

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO NO SORO DE  
CÃES ALIMENTADOS COM RAÇÕES SUPLEMENTADAS  
COM ÓLEO DE CAJU, ÓLEO DE MAMONA E ÓLEO DE  
PEIXE**

**Chayanne Silva Ferreira**

Médica Veterinária

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**PARÂMETROS DO ESTRESSE OXIDATIVO NO SORO DE  
CÃES ALIMENTADOS COM RAÇÕES SUPLEMENTADAS  
COM ÓLEO DE CAJU, ÓLEO DE MAMONA E ÓLEO DE  
PEIXE**

**Chayanne Silva Ferreira**

**Orientador:** Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

**Co-orientador:** Prof. Dr. Ricardo de Souza Vasconcellos

**Co-orientador:** Prof. Dr. Márcio Antônio Brunetto

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Clínica Médica).

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**

**Julho de 2012**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**CHAYANNE SILVA FERREIRA** – nascida em 16 de outubro de 1986, na cidade de Conceição das Alagoas – MG, filha de Beatriz Márcia Borges Silva Ferreira e de Jurandir Ferreira. Concluiu o ensino médio no Colégio Cenecista Dr. José Ferreira em Outubro de 2004 na cidade de Uberaba – MG. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária em março de 2005 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal (UNESP), concluindo-o em janeiro de 2010. Foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de agosto de 2008 a julho de 2009. Em agosto de 2010 iniciou o curso de mestrado pelo programa de pós-graduação em Medicina Veterinária (Clínica Médica) pela mesma instituição, sendo bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Submeteu-se à banca de defesa para a Dissertação de Mestrado em julho de 2012. Foi aprovada para o ingresso no curso de doutorado pelo mesmo programa, com início em agosto de 2012.

**“ Vou te contar  
os olhos já não podem ver  
coisas que só o coração pode entender  
Fundamental é mesmo o amor  
É impossível ser feliz sozinho...”**

**Tom Jobim**

## **DEDICO**

Aos meus pais Beatriz e Jurandir por serem os responsáveis por tudo que eu sou  
e por eu ter chegado até aqui.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por me deixar seguir nos melhores caminhos e por continuar caminhando comigo sempre.

Aos meus pais Jurandir (Andir) e Beatriz (Bibi) por todo apoio, ajuda, conselhos, pela torcida constante, pelas orações, por me darem “puxões de orelha” na hora certa, por serem meus exemplos de honestidade e justiça. O último ano não foi nada fácil, aluguei o ombro, o colo e os ouvidos, principalmente da mãe Bibi. Só tenho a agradecer a vocês por tudo!

À minha irmã Carolinne (Carol), pela presença constante, participando e compartilhando da minha vida como nunca. A distância só nos uniu!

Ao meu irmão Castellane (Tetê), que mesmo na correria, tendo emprego, esposa, filha, sempre deu um jeito de saber de mim. À minha sobrinha Anita, pela alegria que me proporcionou nestes últimos anos e à minha cunhada Lísia, por ser responsável por cuidar dessa família.

Ao Flavio, pela ajuda, pelos bons momentos e por estar do meu lado quando eu preciso. Sem seu apoio e companhia teria sido mais difícil.

Ao meu primo Daniel (Dani), que sem ele eu jamais teria passado meus dias bem. Obrigada pelos finais de semana, pelos telefonemas, pelas festas, pela torcida, pelo ombro, por tudo!

Nunca vou deixar de agradecer à minha vizinha querida Dona Ilda, que cuidou e cuida de mim onde quer q ela esteja. Responsável por grande parte da minha formação, desde os tempos do colégio. Mesmo não estando de corpo presente, tenho certeza que ainda torce pro mim! Sinto muita falta...

A todos meus tios e tias, primos e primas, que afastei do convívio devido à distância, ao experimento e compromissos do mestrado, mesmo os que ainda não

entenderam como eu me formei e continuei estudando. Obrigada principalmente à Tia Dete, pela torcida e oração!

À Raquel Labres, amiga de todas as horas e momentos que cativou um lugar especial na minha vida! E foram horas mesmo, de choro ou de alegria, mas que no final sempre deram certo. Obrigada por tudo!

À minha amiga Verônica, que nunca desistiu da nossa amizade, e mesmo que se passem meses, me recebe como se nos encontrássemos todos os dias. À Glenda, Karina e Bruna que mesmo distantes ainda são importantes pra mim.

Às amigas Pauline, por sempre ter permanecido na minha vida mesmo nos altos e baixos e ainda por ter me dado uma “sobrinha”, Alice; Ana Lúcia (Xulaps), que mesmo morando fora do Brasil sempre soube da minha vida, me deu apoio e atenção; Thais (Quaqualina), que sempre da um jeito de me ver, em Ribeirão ou em Jaboticabal e Nátalie, que nunca vai deixar de ser minha amiga, mesmo morando na mesma cidade sem me ver. Ao meu amigo Reinaldo (Super 15), que sempre sabe da minha vida, mesmo que eu não diga nada. Obrigada meus queridos!

Ao meu orientador Prof. Aulus Cavalieri Carciofi, pela oportunidade, pela paciência e por me deixar continuar nesta área que eu me apaixonei.

Ao meu co-orientador Prof. Ricardo Souza Vasconcellos, por toda a ajuda e paciência em me ensinar, por todo o trabalho realizado, principalmente as análises e a estatística.

Ao meu co-orientador Prof. Márcio Antônio Brunetto, pela disponibilidade, ensinamentos e principalmente pela amizade.

Ao Fabiano César Sá, Flavio Lopes da Silva e Raquel Silveira Pedreira que me ajudaram imensamente nesse projeto. Sem vocês eu não teria conseguido. Muito obrigada!

A todos do Laboratório de Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos Prof. Flavio Prada, pela companhia, pela ajuda essencial, por serem uma equipe e pela parceria não só neste experimento como em tantos outros que fazemos juntos. Em especial Ana Paula, Bruna, Danilo (Sivi), Fernanda, Fernando (Mulamba), Jú e Katiani. Obrigada de coração!

Às estagiárias que sempre me ajudaram e me salvaram principalmente nesta fase de análises! Sem vocês seria muito mais trabalhoso e demorado. Obrigada!

Ao funcionário do laboratório Diego que sempre me ajudou e às funcionárias Elaine e Cláudia, que além da ajuda ainda foram minhas amigas e conselheiras. Muito obrigada a vocês!

À Paulinha e à Jú, pela imensa ajuda nas análises e pela amizade.

Ao João Carlos, do departamento de Tecnologia, à Vivian do Departamento de Patologia e tantos outros que me ajudaram em diversas fases do experimento. Muito obrigada!

Aos professores Eliana, Rosângela, Áureo e Wilter por cederem seus laboratórios e equipamentos para a realização deste projeto.

Ao Professor Áureo Santana e à Dra Juliana Borges por terem participado da minha banca de qualificação.

Aos Professores Alceu Jordão e José Correia (Juca) pelas contribuições na banca de defesa.

À Capes pela bolsa concedida.

À empresa Oligobasics pelo financiamento do projeto, representados pela Dra Marina Galvão.

À Mogiana Alimentos (Guabi) pelo suporte ao nosso laboratório e manutenção dos animais.

Aos cães desse experimento: Peri, Bola, Luigi, Thomas, Bruno, Luisinho, Pepe, Scoth, Scooby, Napoleão, Juca, Chico, Brad, Sivi, Sheik, Spike, Joaquim, Marley, Simba, Manu, Sasha, Ondina e Poulain. A todos os outros cães e gatos do laboratório por também alegrarem meus dias, em especial Ceci e Belinha.

Aos meus cães Tôto, Menininha, Laylla, Puppy e em especial minha velhinha querida Petty. Vocês são a prova de que eu escolhi a profissão certa! São muitos, dão gastos e trabalho, mas o amor e a companhia fiel são impagáveis!

Aos que eventualmente eu tenha esquecido: vocês não são menos importantes. Fico feliz de saber que tive tantas pessoas a agradecer! Isso só me mostra o quanto sou abençoada por ter família, amigos e colegas ao meu lado!

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xii
Abstract .....	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	14
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
II.I Radicais Livres.....	15
II.II Sistemas Antioxidantes de Defesa e Estresse Oxidativo.....	16
II.III Lipoperoxidação.....	18
II.IV Métodos de Avaliação do Estresse Oxidativo.....	21
II.V Antioxidantes Naturais.....	27
II.V.I Óleo de Cajú.....	28
II.V.II Óleo de Mamona.....	29
II.VI Ácidos Graxos Poli-insaturados.....	30
III. MATERIAL E MÉTODOS .....	32
III.I Animais e delineamento experimental.....	32
III.I.I Simulação de Estresse por Transporte.....	33
III.II Dietas Experimentais.....	34
III.III Mensuração da capacidade antioxidante do soro sanguíneo.....	36
III.III.I Ácido Tiobarbitúrico – TBARS.....	36
III.III.II Capacidade Antioxidante Total.....	37
III.III.III Sequestro do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....	38
III.IV Análise estatística.....	39
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
V. CONCLUSÕES .....	49
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

**Lista de Abreviaturas**

<b>ABTS</b>	<b>Ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico</b>
<b>AGPI</b>	<b>Ácidos Graxos Polinsaturados</b>
<b>CN</b>	<b>Ração Controle</b>
<b>DPPH</b>	<b>Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil</b>
<b>ERN</b>	<b>Espécie Reativa ao Nitrogênio</b>
<b>ERO</b>	<b>Espécie Reativa ao Oxigênio</b>
<b>LPO</b>	<b>Lipoperoxidação</b>
<b>MDA</b>	<b>Malonildialdeído</b>
<b>OCA</b>	<b>Ração Óleo de Cajú</b>
<b>OCAOMA</b>	<b>Ração Óleo de Cajú e Óleo de Mamona</b>
<b>OMA</b>	<b>Ração Óleo de Mamona</b>
<b>RL</b>	<b>Radical Livre</b>
<b>SG</b>	<b>Solução Geradora</b>
<b>TAC</b>	<b>Capacidade Antioxidante Total</b>
<b>TBA</b>	<b>Ácido Tiobarbitúrico</b>
<b>TBARS</b>	<b>Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico</b>
<b>TEAC</b>	<b>Capacidade Antioxidante Trolox Equivalente</b>

## RESUMO

Os antioxidantes podem agir retardando ou prevenindo a oxidação do substrato envolvido nos processos oxidativos, impedindo a formação de radicais livres. Neste estudo foram avaliados os efeitos do óleo de caju e mamona, empregados isoladamente ou em associação, e do óleo de peixe sobre o status oxidativo de cães. As dietas utilizadas foram controle (CN); óleo de Caju (OCA), contendo 0,06% de óleo de caju; óleo de mamona (OMA), contendo 0,018% de óleo de mamona; óleo de caju e mamona em associação (OCAOMA), contendo 0,015% da mistura de ambos; óleo de peixe (PEIXE), contendo 0,5% de óleo de peixe. Os animais passaram por um período de adaptação de 30 dias, recebendo uma dieta comercial padrão. Após este período foram alimentados com as dietas experimentais por 84 dias. Foram coletadas amostras de sangue nos períodos 0, 28, 56 e 84 dias. Após esse período, uma simulação de estresse de transporte foi realizada e após 3 horas procedeu-se a coleta de sangue. Foram realizados os ensaios do ácido Tiobarbitúrico (TBARS), Capacidade Antioxidante Total (TAC) e o Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) nas amostras de soro coletadas. Não houve efeito da adição das diferentes fontes de lipídeos, embora tenha sido verificado uma tendência a redução ( $p=0,06$ ) nos níveis séricos de TBARS nos animais que receberam dieta contendo óleo de peixe. Não foi verificado efeito da inclusão dos óleos de caju e mamona sobre o status oxidativo dos cães. Por outro lado, o modelo de stress empregado no estudo promoveu modificações nos parâmetros oxidativos analisados, porém, sem efeito do tratamento recebido. Tendo em vista os resultados obtidos e parâmetros de avaliação do status oxidativo dos cães, o uso de óleo de caju e mamona nas doses utilizadas não promoveu alteração no status oxidativo dos cães.

**Palavras-chave:** Nutrição, Antioxidantes, TBARS, DPPH, TAC

## ABSTRACT

Antioxidants may act by preventing or retarding the oxidation of oxidative processes involved in preventing the formation of free radicals. This study evaluated the effects of cashew and castor oil, used alone or in combination, and fish oil on the oxidative status of dogs. The diets were control (CN); oil Cashew (OCA), containing 0.06% of cashew nut oil, castor oil (OMA), containing 0.018% of castor oil, castor oil and cashew nuts in combination (OCAOMA) containing 0.015% of the mixture of both; fish oil (FISH), containing 0.5% fish oil. The animals went through an adjustment period of 30 days, receiving a standard commercial diet. After they were fed the experimental diets for 84 days. Blood samples were collected in periods 0, 28, 56 and 84 days. After this period, a simulation of transport stress was performed after 3 hours and proceeded to collect blood. Assays were performed in the thiobarbituric acid (TBARS), Total Antioxidant Capacity (TAC) and the sequestration of the radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) in serum samples collected. No effect of addition of different lipid sources, although it has been a trend to decrease ( $p = 0.06$ ) in serum levels of TBARS in the animals fed the diet containing fish oil. There was no effect of inclusion of cashew and castor oil on the oxidative status of the dogs. Moreover, the model used in the study of stress promoted oxidative modifications in the parameters considered, however, no effect of treatment received. In view of the results and parameters for assessing the oxidative status of the dogs, the use of cashew and castor oil in the doses used does not change the oxidative status of dogs.

**Keywords:** Nutrition, Antioxidants, TBARS, DPPH, TAC

## I.INTRODUÇÃO

Manter a alimentação dos cães e gatos adequada tem sido uma busca mais frequente pelos proprietários que fornecem alimentos industrializados aos seus animais, com o objetivo de aumentar a longevidade e prevenir o desenvolvimento de doenças. Com isto, a nutrição e os cuidados veterinários estão ganhando cada vez mais importância na sociedade (BONTEMPO, 2005).

Os antioxidantes podem agir diretamente na neutralização da ação dos radicais livres ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função (SOARES, 2002), com destacado potencial nutracêutico.

O uso de antioxidantes naturais na alimentação de cães e gatos, visando à substituição dos antioxidantes sintéticos com prováveis potenciais deletérios ao organismo, tem ganhado importância à medida que o seu uso se intensifica na alimentação humana.

O óleo de mamona com seu potencial anti-inflamatório e o óleo de caju por seu poder anti-inflamatório, antimicrobiano e antioxidante tem sido estudados como coadjuvantes na alimentação animal. O uso dessas substâncias tem sido testadas em associação, buscando um efeito sinérgico. Já o óleo de peixe possui comprovada ação anti-inflamatória, porém são mais propensos à oxidação, podendo fornecer substratos para a peroxidação lipídica.

No entanto, os estudos avaliando efeitos em *petfood* ainda são escassos e controversos, justificando a necessidade de se explorar melhor estas substâncias. Portanto, este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos antioxidantes do óleo de caju e mamona empregados isoladamente ou em associação e o uso de óleo de peixe sobre o estresse oxidativo de cães alimentados com diferentes dietas contendo estes óleos.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

Pesquisas envolvendo compostos antioxidantes oriundos de fontes naturais têm sido desenvolvidas em diferentes centros de estudos devido a sua importância na prevenção do desencadeamento das reações oxidativas, tanto nos alimentos como no organismo animal. Os antioxidantes podem agir retardando ou prevenindo a oxidação do substrato envolvido nos processos oxidativos, impedindo a formação de radicais livres (HALLIWELL et. al, 1995).

### II.I Radicais Livres

A oxidação, como parte fundamental da vida aeróbica e da manutenção do metabolismo, é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de radicais livres, que podem ser produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica (ROESLER et.al, 2007).

O termo radical livre refere-se a átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL et.al, 1992). Podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU & ANDERSON, 1997).

Esses radicais livres, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são denominados, respectivamente de EROs (Espécies Reativas ao Oxigênio) ou ERNs (Espécies Reativas ao Nitrogênio) (VISIOLI et.al, 2000; FINKEL & HOLBROOK, 2000; PIETTA, 2000). As EROs incluem todos os radicais do oxigênio, como o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ), radical alquila ( $L^{\bullet}$ ), alcóxila ( $LO^{\bullet}$ ) e peróxila

( $\text{LOO}\cdot$ )(BARBER & BERNHEIM, 1967; CHANGE et. al, 1979). Nas ERNs estão incluídos, além do peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), o óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) e o radical dióxido de nitrogênio ( $\cdot\text{NO}_2$ ) (EISERICH et.al, 1998; HOGG & KALYANARAMAN, 1999).

O ânion peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), o ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o oxigênio singlete ( $1\text{O}_2$ ) e o ozônio ( $\text{O}_3$ ) não são radicais livres, mas podem induzir reações radicalares no organismo, sendo por isso também considerados como espécies reativas (PORTER, 1984; BENZIE, 1996; PATEL et.al, 1999). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, seu excesso apresenta efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, como mitocôndrias e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares e, dessa forma, se encontram envolvidos em diversas patologias a exemplo de câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, disfunções cognitivas, dentre outras (HALLIWELL et. al, 1992).

## **II.II Sistemas Antioxidantes de Defesa e Estresse Oxidativo**

O acúmulo de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com HALLIWELL & GUTTERIDGE (1990) “Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. São substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação, inibindo o início da lipoperoxidação, seqüestrando radicais livres e/ou quelando íons metálicos (SOARES, 2002).

Existem dois sistemas principais de defesa antioxidantes: os antioxidantes enzimáticos e os não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são conhecidos como antioxidantes naturais. Eles neutralizam os radicais livres excessivos e previnem danos à estrutura celular. São integrados pelas enzimas: superóxido

dismutase (SOD); catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prx), glutationa (GSH), glutationa redutase (GR) e glutationa peroxidase (GPx). Os antioxidantes não enzimáticos são conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementos da dieta. Um grande número de compostos de baixo peso molecular faz parte do sistema não enzimático, incluindo o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico, ácido  $\alpha$ -lipoico (NORDBERG & ARNÉR, 2001), zinco, taurinas, hipotaurinas, glutationas, vários carotenoides, dentre outros (MAIA, 2006). Esse sistema pode atuar em duas linhas: como removedor do agente, antes que ele cause lesão, ou como reparador da lesão ocorrida. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na manutenção do status oxidativo dos organismos, sendo o primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes são também capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo sua reação com os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda de integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenóides são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode ocorrer adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

O controle das concentrações de enzimas antioxidantes nas células é extremamente importante para a sobrevivência no ambiente aeróbico (BARNETT

& KING, 1995). Numa situação em que há diminuição nos níveis das enzimas antioxidantes, uma elevada velocidade de produção de radicais livres ou uma combinação de ambas as condições pode resultar no chamado estresse oxidativo. Este pode ocorrer devido à ação de xenobiontes, através da alteração na regulação redox celular, pelo metabolismo de citocromos P450, ou ainda, pela presença de íons metálicos livres, gerando ciclos de reações oxidativas celulares (REGOLI et al., 2002).

### **II.III Lipoperoxidação**

Um dos principais mecanismos de lesão celular relativos ao Estresse Oxidativo é a lipoperoxidação (LPO). Esta se caracteriza por reação de oxidação mediada por EROs e ERNs sobre os componentes biológicos lipídicos, principalmente os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), constituintes das membranas biológicas e de lipoproteínas. Acarretam alterações em suas estruturas, permeabilidades, fluidez e atividade enzimática (MELLO FILHO et. al, 1983). Conseqüentemente, há perda de seletividade na troca iônica e ainda liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, com formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989). A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (SHAN et. al, 1990). No entanto, assim como na formação das EROs e ERNs, nem sempre os processos de lipoperoxidação são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Um desequilíbrio metabólico com excesso de formação de tais produtos pode ser lesivo (ROSS & MOLDEUS, 1991).

Em relação à ocorrência de LPO no alimento, estas induzem uma série de conseqüências nutricionais negativas (KIRK, 1984; KANNER, 1994), como: destruição parcial dos ácidos graxos insaturados essenciais; destruição parcial de

outros lipídios insaturados como as vitaminas A, carotenóides e tocoferóis; destruição parcial da vitamina C (co-oxidação); formação de produtos secundários da oxidação lipídica (malonaldeído e outros compostos) e compostos de Maillard, capazes de reagir com biomoléculas, especialmente proteínas, diminuindo sua absorção; irritação da mucosa intestinal por peróxidos, que provocam vômito, diarreia, diminui a capacidade de absorção e importante redução da palatabilidade do alimento; formação de lipídios oxidados que são antagonistas de diversos nutrientes como tiamina, pantotenato de cálcio, riboflavina, ácido ascórbico, vitamina B12, tocoferóis, vitamina A, proteínas, lisina e aminoácidos sulfurados.

Basicamente, a LPO consiste na incorporação de oxigênio molecular a um AGPI, produzindo um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial. Nos sistemas biológicos a LPO pode ocorrer principalmente por duas vias: uma via enzimática, envolvendo as ciclooxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos AGPI; a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de EROs, ERNs, metais de transição e outros radicais livres (AL MEHDI et al., 1993; PORTER et al., 1995).

O processo de LPO pode ser dividido em três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação (Figura 1). O começo desta reação geralmente ocorre através da abstração de átomo hidrogênio de um grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-) através do ataque de uma molécula reativa, como EROs, metais, ou outros radicais livres, formando um radical centrado em carbono. Este, por sua vez, promoverá um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado, o qual pode reagir com moléculas de oxigênio, formando um radical peroxil (ROO•). A partir da formação deste radical ocorre a fase de propagação, devido à sua capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de outros grupos metilenos de cadeias adjacentes (transformando-se em um peróxido lipídico). Estes sofrerão processos de rearranjo molecular, formação de dienos conjugados e, posteriormente, ataque de moléculas de oxigênio, formando um novo ROO•. Este reinicia o processo, gerando uma reação oxidativa em cadeia (Figura 1) (HALLIWELL, B & GUTTERIDGE, 2007).

Ao mesmo tempo, quando o átomo de hidrogênio é abstraído das cadeias adjacentes pela reação com  $\text{ROO}\cdot$ , forma-se um peróxido lipídico ( $\text{ROOH}$ ) (Figura 1). Este peróxido é geralmente estável sob temperatura fisiológica, mas na presença de íons metálicos pode iniciar um novo tipo de reação em cadeia, quebrando a ligação O-O e formando um radical alcoxil ( $\text{ROH}\cdot$ ) (HALLIWELL, B & GUTTERIDGE, 2007).



Estes radicais alcoxilas também podem abstrair átomos de hidrogênio, tanto de outros peróxidos como de grupos metilenos de ácidos graxos poliinsaturados, continuando as reações em cadeia. Outro grande problema destas reações é a oxidação de metais de transição, tais como o  $\text{Fe}^{3+}$ , que também pode reagir com peróxidos lipídicos formando radicais peroxilas e  $\text{Fe}^{2+}$ , em um ciclo autosustentável de propagação (HALLIWELL, B & GUTTERIDGE, 2007):



Vários fatores contribuem para o término deste processo cíclico de lipoperoxidação, tais como a neutralização desses inúmeros radicais por antioxidantes, formação de produtos não radicalares, consumo dos reagentes, dentre outros.

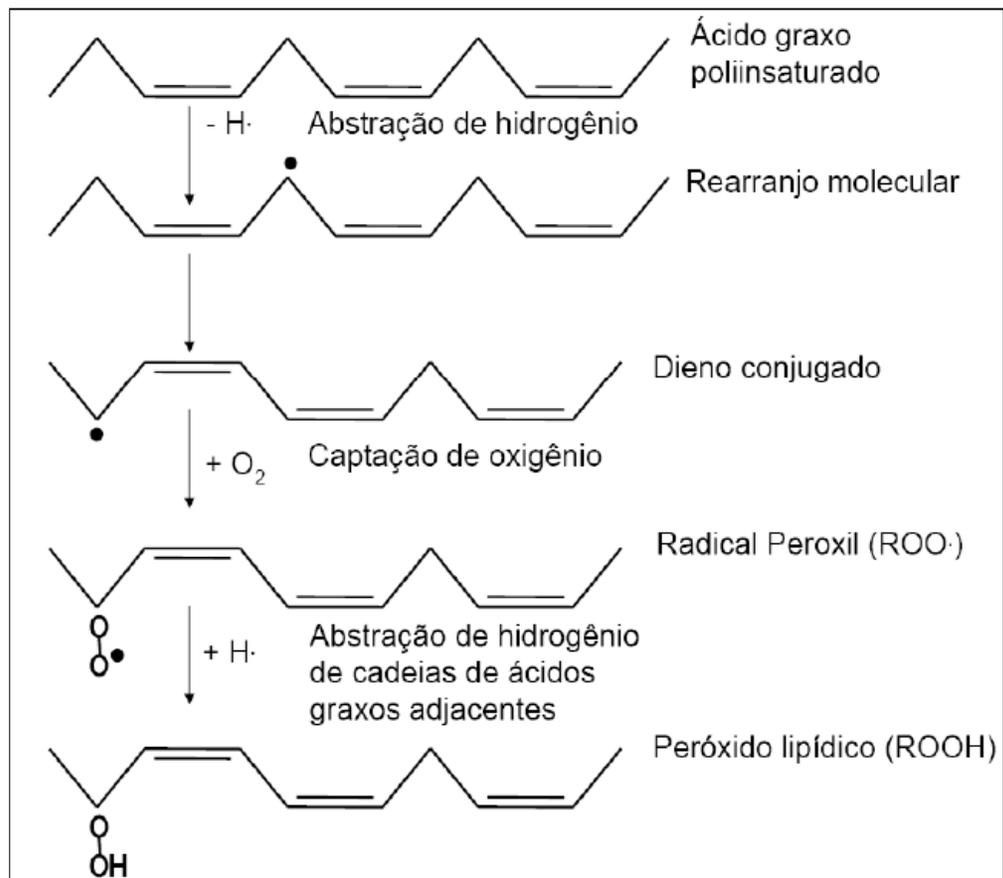


Figura 1: Reações envolvidas na peroxidação lipídica. A abstração de átomos de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado (neste esquema representado por três ligações duplas) leva à formação de um dieno conjugado por rearranjo molecular. Esta molécula pode sofrer o ataque de oxigênio, formando um radical peróxil. Este radical pode continuar o ciclo de lipoperoxidação através da abstração de átomos de hidrogênio de cadeias poliinsaturadas próximas, transformando-se em um peróxido lipídico. (HALLIWELL et al., 2007)

#### II.IV Métodos de Avaliação do Estresse Oxidativo

Os testes para medir a atividade anti-radical livre em alimentos e sistemas biológicos podem ser divididos em dois grupos: métodos diretos e métodos indiretos. Os diretos avaliam a peroxidação lipídica, sob condições padronizadas usa-se um substrato (lipídico, lipoproteína) e mede-se o grau de inibição da oxidação, sendo os mais utilizados o TBARS (substâncias reativas ao ácido

tiobarbitúrico) e dienos conjugados (ROGINSKY & LISSI, 2005). Os métodos indiretos medem a habilidade de aprisionar (scavenger) radicais livres e podem ser empregados na avaliação da capacidade anti-radical livre de compostos puros e de extratos complexos. Devido à estabilidade, facilidade de manipulação e simplicidade de procedimento, os radicais mais utilizados são derivados do 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH•) e do ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS) (ROGINSKY & LISSI, 2005).

Uma das técnicas mais empregadas para a determinação da oxidação de lipídios é a determinação do produto final da reação: o malondialdeído ou malonildialdeído (MDA). A introdução deste método para determinação da LPO ocorreu em 1944 por Kohn & Liversedge, tornando-se um método simples e barato, porém de pouca especificidade. O MDA é um aldeído formado como produto secundário durante a oxidação de AGPI por cisão beta dos ácidos graxos poliinsaturados peroxidados. O MDA tem as seguintes características físico-químicas: volatilidade, baixo peso molecular ( $C_3H_4O_2$ ; PM = 72,02) e pKa 4,46. Em condições favoráveis, como pH ácido e aquecimento (80-100 °C) o MDA reage com agentes nucleofílicos para produzir cromógenos com alta absorvidade molar no espectro visível. A condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e formação do produto róseo MDATBA na proporção de 1:2 pode ser monitorada através da absorção no espectro visível com comprimento de onda de 532 nanômetros (Figura 2).

Esta reação tornou-se muito conhecida pelo nome de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês TBARS) e representa a maioria dos métodos que utilizam o TBA como agente cromógeno (LIMA & ABDALLA, 2001; ROGINSKY & LISSI, 2005). O método é aplicável à determinação da extensão da LPO em amostras biológicas e em ensaios in vitro, sendo considerado útil e satisfatório.

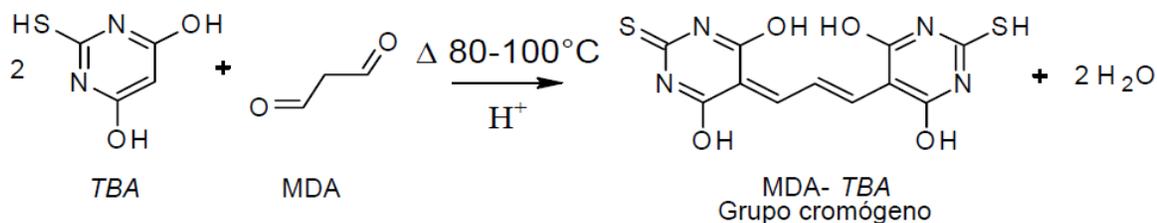


Figura 2 – Reação TBARS

Apesar de frequentemente usado, o teste do TBA apresenta limitações, tornando necessárias algumas precauções quanto ao significado atribuído às determinações realizadas: o MDA forma-se unicamente a partir dos ácidos graxos possuindo pelo menos três duplas ligações; o MDA não é o único produto de oxidação dos lipídios que reage com o TBA: os 4-hidroxiacetaldeídos, os 2,4-diacetaldeídos e os 2-acetaldeídos formam igualmente um cromógeno. Por essa razão parece preferível falar em “substâncias que reagem com o TBA” (TBARS) (BERSET, 1996); a falta de especificidade do teste não se limita aos compostos anteriormente referidos. Particularmente quando o teor de MDA é baixo, outros aldeídos não provenientes do processo de degradação dos lipídios podem reagir com o TBA (e.g. acetaldeído e compostos da reação de Maillard). Os açúcares, nomeadamente a sacarose e a glicose, interferem exercendo um forte efeito sinérgico na formação de TBARS, sobrestimando dessa forma a extensão da oxidação. Por outro lado, o MDA pode não reagir com o TBA devido à sua complexação com proteínas, aminas e outros compostos (FRANKEL, 1993; BERSET, 1996; WONG et. al., 1995).

Pelo anteriormente exposto, parece conveniente estabelecer uma correlação entre os valores de TBARS e os resultados da avaliação de outros métodos.

Outro método existente é o Sequestro do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•). Esse método consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade

sequestradora do radical livre DPPH•. O radical DPPH• possui coloração púrpura absorvendo um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção de luz que pode ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (Figura 3). Os radicais livres de DPPH•, que inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétron livre, perdem esta cor quando um radical hidrogênio doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH•, diminuindo-se, assim, a absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (CHANDRASEKAR et al, 2006; KIM & THOMAS, 2006; RAYMUNDO et al, 2004). A baixa absorbância indica atividade sequestrante de radicais livres (SOUSA et al, 2007). O DPPH é um radical estável e com baixa taxa de deterioração e reatividade com a maioria dos compostos. Assim sendo, apenas reagentes redutores fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis em um modo estequiométrico.

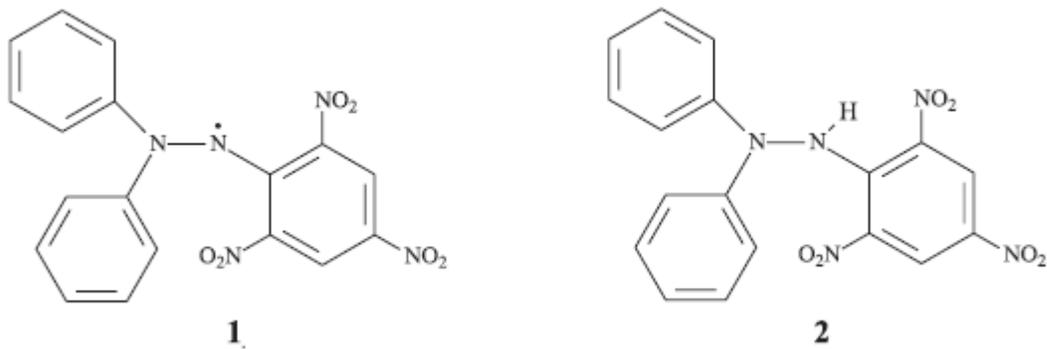


Figura 3 – Reação do DPPH. 1- Forma radicalar; 2 – Forma reduzida

Embora este seja um teste largamente utilizado, tanto pela simplicidade e rapidez quanto pela reprodutibilidade, os resultados devem ser cuidadosamente interpretados. As substâncias analisadas podem interferir nos resultados caso seus espectros se sobreponham ao do DPPH ao redor de 515 nm como, por exemplo, os carotenoides. Sendo a acessibilidade estérica o fator determinante da reação, moléculas pequenas que têm melhor acesso ao sítio do radical podem apresentar uma maior atividade aparente quando comparada às moléculas maiores (PRIOR et. AL, 2005).

Em outro ensaio proposto pelo, o radical cátion ABTS•+ foi obtido em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentando máximos de absorção a 417, 645, 734 e 815 nm. Na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, pode medir-se a diminuição da formação deste radical por espectrofotometria (SILVA et al, 1999). O teste se baseia na formação do radical cátion ABTS•+ [2,2'- azino-di-(3-etilbenzotiazolina sulfonato)], de coloração verde-azulada e sua remoção (pelos constituintes da amostra, isto é, soro sanguíneo, medicamento ou alimento) é medida por espectrofotometria. O ABTS é incubado com a enzima metahemoglobina peroxidase, produzindo o radical ABTS•+ (reações 1 e 2), que apresenta coloração azul-esverdeada estável (FERRARI, 2008; RICE-EVANS, 2000).



Mb = mioglobina

A adição da amostra produz a inibição na produção do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , promovendo a diminuição na absorbância (Figura 4). A absorbância é inversamente associada com o conteúdo de antioxidantes da amostra. Também é possível determinar a quantidade de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  consumida devido a reação com amostras contendo compostos fenólicos, que foi expressa em Trolox equivalentes (unidades de concentração). Esse valor foi designado como TEAC (Capacidade antioxidante trolox equivalente), fornecendo uma estimativa da quantidade de moléculas de radicais consumidas pelo antioxidante (CAMPOS & LISSI, 1997). Os resultados são expressos em mmol de equivalentes de Trolox (ET)/L (sangue ou fluidos) ou em  $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$  de amostra (alimento ou amostra sólida). Por sua relativa simplicidade e elevada qualidade analítica, o kit TEAC, comercializado com o nome de “capacidade antioxidante total” (TAC), é largamente empregado em todo mundo (FERRARI, 2008; RICE-EVANS, 2000).

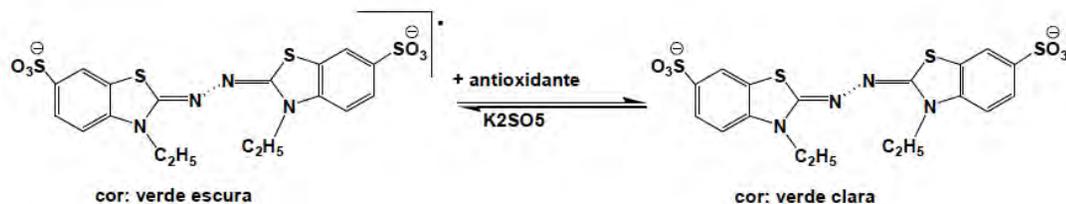


Figura 4 - Estabilização do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Adaptada de SOUSA et al, 2007.

## II.V Antioxidantes Naturais

Pesquisas envolvendo compostos antioxidantes oriundos de fontes naturais têm sido desenvolvidas em diferentes centros de estudos devido a sua importância na prevenção do desencadeamento das reações oxidativas, tanto nos alimentos como no organismo animal. No século passado, a partir dos anos 80, deu-se início às pesquisas com antioxidantes naturais visando à substituição total ou parcial dos antioxidantes sintéticos, aos quais se atribuem efeitos deletérios ao organismo animal quando utilizados em doses elevadas (DURAM & PADILLA, 1993). Além dos possíveis riscos que o uso irregular e/ou indiscriminado dos antioxidantes sintéticos pode acarretar ao homem, soma-se a rejeição generalizada da população aos aditivos alimentares sintéticos. Ênfase tem sido dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, oriundos de fontes naturais, que possam agir sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como uma forma de prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e tornar possível a redução da utilização dos antioxidantes sintéticos (SHAHIDI et. al, 2007).

Compostos típicos que possuem atividade antioxidante incluem a classe de fenóis, ácidos fenólicos e seus derivados, flavonóides, tocoferóis, fosfolipídios, aminoácidos, ácido fítico, ácido ascórbico, pigmentos e esteróis (XING & WHITE, 1996). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se, principalmente, às suas propriedades redutoras e à estrutura química, que desempenham papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo assim tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002; SOUSA et.al, 2007). Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOARES, 2002).

### II.V.I Óleo de Cajú

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), planta disseminada em todo o mundo tropical, vem despertando interesse cada vez maior na região Nordeste do Brasil devido, principalmente, a geração de emprego e renda. O líquido da castanha de caju, ou óleo de cajú é uma fonte natural de compostos de cadeia fenólica longa e insaturada (KUMAR et al., 2002). O líquido proveniente da extração com solventes é constituído principalmente de ácido anacárdico (60-65%), cardol (15-20%), cardanol (10%) e traços de 2-metil cardanol. O líquido técnico proveniente da queima das castanhas é constituído por cardanol (60-65%), cardol (15 -20%), material polimérico (10%) e traços do 2-metil cardol. Dependendo das condições do processo de queima a composição do líquido técnico da castanha de caju pode mudar de composição e chegar a uma alta porcentagem de cardanol (83 -84%), com menos cardol (8-11%) mas mantendo as quantidades de material polimérico e o índice do 2-metil cardol (2%). O ácido anacárdico é termicamente instável e é facilmente descarboxilado durante o processo de extração por aquecimento, quando é transformado em cardanol (KUMAR et. al, 2002). Estes lipídeos fenólicos apresentam o núcleo do ácido salicílico e uma cadeia lateral de 15 carbonos, que pode conter uma, duas ou três ligações insaturadas (AGOSTINI et al., 2008).

O ácido anacárdico e o cardol são os dois componentes do óleo de caju com ação antimicrobiana (NAGABHUSA et al., 1995). O cardanol tem atividade tanto antiinflamatória como antioxidante (AMORATTI et al., 2001; TREVISAN et al., 2006). A maioria dos antioxidantes de plantas superiores são polifenóis, que mostram também atividades biológicas do tipo antibacteriana, anticarcinogênica, antiinflamatória, antialérgica, estrogênica e imuno-estimulante. As propriedades antioxidantes dos fenóis são devidas as suas propriedades de oxirredução, que permitem a eles agirem como agentes redutores, doadores de hidrogênio e eliminador de oxigênio singlete (GUERRA, 2001).

## II.V.II Óleo de Mamona

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma planta pertencente à família das Euforbiáceas, a mesma da mandioca, da seringueira e do pinhão manso. É originária provavelmente da África ou da Índia, sendo atualmente cultivada em diversos países do mundo, sendo a Índia, a China e o Brasil, nesta ordem, os maiores produtores mundiais (EMBRAPA, 2012). O principal produto da mamoneira é seu óleo, que possui propriedades químicas peculiares que lhe fazem único na natureza. Estas características são conferidas pelo ácido graxo ricinoleico, que tem larga predominância na composição do óleo (cerca de 90%). Este possui uma hidroxila (OH), o que lhe confere propriedades como alta viscosidade, estabilidade física e química e solubilidade em álcool a baixa temperatura (EMBRAPA, 2012). Cerca de 90% do óleo de mamona é composto por triglicerídeos esterificados com ricinoleína, o componente do ácido ricinoléico cuja fórmula molecular é  $C_{17}H_{32}OHCOOH$ . O ácido ricinoléico tem ligações insaturadas e pertence ao grupo dos hidroxiácidos, caracterizando-se por seu alto peso molecular (298) e baixo ponto de fusão ( $5^{\circ}C$ ). O grupo hidroxila presente na ricinoleína confere ao óleo de mamona a propriedade exclusiva de solubilidade em álcool (WEISS, 1983; MOSHKIN, 1986).

Quimicamente, o ácido ricinoléico é um ácido graxo muito parecido ao ácido oléico, sendo a única diferença um radical hidroxila presente no ácido ricinoléico e ausente no oléico. Por este motivo o ácido ricinoléico é também chamado hidroxiloléico. O ácido ricinoléico funciona como um ionóforo divalente e embora existam poucos trabalhos da ação do ácido ricinoléico como antiinflamatório, pesquisas mostraram ação antiinflamatória ocular quando usado continuamente (VIEIRA et. al, 2001).

## II.VI Óleo de Peixe

O óleo de Peixe contém os ácidos eicosapentahenóico (EPA) e docosaexahenóico (DHA), pertencentes à família ômega 3 ( $\omega$ -3) e desempenham papéis importantes no desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso central (MACLEAN et.al, 2005), produzindo efeitos benéficos em doenças associadas a reações inflamatórias, como artrite reumatoide ou doença intestinal inflamatória (ROMBEAU & ROLANDELLI, 2005) e auxiliando no tratamento e prevenção de doenças do coração e câncer. A base de sua ação consiste no fato destes reduzirem a concentração de mediadores proinflamatórios produzidos nas células (MORAES & COLLA, 2006). O EPA e o DHA também parecem atuar na prevenção da doença de Alzheimer em humanos (FETT, 2001; MORAES & COLLA, 2006). O óleo de peixe tem sido atualmente largamente ingerido como forma não farmacológica de se corrigir ou prevenir algumas doenças citadas anteriormente, mas os ácidos graxos  $\omega$ -3 devem ser consumidos em uma proporção equilibrada (MORAES & COLLA, 2006). Existem preocupações quanto à possibilidade de aumento da peroxidação lipídica em razão da suplementação exagerada com óleo de peixe (PEDERSEN et.al, 2003).

De acordo com Pacheco (2005), os ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3 são mais propensos à oxidação por apresentarem muitas duplas ligações que atuam como alvo para o ataque de espécies reativas de oxigênio. Estudos evidenciaram que gorduras oxidadas e produtos da peroxidação lipídica (hidroperóxidos lipídicos) na dieta podem contribuir para o aparecimento de doenças, uma vez que esses compostos são absorvidos pelo intestino e transportados pela corrente sanguínea. Os ácidos graxos  $\omega$ -3 incorporados na membrana das células e oxidados por radicais livres podem danificar outros lipídeos, proteínas e também DNA celular, levando até mesmo ao processo de apoptose (GONZÁLEZ & RIORDAN, 1996). Além disso, os produtos da peroxidação lipídica podem também atuar como indutores da carcinogênese (PACHECO, 2005).

O ácido linoléico, presente no óleo de girassol, pertencente ao grupo dos ácidos graxos ômega 6, é transformado pelo organismo humano no ácido araquidônico e em outros ácidos graxos poliinsaturados. Os ômega 6 derivados do ácido linoléico exercem importante papel fisiológico: participam da estrutura de membranas celulares, influenciando a viscosidade sanguínea, permeabilidade dos vasos, ação antiagregadora, pressão arterial, reação inflamatória e funções plaquetárias (MORAES & COLLA, 2006).

Assim, apesar de existirem muitos benefícios relatados com a ingestão de óleo de peixe há a necessidade de se investigar se a suplementação crônica com esse óleo pode fornecer substrato para a peroxidação lipídica em órgãos metabólicos importantes, e com isso, oferecer risco para a saúde. São necessários mais estudos para se definir os limites seguros de seu emprego, entendendo também que riscos oxidativos este poderia ocasionar em animais saudáveis.

### III MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no canil de pesquisas do Laboratório de Pesquisas em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Jaboticabal. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV/UNESP. (Protocolo: 010074/11, Apêndice 1).

#### III.I Animais e delineamento experimental

Foram utilizados 40 cães adultos da raça Beagle, com idade média de  $4,9 \pm 2,85$  anos, peso médio de  $12,4 \pm 1,55$  Kg e Escore de Condição Corporal (ECC)  $4,7 \pm 0,46$  distribuídos em um delineamento de blocos casualizados, com dois blocos de 20 animais, cinco tratamentos e oito repetições por tratamento. Cada bloco experimental teve duração de 114 dias, sendo 30 dias de adaptação e 84 dias de tratamento. A distribuição entre os tratamentos foi organizada de modo a se balancear diferenças de sexo, idade e escore corporal. Todos os animais foram devidamente vermifugados e submetidos ao exame clínico, antes do início do estudo, demonstrando bom estado de saúde. Adicionalmente, uma amostra de 10mL de sangue foi obtida por venipunção da jugular para a realização do hemograma e determinação do perfil bioquímico e enzimático sérico, com a finalidade de atestar a saúde de todos os animais.

Durante o experimento os cães foram alojados em canis de 1,5m por 3,5m, com solário. Água de bebida foi disponibilizada *ad libitum*. Os cães eram soltos em terreno gramado (200m<sup>2</sup>) das 7:30 da manhã, e permaneciam até as 10:30, horário da alimentação.

Durante o período experimental, os animais receberam a mesma ração comercial antes do início do estudo, por um período de 30 dias, para padronização do status oxidativo (Tabela 1; Sabor & Vida® cães adultos, Mogiana Alimentos

S.A., Campinas, SP). No momento inicial (dia 0) e mensalmente (dias 28, 56 e 84), até o término do estudo, após jejum de 24 horas, uma amostra de 13mL de sangue foi obtida por venipunção da jugular para a determinação do status oxidativo sérico, centrifugada a 4°C por 15 minutos e armazenada em freezer – 80°C.

Os cães foram alimentados de modo a manterem constante seu peso corporal, oferecida uma vez ao dia as 10:30 da manhã. Para isto, a necessidade energética inicial dos animais foi calculada inicialmente pela seguinte fórmula:  $NEM = 125 \times \text{Peso}^{0,75}$  Onde: NEM – necessidade energética de manutenção; 125: média verificada pelo canil;  $\text{Peso}^{0,75}$  – peso metabólico.

Ajustes individuais nas quantidades de alimento fornecido foram realizados mensalmente, com o intuito de manter do peso corporal dos cães.

Tabela 1: Composição química da dieta comercial (Sabor & Vida®, Mogiana Alimentos S.A., Campinas, SP).

Composição química (% na MS)	
Matéria seca	91,85
Proteína bruta	23,3
Extrato etéreo	13,96
Matéria fibrosa	1,93
Matéria mineral	10,05
Energia metabolizável (kcal/100g MS) <sup>1</sup>	400,3

<sup>1</sup> Energia metabolizável estimada de acordo com a composição química do alimento (NRC, 2006).

### III.I.I Simulação de estresse por transporte

Ao final do experimento, os animais foram submetidos a um transporte, visando mimetizar uma situação de estresse. Os cães foram alojados aos pares em caixas de transporte medindo 1,0m por 1,5m, colocados em carreta acoplada a um trator e transportados pelo período de 15 minutos no período após as 14:00 horas. Foi coletada amostra de sangue após 3 horas do transporte para avaliação

de estresse oxidativo. Esperava-se um aumento na oxidação com possível ação antioxidante sérica.

### **III.II Dietas experimentais**

Foi formulado um alimento cuja composição química atendeu as recomendações nutricionais para cães em manutenção da AAFCO (2004) e estão descritas na Tabela 2. Estas ficaram assim dispostas:

Controle (CN) – Com óleo de girassol 0,5%.

Óleo Caju (OCA) – Com óleo de girassol 0,5% e óleo de caju 0,06%.

Óleo de mamona (OMA) – Com óleo de girassol 0,5% e óleo de mamona 0,018%.

Óleo de Caju e Óleo de Mamona (OCAOMA) – Com óleo de girassol 0,5% e associação de óleos de caju e mamona em apresentação em pó 0,015%.

Óleo de Peixe (PEIXE) – Com óleo de peixe 0,5% em substituição ao óleo de girassol.

As rações experimentais foram produzidas na Fábrica de Ração do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal (FCAV/UNESP). Os ingredientes das foram selecionados e misturados após avaliação de índice de peróxidos, BHA e BHT dos ingredientes de origem animal (farinha de vísceras e óleos). Os óleos foram adicionados à mistura antes da extrusão. As rações foram moídas previamente à extrusão em moinho com peneira de 0,8mm e em seguida extrusadas (Extrusora MAB 400S, com capacidade de processamento de 150 kg de ração/hora). Todas as condições de processamento foram controladas (produtividade e pressão interna da máquina, temperatura de extrusão, temperatura de secagem, umidade do extrusado, densidade do extrusado, umidade da ração após a secagem e

atividade de água da ração seca), procurando-se manter as mesmas condições de processamento para todas as rações. Os óleos de caju, mamona, girassol e de peixe foram acrescentados aos ingredientes no momento da mistura, antes da moagem e extrusão.

Tabela 2. Formulações dos alimentos utilizados no experimento

<b>Ingredientes</b>	<b>CN<sup>1</sup></b>	<b>OCA</b>	<b>OMA</b>	<b>OCAOMA</b>	<b>PEIXE</b>
Milho Grão	49,44	49,44	49,44	49,44	49,44
Milho Gluten	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Farelo trigo	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Farinha de Vísceras de Aves 10%	26,10	26,10	26,10	26,10	26,10
Gordura de Aves	9,52	9,52	9,52	9,52	9,52
Cloreto de colina	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Cloreto de potássio	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
sal comum	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Premix min/vit <sup>2</sup>	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Óleo de Girassol	0,5	0,5	0,5	0,5	0
Óleo de Peixe	0	0	0	0	0,5
Óleo de Caju	0	0,06	0	0	0
Óleo de Mamona	0	0	0,018	0	0
Essential Oil® em pó <sup>3</sup>	0	0	0	0,15	0
Palatabilizante Líquido	2,00	2,00	2,00	2	2
Palatabilizante pó	1	1	1	1	1
Antifúngico <sup>4</sup>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Antioxidante <sup>5</sup>	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
<b>Composição química analisada das dietas</b>					
Umidade (%)	5,55	6,7	5,16	3,8	4,65
Proteína Bruta (%)	26,47	27,31	27,63	28,06	27,89
Extrato Etéreo Hidrólise Ácida (%)	14,69	14,49	15,58	15,66	14,88
Fibra bruta (%)	1,9	1,88	1,7	2,1	2
Matéria Mineral (%)	6,4	6,2	6,5	6,3	6,7
Energia Metabolizável (Kcal/g) <sup>6</sup>	3,97	3,93	4,05	4,08	4

<sup>1</sup>CN – controle; OCA – óleo de caju; OMA – óleo de mamona; OCAOMA – óleo de caju e mamona associados em pó (Essential oil); PEIXE – óleo de peixe <sup>2</sup> Adição por quilograma de produto: Ferro 100 mg,

Cobre 10 mg, Manganês 10 mg, Zinco 150 mg, Iodo 2 mg, Selênio 0,3 mg, Vitamina A 18000 UI, Vit. D 1200 UI, Vit. E 200 UI, Tiamina 6 mg, Riboflavina 10 mg, Ácido pantotênico 40 mg, Niacina 60 mg, Piroxidina 6 mg, Ácido fólico 0,30 mg, Vit. B12 0,1 mg. <sup>3</sup>Essential Oil®, Óleo de caju e óleo de mamona, Oligabasics, Cascavel, Brasil. <sup>4</sup> Mold Zap Aquativa, Alltech Brasil Agroindustrial Ltda: propionato de amônio, propanodiol, ácido propiônico, ácido acético, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido fórmico, sorbato de potássio, veículo q.s.p. <sup>5</sup> BHT <sup>6</sup> Estimada de acordo com recomendações do NRC (2006)

### **III.III Mensuração da capacidade antioxidante do soro sanguíneo**

Foi realizada uma série de testes laboratoriais para avaliar o estresse oxidativo dos animais com a ingestão das dietas experimentais. Estas análises foram realizadas no Laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal Reprodução, no Laboratório de Pesquisas do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária e no Laboratório do Departamento de Patologia Animal, todos da FCAV/UNESP/Jaboticabal.

#### **III.III.I Ácido tiobarbitúrico – TBARS**

Este método foi realizado conforme descrito por Paya et al. (1992). A extensão da degradação dos lipídeos pelo ataque de radicais livres pode ser indiretamente medida por este método, que consiste na reatividade dos produtos finais da lipoperoxidação, especialmente o malondialdeído e outros aldeídos, com o ácido tiobarbitúrico, produzindo cromógenos que podem ser medidos espectrofotometricamente entre 520-540nm. Foram separadas duas amostras de soro de cada animal. Foi adicionada à primeira 2mL da solução de TBARS-RL (15% de Ácido Tricloroacético, 0,275% de Ácido Tiobarbitúrico e 0,25M de Ácido Clorídrico). Em seguida, os tubos foram levados à ebulição por 15 minutos em banho-maria e, então, resfriados por 15 minutos em gelo moído acondicionado em caixa térmica de isopor e centrifugados por 15 minutos a 1200G, formando um precipitado. O sobrenadante foi analisado ao espectrofotômetro UV-visível. O cromógeno desenvolvido foi identificado por meio de leituras de absorvância em um comprimento de onda fixo de 532nm conforme metodologia descrita por Paya

et al. (1992) determinando a quantidade de lipoperoxidação na amostra. À segunda amostra foi adicionada 2mL de solução de TBARS-SG (15% de Ácido Tricloroacético, 0,375% de Ácido Tiobarbitúrico, 0,25M de Ácido Clorídrico, 0,24mM de Cloreto de Ferro e 50 $\mu$ M de Hidroxitoluenobutilado). Esse procedimento foi denominado de sistema gerador e tem a mesma função do sistema gerador para o radical  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ . Os tubos passaram pelo mesmo procedimento dos tubos anteriores. Os resultados de mensuração de lipoperoxidação foram expressos em absorbância.

### **III.III.II Capacidade antioxidante total (TAC)**

Essa é uma técnica utilizada para mensuração de radicais totais em culturas celulares, tecidos, plasma e soro. Foi utilizado kit específico (Antioxidant Assay Kit, CS0790, Sigma, São Paulo, Brasil), cujo princípio é a indução *in vitro* da formação dos radicais ferril mioglobina, metmioglobina e peróxido de hidrogênio que oxidam o ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) levando a produção de um radical cátion  $ABTS^+$ , um cromógeno solúvel de coloração esverdeada que pode ser determinado pelo espectrofotômetro num comprimento de 405nm. Desta forma, a presença de antioxidantes na amostra inibe parcialmente a oxidação do ABTS. Para o teste, as soluções estoques foram preparadas de acordo com o boletim técnico que acompanha o Kit da seguinte maneira: o tampão foi diluído a 10X; solução estoque de mioglobina (adicionado 285 $\mu$ L de água e estocado a menos 20°C); solução trabalho (1 $\mu$ L de estoque de mioglobina em 99 $\mu$ L de tampão, no momento da utilização); solução trabalho de Trolox (adicionado 2,67mL de tampão 1X, estocado a -20°C); solução ABTS (adicionado um tablete de ABTS mais um tablete de fosfato mais 100mL de água, estocado a 4°C); solução trabalho 10 $\mu$ L da solução de ABTS mais 25 $\mu$ L de peróxido de hidrogênio a 3% que deve ser utilizado em 20 a 30 minutos. O plasma foi descongelado a temperatura ambiente e centrifugado a 2000g por 10 minutos a

4°C, removendo-se o sobrenadante para continuar o procedimento.

O procedimento foi realizado em placas de 96 poços sendo adicionados sobre o sobrenadante 10µL da solução trabalho de Trolox, 20µL da solução trabalho de mioglobina, 150µL de solução trabalho de ABTS. Passados dois minutos, período de incubação em temperatura ambiente foi adicionado 100µL de solução STOP que se encontrava em temperatura ambiente. Em seguida, foi efetuada a leitura em absorvância de 405nm. Para o conhecimento das concentrações de antioxidante foi construída uma curva padrão com a expressão dos resultados em equivalentes de TROLOX (análogo hidrossolúvel da vitamina E).

### **III.III.III Sequestro do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)**

A atividade doadora de hidrogênio pelos antioxidantes do soro foi avaliada através da capacidade de sequestração do radical DPPH• seguida por espectrofotômetro UV-visível. O radical DPPH• em solução metanólica tem um máximo de absorvância a 517 nm, sendo a sua forma reduzida de cor amarela. Efetuou-se uma mistura de 0,5 mL de soro e 0,5 mL de acetona que foi homogeneizada em vortex por 1 minuto; em seguida centrifugou-se esta mistura durante 5 min, à velocidade de 3600 rpm para a desproteinização da amostra. O sobrenadante foi filtrado numa pipeta Pasteur com enchimento de algodão de forma a remover pequenas partículas de precipitado não separadas por centrifugação. Uma solução de DPPH• em metanol a 0,1mM (0,0039 g/100 mL) foi preparada por dia de teste, ficando incubada no escuro por 30 minutos antes de ser utilizada. Foi mantida armazenada em geladeira e protegida da luz. Seguidamente adicionou-se 400 µL da solução em 360 µL de PBS e 40 µL do sobrenadante filtrado homogeneizados em vortex. A mistura foi feita no momento zero da leitura. Foram feitas leituras em espectrofotômetro UV-visível com absorvância a 505 nm, nos momentos zero, 5, 10, 15 e 20 minutos após a mistura.

A inibição do radical DPPH• foi calculada como a diferença relativa percentual entre a absorvância da amostra e a de um branco de 400 µL de solução metanólica de DPPH e 400 µL de PBS. Água destilada foi utilizada para a calibragem do aparelho. A atividade sequestrante (%ASRL) ou porcentagem de descoloração (% descoloração) foi expressa em porcentagem por comparação a um controle ou branco, segundo a seguinte equação:

$$\%ASRL (\% \text{ descoloração}) = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

Onde, Ac: absorvância controle ou branco; At: absorvância teste (amostra).

### **III.IV Análise estatística**

O estudo apresentou um delineamento inteiramente casualizado em um esquema de medidas repetidas no tempo, utilizando para as análises, cinco tratamentos e oito cães por tratamento, totalizando 40 animais. Foram comparados os efeitos dos tratamentos, períodos e interação entre ambos. Os dados foram inicialmente analisados quanto à distribuição Normal e igualdade de Variâncias, antes da realização da análise de Variância (ANAVA). As variáveis que não apresentaram Distribuição Normal (DPPH nos diferentes momentos de avaliação) foram transformadas para a escala logarítmica ( $\log x + 1$ ), antes de proceder-se a ANAVA. Posteriormente procedeu-se a ANAVA, considerando-se 5% de probabilidade e, quando significativa, os dados entre tratamentos ou períodos foram comparados pelo Teste Duncan, também considerando 5% de probabilidade. Todos os dados foram realizados com o auxílio do software estatístico SAS (Schlotzhauer e Littell, 1997).

#### **IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Não houve interação entre tratamentos e períodos no estudo, para nenhuma das variáveis estudadas. Desta forma, as médias dos tratamentos e períodos para cada uma das variáveis em estudo foram comparadas entre si. A inclusão de óleo de caju, mamona ou ambos nas dietas, assim como do óleo de peixe não modificaram os parâmetros oxidativos estudados, visto pela ausência de efeito de tratamento pela análise estatística realizada. Por outro lado, para todas as variáveis verificaram-se diferenças entre os períodos do estudo, visto pelas oscilações do status oxidativo dos animais nos diferentes momentos de coleta. Os resultados são apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5.

O protocolo de stress empregado neste estudo pareceu ser eficiente na indução de modificações nos parâmetros oxidativos. Apesar disto, não foram verificadas diferenças entre os tratamentos, mas apenas entre o status oxidativo antes ou após 3 horas de indução do stress. Estes dados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 3: Concentração Sérica de Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS-RL) e na oxidação induzida in vitro (TBARS-SG)

Item	Dietas					Médias	EPM <sup>1</sup>
	CN	OCA	OMA	OCAOMA	PEIXE		
TBARS – RL							
Dia 0	0,048	0,050	0,052	0,048	0,041	0,048a	0,0003
Dia 28	0,036	0,041	0,045	0,041	0,037	0,040b	0,0002
Dia 56	0,053	0,040	0,052	0,043	0,039	0,046 <sup>a</sup>	0,0004
Dia 84	0,033	0,043	0,041	0,042	0,034	0,039b	0,0003
Médias	0,043	0,043	0,048	0,044	0,038		
EPM <sup>1</sup>	0,0004	0,0003	0,0004	0,0004	0,0003		
TBARS – SG							
Dia 0	0,065	0,070	0,069	0,068	0,066	0,068ab	0,0003
Dia 28	0,059	0,060	0,067	0,067	0,062	0,063b	0,0002
Dia 56	0,077	0,072	0,081	0,062	0,066	0,072 <sup>a</sup>	0,0005
Dia 84	0,063	0,063	0,062	0,076	0,061	0,064b	0,0003
Médias	0,067	0,066	0,070	0,068	0,063		
EPM <sup>1</sup>	0,0004	0,0003	0,0006	0,0005	0,0003		

<sup>1</sup> – EPM = erro padrão da média, n=8 repetições por dieta

<sup>a, b</sup> – médias dos tratamentos nas colunas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Duncan (p<0,05)

Tabela 4: Atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente. Valores medidos pelo percentual de descoloração ao momento inicial.

Item	Dietas					Médias	EPM <sup>1</sup>
	CN	OCA	OMA	OCAOMA	PEIXE		
DPPH (% de descoloração)							
Dia 0	5,731	5,112	6,470	5,507	5,535	5,671a	0,0454
Dia 28	6,44	6,217	6,337	5,463	6,365	6,155a	0,0474
Dia 56	5,72	5,638	5,721	5,232	6,212	5,707a	0,0326
Dia 84	4,471	4,952	5,267	4,725	4,711	4,831b	0,0343
Médias	5,568	5,450	5,949	5,248	5,738		
EPM <sup>1</sup>	0,0589	0,0437	0,0514	0,0378	0,0642		

<sup>1</sup> – EPM = erro padrão da média, n=8 repetições por dieta

<sup>a, b</sup> – médias dos tratamentos nas colunas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ )

Tabela 5: Capacidade Antioxidante Total

Item	Dietas					Médias	EPM <sup>1</sup>
	CN	OCA	OMA	OCAOMA	PEIXE		
TAC							
Dia 0	0,417	0,302	0,358	0,326	0,364	0,353b	0,0039
Dia 28	0,453	0,367	0,389	0,259	0,307	0,356b	0,0040
Dia 56	0,462	0,490	0,550	0,489	0,462	0,491a	0,0044
Dia 84	0,463	0,463	0,435	0,470	0,444	0,455a	0,0042
Médias	0,449	0,403	0,433	0,387	0,395		
EPM <sup>1</sup>	0,0051	0,0054	0,0060	0,0059	0,0050		

<sup>1</sup> – EPM = erro padrão da média, n=8 repetições por dieta

<sup>a, b</sup> – médias dos tratamentos nas colunas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ )

Tabela 6: Capacidade antioxidante total, Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS-RL) e oxidação induzida in vitro (TBARS-SG) e DPPH no dia 84 e no estresse de transporte .

Item	Dietas					Médias	EPM <sup>1</sup>
	CN	OCA	OMA	OCAOMA	PEIXE		
TBARS-RL							
Dia 84	0,029	0,041	0,032	0,039	0,039	0,036b	0,0004
Transporte	0,043	0,032	0,050	0,061	0,050	0,047 <sup>a</sup>	0,0008
Médias	0,036	0,037	0,041	0,050	0,044		
EPM <sup>1</sup>	0,0013	0,0011	0,0015	0,0021	0,0024		
TBARS-SG							
Dia 84	0,058	0,066	0,057	0,062	0,067	0,062b	0,0003
Transporte	0,062	0,063	0,097	0,111	0,090	0,085a	0,0020
Médias	0,060	0,064	0,077	0,086	0,077		
EPM <sup>1</sup>	0,0011	0,0010	0,0058	0,0044	0,0033		
DPPH (% descoloração)							
Dia 84	4,992	5,542	5,080	5,087	4,538	5,024b	0,0590
Transporte	6,195	6,932	6,725	5,212	6,307	6,272 <sup>a</sup>	0,0825
Médias	5,594	6,237	5,902	5,150	5,201		
EPM <sup>1</sup>	0,2101	0,1767	0,2670	0,1033	0,1720		
TAC							
Dia 84	0,507	0,536	0,515	0,511	0,554	0,526	0,0067
Transporte	0,736	0,485	0,512	0,489	0,482	0,544	0,0076
Médias	0,622	0,511	0,514	0,500	0,527		
EPM <sup>1</sup>	0,0207	0,0159	0,0179	0,0171	0,0162		

<sup>1</sup> – EPM = erro padrão da média, n=8 repetições por dieta

<sup>a, b</sup> – médias dos tratamentos nas colunas sem uma letra em comum diferem pelo teste de Duncan ( $p < 0,05$ )

Embora não tenha sido verificado efeito de tratamento para os parâmetros estudados, o tratamento com óleo de peixe apresentou os menores valores de TBARS ( $p=0,06$ ), com uma tendência a redução neste parâmetro.

O efeito anti-inflamatório dos óleos de caju, mamona e óleo de peixe tem sido verificado em estudos anteriores. No entanto, neste estudo buscou-se verificar os efeitos destes óleos sobre o status oxidativo de cães. Apesar de aparentemente distintas estas funções no organismo, MOREIRA e MANCINI-FILHO (2003) demonstraram que especiarias comumente empregadas na alimentação, ricas em compostos fenólicos, foram eficientes em inibir os processos oxidativos em ratos e um dos mecanismos verificados para a inibição da lipoperoxidação foi por meio da redução da atividade de enzimas cicloxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX), as quais estão envolvidas na síntese de mediadores inflamatórios no organismo pela oxidação do ácido araquidônico, gerando produtos de oxidação lipídica.

Os mecanismos de defesa antioxidante do organismo foram evoluindo ao longo dos anos para limitar os danos promovidos pelos ataques intra ou extracelulares dos radicais livres. O organismo apresenta dois principais sistemas de ação antioxidante, que são o enzimático, representado por enzimas como a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e NADPH quinona oxidoreductase, além de enzimas de reparo, e o sistema não enzimático, representado por vitaminas E e C, carotenóides, flavonóides, proteínas plasmáticas, selênio, glutathione, clorofilina e aminoácidos, entre outros (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

Os óleos de caju e mamona empregados nesta pesquisa apresentam como principais compostos antioxidantes o cardanol e ácido ricinoléico, respectivamente. O cardanol é um composto fenólico que atua pelo sequestro direto dos radicais livres, tanto em meio lipofílico quanto hidrofílico, por meio da doação de íons hidrogênio. Graças a este mecanismo de ação, os compostos

fenólicos apresentam importante função inibindo a reação em cadeia (fase de propagação) promovida pelos radicais livres (RODRIGUES et al., 2006). Apesar disto, os compostos fenólicos não atuam em todos os tipos de processos oxidativos e podem atuar como substâncias pró-oxidantes dependendo da dose empregada (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Embora os mecanismos de ação do ácido ricinoléico ainda sejam pouco conhecidos, OLOYEDE (2012) demonstrou que este composto, mesmo em baixas concentrações (0,00625 mg/mL) foi capaz de inibir, *in vitro*, a oxidação induzida pelo ferro, além de ser eficiente no sequestro de radicais hidrogênio e peróxido de hidrogênio, sendo estes efeitos superiores aos verificados por antioxidantes conhecidos, como o butil hidroxianisol (BHA), alfa-tocoferol e ácido ascórbico.

Tendo em vista as doses empregadas nos estudos em outras espécies e no presente estudo em cães, uma possível explicação para a ausência de efeitos dos óleos de caju, mamona ou da associação de ambos sobre o status oxidativo de cães pode ser explicada pela baixa concentração destes compostos nas dietas, havendo necessidade de outros estudos com diferentes dosagens para confirmar esta hipótese. Neste estudo, os animais receberam em média, aproximadamente 9 mg/kg do óleo de caju, 3 mg/kg do óleo de mamona e 23 mg/kg da associação de ambos. Não foram encontrados outros estudos com estes compostos em cães para efeitos comparativos de resultados.

LING (2006) verificou os efeitos do extrato alcoólico do óleo de caju sobre o status oxidativo em ratos diabéticos e verificou que na dose de 250, 500 e 1000 mg/kg, houve redução significativa nas concentrações séricas de malondialdeído (MDA) dos animais, além de melhora na regulação das concentrações glicêmicas dos ratos. Em outro estudo, BROINIZI et al (2008) suplementaram 200-400 mg/kg de extrato hidroalcoólico de bagaço do pedúnculo do caju em ratos e verificaram que, embora não tenha ocorrido modificação nos parâmetros oxidativos plasmáticos, os animais suplementados apresentaram melhor status oxidativo cerebral e maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados neste órgão, com

possíveis benefícios para o sistema nervoso. Os efeitos do extrato aquoso do *Anacardium occidentale* sobre o status oxidativo também foram estudados por FAZALI et al. (2011), em coelhos hipercolesterolêmicos, que verificaram redução nas concentrações de MDA nas doses de 100-200 mg/kg.

Com relação ao óleo de mamona, foram encontrados poucos estudos na literatura, nos quais os efeitos in vivo deste composto foram estudados. RAVISHANKAR et al. (2012), estudaram os efeitos da intoxicação com tetracloreto de carbono ( $\text{CCl}_4$ ) em ratos tratados previamente com extrato etanólico de *Ricinus communis* e verificaram os animais tratados com 300 ou 500 mg/kg deste extrato apresentaram efeitos mais brandos da intoxicação por este composto, quando comparados ao grupo Controle, não tratado. A atividade de sequestro dos radicais livres foi o principal mecanismo protetor atribuído pelos autores.

Neste estudo, os óleos contendo compostos antioxidantes foram ainda submetidos ao processo de extrusão, visando reproduzir as condições de processo industrial as quais os alimentos para cães são submetidos. Considerando a sensibilidade de compostos fenólicos ao tratamento térmico, podem ter ocorrido perdas destes compostos durante a extrusão. Embora esta hipótese seja levantada, não foram encontrados estudos na literatura para uma discussão mais aprofundada. Sabe-se que o ácido anacárdico presente no óleo de caju é termicamente instável e quando submetido a elevadas temperaturas é transformado em cardanol (KUMAR et al., 2002). Não foram determinadas as concentrações dos compostos antioxidantes nos óleos estudados, antes e após a extrusão, para verificar possíveis perdas durante este processo.

Os óleos e extratos extraídos de frutas, algas e outros alimentos são susceptíveis às perdas de acordo com o método de obtenção. LIMA & GONÇALVES (1997) encontraram diferenças com relação à técnica de extração. A extração a frio se mostrou mais eficiente do que a extração a quente, com relação ao teor de tocoferóis do óleo da castanha de caju, mas em relação à

composição de ácidos graxos não houve diferença. Este fato reforça possível efeito danoso da extrusão sobre os compostos antioxidantes destes ingredientes. ROESLER et al (2007) estudou a função antioxidantes de frutos do cerrado e encontrou uma relação entre concentração de fenóis totais e a capacidade de seqüestrar radicais livres dos extratos de frações das frutas. Foram utilizados polpa, semente e casca dos frutos de lobeira, pequi, araticum, cagaita e banha de galinha, por dois métodos de extração. Os extratos com maior concentração de fenóis totais apresentaram maior atividade antioxidante. Concluíram ainda que para a extração seletiva de antioxidantes naturais, é de grande importância e necessário um estudo sobre o solvente mais apropriado.

MELO et al (2008) verificaram que o extrato aquoso e acetônico da acerola, seguido pelo do caju, destacaram-se com o mais elevado teor de fenólicos totais. Neste mesmo estudo, os extratos acetônico da acerola, caju, pinha e goiaba exibiram uma elevada capacidade de seqüestrar o radical DPPH (superior a 70%), superior a encontrada por fenólicos sintéticos como o butil hidroxianisol (BHT).

Nesta pesquisa, a utilização do óleo de peixe teve como propósito verificar seus efeitos sobre o status oxidativo dos animais, uma vez que os dados da literatura são controversos com relação a este efeito. SEALLS et al. (2008) relataram aumento da peroxidação lipídica hepática em animais alimentados com dietas contendo óleo de peixe. Outros estudos observaram uma redução na produção de EROs e do estresse oxidativo associado ao uso do EPA (SAW et al, 2010; TANAKA et al, 2010). As diferentes conclusões entre estes estudos são provavelmente devido às diferentes dosagens absolutas empregadas e relações entre ácidos graxos das famílias ômega 6 e 3.

Os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), além de participarem como constituintes celulares neuronais, também competem com o ácido araquidônico na síntese de mediadores inflamatórios, dando origem a mediadores menos inflamatórios, o que reduz os danos oxidativos decorrentes da

degradação do ácido araquidônico. Graças a este efeito, estes ácidos graxos têm sido extensivamente utilizados em doenças crônicas degenerativas (GROSS et al., 2010; FORRESTER et al., 2010). Conforme verificado por WANDER et al. (1997), em dietas para cães, relações muito baixas (próximas de 1:1) entre estes ácidos graxos devem ser evitadas, pois aumentaram as concentrações de metabólitos da oxidação lipídica (malondialdeído) no plasma de cães. Neste estudo, a relação exata entre o ácido alfa-linoléico e EPA+DHA não foram determinadas, mas estima-se, pelos níveis de gordura de aves e óleo de peixe incluídos nas dietas, que tenham ficado ao redor de 9:1. Possivelmente devido aos mecanismos de ação explicados acima, a dieta contendo óleo de peixe tendeu a reduzir as concentrações séricas de TBARS nos animais pertencentes a este grupo, em relação aos demais (Tabela 3).

Apesar disto, SUGIHARA et al. (1994) verificaram que a peroxidação lipídica em cultura de hepatócitos de ratos é proporcional à insaturação da cadeia do ácido graxo em questão, da seguinte maneira: DHA > EPA > AA (ácido araquidônico) > alfa-linolênico > alfa-linoléico > oléico. Reforçando estes achados, ALMEIDA (2011) submeteram ratos à dietas hiperlipídicas e verificaram que as dietas contendo óleo de peixe (35% da gordura total) aumentaram a peroxidabilidade lipídica hepática, vista pelo aumento no TBARS neste tecido, embora as concentrações plasmáticas de colesterol e triglicerídeos tenha diminuído.

De acordo com os dados verificados neste estudo, a inclusão de 0,5% de óleo de peixe em dietas contendo 30% da energia metabolizável proveniente dos lipídeos foi considerada segura, sem efeitos sobre os parâmetros oxidativos estudados.

Embora o protocolo de indução do stress nos animais nesta pesquisa tenha sido eficiente na indução da lipoperoxidação, não verificou-se efeito protetor dos óleos de caju, mamona ou peixe sobre as concentrações de TBARS. Ao contrário do verificado nos resultados de percentual de descoloração do radical DPPH e da

Capacidade Antioxidante Total dos animais, esperava-se com este protocolo uma redução na Capacidade Antioxidante Total e redução no percentual de descoloração do DPPH, pelos antioxidantes presentes na amostra. Possível explicação para este efeito contrário ao esperado pode ser devido à indução dos sistemas antioxidantes enzimáticos do organismo (CAT, SOD e GPx), além da síntese e liberação de moléculas com ação antioxidante pelo organismo, como por exemplo o ácido ascórbico, ácido úrico e proteínas. Apesar disto, estes compostos não foram quantificados nesta pesquisa. Estes achados ressaltam a importância de avaliações completas de muitos parâmetros oxidativos, quando se estuda antioxidantes, visando estabelecer relações fisiológicas entre as modificações em cada parâmetro estudado.

## **V. CONCLUSÃO**

A adição dos óleos de caju, mamona e peixe, nas dosagens empregadas neste estudo não promoveu modificações no status oxidativo dos cães.

O protocolo de stress avaliado neste estudo foi eficiente em estimular o sistema de defesa antioxidante dos animais e induzir a produção de produtos da liperoxidação.

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS (AAFCO). **Official Publication 2004**. Association of American Feed Control Officials, 2004.
- AGOSTINI-COSTA, T.S.; JALES, K.A.; OLIVEIRA, M.E.B. et al. Determinação espectrofotométrica de ácido anacárdico em amêndoas de castanhas de caju. **Comunicado Técnico 122**, EMBRAPA, Brasília – DF, 2008.
- AL MEHDI, A.B., DODIA, C., JAIN, M.K., FISHER, A. B. A phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substances during lung ischemia-reperfusion. **Biophys. Biochim. Acta**, v.1166, p.56-62, 1993..
- ALMEIDA, Bianca Bellizzi de. **Ações do óleo de peixe e triglicerídeos de cadeia média na esteatose hepática e estresse oxidativo induzidos pela dieta hiperlipídica em ratos**. 2011. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17138/tde-22112011-102759/>>. Acesso em: 2012-07-15.
- AMORATI, R.; PEDULLI, G. F.; VALGIMIGLI, L. Absolute rate constants for the reaction of peroxy radicals with cardanol derivatives. **Journal of Chemistry Society**, Perkin Trans., p.2142-2146. 2001.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- BARBER, A.A. & BERNHEIM, F. Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. **Adv. Gerontol. Res.**, v.2, p.355-403,1967.
- BARNETT, Y.A. & KING, C.M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v.338, n.1/6, p.115-128, 1995.

- BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v.47, p.233-261, 1996.
- BERSET, C., AND M.-E. CUVELIER, Methods of Estimating the Degree of Lipid Oxidation and of Measuring Antioxidizing Power, **Sci. Aliments** 16:219–245, 1996
- BIANCHI M.L.P. & ANTUNES L.M.G. FREE RADICALS AND THE MAIN DIETARY ANTIOXIDANTS. **Rev. Nutr.**, Campinas, 12(2): 123-130, maio/ago., 1999
- BONTEMPO, V. Nutrition and health of dogs and cats: evolution of petfood. **J. Vet. Res.** V.29, p.45-50, 2005.
- BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Propriedades antioxidantes em subproduto do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.): efeito sobre a lipoperoxidação e o perfil de ácidos graxos poliinsaturados em ratos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** [online]. 2008, vol.44, n.4, pp. 773-781. ISSN 1516-9332. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322008000400025>.
- CAMPOS, AM & LISSI, EA. Kinetics of the reaction between 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. **International Journal of Chemical Kinetics.** 219–224. 1997.
- CHANDRASEKAR, D, MADHUSUDHANA, K, RAMAKRISHNA, S, DIWAN, PV. Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: A sensitive screening method for polyherbal formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** 40, 460-464. 2006.
- CHANGE, B., SIES, H., BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.**, v.59, n.3, p. 527-605, 1979.
- DURAN, R. M. & PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 44, n. 2, p. 101-6, 1993.

- EISERICH, J. P., PATEL, R. P., O'DONNELL, V.B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Molec. Aspects Med.** v.19, p.221-357, 1998.
- EMBRAPA, Mamona – Apresentação do produto, Disponível em; <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/apresentacao.html>. Acesso em: 21/06/2012
- FAZALI, F. ZULKHAIRI, A. NURHAIZAN0 M. E. KAMAL, N.H. ZAMREE, M.S SHAHIDAN, M.A. Phytochemical Screening, *In vitro* and *In vivo* Antioxidante Activities of Aqueous Extract of Anacardium occidentale Linn. And its Effects on Endogenous Antioxidant Enzymes in Hypercholesterolemic Induces Rabbits. **Research Journal of Biological Sciences** 6 (2): 69-74, 2011.
- FERRARI CKB. Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. **J Cell Mol Biol.** 2008;7(1):1-15.
- FERREIRA A.L.A & MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Med Bras**, v.43, p.1-16, 1997.
- FETT, C. A. Suplementação de Ácidos Graxos Ômega-3 ou Triglicerídios de Cadeia Média para Indivíduos em Treinamento de Força. **Motriz**, v. 7, n. 2, p. 83-91, 2001.
- FINKEL T& HOLBROOK NJ: Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, 408:239-247, 2000.
- FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Food Sci. Technol.**, v. 4, p. 220-225, 1993.
- GONZÁLEZ, M. J. & RIORDAN, N. H. The paradoxical role of lipid peroxidation on carcinogenesis and tumor growth: a commentary. **Medical Hypotheses**, n. 46, p. 503-504, 1996.

- GUERRA E.J.I. Oxidative stress, diseases and antioxidant treatment. **Anais Medicinal Internal**, v.18, p. 326-335, 2001.
- HALLIWEL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 33, n. 7, p. 601-17, 1995
- HALLIWELL B & GUTTERIDGE JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol** 1990; 186: 1-85.
- HALLIWELL B, CROSS C.E, GUTTERIDGE J.M.C. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now?. **J Lab Clin Med**; 119: 598-620, 1992.
- HALLIWELL, B & GUTTERIDGE, J. Free Radical in Biology and Medicine. 4. ed. **Oxford: Oxford University Press**, 2007. 704p.
- HERSHKO C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**; 26: 277-85, 1989.
- HOGG, N. & KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1411, n.2-3. P.378-384, 1999.
- KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat Science**, Essex, v.36, n.1/2, p.169-189, 1994.
- KIM, K.W. & THOMAS, R.L. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weight. **Food Chemistry**. 2006.
- KIRK, J.R. Biological availability of nutrients in processed foods. *Journal of Chemical Education*, v.61, n.4, p.364-367, 1984.
- Kohn HI & Liversedge M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. **J Pharmacol Exp Ther** 1944;82:292-300.
- KUMAR, P.P. et al. Process for isolation of cardanol from technical cashew (*Anacardium occidentale*.) nut shell liquid. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.47054708, 2002.

- LIMA, E. S. & ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3. p. 293-303, 2001.
- LIMA, J. R., GONÇALVES, L. A. G. Tocopherol quantification in oils (corn, soy bean, Brazil-nut and cashew-nut) by high performance liquid chromatography in reverse phase. **Alim. Nutr.** (São Paulo), v.8, p.65-73, 1997.
- LING, L. **Hypoglycemic and antioxidative effects of *Anacardium occidentale* linn. In diabetic rats.** Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Putra Malaysia in fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science, April, 2006.
- MACLEAN, C. H. et al. Effects of Ômega-3 Fatty Acids on Cognitive Function with Aging, Dementia and Neurological Diseases. **Agency for Healthcare Research and Quality**, n. 114, 144 f. fev. 2005.
- MAIA MS. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase.** 2006. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. A. G. L.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.
- MELLO FILHO A.C, HOFFMAN ME, MENEGHINI R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem J**; 218: 273-5, 1983.
- MORAES, F. P. & COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracênicos: Definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, nov. 2006.

- MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire**, v.39, v.25, p.31-46, 2003.
- MOSHKIN, V.A. Castor. **Moskow**: Kolos Publisher, p.315, 1986.
- NORDBERG J & ÁRNER ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v.31, p.1287-1312, 2001.
- OLOYEDE, G.K. Antioxidant Activities of Methyl Ricinoleate and Ricinoleic Acid Dominated Ricinus communis Seeds Extract Using Lipid Peroxidation and Free Radical Scavenging Methods. **Research Journal of Medicinal Plant**, 6: 511-520, 2012
- PACHECO, S. G. A. **Estabilidade oxidativa de óleo de peixe encapsulado e acondicionado em diferentes tipos de embalagem em condição ambiente**. 2005. 79 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)– Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- PATEL, R.P., MCANDREW, J., SELLAKE, H., WHITE, C.R., JO, H., FREEMAN, B.A, DARLEY-USMAR, V.M. Biological aspects of reactive nitrogen species. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1411, p.385-400, 1999.
- PAYÁ, M.; HALLIWELL, B.; HOULT, JR. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochem. Pharmacol.** v.44, p.205-214, 1992.
- PEDERSEN, H. et al. Influence of fish oil supplementation on in vivo and in vitro oxidation resistance of low-density lipoprotein in type 2 diabetes. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 57, p. 713-720, 2003.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.63, n.7, p.1035-1042, 2000

- PORTER, N.A. Chemistry of Lipid peroxidation. **Method. Enzymols.**, v.105, p.273-282, 1984.
- PORTER, N.A., CALDWELL, S.E., MILLS, K.A. Mechanism of free radical oxidation of unsaturated lipids. **Lipids**, v.30, n.4, p.277-290, 1995.
- PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food. Chem.** 2005, 53, 4290. 2005.
- RAVISHANKAR K. et al. *In vivo* hepatoprotective activity of ricinus communis. Linn leaf extract against ccl4 Induced hepatic damage in albino rats. **International Journal of Biological & Pharmaceutical Research.** 2012; 3(3): 444-449.
- RAYMUNDO, MS, HORTA, P, FETT. R, Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil), **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas.** 40. 2004.
- REGOLI, F; GORBI, S; FRENZILLI, G; NIGRO, M; CORSI, I; FOCARDI, S; WINSTON, GW. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. **Marine Environmental Research**, v.54, p. 419-423, 2002.
- RICE-EVANS C. Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status in vivo: procedures and limitations. **Free Radic Res.** 2000;33:S59-S66.
- RODRIGUES F. H. A., FEITOSA J. P.A. FRANÇA F. C. F. CARIOCA O.B. Antioxidant Activity of Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) Derivatives on the Thermal Oxidation of Synthetic cis-1,4-Polyisoprene. **Journal Brazilian Chemistry Society**, 17: 265-271, 2006.
- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de. Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

- ROGINSKY, V. & LISSI, E. A.. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, n. 92, p. 235-254, 2005.
- ROMBEAU, J. L. & ROLANDELLI, R. H. Nutrição clínica nutrição parenteral. 3. ed. São Paulo: Roca, 2005. Disponível em: <http://books.google.com.br/books>. Acesso em: 27 junho. 2012.
- ROSS D & MOLDEUS P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. 1th ed. Boca Raton, CRC Press;151-70, 1991.
- SAW, C.L., Y. HUANG AND A.N. KONG. Synergistic anti-inflammatory effects of low doses of curcumin in combination with polyunsaturated fatty acids: Docosahexaenoic acid or eicosapentaenoic acid. **Biochem. Pharmacol.**, 79: 421-430, 2010
- SCHLOTZHAUER, S.; LITTELL, R.C. **SAS system for elementary statistical analysis**. 2nd. ed. Cary: Sas institute. 1997. p. 456.
- SEALLS W, GONZALEZ M, BROSNAN MJ, BLACK PN, DIRUSSO CC. Dietary polyunsaturated fatty acids (C18:2 omega6 and C18:3 omega3) do not suppress hepatic lipogenesis. **Biochim Biophys Acta**;1781:406–414, 2008.
- SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C. M. Antioxidant Phytochemicals in Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Byproducts. **J. Agric. Food Chem.**, Washington, v. 55, n. 4, p. 1212-20, 2007.
- SHAN X, AW TY, JONES DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**; 47: 61-71, 1990.
- SILVA, FAM, BORGES, MFM, FERREIRA, MA. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**. 22, 1999.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. v. 15, p. 71-81, 2002.

- SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 02, p. 351-5, 2007.
- SUGIHARA N, TSURUTA Y, DATE Y, FURUNO K, KOHASHI K. High peroxidative susceptibility of fish oil polyunsaturated fatty acid in cultured rat hepatocytes. **Toxicol Appl Pharmacol**. May;126(1):124–128, 1994.
- TANAKA N, ZHANG X, SUGIYAMA E, et al. Eicosapentaenoic acid improves hepatic steatosis independent of PPAR $\alpha$  activation through inhibition of SREBP-1 maturation in mice. **Biochemical Pharmacology**;80(10):1601–1612, 2010.
- TREVISAN M.T.S.; PFUNDSTEIN B.; HAUBNER R. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food. Chem. Toxicol.**, v. 44(2): p.188-97, 2006.
- VIEIRA, C., FETZER S., SAUER S.K. Pro- and antiinflammatory actions of ricinoleic acid:similarities and differences with capsaicin. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, p.87–95, 2001.
- VISIOLI, F.; KEANEY JR, J. F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovasc. Res.**, 47, 409-418, 2000.
- WANDER R, HALL JA, GRADIN JL, DU SH, JEWELL DE. The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation, and vitamin E status in aged dogs. **J Nutr.** ;127:1198–205, 1997.
- WEISS, E.A. **Oil seed crops**. London: Longman, 1983. 659p.
- Wong JW, Hashimoto K, Shibamoto T. Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model system. **J Agric Food Chem**; 43(10): 2707-12, 1995.

XING, Y. & WHITE, P. J. Antioxidants from Cereals and Legumes in Natural Antioxidants Chemistry, Health Effects, and Applications "in" **SHAHIDI, F.** **AOCS Press**: Champaign, Illinois, p. 25-55, 1996.

YU, T-W. & ANDERSON, D. Reactive oxygen species-- induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, Amsterdam, v.379, n.2, p.201-210, 1997.