-35, 1999.

WOJTAS, K.; CWYNAR, P.; KOLACZ, R. et al. Effect of heat stress on acid base balance in Polish Merino sheep. **Archives Animal Breeding**, Dummerstorf, v.56, n.92, Nov., 2013.

YOUSEF, M. I. et al. Influence of ascorbic acid supplementation on the hematological and clinical biochemistry parameters of male rabbit exposed to aflatoxin B. **Journal of Environmental Sciences and Health**, London, v.38, n.2, p.193-209, Mar., 2003.

XIÃO, R. et al. A comparative transcriptomic study of vitamin E and an algae-based antioxidant as antioxidative agents: Investigation of replacing vitamin E with the algae-based antioxidant in broiler diets. **Poultry Science**, Oxford, v.90, n.1, p.136-146, Jan., 2011.

ZICKER, S.C.; WEDEKIND, K.J.; JEWELL. Antioxidants in veterinary nutrition. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v.36, n.6, p.1183-1198, Nov., 2006.

(VERSÃO PRELIMINAR)

ANEXOS

ANEXO A - ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Tabela 1A. Análise de variância e coeficiente de variação para cortisol

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	1,233524	0,026640	3,166	0,0553
Resíduo 1	15	1,947890	0,022461		
Tempo	4	7,888353	0,126667	17,778	0,0000
Tempo*Nível	12	2,503382	1,972088	1,881	0,0482
Resíduo 2	85	9,429080	0,208615		
Total corrigido	119	23,00222	0,110930		
CV1 (%)	24,39				
CV2(%)	22,52				
Média geral	1,47		Nº de observações:	120	

Tabela 2A. Análise de variância e coeficiente de variação para superóxido dismutase

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,414581	0,138194	2,040	0,1515
Resíduo 1	15	1,016128	0,067742		
Tempo	4	7,471119	1,867780	69,839	0,0000
Tempo*Nível	12	0,851596	0,070966	2,654	0,0046
Erro 2	85	2,273248	0,026744		
Total corrigido	119	12,02667			
CV1 (%)	20,04				
CV2(%)	12,59				
Média geral	1,29		Nº de observações:	120	

Tabela 3A. Análise de variância e coeficiente de variação para catalase

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	31,25385	10,417951	4,528	0,0188
Resíduo 1	15	34,514086	2,300939		
Tempo	4	59,847441	14,961860	15,940	0,0000
Tempo*Nível	12	22,73398	1,89449	2,018	0,0321
Resíduo 2	85	79,78477	0,93864		
Total corrigido	119	228,13414			
CV1 (%)	22,51				
CV2(%)	14,38				
Média geral	6,73		Nº de observações:		120

Tabela 4A. Análise de variância e coeficiente de variação para glutatona peroxidase

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	1061,70	353,9012	2,216	0,1285
Resíduo 1	15	2395,35	159,6899		
Tempo	4	4215,56	1053,8910	13,996	0,0000
Tempo*Nível	12	649,11	54,092712	0,718	0,7297
Resíduo 2	85	6400,23	75,296908		
Total corrigido	119	14721,96			
CV1 (%)	22,52				
CV2(%)	15,46				
Média geral	56,11		Nº de observações:		120

Tabela 5A. Análise de variância e coeficiente de variação para TBARS

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,215724	0,071908	5,149	0,0120
Resíduo 1	15	0,209494	0,013966		
Tempo	4	0,967976	0,241994	20,387	0,0000
Tempo*Nível	12	0,350087	0,029174	2,458	0,0084
Resíduo 2	85	1,008928	0,011870		
Total corrigido	119	2,752210			
CV1 (%)	14,62				
CV2(%)	13,48				
Média geral	0,80			Nº de observações:	120

Tabela 6A. Análise de variância e coeficiente de variação para glicemia

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	1528,166667	509,3888889	6,996681971	0,0585
Glic 0	1	26,38400077	26,38400077	0,362395935	0,5500
Resíduo	19	1383,282666	72,80435084		
CV (%)	11,14				
Média geral	75,58			Nº de observações:	24

Tabela 7A. Análise de variância e coeficiente de variação para uréia

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	198,8333333	66,27777778	0,860518112	0,4785
Uréia 0	1	419,6051452	419,6051452	5,447947102	0,03072
Resíduo	19	1463,394855	77,02078183		
CV (%)	19,68				
Média geral	45			Nº de observações:	24

Tabela 8A. Análise de variância e coeficiente de variação para creatinina

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,18	0,060	2,91	0,0610
Creat 0	1	0,12	0,120	5,79	0,0260
Resíduo	19	0,39	0,021		
CV (%)	10,78				
Média geral	45		Nº de observações:		24

Tabela 10A. Análise de variância e coeficiente de variação para colesterol total

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,5	0,2	3,4	0,039
linear	1	0,4	0,39	7,707	0,01
quadrática	1	0,1	0,11	2,137	0,16
desvio	1	0,0	0,01	0,219	0,65
Colest 0	1	1,1	1,1	21,5	0,000
Resíduo	19	1,0	0,1		
CV (%)	4,93				
Média geral	4,59		Nº de observações:		24

Tabela 11A. Análise de variância e coeficiente de variação para triglicerídeos

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,766	0,255	2,187	0,123
TG1 0	1	0,003	0,003	0,025	0,875
Resíduo	19	2,219	0,117		
CV (%)	9,72				
Média geral	3,52		Nº de observações:		24

Tabela 12A. Análise de variância e coeficiente de variação para HDL-c

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,50	0,17	3,83	0,03
linear	1	0,42	0,42	9,545	0,01
quadrática	1	0,08	0,08	1,824	0,19
desvio	1	0,00	0,00	0,110	0,74
HDL-c 0	1	1,08	1,08	24,77	0,00
Resíduo	19	0,83	0,04		
CV (%)	4,77				
Média geral	4,38		Nº de observações:		24

Tabela 13A. Análise de variância e coeficiente de variação para LDL-c

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,67	0,22	1,38	0,28
LDL-c 0	1	1,43	1,43	8,86	0,01
Resíduo	19	3,07	0,16		
CV (%)	13,91				
Média geral	2,89		Nº de observações:		24

Tabela 14A. Análise de variância e coeficiente de variação para VLDL-c

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,77	0,26	2,19	0,12
VLDL-c 0	1	0,00	0,00	0,03	0,88
Resíduo	19	2,22	0,12		
CV (%)	17,93				
Média geral	1,91		Nº de observações:		24

Tabela 15A. Análise de variância e coeficiente de variação para proteínas totais

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,46	0,154	1,05	0,394
PTN 0	1	0,51	0,505	3,44	0,079
Resíduo	19	2,79	0,147		
CV (%)	5,02				
Média geral	7,64		Nº de observações:		24

Tabela 16A. Análise de variância e coeficiente de variação para albumina

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,09	0,030	1,20	0,335
Albumina 0	1	0,26	0,258	10,22	0,005
Resíduo	19	0,48	0,025		
CV (%)	6,12				
Média geral	2,60		Nº de observações:		24

Tabela 17A. Análise de variância e coeficiente de variação para gama glutamil transferase

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	2,798	0,93	1,433	0,26
Ggt 0	1	0,247	0,25	0,379	0,55
Resíduo	19	12,362	0,65		
CV (%)	50,02				
Média geral	1,61		Nº de observações:		24

Tabela 18A. Análise de variância e coeficiente de variação para pH sanguíneo em jejum

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,008	0,002	1,573	0,2287
pH 0	1	0,003	0,003	1,818	0,1933
Resíduo	19	0,033	0,001		
CV (%)	0,57				
Média geral	7,24		Nº de observações:		24

Tabela 19A. Análise de variância e coeficiente de variação para pH sanguíneo após alimentação

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,0171	0,005	2,054	0,1404
pH 0	1	0,0007	0,0007	0,260	0,6158
Resíduo	19	0,0595	0,0027		
CV (%)	0,70				
Média geral	7,23		Nº de observações:		24

Tabela 20A. Análise de variância e coeficiente de variação para pCO₂ sanguíneo em jejum

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	90,043	30,0142	3,4305	0,0379
linear	1	62,496	62,496	6,5350	0,0168
quadrática	1	4,507	4,507	0,4712	0,4999
pCO ₂ 0	1	11,556	11,5561	1,3208	0,2647
Resíduo	19	166,235	8,7492		
CV (%)	10,86				
Média geral	26,91		Nº de observações:		24

Tabela 21A. Análise de variância e coeficiente de variação para pCO₂ sanguíneo após alimentação

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	12,942	4,314	0,769	0,5255
pCO ₂ 0	1	0,054	0,054	0,009	0,9227
Resíduo	19	106,59	5,610		
CV (%)	10,46				
Média geral	22,10		Nº de observações:		24

Tabela 22A. Análise de variância e coeficiente de variação para HCO₃⁻ sanguíneo em jejum

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	10,635	3,5451	2,9559	0,0386
linear	1	7,2521	7,2521	6,0144	0,02259
quadrática	1	2,2204	2,2204	1,9183	0,1806
HCO ₃ ⁻ 0	1	0,357	0,357	0,29977	0,5917
Resíduo	19	22,787	1,199		
CV (%)	9,23				
Média geral	11,55		Nº de observações:		24

Tabela 23A. Análise de variância e coeficiente de variação para HCO₃⁻ sanguíneo após alimentação

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	1,601	0,533	0,5609	0,6473
HCO ₃ ⁻ 0	1	0,054	0,054	0,0573	0,8133
Resíduo	19	18,077	0,951		
CV (%)	9,03				
Média geral	12,39		Nº de observações:		24

Tabela 24A. Análise de variância e coeficiente de variação para tCO₂ sanguíneo em jejum

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	12,1288	4,0429	3,1504	0,0489
linear	1	8,5333	8,5333	6,6608	0,01705
quadrática	1	1,9267	1,9267	1,5408	0,2281
tCO ₂ 0	1	0,2067	0,2067	0,1611	0,6926
Resíduo	19	24,3828	1,2833		
CV (%)	16,22				
Média geral	12,39		Nº de observações:		24

Tabela 25A. Análise de variância e coeficiente de variação para tCO₂ sanguíneo após alimentação

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	1,0529	0,3509	0,3577	0,7842
tCO ₂ 0	1	0,0377	0,0377	0,0384	0,8467
Resíduo	19	24,3828	1,2833		
CV (%)	8,60				
Média geral	11,21		Nº de observações:		24

Tabela 26A. Análise de variância e coeficiente de variação para EB sanguíneo em jejum

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	9,668	3,222	1,1354	0,3600
BE 0	1	6,566	6,566	2,3134	0,1447
Resíduo	19	53,926	2,8382		
CV (%)	11,80				
Média geral	13,99		Nº de observações:		24

Tabela 27A. Análise de variância e coeficiente de variação para EB sanguíneo após alimentação

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	19,371	6,457	1,699	0,2010
BE0	1	0,567	0,566	0,149	0,7037
Resíduo	19	72,199	3,799		
CV (%)	14,06				
Média geral	-13,53		Nº de observações:		24

Tabela 28A. Análise de variância e coeficiente de variação para eritrócitos

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	5,918	1,97	3,465	0,05
Eritroc 0	1	0,908	0,91	1,594	0,22
Resíduo	19	10,816	0,57		
CV (%)	8,52				
Média geral	8,85		Nº de observações:		24

Tabela 29A. Análise de variância e coeficiente de variação para hematócrito

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	114,655	38,22	3,712	0,05
Hematócrito 0	1	55,244	55,24	5,366	0,03
Resíduo	19	195,599	10,29		
CV (%)	8,16				
Média geral	39		Nº de observações:		24

Tabela 30A. Análise de variância e coeficiente de variação para hemoglobina

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	13,445	4,48	6,840	0,00
Hemoglob 0	1	4,486	4,49	6,847	0,02
Resíduo	19	12,449	0,66		
CV (%)	6,62				
Média geral	12,92		Nº de observações:		24

Tabela 31A. Análise de variância e coeficiente de variação para V.C.M.

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	1,723	0,57	0,351	0,79
V.C.M. 0	1	3,225	3,23	1,970	0,18
Resíduo	19	31,112	1,64		
CV (%)	2,88				
Média geral	44,40		Nº de observações:		24

Tabela 32A. Análise de variância e coeficiente de variação para C.H.C.M

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	1,431	0,48	0,586	0,63
C.H.C.M. 0	1	9,172	9,17	11,261	0,00
Resíduo	19	15,476	0,81		
CV (%)	2,15				
Média geral	32,85		Nº de observações:		24

Tabela 33A. Análise de variância e coeficiente de variação para H.C.M

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,575	0,19	0,903	0,46
H.C.M. 0	1	0,096	0,10	0,454	0,51
Resíduo	19	4,029	0,21		
CV (%)	3,16				
Média geral	14,58		Nº de observações:		24

Tabela 34A. Análise de variância e coeficiente de variação para leucócitos totais

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	0,19	0,06	0,19	0,90
LT 0	1	0,89	0,89	2,63	0,12
Resíduo	19	6,45	0,34		
CV (%)	2,57				
Média geral	22,69		Nº de observações:		24

Tabela 35A. Análise de variância e coeficiente de variação para plaquetas

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	70013,792	23337,93056	1,268376011	0,31353
Plaquetas 0	1	30666,650	30666,65033	1,666679209	0,21219
Resíduo	19	349597,183	18399,85174		
CV (%)	14,22				
Média geral	953,93		Nº de observações:		24

Tabela 36A. Análise de variância e coeficiente de variação para pH urina

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	1,30581	0,43527	1,5460	0,2352
pH urina 0	1	0,00180	0,00180	0,00642	0,9369
Resíduo	19	5,34935	0,28154		
CV (%)	6,99				
Média geral	7,59		Nº de observações:		24

Tabela 37A. Análise de variância e coeficiente de variação para densidade da urina

Fator de variação	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Nível	3	166,7916667	55,59722222	0,74338057	0,53938
densidade 0	1	166,8287069	166,8287069	2,23063695	0,15172
Resíduo	19	1421,004626	74,78971718		
CV (%)	0,84				
Média geral	1025		Nº de observações:		24

Tabela 38A. Análise de variância não paramétrica para a fragilidade osmótica eritrocitária - Hemólise 5%

Fator de variação	GL	Qui-quadrado	P
Nível	3	1,6024	0,6589

Tabela 39A. Análise de variância não paramétrica para a fragilidade osmótica eritrocitária - Hemólise 50%

Fator de variação	GL	Qui-quadrado	P
Nível	3	1,6733	0,6429

Tabela 40A. Análise de variância não paramétrica para a fragilidade osmótica eritrocitária - Hemólise 95%

Fator de variação	GL	Qui-quadrado	P
Nível	3	1,4823	0,6864

ANEXO B - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

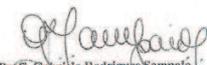
CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 036/11**, relativo ao projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO ANTIOXIDANTE CELULAR EM GATOS SOBRE PARÂMETROS SANGUÍNEOS E AÇÃO ANTIOXIDANTE", que tem como responsável **Flávia Maria de Oliveira Borges**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, tendo sido aprovado na reunião de 15/09/2011.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 036/11**, related to the project entitled "EVALUATION OF BLOOD PARAMETERS AND ANTIOXIDANT ACTION EFFECT OF CELLULAR ANTIOXIDANT IN CATS", under the supervision of **Flávia Maia de Oliveira Borges**, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Bioethic Committee in Utilization of Animals (Comissões Permanentes/PRP-Ufla)**, and was approved in **September 15, 2011**.

Lavras, 15 de setembro de 2011.


Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio
Presidente em exercício da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa / Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 - Lavras, MG - Brasil
Tel: +55 (35) 3829 5182
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br