



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**EFEITO DA FARINHA DE VÍSCERAS DE AVES HIDROLISADA EM ALIMENTO  
EXTRUSADO SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE SÉRICA E SEMINAL DE  
CÃES**

**MIRNA XAVIER SALES DOS SANTOS**

**SALVADOR – BA**

**DEZEMBRO/2024**

**MIRNA XAVIER SALES DOS SANTOS**

**EFEITO DA FARINHA DE VÍSCERAS DE AVES HIDROLISADA EM ALIMENTO  
EXTRUSADO SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE SÉRICA E SEMINAL DE  
CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Produção de Monogástricos.

Orientador: Dra. Bruna Agy Loureiro, BSc, PhD.

Coorientador: Dr. Wilmer Alejandro Zamora Restan.

**SALVADOR – BA**

**DEZEMBRO/2024**

Dados internacionais de catalogação-na-publicação  
(SIBI/UFBA/Biblioteca Universitária Reitor Macedo Costa)

Santos, Mirna Xavier Sales dos.

Efeito da farinha de vísceras de aves hidrolisada em alimento extrusado sobre a capacidade antioxidante sérica e seminal de cães / Mirna Xavier Sales dos Santos. - 2024.

44 f.: il.

Orientadora: Profª. Dra. Bruna Agy Loureiro.

Coorientador: Prof. Dr. Wilmer Alejandro Zamora Restan.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2024.

1. Zootecnia. 2. Nutrologia. 3. Nutrição animal. 4. Cães - Alimentação e rações. 5. Cães - Nutrição. 6. Cães - Reprodução. 7. Hidrolisados de proteína. 8. Peptídeos. I. Loureiro, Bruna Agy. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 636.7085

CDU - 636.085

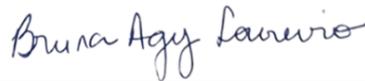
**“EFEITO DA FARINHA DE VÍCERAS DE AVES HIDROLIZADA EM ALIMENTO EXTRUSADO SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE SÉRICA E SEMINAL DE CÃES”**

Mirna Xavier Sales dos Santos

Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia

Salvador, 06 de dezembro de 2024

Comissão examinadora:



---

Dra. Bruna Agy Loureiro  
UFBA  
Orientadora / Presidente



---

Dra. Stephanie de Souza Theodoro UNESP



---

Dr. Luciano Trevizan  
UFRGS

## AGRADECIMENTOS

Todo o trabalho executado durante o meu mestrado é a prova viva de que desistir dos próprios sonhos nunca é uma opção. Faltariam linhas para agradecer todos os que me permitiram continuar, persistir e concluir essa fase durante o momento mais conturbado da minha vida. Agradeço primeira a minha família, minha base, suporte e a minha fonte maior de força todas as adversidades. Especialmente aos meus pais, Marta e Marcos, por serem meus alicerces e os meus pontos de segurança desde sempre. Aos meus avós paternos, José e Anita, por me apoiarem e se orgulharem das minhas escolhas durante toda a minha vida. Aos meus avós maternos, Gildásio e Edelzuita, eternos em minha memória e no meu coração, por me moldarem como pessoa e ensinarem quase tudo que eu conheço sobre o amor, eu tenho certeza que sou guiada e protegida por vocês sempre. Essa e todas as minhas conquistas são para vocês.

Agradeço também a minha orientadora Bruna Agy, por ser uma profissional de excelência e uma fonte de inspiração na área de nutrição de cães e gatos, mas acima de tudo por ser tão humana. Jamais serei grata o suficiente por todo apoio, compreensão, conselhos e sensibilidade comigo durante esses dois anos. Ao nosso grupo e companheiros de trabalho, Rayssa, Elias, Douglas e Prof. Dr. Wilmer Alejandro, por todo apoio. Em especial, à Luna e Rafaela, minhas amigas desde a graduação por aguentarem meus choros, meu desespero (que não foram poucos), por compartilharem as risadas, as lutas e as vitórias.

A minha irmã de alma, Cibele, por dar todo o suporte emocional à minha família na minha ausência, por levantar minha cabeça e me dar forças para continuar. Aos meus amigos, Leonardo, Ingrid, Mayra, Luna, Natália, Mayara, por deixarem a vida mais leve com os risos, os passeios e as histórias. Ao grande amor da minha vida, meu noivo Matheus, por ser meu braço direito, meu companheiro para tudo e a luz mais brilhante que já conheci, por todo amor, carinho e suporte, descrever o que eu sinto por ti nunca vai ser o suficiente.

A banca examinadora, Dr. Luciano e Dr<sup>a</sup>. Stephanie, por terem aceitado o convite e pela disponibilidade para avaliar e contribuir com o meu trabalho. Ao PPGZ UFBA, a CAPES e a Premier Pet, pela oportunidade, incentivo e financiamento para o desenvolvimento da pesquisa, nada seria possível sem vocês.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Escore de condição corporal (ECC, sistema de 1-9) e Peso corporal médio  $\pm$  desvio padrão (PC, kg) dos grupos experimentais ao longo do experimento ..... 22

**Tabela 2.** Composição dos ingredientes e análise química das dietas experimentais contendo farinha de vísceras de aves (FVA) e farinha de aves hidrolisada(FVH) ..... 24

**Tabela 3.** Avaliação dos parâmetros antioxidantes em soro sanguíneo de cães alimentados com FVA e FVH ..... 28

**Tabela 4.** Avaliação dos parâmetros antioxidantes em sêmen de cães alimentados com FVA e FVH ..... 29

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

% MS – Porcentagem de Matéria Seca

CAT – Capacidade Antioxidante Total

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CEUA – Comitê de Ética do Uso Animal

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

ECC – Escore de Condição Corporal

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FVA – Farinha de Vísceras de Aves

FVH – Farinha de Vísceras de Aves Hidrolisada

GPH-Px - Glutaciona peroxidase

GPHR- Glutaciona redutase

MDA - Malondialdeído

NEM – Necessidade de Energia Metabolizável

LPO – Peroxidação Lipídica

RL – Radicais livres

SOD – Superóxido Dismutase

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	12
2.1 Proteína hidrolisada e peptídeos bioativos.....	12
2.2 Atividade antioxidante e hidrolisados .....	14
2.3 Antioxidantes e qualidade espermática em cães .....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
3.1 Protocolo de ética no uso de animais e local do experimento .....	21
3.2 Animais, instalações e delineamento experimental .....	21
3.3 Dietas experimentais .....	22
3.4 Coleta de sangue e sêmen .....	24
3.5 Análise da capacidade antioxidante sérica e seminal em cães.....	25
3.6 Análises estatísticas .....	26
4. RESULTADOS .....	26
4.1 Parâmetros do soro sanguíneo .....	27
4.2 Parâmetros Seminais .....	27
5. DISCUSSÃO .....	29
6. CONCLUSÃO .....	32
7. REFERÊNCIAS .....	33

## **Efeito da Farinha de Vísceras de Aves Hidrolisada em alimento extrusado sobre a capacidade antioxidante sérica e seminal de cães**

### **RESUMO**

A utilização das farinhas hidrolisadas em rações é crescente devido as suas potenciais funcionalidades em decorrência da presença de peptídeos bioativos, destacando-se a sua função antioxidante. Este estudo teve como objetivo avaliar a inclusão de 10% de farinha de vísceras de aves hidrolisada (FVH) em dieta seca extrusada para cães adultos sobre a capacidade antioxidante sérica e seminal dos animais. Utilizou-se 16 cães machos adultos em idade reprodutiva de  $4,19 \pm 0,71$  anos, divididos em dois tratamentos: 1) dieta seca extrusada para cães adultos contendo 32% de farinha de vísceras de aves (FVA) e 2) dieta 1 com inclusão de 10% da FVH em substituição a dieta controle. Para avaliar o efeito das dietas sobre a capacidade antioxidante sérica, amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 60 e 120 de consumo das dietas experimentais para determinação de malondialdeído (MDA), capacidade antioxidante total (CAT) e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Para análise seminal, o sêmen dos cães foi colhido após 60 e 120 dias de consumo das dietas, para determinação de MDA, CAT e superóxido desmutase (SOD). Dados foram avaliados por ANOVA *two-way*, utilizando SigmaPlot v.12.0 a 5% de probabilidade. Verificou-se na análise de MDA redução significativa na peroxidação lipídica no soro dos cães que receberam dieta com inclusão de FVH ( $p=0,005$ ). Para o sêmen, não foi verificado efeito significativo de dieta, mas uma tendência à maior CAT no grupo que consumiu a dieta contendo FVH ( $p=0,058$ ). Os resultados demonstram que a capacidade antioxidante orgânica dos animais melhorou, evidenciada pela redução de marcadores do estresse oxidativo no organismo dos cães durante o período estudado. O consumo de dieta contendo FVH promoveu melhora do status antioxidante sérico de cães, que se estendeu a uma melhora na capacidade antioxidante seminal, indicando potencial para dar suporte à saúde e reprodução destes animais.

**Palavras-chave:** canina; estresse oxidativo; hidrolisado proteico; peptídeos bioativos; reprodução

## **Effect of Hydrolyzed Poultry By-product Meal in Extruded Food on Dogs Serum and Seminal Antioxidant Capacity**

### **ABSTRACT**

The use of hydrolyzed meals in feed is increasing due to their potential functionalities resulting from the presence of bioactive peptides, highlighting their antioxidant function. This study aimed to evaluate the inclusion of 10% of hydrolyzed poultry viscera meal (HVM) in an extruded dry diet for adult dogs on the serum and seminal antioxidant capacity of the animals. Sixteen adult male dogs of reproductive age of  $4.19 \pm 0.71$  years were used, divided into two treatments: 1) extruded dry diet for adult dogs containing 32% viscera meal (VFM) and 2) diet 1 with the inclusion of 10% (HVM) replacing the control diet. To evaluate the effect of diets on serum antioxidant capacity, blood samples were collected on days 0, 60 and 120 of consumption of the experimental diets to determine malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (TAC) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). For seminal analysis, semen from dogs was collected after 60 and 120 days of consumption of the diets to determine MDA, TAC and superoxide dismutase (SOD). Data were evaluated by two-way ANOVA, using SigmaPlot v.12.0 at 5% probability. In the MDA analysis, a significant reduction in lipid peroxidation was observed in the serum of dogs that received a diet with inclusion of FVH ( $p=0.005$ ). For semen, no significant effect of diet was observed, but a tendency towards greater TAC in the group that consumed the diet containing FVH ( $p=0.058$ ). The results demonstrate that the organic antioxidant capacity of the animals improved, evidenced by the reduction of oxidative stress markers in the dogs' bodies during the study period. The consumption of a diet containing FVH promoted an improvement in the serum antioxidant status of dogs, which extended to an improvement in seminal antioxidant capacity, indicating potential to support the health and reproduction of these animals.

**Keywords:** bioactive peptides; canines; functional properties; protein hydrolyzate; oxidative stress

## 1. INTRODUÇÃO

Os animais de companhia, com destaque para os cães, têm presença crescente nos lares brasileiros. De acordo com dados da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (Abinpet, 2024), dos 167,6 milhões de pets convencionais, 67,8 milhões corresponde a espécie canina, ocupando o 1º lugar entre os demais animais e demonstrando a importância dessa espécie no país. Normalmente, a posse de cães vem associada à preocupação dos tutores em oferecer aos animais qualidade de vida e bem-estar, principalmente através da alimentação. Esse fato é comprovado quando os dados do setor de *petfood* são considerados, possuindo o maior crescimento do país quando comparado aos outros segmentos ligados a animais de estimação e responsável por 74% do faturamento da indústria pet brasileira em 2023 (Abinpet, 2024).

A farinha de vísceras de aves (FVA) é uma das principais fontes de proteína na produção de *petfood*, amplamente utilizada devido a qualidade nutricional, balanço de aminoácidos, ao preço acessível e a sua disponibilidade., além de ser um subproduto da indústria avícola, a FVA é relativamente barata quando comparada a outros ingredientes proteicos, além de ser uma opção ambientalmente mais sustentável devido a diminuição da pegada de carbono, uma vez que esses materiais quando não são recuperados no ciclo de produção precisam ser incinerados (Bechaux *et al.*, 2019). Logo, economicamente a valorização dos subprodutos de origem animal permite que a economia circule de forma mais efetiva.

Apesar do método tradicional ser o mais utilizado no mercado, existe a propensão do desenvolvimento de pesquisas e novos métodos de processamento, como o uso de enzimas, com o intuito de agregar novas propriedades funcionais e melhorar a qualidade do produto final (Brandelli *et al.*, 2015). Neste contexto, destaca-se o desenvolvimento das proteínas hidrolisadas, com uma gama de propriedades bioativas, como efeitos anti-hipertensivos, antimicrobianos, imunomoduladores e antioxidantes (Ramos, 2022). Assim como a farinha de vísceras de aves hidrolisada (FVH) abordada nesse estudo.

A FVH é um potencial ingrediente já utilizado nas rações, como por exemplo, na composição de alimentos hipoalergênicos. Esse material hidrolisado é caracterizado pela presença dos peptídeos bioativos, fragmentos compostos de 2 a 20 aminoácidos com baixo peso molecular que são liberados no processo de hidrólise, e podem contribuir positivamente em diversas funções fisiológicas do organismo além da função antialérgica, como elevar o potencial antioxidante orgânico (Da Silva *et al.*, 2009; Brandelli *et al.*, 2015; Bechaux *et al.*, 2019).

Funções fisiológicas naturais no organismo resultam em processos metabólicos como a oxidação, originando intermediários químicos com potencial oxidante como os radicais livres (RL) e as espécies reativas de oxigênio (EROs) (Marlin *et al.* 2002; Maia *et al.*, 2009). Quando existe o desequilíbrio no corpo entre as moléculas antioxidantes e oxidantes, ocorre um processo determinado como estresse oxidativo, gerando danos à saúde e a homeostase. Outra consequência associada a sobrecarga oxidativa é a redução da capacidade fertilizante espermática, diminuindo a fertilidade de machos através de alterações na motilidade e integridade da membrana celular de espermatozoides e de sua funcionalidade (Baskin e Salem, 1997; Lopes, 2010., Sampaio e Zúccari, 2016., Rodwell *et al.*, 2021).

Naturalmente, o corpo possui mecanismos de defesa para diminuição ou inibição dos efeitos danosos dessas moléculas (Ferreira e Abreu, 2007). De forma complementar, a adição de antioxidantes naturais ou sintéticos de forma exógena, ou seja, presentes na composição de produtos destinados a alimentação pet, pode contribuir para que estes forneçam suporte as defesas orgânicas (Aguilar-Toalá e Liceaga,2021). Dessa forma, o potencial antioxidante da FVH vem sendo investigado como uma alternativa dietética interessante para contribuir para a melhora da resposta antioxidante orgânica de cães. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do consumo de uma dieta contendo a inclusão de 10% de FVH na capacidade antioxidante sérica e seminal de cães.

## **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 Proteína hidrolisada e peptídeos bioativos**

As proteínas são definidas como macromoléculas compostas por cerca de 20 aminoácidos diferentes ligados por meio de ligações peptídicas, com funções diversas no organismo animal, atuando como enzimas e hormônios regulando processos fisiológicos, formando estruturas de tecidos, contribuindo com o aporte imunológico, entre outros. Biologicamente, o aporte proteico necessário para o corpo suprir as necessidades nutricionais é obtido através da dieta, com o consumo de carnes e vegetais ricos nesse nutriente. Na composição das rações, geralmente as proteínas são adicionadas de forma íntegra, sem nenhum procedimento de hidrólise anterior. Após a ingestão, elas são digeridas e fragmentadas no intestino delgado pela ação de enzimas como proteases e oligopeptidases, em peptídeos menores ou aminoácidos livres. Dentro do corpo a formação de peptídeos e aminoácidos é variável, relacionadas com a dieta consumida e as necessidades fisiológicas do animal naquele momento (Pasupuleti *et al.*, 2010).

Quando a proteína passa pelo processo de hidrólise antes da sua inclusão na dieta, diversas propriedades funcionais podem ser obtidas com esse processo, através da liberação de peptídeos bioativos. Eles são definidos como sequências curtas de aminoácidos com baixo peso molecular (< 8000 daltons) e funcionalidades como a elevação da atividade antimicrobiana, imunomoduladora, inibidora da ECA e antioxidante (Brandelli *et al.*, 2015; Etemadian *et al.*, 2021). Apesar da variedade de funções associadas as proteínas hidrolisadas, na nutrição de animais de companhia, a utilização está relacionada com a redução de alergenicidade que as proteínas hidrolisadas apresentam. A inclusão do ingrediente é comum em dietas hipoalergênicas, além de dietas para pacientes com doença inflamatória intestinal devido a sua digestibilidade facilitada pelo menor peso molecular dos peptídeos quando comparados a proteína intacta, sendo a aplicação de outras funcionalidades uma opção viável na indústria *pet food* (Cave, 2006; Noli e Beltrando, 2021).

As vísceras obtidas da indústria avícola são, normalmente, processadas de maneira convencional para obtenção da FVA. No entanto a hidrólise da farinha de vísceras de aves é uma alternativa para produção de um ingrediente com maior leque de aplicações, como também no fornecimento de peptídeos bioativos. Existem diversas formas de realizar hidrólise em um material, sendo a enzimática o método mais utilizado na fabricação de rações. Diferentemente do modo convencional, o processamento de ingredientes hidrolisados através do método enzimático consiste na drenagem do material cru e trituração, transporte até o reator, aplicação da enzima para posterior hidrólise enzimática, separação das fases (fase solúvel, resíduo não solúvel e gordura), secagem por desidratação da fase solúvel, resfriamento e moagem. Na hidrólise enzimática ocorre a clivagem das ligações peptídicas das proteínas com a ação das proteases, e como resultado desse processo acontece a formação de peptídeos de tamanhos moleculares variados e aminoácidos livres (Clemente, 2000). As enzimas utilizadas nesse procedimento podem variar e sua escolha depende de alguns fatores associados como: a fonte proteica utilizada, as características adicionais desejadas no produto final e o grau de hidrólise. Ainda assim, por ser um processo enzimático, mesmo com padrões de equipamentos e matérias-primas estabelecidos, as enzimas podem atuar de forma heterogênea em diferentes sítios de clivagem e resultar em peptídeos distintos. Outros fatores que exercem influência no resultado dos peptídeos gerados são padrões geralmente estabelecidos pelas fábricas como: o pH, o tempo de hidrólise, temperatura ideal para cada protease e a proporção de enzimas para a quantidade de substrato utilizada (Pasupuleti *et al.*, 2010).

A origem da enzima também interfere na hidrólise, já que existe muitas fontes de obtenções possíveis. As de origem vegetal mais utilizadas são papaína e bromelina; as advindas dos animais podem ser citadas a pancreatina, pepsina, tripsina e carboxipeptidases; já de origem fúngicas existem exemplos como *Aspergillus melleus* e *Aspergillus niger*; e das bacterianas *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Rao *et al.*, 1998, Miltenburg, 2021). Segundo Giongo (2006), as proteases bacterianas são as mais empregadas pelas indústrias químicas e alimentícias, isso pode ser justificado por características como: um rápido crescimento para utilização, uma ampla versatilidade de atividade catalítica, a pouca necessidade de espaço para cultivo e maior facilidade de produção.

De forma geral, em fontes proteicas convencionais, os peptídeos bioativos permanecem inativos dentro da proteína e vão ser liberados internamente após a ingestão e digestão através das proteases no trato gastrointestinal, sendo dessa forma classificados como endógenos. Já externamente, os peptídeos podem ser liberados de forma “artificial” com um prévio tratamento de hidrólise alcalina, ácido, ou enzimática da proteína, sendo nesses casos classificados como exógenos (Bechaux *et al.*, 2019). A adição de peptídeos bioativos de forma exógena funciona como um aporte adicional importante, já que não é possível ter controle da atividade endógena, com seus sítios de clivagem específicos (Lafarga e Hayes, 2014).

## 1.2 Atividade antioxidante e hidrolisados

Naturalmente, existe a geração de compostos oxidativos no corpo do animal devido à participação dessas moléculas oxidantes como mediadores e intermediários em processos fisiológicos. No contexto científico, os termos radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (EROs) são utilizados para identificar compostos que em excesso podem causar danos as células. Apesar disso, esses componentes são necessários e desempenham funções significativas no organismo, como a participação na produção de energia, na síntese de componentes biológicos essenciais e na fagocitose. Durante o metabolismo celular aeróbio, por exemplo, ocorre a redução tetravalente do oxigênio, aceitando quatro elétrons para formar H<sub>2</sub>O. Esse processo pode gerar intermediários reativos, conhecidos como oxidantes, incluindo o superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidroperóxido (HO<sub>2</sub>), hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Maia *et al.*, 2009).

Os radicais livres são caracterizados por possuírem um elétron não pareado ocupando sua órbita externa, tornando-se altamente reativos. Em contrapartida, as EROs são moléculas derivadas do metabolismo do oxigênio e não necessariamente possuem elétrons desemparelhados. Em similaridade, ambos quando produzidos em excesso são prejudiciais ao organismo, e interagem de maneira adversa com diversos compostos como: lipídios, ocasionando a peroxidação lipídica, as proteínas, modificando as sequências de aminoácidos e alterando a homeostase celular, além dos ácidos nucleicos, gerando danos irreversíveis ao modificar bases nitrogenadas e ocasionar mutações (Rudenko *et al.*, 2021; Ramos, 2022). Ou seja, uma concentração exacerbada de metabólitos oxidativos pode ocasionar um estado de estresse oxidativo, expressão que define quando a concentração de oxidantes ultrapassa a capacidade antioxidante do corpo (Aitken, 1994). Uma das consequências mais significativas desse estresse é a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares, um processo conhecido como a peroxidação lipídica. Este nível de peroxidação pode ser avaliado quantitativamente através da medição do acúmulo de subprodutos gerados durante esse processo, como o malondialdeído (MDA). O MDA é frequentemente utilizado em pesquisas científicas como um índice da intensidade da peroxidação lipídica, fornecendo uma medida do dano oxidativo sofrido pelas células. (Kerksick & Willoughby 2005).

Esse fenômeno oxidativo resulta em danos que podem comprometer a integridade e fluidez das membranas celulares, interferindo na função de transporte de nutrientes essenciais como proteínas e glicose, além de permeabilidade e redução a capacidade de resposta do sistema autoimune (Ferreira e Abreu, 2007). Em meio a suscetibilidade do organismo aos ataques de oxidantes, uma associação entre os antioxidantes do organismo e antioxidantes advindos da dieta são fundamentais para aumentar a proteção das células, melhorar suas funções no organismo e elevar a resposta orgânica do corpo (Moraes & Colla, 2006).

O organismo possui um sistema de defesa antioxidante próprio e espontâneo para mitigar os danos causados pelos radicais, sendo essa defesa classificada em endógena. Sendo assim, mecanismos enzimáticos são distribuídos tanto no meio intracelular quanto extracelular e as principais enzimas que podem ser citadas são: a catalase, responsável por catalisar a decomposição do peróxido de oxigênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ), a superóxido dismutase (SOD), encarregada de catalisar a conversão do superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) e glutathione peroxidase (GPH-Px) e redutase (GPHR), que atuam catalisando a redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e reduzindo a glutathione oxidada (GSSG) de volta a sua forma reduzida (GSH) respectivamente (Ferreira e Abreu, 2007). Além

das enzimas, há também componentes não enzimáticos que funcionam como antioxidantes, como a vitamina C, responsável por doar elétrons e estabilizar radicais livres e a vitamina E, que desempenha o papel de proteção das membranas celulares contra a oxidação.

Ademais, Davies (1988) sugere uma classificação do sistema de defesa antioxidante orgânico em duas categorias: defesa primária e defesa secundária. A defesa primária agrega os complexos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que atuam na linha de frente para a eliminação de radicais livres. Por outro lado, a defesa secundária consiste em enzimas com funções adicionais de reparo e manutenção celular, tais como lipases, fosfolipases, enzimas proteolíticas, enzimas reparadoras de DNA, endonucleases, exonucleases e ligases. De forma exógena, evidências estão aumentando o indicativo dos benefícios de adicionar antioxidantes em dietas para dar suporte ao sistema de produção própria do organismo, através da adição de um ou mais componentes com ação antioxidante, como os hidrolisados proteicos, pode ocorrer um efeito sinérgico no combate aos radicais livres produzidos no organismo. Nesse sentido, a hidrólise de subprodutos como couro de suínos e ruminantes, partes diversas como pés, traqueia, ossos, sangue e plasma de diversas espécies tem sido amplamente estudada (Vasconcellos *et al.*, 2024).

No decorrer dos anos, nas fontes proteicas de origem animal, já foram identificados alguns compostos que podem atuar como reguladores de processos oxidativos, entre esses compostos antioxidantes podem ser citados o ácido linoleico conjugado (CLA) e dois dipeptídeos, histidil carnosina ( $\beta$ -alanil-L-histidina) e a anserina (N $\beta$ -alanil 1-metil-L-histidina) (Arihara, 2006). A carnosina exerce atividade antioxidante quelando metais de transição e reduzindo radicais livres (Sacchetti *et al.*, 2008). Já a anserina, assim como a carnosina, foram citadas em estudos atuando como capturadores do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e como agentes redutores (Wu *et al.*, 2003). Outrossim, o consumo de carne bovina foi associado ao aumento da capacidade antioxidante total do soro humano, um efeito semelhante ao observado com a administração oral de L-carnosina (Sacchetti *et al.*, 2008).

Sacchetti e colaboradores (2008) relataram que a atividade antioxidante da carne de frango foi avaliada utilizando-se extratos hidrofílicos e lipofílicos obtidos da carne, sendo a fração solúvel em água extraída com água, enquanto a fração solúvel em lipídios foi obtida pela mistura de Folch utilizando metanol e clorofórmio. Os resultados indicaram que a atividade de eliminação de radicais livres do extrato hidrofílico foi 40 vezes maior do que a do extrato lipofílico (expressa por grama de carne fresca). Os antioxidantes hidrofílicos presentes na carne

podem ser classificados como endógenos, incluindo peptídeos, ácido úrico, ascorbato, enzimas antioxidantes e poliaminas; ou exógenos, como nitrito e compostos fenólicos, enquanto os antioxidantes lipofílicos na carne são representados por carotenoides, alfa-tocoferol e ubiquinona.

Ao avaliar a fisiologia animal, percebe-se que no tecido conjuntivo animal o colágeno é a proteína mais abundante, possuindo 27 isoformas e sendo encontrada nos mais diversos tecidos como ossos, cartilagens, ligamentos, pele, músculos, tendões, e vasos sanguíneos (Damodaran *et al.*, 2008). Devido a sua diversidade e importância para os tecidos, a atividade antioxidante do colágeno após o processo de hidrólise já foi avaliada por pesquisadores. Li e colaboradores (2007), avaliaram o colágeno da pele suína, hidrolisando o material isoladamente por 24 horas e utilizando fontes distintas de proteases as enzimas papaína, protease pancreática bovina (PP) e um coquetel de três enzimas compostas por PP, protease de *Streptomyces* (PS) e protease de *Bacillus polymixa* (PB). Neste estudo, o hidrolisado de colágeno suíno preparado com o coquetel enzimático demonstrou a maior atividade antioxidante, além disso, através de técnicas como cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica e RP-HPLC, quatro peptídeos antioxidantes foram isolados, cujas sequências foram identificadas como Q-G-A-R, L-Q-G-M, L-Q-G-M-Hyp e Hyl-C. Esse resultado confirmou a atividade antioxidante do colágeno da pele suína hidrolisada e a sua viabilidade como suporte a atividade endógena (Li *et al.*, 2007).

Na fabricação de alimentos para animais, a FVA é tradicionalmente muito utilizada e sua composição pode variar conforme a fábrica e o lote de processamento. Segundo a Associação Americana Oficial de Controle de Alimentos (AAFCO, 2014), a inclusão de diversos componentes da ave como moela, intestino, pescoço, cabeça, pés, ovos não desenvolvidos, aparas, carcaças danificadas para consumo humano e resíduos de carne mecanicamente separada (CMS) são permitidas. Sendo assim, devido a essa diversidade na sua composição é esperada a presença de proteínas miofibrilares, além de colágeno, elastina e queratina. Em adição a vantagem da presença de materiais com potencial antioxidante, as vísceras ainda contêm naturalmente enzimas proteolíticas em abundância, o que pode contribuir para os processos de hidrólise industriais (Abeer *et al.*, 2021; Bao e Wu, 2021).

De forma geral, as pesquisas já identificaram diversas propriedades funcionais que as proteínas hidrolisadas podem obter após o processo de hidrólise, são exemplos, a elevação da atividade antimicrobiana, imunomoduladora, atividade inibitória da dipeptidil peptidase IV,

inibitória da ECA e a elevação da atividade antioxidante (Brandelli *et al.*, 2015), foco principal desse estudo. Algumas pesquisas desenvolvidas para estudar a capacidade antioxidante de hidrolisados realizados nos últimos anos alcançaram resultados promissores, como Taheri e colaboradores (2019) ao avaliarem a proteína hidrolisada de músculo do peixe Kawakawa, concluíram que o material atingiu quase 100% de eliminação de DPPH, possuindo assim efeito antioxidante eficiente, já Wang e Shahidi (2018) ao estudarem a capacidade antioxidante de proteína hidrolisada de carne de diferentes fontes animais (bovino, frango e peru) encontraram atividade antioxidante superiores na carne de aves. Em contrapartida, alguns estudos obtiveram efeitos contrários como como Pinto e colaboradores (2023) que não observaram em cães adultos alimentados com dietas formuladas com fígado de frango hidrolisado como principal fonte de proteína (24%, 32% e 40% de proteína bruta) efeitos protetores contra a oxidação. Sendo assim, mais experimentos focados na utilização de fontes proteicas hidrolisadas e a sua capacidade de suporte a rede endógena de antioxidante nos animais são importantes para corroborar com novas perspectivas para a utilização desses ingredientes.

### **1.3 Antioxidantes e qualidade espermática em cães**

A saúde dos animais de companhia, de forma geral, é uma questão significativa para tutores. Os aspectos relacionados a reprodução de animais com alto valor zootécnico desperta preocupação principalmente nos criadores de cães de raça pura, como a capacidade potencial reprodutiva (Silva, 2002). Uma dieta rica em alimentos antioxidantes atua como aliada para o combate do estresse oxidativo no sistema reprodutivo, sendo a nutrição uma aliada essencial para a boa performance reprodutiva.

Os espermatozoides de mamíferos são particularmente susceptíveis a danos citotóxicos induzidos pelas EROs e ao estresse oxidativo. Essa sensibilidade pode ser atribuída à escassez de enzimas antioxidantes no citoplasma devido ao seu tamanho reduzido, a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática, além da reduzida capacidade de reparação do seu DNA (Aitken *et al.*, 1996; Aitken e Sawyer, 2003; Nichi, 2009; Lúcio, 2012; Vieira, 2018). Um dos poucos mecanismos de proteção dos espermatozoides contra agentes oxidantes ocorre através do plasma seminal, o qual contém moléculas de baixo e alto peso molecular, incluindo antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutase (SOD) e catalase, constituindo uma linha de defesa crucial contra as EROs (Agarwal e Saleh, 2002; Maia *et al.*, 2009; Lopes *et al.*, 2021).

A membrana dos espermatozoides é abundantemente composta por ácidos graxos poli-insaturados (Zalata *et al.*, 1998; Baumber *et al.*, 2000), o que a torna altamente suscetível a ação dos oxidantes. Isso pode ser explicado já que a velocidade da peroxidação lipídica depende, entre outros fatores, do grau de insaturação do ácido graxo. Ou seja, quanto maior a insaturação, maior a vulnerabilidade da membrana à oxidação (Comhaire e Mahmoud., 1999; Ochsendorf, 1999; Nichi *et al.*, 2007).

A capacidade dos antioxidantes celulares de atenuarem o dano oxidativo causado pelos EROs e radicais livres influencia diretamente a manutenção da qualidade dos espermatozoides ao longo da espermatogênese, armazenamento epididimário e durante a ejaculação. Essa função antioxidante é crucial, uma vez que a peroxidação lipídica das membranas espermáticas induz a formação de radicais livres, resultando em danos que comprometem a viabilidade reprodutiva dos espermatozoides. Além disso, a atividade oxidativa dos metabólitos interfere na qualidade do sêmen, podendo resultar na perda irreversível na motilidade celular, na fluidez da membrana, inibição da respiração celular, danos ao DNA nuclear e mitocondrial, além da perda de enzimas intracelulares e, conseqüentemente, na fertilidade espermática (Valença e Guerra, 2007; Aitken *et al.*, 2014; Sampaio e Zúccari, 2016).

Devido a extensão dos danos espermáticos causados pelos EROs, estratégias são estudadas para melhorar a capacidade reprodutiva masculina, sendo sugerido o uso de dietas ricas em antioxidantes, uma vez que elas podem reduzir a propagação dos danos oxidativos ao atuarem como suporte à capacidade antioxidante orgânica (Wong *et al.*, 2002).

Em sinergia com a proteção advinda do plasma seminal através dos antioxidantes, como o superóxido dismutase, a glutatona peroxidase e a catalase que atuam na defesa dos espermatozoides dos cães, a proteção exógena através dos alimentos também age como uma importante linha de defesa contra os EROs e seus efeitos nocivos ao operarem de forma colaborativa com o sistema endógeno potencializando a sua ação (Srtzezek *et al.*, 2009). Ou seja, ajudam a manter o equilíbrio na produção dos oxidantes ao entrarem na corrente sanguínea, serem direcionados ao plasma seminal e capturarem as espécies reativas produzidas em excesso (Risso *et al.*, 2021).

Diversas moléculas oxidantes são formadas durante os processos metabólicos do corpo, sendo os mais citados na literatura: radical superóxido ( $O_2^-$ ); radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Agarwal; Gupta; Sharma, 2005; Andrade *et al.*, 2010; Vieira, 2018). Além das EROs, existem produtos de oxidação formados pela ação destas moléculas, como por

exemplo, os produtos da peroxidação lipídica. Dentre estes produtos, existe a molécula denominada malondialdeído (MDA) oriunda da quebra dos ácidos graxos poli-insaturados que são peroxidados durante esse processo, que tende a reagir com proteínas, lipídios e DNA e tem ação tão deletéria quanto as EROs (Montjean *et al.*, 2010).

Apesar do efeito deletério quando produzidos em excesso ou desequilíbrio, os EROs desempenham um papel crucial na fisiologia do espermatozoide, participando de processos fundamentais como a capacitação, hiperativação, reação acrossômica e penetração do espermatozoide no oócito (Lamirande *et al.*, 1997). Portanto, as suplementações com antioxidantes devem ter doses ótimas para evitar a eliminação completa de EROs e RL, afim de não ter impacto negativo no papel dos oxidantes na fisiologia das funções espermáticas em mamíferos.

A atuação dos antioxidantes é variada e pode ser classificada em três categorias de acordo com seus mecanismos de ação: inibindo, bloqueando ou reparando o DNA. Os inibidores preventivos sequestram as EROs e impedem sua interação com os alvos celulares, retardando a sua fase de iniciação. Os bloqueadores, que interceptam, reagem diretamente com os radicais e impedem sua ação. Já os antioxidantes de reparo de DNA, são representados por lipídios e proteínas que removem os danos causados (Ferreira e Abreu, 2007; Michael *et al.*, 2007; Lopes-Santiago *et al.*, 2012; Lima, 2013; Prete *et al.*, 2018; De Souza *et al.*, 2018; Vieira, 2018). Os antioxidantes endógenos presentes no plasma seminal são responsáveis pelo controle da concentração de radicais livres no sêmen, através da neutralização dos EROs, atuando como inibidores ou bloqueadores nesse sistema (Lúcio, 2012; Kawai, 2017; Tufarelli *et al.*, 2018; Lecewicz *et al.*, 2018), com a finalidade de conservar a qualidade do sêmen e prevenir a sobrecarga oxidativa (Lone *et al.*, 2018; Prete *et al.*, 2018).

Em relação a fertilidade, quando comparado a outras espécies animais o sistema reprodutivo de cães é insuficientemente equipado com glândulas sexuais. Isso acontece uma vez que a próstata, adjacente ao epidídimo, é a principal responsável pela produção dos principais componentes bioquímicos do plasma seminal e a glândula acessória mais importante da espécie. Compreendendo a primeira e terceira fração do ejaculado de cães, cerca de 95% do seu volume (England, Allen, 1990; Iguer-Ouada e Verstegen, 1997).

Esse ejaculado é dividido em três frações, a primeira que tem como função limpar o canal da uretra da fêmea para que resíduos de células ou urina não interajam com o sêmen, a segunda que é responsável pelos espermatozoides viáveis e a terceira que tem a função de impelir a segunda fração (England, G.C.W., 2013; Paulo, 2020). Apesar dessa divisão das

frações seminais bem definidas, não há literatura disponível acerca do complexo sistema antioxidante específico de cada uma delas na ejaculação canina, o que dificulta o desenvolvimento de estratégias para melhorar a função reprodutiva por meio do uso de antioxidantes.

Domosławska e colaboradores (2018) investigaram o efeito da suplementação oral de selênio (6 µg/kg) e vitamina E (5mg/kg) no estado antioxidante dos espermatozoides e na qualidade do sêmen em cães com fertilidade reduzida. Os autores observaram aumento no status antioxidante dos espermatozoides e melhora da qualidade do sêmen. Não foram encontrados estudos que avaliaram o consumo de FVH na atividade antioxidante seminal de cães, sendo na maioria dos trabalhos disponíveis relacionados a suplementação oral com outras formas de antioxidantes não enzimáticas, em animais com algum problema reprodutivo.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Protocolo de Ética no uso de animais e local do experimento**

O protocolo experimental deste estudo obedeceu aos princípios de ética adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Brasília, Brasil) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, Areia, Brasil (Protocolo nº3870020621). O presente experimento foi realizado nos canis Altos do Miramar e Quinta di Cani (propriedades privadas), localizados no estado da Paraíba, e que ficam localizados nas cidades de João Pessoa e Campina Grande, respectivamente.

#### **3.2 Animais, instalações e delineamento experimental**

Foram utilizados 16 cães machos adultos (6 cães da raça American Pitbull Terrier, 2 cães da raça Dachshund Miniatura, 6 cães da raça Bulldog Francês e 2 cães da raça Shih Tzu), em idade reprodutiva com média de  $4,19 \pm 0,71$  anos e escore de condição corporal 4 ou 5 de 9 (LaFlamme, 1997). Todos os cães foram previamente vacinados, vermifugados e clinicamente avaliados por médico veterinário para assegurar seu estado clínico antes do estudo. O ECC e o peso corporal ao longo do estudo estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Escore de Condição Corporal (ECC, sistema de 1 – 9) e Peso corporal médio  $\pm$  desvio padrão (PC, kg) dos grupos experimentais ao longo do estudo.

Tratamento	30 dias		90 dias		120 dias	
	ECC	PC	ECC	PC	ECC	PC
FVH	4,5 $\pm$ 0,41	18,8 $\pm$ 10,5	5,3 $\pm$ 0,5	19,7 $\pm$ 11,1	5,3 $\pm$ 0,5	21,2 $\pm$ 12,4
FVA	4,9 $\pm$ 0,85	19,3 $\pm$ 10,7	5,3 $\pm$ 0,5	20,3 $\pm$ 11,2	5,2 $\pm$ 0,5	21,1 $\pm$ 11,5

FVH: Farinha de Vísceras de Aves Hidrolisada; FVA: Farinha de Vísceras de Aves; ECC: Escore de Condição Corporal; PC: Peso Corporal

Todos os cães foram alojados em baias individuais com 2m<sup>2</sup> de área coberta e 4m<sup>2</sup> de solário, durante 120 dias, com acesso diário por um período de uma hora à área externa de 120 m<sup>2</sup> para realização de atividades físicas e socialização. Toda a área foi limpa e checada diariamente para evitar possíveis presenças indesejáveis, como fezes ou material vegetal, que pudessem interferir nos resultados do experimento. Os animais foram alimentados uma vez ao dia (09h00) em quantidade suficiente para suprir suas necessidades de energia metabolizável (estabelecida inicialmente como 110 kcal x peso corporal kg<sup>0,75</sup>) segundo Nutritional Research Council (2006), sendo esse fator ajustado durante o experimento para manter o peso corporal dos cães constante. A água foi fornecida *ad libitum*.

O estudo foi realizado em delineamento ao acaso programado, durante um período de 120 dias, sendo os animais divididos igualmente de acordo com a raça, idade e o peso corporal em dois tratamentos: farinha de vísceras de aves (FVA), com peso corporal inicial médio de 15,92  $\pm$  8,24, e proteína hidrolisada de frango (FVH), com peso corporal inicial médio de 15,59  $\pm$  7,98.

### 3.3 Dietas experimentais

Foram formuladas duas dietas com composição nutricional semelhante, de forma a atender as necessidades nutricionais de cães adultos (FEDIAF, 2020) Dieta 1- contendo 32% de farinha de vísceras (FVA) e Dieta 2- com inclusão de 10% da FVH em substituição a dieta

controle, conforme descrito na Tabela 2. Ambas as dietas foram processadas por extrusão em extrusora de rosca única pertencente a Universidade Estadual Paulista, em Botucatu, Brasil. Posteriormente, o material resultante foi submetido à secagem em um secador tipo esteira. Após esse processo, a gordura de aves e os agentes aromatizantes foram aplicados sobre os *kibbles* por pulverização, enquanto estes estavam sendo continuamente misturados.

A farinha de vísceras de aves hidrolisada (FVH) empregada no estudo é tipicamente produzida a partir de miúdos, órgãos e carne que foram previamente submetidos à hidrólise em um reator enzimático. Após a etapa de hidrólise, a fase solúvel é separada da fração gordurosa e dos resíduos insolúveis, sendo então seca e moída. Os níveis de garantia e as especificações físico-químicas da FVH (BRF S.A, Concórdia, Brasil) foram: umidade (máximo de 8%), proteína bruta (mínimo de 75%), gorduras (máximo de 8%), matéria mineral (máximo de 6%) e digestibilidade (mínimo de 95%).

**Tabela 2.** Composição de ingredientes e química das dietas experimentais contendo farinha de vísceras de aves (FVA) e farinha de aves hidrolisada (FVH).

<b>Ingredientes (%)</b>	<b>FVA <sup>1</sup></b>	<b>FVH <sup>2</sup></b>
Milho	39,34	39,07
Farinha de aves	31,91	20,76
Farinha de aves hidrolisada	-	10,00
Quirera de Arroz	12,00	12,00
Óleo de vísceras de frango	7,49	8,70
Polpa de beterraba	4,00	4,00
Levedura de cerveja	1,00	1,00
Óleo de peixe	0,55	0,55
Palatabilizante	2,00	2,00
Suplemento mineral-vitamínico <sup>3</sup>	0,40	0,40
Cloreto de potássio	0,39	0,37
Sal	0,30	0,30
Colina 60%	0,13	0,19
Fosfato bicálcico	-	0,17
DL-metionina	0,12	0,12
Antifúngico	0,10	0,10
AM	0,10	0,10
Antioxidante	0,07	0,07
<b>Composição química analisada (%)</b>		
Umidade (%)	6,64	6,21
Proteína brutal (%)	26,63	26,90

Extrato etéreo hidrólise ácida (%)	13,74	14,99
Matéria mineral (%)	5,95	4,53
Matéria orgânico (%)	94,05	95,47
Energia bruta (kcal/kg)	4.681	4.759
Energia metabolizável (kcal/kg)	3.780	3.810

FVA<sup>1</sup>: Farinha de vísceras de aves; FVH<sup>2</sup>: Ingrediente da farinha de vísceras hidrolisada foi concedida pela BRF (Proteína hidrolisada de frango, BRF SA, Concórdia, Brasil); <sup>3</sup> Quantidade por kg de Produto: vitamina A, 2.000.000 UI; vitamina B<sub>1</sub> (Mononitrato de Tiamina), 500 mg; vitamina A B12, 6250 mcg; vitamina A B2, 1000 mg; vitamina A B6 (Cloridrato de Piridoxina), 500 mg; vitamina A D3, 200.000 UI; vitamina E (DL-alfa tocoferol), 12.000 UI; ácido pantotênico (D - pantotenato de cálcio), 2500 mg; ácido fólico, 75 mg; biotina, 6 mg; sulfato de cobre, 1750 mg; colina, 100 g; ferro (sulfato de ferro), 20 g; iodo (iodeto de sódio), 375 mg; manganês (óxido manganoso), 1250 mg; niacina, 3750 mg; selênio (selenito de sódio), 40 mg; óxido de zinco, 30 g.

### 3.4 Coleta de sangue e sêmen

Para avaliar o efeito consumo das dietas sobre a capacidade antioxidante orgânica no soro, amostras séricas (3 mL) foram coletadas da veia jugular por venopunção nos dias 0, 60 e 120 usando sistemas de coleta a vácuo de sangue. As amostras foram coletadas, colocadas em tubos previamente identificados e posteriormente centrifugadas durante 10 min a 1400 rpm a 4°C para a obtenção de soro. Na sequência foram guardadas em tubos à -80°C, até posterior análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), determinação do malondialdeído (MDA), capacidade antioxidante total (CAT), e 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).

Para avaliação da capacidade antioxidante seminal, o sêmen de cada cão foi coletado 2 vezes, considerando que o ciclo seminal completo do cão dura cerca de 60 dias, foram realizadas duas avaliações do efeito na dieta sobre a capacidade antioxidante do sêmen, após 60 e 120 dias de consumo das dietas. A coleta foi realizada de forma não invasiva utilizando o método de manipulação digital. Antes do procedimento a região peniana dos animais foi higienizada com uma solução salina e seca com material limpo e seco. Após a higienização, a coleta do sêmen foi realizada com a presença de uma fêmea em um ambiente calmo, para minimizar possível estresse no animal. O ejaculado com volume mínimo de 6 mL foi obtido e mantido em tubo falcon, sendo os primeiros jatos descartados e apenas a segunda fração do ejaculado (fração rica em espermatozoides) aproveitada. Em seguida o volume foi centrifugado com velocidade de 2.000 rpm por 10 minutos para separação do plasma seminal. Cerca de 4 mL do plasma seminal foi transferida para 2 tubos eppendorf (2mL para análise e 2mL para

reserva) e armazenados à -80°C, até posterior análise de malondialdeído (MDA), capacidade antioxidante total (CAT) e superóxido desmutase (SOD).

### 3.5 Análise da capacidade antioxidante sérica e seminal em cães

O MDA foi determinado seguindo o método proposto por Gerard-Monnier (1998), com adaptações. Para esta avaliação, 100µl do plasma sérico foi sequencialmente misturado com 300µl de 10mM da solução de 1-metilfenilindol em acetonitrila e metanol (2:1, v/v) e adição de 75µl de HCl P.A. (37%). Logo após, os tubos passaram pelo vórtex e incubados em banho maria à 45°C por 40 minutos. Após o banho, as amostras foram resfriadas no gelo e então os tubos foram centrifugados à 4.000 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante, a absorbância foi lida usando método de espectrofotometria (SpectraMax M3, Molecular Devices, EUA), no comprimento de onda de 586nm. A concentração do MDA foi calculada usando a curva do 1,1,3,3-tetrametoxipropano hidrolisado (TMP) (Ekstrom *et al.*, 1988).

A mensuração das concentrações plasmáticas de diferentes antioxidantes pode ocorrer separadamente no laboratório, mas geralmente são demoradas, dispendiosos, trabalhosos e muitas vezes requerem técnicas complicadas. Uma alternativa viável é medir a capacidade antioxidante total (CAT), já que o efeito dos diferentes antioxidantes é aditivo e análise da CAT, fornece uma estimativa da quantidade de moléculas de radicais consumidas pelo agente antioxidante (Campos e Lissi, 1997; Ferreira, 2012), para isso foi mensurada usando o método baseado no 2,2-azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS) por leitura da absorbância no comprimento de onda de 660nm (Erel, 2004).

Enquanto o método DPPH, o teste de redução do radical 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl, se baseia na capacidade desse radical orgânico livre em reagir com doadores de hidrogênio, sendo a porcentagem de DPPH restante no sistema proporcional a concentração de antioxidantes (Sanchez-Moreno, 2002; Tomei e Salvador, 2007). A atividade de eliminação do radical DPPH foi avaliada usando a mistura de 0,5ml do sêrum com 0,5ml de acetona, misturada por 1 minuto e então centrifugada por 5 minutos à 5500g e 4°C para desproteíntização da amostra. O sobrenadante foi filtrado com pipeta Pasteur preenchida com pano de algodão para remover pequenas partículas. Uma solução de 0,1mM de DPPH metanólico (0,0039g/100ml) foi imediatamente preparada antes do teste e foi incubada em ambiente escuro. Uma alíquota de 400µl da solução de DPPH foi adicionada em 360µl de neutralizador de fosfato (pH de 7,4)

e 40 µl da amostra e homogeneizada por vórtex. A absorbância foi lida à 505nm (Labquest, Labtest Diagnostica) nos tempos 0, 5, 10, 15 e 20 minutos após mistura. A inibição (descoloração) do radical DPPH foi calculado como a porcentagem relativa da absorbância da amostra no tempo de leitura comparado com um branco (400µl de solução de DPPH adicionado do neutralizador de fosfato).

Superóxido dismutase foi medida indiretamente pelo índice de inibição da SOD. Foi utilizado um kit comercial para dosagem de frutossamina (Labtest), proteína consumida pela SOD. A SOD foi, portanto, mensurada a partir da concentração de frutossamina no plasma seminal, sem inibição e com inibição da ação da SOD. A análise foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) utilizando um comprimento de onda de 530nm, após incubação da amostra a 37°C por 10 minutos e depois realizada duas novas análises, uma após 5 minutos e outra após 10 minutos. Os resultados obtidos sem a inibição da SOD foram considerados como 100%. Para a determinação do valor da SOD, foi realizada uma curva padrão, utilizando-se concentrações pré-determinadas de SOD, utilizando a equação:  $y = 0,027x + 44,26$ . Onde y é a concentração de SOD em ng/mL e x o valor encontrado na porcentagem de inibição da SOD.

### **3.6 Análises estatísticas**

Para a análise estatística, todas as variáveis foram verificadas quanto à distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Para a determinação do efeito da dieta na capacidade antioxidante dos cães ao longo do tempo, os dados foram analisados usando ANOVA modelo misto com dois fatores [grupo (Duas dietas: FVA e FVH) x tempo (Três momentos: 0, 60, 120 dias de consumo das dietas) ] com medidas repetidas do fator [tempo]. Para avaliação seminal considerou-se o mesmo modelo e dois momentos (60 e 120 dias de consumo das dietas). As comparações post-hoc dos dados foram realizadas usando teste de comparação múltipla Tukey-Kramer. As análises estatísticas efetuadas no software SigmaPlot v.12.0 com nível de significância de 5%.

## **4. RESULTADOS**

Todos os cães mantiveram peso e escore corporal adequados, as dietas foram bem aceitas pelos animais, os quais não apresentaram quadros de recusa, diarreia ou vômito. O

consumo médio de alimentos para ambas as dietas durante os 120 dias de consumo foi  $30,94 \pm 3,38$  e  $30,44 \pm 1,89$  g/kg 0,75 /por dia para as dietas FVA e FVH, respectivamente.

#### 4.1 Parâmetros no soro sanguíneo

Na tabela 3 estão descritos os resultados as análises de MDA, CAT e DPPH nas amostras de soro sanguíneo dos cães alimentados com FVA e FVH. Não foram observadas diferenças significativas entre grupos (dietas). Contudo, verificou-se efeito significativo de tempo na avaliação MDA, com redução desta variável ao longo do tempo para o tratamento FVH ( $p=0,005$ ).

**Tabela 3.** Avaliação dos parâmetros antioxidantes em soro sanguíneo de cães alimentados com farinha de vísceras de aves (FVA) e farinha de aves hidrolisada (FVH).

U ( $\mu$ M)	FVA			FVH			P valor		
	Basal	60 dias	120 dias	Basal	60 dias	120 dias	grupo	periodo	interação
MDA <sup>1</sup>	$15,3 \pm 3,6$	$13,2 \pm 4,2$	$13,3 \pm 1,8$	$13,3 \pm 2,07^a$	$13,21 \pm 1,54^a$	$10,6 \pm 1,7^b$	0,069	0,005	0,118
CAT <sup>2</sup>	$0,35 \pm 0,17$	$0,49 \pm 0,35$	$0,38 \pm 0,08$	$0,37 \pm 0,13$	$0,39 \pm 0,09$	$0,31 \pm 0,14$	0,160	0,298	0,701
DPPH <sup>3</sup>	$50,6 \pm 15,7$	$68,9 \pm 18,5$	$55,4 \pm 23,9$	$48,0 \pm 20,2$	$67,0 \pm 19,40$	$47,8 \pm 20,7$	0,427	0,067	0,819

<sup>1</sup> Malondialdeído. <sup>2</sup> Capacidade oxidante total. <sup>3</sup> 1,1-difenil-2-picrilhidrazil. Letras diferentes (a, b, c) na coluna indicam diferenças significativas entre as médias dos tratamentos. Foi estabelecido nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ) e tendências consideradas quando  $0,05 \leq P \leq 0,10$ .

#### 4.2 Parâmetros seminais

Na tabela 4 estão descritos aos parâmetros antioxidantes do sêmen. Não foram encontradas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos estudados, contudo, verificou-se uma tendência à maior capacidade antioxidante seminal nos cães que consumiram dieta FVH ( $p=0,058$ ).

**Tabela 4.** Avaliação dos parâmetros antioxidantes do sêmen alimentados com farinha de vísceras de aves (FVA) e farinha de aves hidrolisada (FVH).

	FVA		FVH		P valor		
	60 dias	120 dias	60 dias	120 dias	grupo	intervalo	Interação
MDA <sup>1</sup> (μM)	6,24 ± 4,78	7,32 ± 5,87	6,16 ± 3,71	4,83 ± 1,96	0,514	0,937	0,437
CAT <sup>2</sup> (μM)	0,167 ± 0,10	0,132 ± 0,12	0,303 ± 0,19	0,278 ± 0,18	0,058	0,493	0,908
SOD <sup>3</sup> (U/mL)	4,48 ± 2,38	3,77 ± 2,16	5,22 ± 2,71	3,64 ± 1,91	0,667	0,304	0,880

1 Malondialdeído. <sup>2</sup>Capacidade oxidante total. <sup>3</sup>Superóxido dismutase

## 5. DISCUSSÃO

A farinha de vísceras de aves é um ingrediente comumente empregado na fabricação de rações na indústria *pet food*. Em contraste com o modo de fabricação convencional, quando esse material passa pelo processo de hidrólise enzimática, ocorre a clivagem das ligações peptídicas pelas proteases, formando aminoácidos livres e peptídeos de baixo peso molecular (Clemente, 2000), dando origem a farinha de aves hidrolisada, que além de possuir características desejáveis para compor alimentos hipoalérgicos também pode ser uma fonte interessante de compostos funcionais antioxidantes, definidos como peptídeos bioativos (Möller *et al.*,2008).

A absorção dos peptídeos no organismo, especialmente no intestino delgado, envolve mecanismos complexos com interação com o sistema oxidante orgânico através de sinais transmitidos para o cérebro, interações celulares com enzimas e transportadores (Hou *et al.*, 2022). Após interagir com receptores presentes no epitélio intestinal, mediadores definidos como transportadores especializados de peptídeos (PEPT1) levam esse fragmento de proteína para dentro das células intestinais. A partir desse ponto, são liberados na corrente sanguínea e direcionados ao fígado e após a chegada nesse órgão os peptídeos são processados seguem para a circulação sistêmica onde são distribuídos para outros tecidos do corpo (Hernández- Ledesma *et al.*,2011). A colaboração dos peptídeos bioativos com a defesa antioxidante endógena pode ocorrer de forma direta ou indireta.

Diretamente, atuando no combate das EROs através da diminuição das concentrações intracelulares dos compostos oxidativos e inibição da produção dos oxidantes ocasionando a redução dos danos do estresse oxidativo, estabelecido pelo desequilíbrio entre a produção dos EROS e a capacidade antioxidante orgânica do corpo em neutralizá-los. Ou indiretamente, modulando a expressão das enzimas antioxidantes endógenas ao ativar vias de sinalização celular para a sua produção. Ou seja, quando ocorre o desequilíbrio entre as concentrações de oxidantes e antioxidantes os peptídeos bioativos podem operar em ambas as vias para estabilizar a homeostase (Zhu *et al.*, 2022).

A oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, também conhecida como peroxidação lipídica (PL), causa alterações na estrutura e permeabilidade dessas estruturas, comprometendo o metabolismo celular e tendo como consequência mais importante o estresse oxidativo (Ferrari,1999). O malondialdeído ou malonildialdeído (MDA), aldeído de cadeia curta é um dos principais produtos da PL, servindo como índice para a

mensuração da intensidade da reação (Sobrinho, 2009; Montjean *et al.*, 2010), O MDA é uma das principais técnicas empregadas para avaliar a oxidação de lipídios, a qual determina os produtos finais da reação, sendo os menores valores (menos produtos formados durante a reação de oxidação), mais desejáveis. O MDA pode ser mais prejudicial do que os EROs, devido ao seu maior tempo de ação, estando associado a doenças degenerativas e ao envelhecimento precoce (Maia *et al.*, 2009; Montjean *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2018).

O MDA é um dos principais biomarcadores do estresse oxidativo, logo sua redução ao longo do tempo é desejável e indica melhora no sistema de defesa antioxidante, e no presente experimento o valor encontrado ( $p=0,005$ ) demonstra a influência positiva da dieta FVH na capacidade antioxidante do cão, ao observar uma redução do potencial dos danos celulares após 120 dias da dieta. Efeitos benéficos dos antioxidantes de hidrolisados proteicos como redução do malondialdeído em diversas espécies já foram avaliados ao longo dos anos. Liu *et al* (2015) ao avaliarem o efeito da proteína hidrolisada de *Macraa veneriformis*, uma espécie de molusco, em camundongos através de marcadores oxidativos como o MDA e a atividade da SOD, observou a elevação da atividade e defesa antioxidante nos animais. Já Sun *et al* (2012) analisaram a proteína de frango hidrolisada *in vitro* e *in vivo* na dieta para camundongos, que mostraram atividades de enzimas antioxidantes significativamente aumentadas, enquanto os níveis de MDA diminuíram tanto no soro quanto no fígado dos animais avaliados. De forma geral, as proteínas de origem animal após o processo de hidrólise demonstram ser importantes fontes de aporte antioxidativo para o organismo, especialmente as de aves. Ao comparar o potencial antioxidante de hidrolisados de carne de peru, frango e carne bovina através da hidrólise com a enzima flavourzyme avaliando radicais como DPPH, Wang e Shahidi (2018) obtiveram como resultado uma atividade antioxidante da carne de peru e de frango significativamente maior do que a da carne bovina ( $P < 0,05$ ). Em contrapartida, outra pesquisa (Hsu *et al.*, 2024) avaliando os efeitos da proteína hidrolisada de frango incorporada em 5 dietas com diferentes proporções e fontes de hidrolisados de frango (dieta 1 com 25% de FVA; dieta 2 20% FVA mais 5% de hidrolisado de coração e fígado de frango; dieta 3 com 25% de hidrolisado de coração e fígado de frango; dieta 4 5% de hidrolisado de frango mais 20% de FVA e dieta 5 com 25% de hidrolisado de frango) na dieta de cães adultos saudáveis não encontraram diferenças nos biomarcadores séricos de estresse oxidativo entre os grupos de hidrolisados, tendo valores comparáveis aos da farinha de frango.

O estresse oxidativo também desempenha efeito negativo em relação ao sêmen, sendo os antioxidantes uma importante fonte de defesa. Neste estudo, apesar de não serem encontradas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos estudados, foi encontrado uma tendência à maior capacidade antioxidante seminal, nos cães que consumiram dieta FVH ( $p = 0,058$ ). Estas avaliações refletem o índice de estresse oxidativo ao qual este está exposto, sendo beneficiado ou não pelo alimento (Vieira, 2018). As EROs podem ocasionar danos irreversíveis ao espermatozoide, como a redução na motilidade, fragmentação do material genético e ruptura da ligação do espermatozoide ao oócito, fatores que em níveis elevados podem comprometer totalmente a fertilidade do animal (Rocha *et al.*, 2018). Essa sensibilidade induzida pelas espécies reativas ao oxigênio, especialmente em espermatozoides de mamíferos, ocorre em decorrência da grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes na membrana plasmática, com a clivagem de suas ligações duplas ocorrendo facilmente (Nichi *et al.*, 2007). Mas também pela sensibilidade do seu DNA com baixa capacidade de reparo, além da baixa quantidade de antioxidantes no seu citoplasma. O plasma seminal é a principal linha de defesa antioxidante para esta célula reprodutiva, sendo composto por moléculas e enzimas de defesa intracelulares como catalase e a SOD (Agarwal e Saleh, 2002; Maia *et al.*, 2009; Nichi, 2009). Um animal com alta performance reprodutiva é uma característica de grande interesse aos criadores comerciais, respaldando a importância do desenvolvimento de dietas que contêm ingredientes antioxidantes na sua formulação, como suplementações de selênio, vitamina C, E e hidrolisados com o intuito de colaboração na melhora do sistema reprodutivo em geral (Silva, 2002; Santos *et al.*, 2016).

Segundo Lamirande e colaboradores (1997) apesar do excesso de oxidantes ser extremamente nocivo, as EROs participam do metabolismo espermático desempenhando uma função fundamental na capacitação, hiperativação e no processo de penetração do espermatozoide no oócito, sendo importante para o processo de fecundação o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Desta forma, o objetivo dos tratamentos com antioxidantes deve evitar a completa eliminação de EROs para não influenciar negativamente em seu papel fundamental na fisiologia das funções espermáticas dos mamíferos.

Visto que, os cães do presente estudo eram saudáveis e não foram expostos a situações adversas para a indução de um maior estresse oxidativo, como exercícios físicos extensos, problemas reprodutivos ou desafios, fatores que contribuem para uma maior atividade oxidativa em animais, não houve muitas alterações significativas no teor de antioxidantes e oxidantes do

sêmen, apenas a tendência a uma maior capacidade antioxidante total no grupo FVH. Dados semelhantes a um experimento realizado por Lopes (2010) onde a adição de antioxidantes no congelamento de sêmen canino não obteve resultado em cães férteis, em contrapartida houve efeito positivo da SOD no grupo com animais subférteis. Entretanto, Aiudi e colaboradores (2022) ao avaliar o efeito da lignina hidrolisada de *Pinus taeda* no status oxidativo e qualidade do sêmen de 40 cães saudáveis, observaram que cães que receberam a substância hidrolisada apresentaram maior atividade sanguínea de superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx) ( $p < 0,01$ ). Os dados mostram que provavelmente os antioxidantes exercem interferência maior na atividade seminal de cães expostos a circunstâncias de maior estresse oxidativo, sendo interessante o desenvolvimento de futuros estudos nesse sentido, com uma abordagem alimentar com dietas ricas em antioxidantes sendo alternativa para redução dessa condição biológica. Como fatores limitantes no presente estudo podem ser citados a impossibilidade de realização da coleta inicial do sêmen e análises morfológicas adicionais devido a logística.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que a inclusão de 10% de farinha de vísceras de aves hidrolizada em dietas para cães parece contribuir para a melhora do status antioxidante sérico de cães, estendendo-se a uma melhora no status antioxidante do sêmen. Os resultados indicam potencial deste ingrediente para compor alimentos que contribuam com a a saúde animal geral e reprodutiva. Futuros estudos são recomendados para definir os teores ótimos de inclusão da farinha de vísceras de aves hidrolizada para efetiva melhora da atividade antioxidante orgânica de cães.

## 7. REFERÊNCIAS

ABEER, M. M.; TRAJKOVIC, S.; BRAYDEN, D. J. Measuring the oral bioavailability of protein hydrolysates derived from food sources: A critical review of current bioassays. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 144, p. 112275, 2021. Doi <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112275>

Informações Gerais do setor. ABINPET, 2024. Disponível em: <https://abinpet.org.br/informacoes-gerais-do-setor/>

AITKEN, R. J. A free radical theory of male infertility. *Reproduction, Fertility, and Development*, v. 6, n. 1, p. 19- 23; discussion 23–4, 1994. Doi <https://doi.org/10.1071/RD9940019>

AITKEN, R. J. *et al.* Superoxide dismutase in human sperm suspensions: Relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 21, n. 4, p. 495–504, 1996. Doi [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00119-0](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00119-0)

AITKEN, R.J.; SMITH, T.B.; JOBLING, M.S.; BAKER, M.A.; DE IULIIS, G.N. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*, v.13, p.31-38, 2014. Doi 10.4103/1008-682X.122203

AITKEN, R. JOHN; SAWYER, DENNIS. The human spermatozoon—not waving but drowning. *Advances in male mediated developmental toxicity*, p. 85-98, 2003

Association of American Feed Control Officials (AAFCO). Official publication. Oxford. 2014.

AGARWAL ,ASHOK, SALEH, RAMADAN A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am*, v. 29, p.817-27, 2002

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 3, p. 1–21, 2005. Doi <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>

AGUILAR-TOALÁ, J. E.; LICEAGA, A. M. Cellular antioxidant effect of bioactive peptides and molecular mechanisms underlying: beyond chemical properties. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 56, n. 5, p. 2193–2204, 2021 Doi <https://doi.org/10.1111/ijfs.14855>

ANDRADE, E. R., MELO-STERZA, F. A., SENEDA, M. M., & ALFIERI, A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, n. 2, p. 79–85, 2010

ARIHARA, KEIZO. Strategies for designing novel functional meat products. *Meat science*, v. 74, n. 1, p. 219-229, 2006 Doi <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.028>

AIUDI, G. G., CICIRELLI, V., MAGGIOLINO, A., BURGIO, M., BRAGAGLIO, A., TATEO, A., & DE PALO, P. Effect of *Pinus taeda* hydrolyzed lignin on biochemical profile, oxidative status, and semen quality of healthy dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 9, p. 866112, 2022 Doi <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.866112>

BAO, X.; WU, J. Impact of food-derived bioactive peptides on gut function and health. *Food Research International*, v. 147, n. May, 2021. Doi <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110485>

BASKIN, STEVEN; SALEM, HARRY (ED.). *Oxidants, antioxidants and free radicals*. CRC Press, 1997

BAUMBER, J., BALL, B. A., GRAVANCE, C. G., MEDINA, V., & DAVIES-MOREL, M. C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of andrology*, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000 Doi <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03420.x>

BECHAUX, J., GATELLIER, P., LE PAGE, J. F., DRILLET, Y., & SANTELHOUTELLIER, V. A comprehensive review of bioactive peptides obtained from animal byproducts and their applications. *Food & function*, 10(10), 6244-6266, 2019 Doi <https://doi.org/10.1039/C9FO01546A>

BRANDELLI, A., DAROIT, D. J., CORRÊA, A. P. F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Research International*, v. 73, p. 149-161, 2015 Doi <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.01.016>

CAMPOS, A. M.; LISSI, E. A. Kinetics of the reaction between 2, 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *International Journal of chemical kinetics*, v. 29, n. 3, p. 219-224, 1997 Doi [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4601\(1997\)29:3%3C219::AID-KIN9%3E3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4601(1997)29:3%3C219::AID-KIN9%3E3.0.CO;2-X)

CAVE, N. J. Hydrolyzed Protein Diets for Dogs and Cats. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v. 36, n. 6, p. 1251–1268, 2006 Doi DOI: 10.1016/j.cvsm.2006.08.008

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, n. 7, p. 254–262, jul. 2000 Doi [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00007-3)

COMHAIRE, F. H., MAHMOUD, A. M. A., DEPUYDT, C. E., ZALATA, A. A., & CHRISTOPHE, A. B. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm quality and fertilizing potential: the andrologist's viewpoint. *Human Reproduction Update*, v. 5, n. 5, p. 393-398, 1999 Doi <https://doi.org/10.1093/humupd/5.5.393>

DAMODARAN, SRINIVASAN. Amino acids, peptides and proteins. *Fennema's food chemistry*, v. 4, p. 425-439, 2008

DA SILVA MAIA, M., BICUDO, S. D., AZEVEDO, H. C., SICHERLE, C. C., DE SOUSA, D. B., & RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Ruminant Research*, v. 85, n. 2-3, p. 85-90, 2009 Doi <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.07.001>

DAVIES, KELVIN JA. A secondary antioxidant defense role for proteolytic systems. *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*, p. 575-585, 1988 Doi [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5568-7\\_90](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5568-7_90)

DE LAMIRANDE, E., JIANG, H., ZINI, A., KODAMA, H., & GAGNON, C. Reactive Oxygen Species and Sperm Physiology. *Reviews of Reproduction*, v. 2, P. 48-54, 1997

DE SOUZA, WILDELFANCYS LIMA; MORAIS, ELENICE ANDRADE; TONIOLLI, RICARDO. Antioxidantes e Crioprotetores na Criopreservação do Sêmen de Ovinos. 2018

DEATON, CHRISTOPHER M.; MARLIN, DAVID J. Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 2, n. 3, p. 278-291, 2003 Doi [https://doi.org/10.1053/S1534-7516\(03\)00070-2](https://doi.org/10.1053/S1534-7516(03)00070-2)

DOMOSŁAWSKA, A., ZDUNCZYK, S., FRANCZYK, M., KANKOFER, M., & JANOWSKI, T. Selenium and vitamin E supplementation enhances the antioxidant status of spermatozoa and improves semen quality in male dogs with lowered fertility. *Andrologia*, v. 50, n. 6, p. e13023, 2018 Doi <https://doi.org/10.1111/and.13023>

EKSTRÖM, T., GARBERG, P., EGESTAD, B., & HÖGBERG, J. Recovery of malondialdehyde in urine as a 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivative analyzed with high-performance liquid chromatography. *Chemico-biological interactions*, v. 66, n. 3-4, p. 177-187, 1988 Doi [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(88\)90070-1](https://doi.org/10.1016/0009-2797(88)90070-1)

ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E., MIDDLETON, D.J. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculate. *Research in Veterinary Science*, v.49, p.66–70, 1990 Doi [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)31048-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31048-8)

ENGLAND, G.C.W., RUSSO, M., FREEMAN, S.L. The bitch uterine inflammatory response to mating and its modification by male accessory gland secretion. *The Veterinary Journal*, v.195, p.179–184, 2013 Doi <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.04.027>

EREL, OZCAN. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry*, v. 37, n. 4, p. 277-285, 2004 Doi <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015>

ETEMADIAN, Y., GHAEMI, V., SHAVIKLO, A. R., POURASHOURI, P., MAHOONAK, A. R. S., & RAFIPOUR, F. Development of animal/ plant-based protein hydrolysate and its application in food, feed and nutraceutical industries: State of the art. *Journal of Cleaner Production*, v. 278, 2021 Doi <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123219>

FAN, Q., CHEN, L., CHENG, S., LI, F., LAU, W. B., WANG, L. F., & LIU, J. H. Aging aggravates nitrate-mediated ROS/RNS changes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2014, 2014 Doi <https://doi.org/10.1155/2014/376515>

FERNANDES, W. R., RODRIGUES, J. A., MICHIMA, L. E. D. S., & SIQUEIRA, R. F. D. "Avaliação do estresse oxidativo em cavalos de trote através da mensuração de malondialdeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH) eritrocitária." *Pesquisa Veterinária Brasileira* 32 (2012): 677-680 Doi <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000700017>

FERRARI, C. K. B. Oxidação de gorduras em alimentos: produção de substâncias tóxicas na dieta do homem. *Rev Instit Hig Med Soc*, v. 3, p. 22-6, 1999

FERREIRA, CHAYANNE SILVA. Parâmetros do estresse oxidativo no soro de cães alimentados com rações suplementadas com óleo de caju, óleo de mamona e óleo de peixe. 2012

FERREIRA, ISABEL CFR; ABREU, RUI. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, p. 32-39, 2007 Disponível em <http://hdl.handle.net/10198/2711>

GÉRARD-MONNIER, D., ERDELMEIER, I., RÉGNARD, K., MOZE-HENRY, N., YADAN, J. C., & CHAUDIERE, J. "Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4- hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 11, no. 10, pp. 1176–1183, 1998 Doi <https://doi.org/10.1021/tx9701790>

GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.* [lume.ufrgs.br](http://lume.ufrgs.br), 2006

HERNÁNDEZ-LEDESMA, BLANCA; DEL MAR CONTRERAS, MARIA; RÉCIO, ISIDRA. Peptídeos anti-hipertensivos: Produção, biodisponibilidade e incorporação em alimentos. *Avanços na ciência de colóides e interfaces*, vol. 1, pág. 23-35, 2011

HOU, Y., WU, Z., DAI, Z., WANG, G., & WU, G. Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Bioactive Peptides from Food*, p. 209-232, 2022

HSU, C., MARX, F., GULDENPFENNIG, R., VALIZADEGAN, N., & DE GODOY, M. R. The effects of hydrolyzed protein on macronutrient digestibility, fecal metabolites and microbiota, oxidative stress and inflammatory biomarkers, and skin and coat quality in adult dogs. *Journal of animal science*, p. skae057, 2024 Doi <https://doi.org/10.1093/jas/skae057>

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Effect of finasteride (Proscar MSD) on seminal composition, prostate function and fertility in male dogs. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, v. 51, p. 139-149, 1997

JANASZEWSKA, A.; BARTOSZ, G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, v. 62, n. 3, p. 231-236, 2002 Doi <https://doi.org/10.1080/003655102317475498>

KERKSICK, CHAD; WILLOUGHBY, DARRYN. The antioxidant role of glutathione and N-acetyl-cysteine supplements and exercise-induced oxidative stress. *Journal of the international society of sports nutrition*, v. 2, n. 2, p. 38, 2005 Doi <https://doi.org/10.1186/1550-2783-2-2-38>

LAFARGA, TOMAS; HAYES, MARIA. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat science*, v. 98, n. 2, p. 227-239, 2014 Doi <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.036>

LAFLAMME; DRALSTON P. C. Development and validation of a body condition score system for dogs. *Canine practice (Santa Barbara, Calif: 1990) (USA)*, 1997

LECEWICZ, M., STRZEŻEK, R., KORDAN, W., & MAJEWSKA, A. Effect of extender supplementation with low-molecular-weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. *Journal of veterinary research*, v. 62, n. 2, p. 221-227, 2018 Doi <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0032>

LI, B., CHEN, F., WANG, X., JI, B., & WU, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food chemistry*, v. 102, n. 4, p. 1135-1143, 2007 Doi <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.002>

LIU, R., WANG, L., ZHENG, W., & WU, H. In vivo antioxidant effects of hydrolysate derived from waste proteins of *Macrura veneriformis*. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, v. 24, n. 2, p. 143-152, 2015 Doi <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.763315>

LIMA, ALESSANDRA SILVA. Metabolismo oxidativo, perfil bioquímico e função de polimorfonucleares de vacas holandesas primíparas e múltíparas no periparto suplementadas com vitaminas ADE. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo

LONE, S. A., PRASAD, J. K., GHOSH, S. K., DAS, G. K., BALAMURUGAN, B., & VERMA, M. R. Study on correlation of sperm quality parameters with antioxidant and oxidant status of buffalo bull semen during various stages of cryopreservation. *Andrologia*, v. 50, n. 4, p. e12970, 2018 Doi <https://doi.org/10.1111/and.12970>

LOPES, BETHANIA VIEIRA. Efeito da adição e/ou suplementação de antioxidante no processo de congelação/descongelação de sêmen de cães férteis e subférteis. 2010

LOPES-SANTIAGO, B. V., MONTEIRO, G. A., BITTENCOURT, R., ARDUINO, F., OVIDIO, P. P., JORDÃO-JUNIOR, A. A., ... & LOPES, M. D. Evaluation of sperm DNA peroxidation in fertile and subfertile dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 208-209, 2012 Doi <https://doi.org/10.1111/rda.12039>

LÚCIO CF. Efeito da glutathiona reduzida (GSH) na criopreservação de espermatozóides da espécie canina: avaliação in vitro e in vivo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012

KAWAI, G. K. V., GURGEL, J. R. C., DE AGOSTINI LOSANO, J. D., DALMAZZO, A., ROCHA, C. C., TSUNODA, R. H., ... & NICHI, M. Susceptibility of stallion spermatozoa to different oxidative challenges: role of seminal plasma. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 55, p. 76-83, 2017 Doi <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.03.225>

MAIA, M. da S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2009

MARLIN D.J., FENN K., SMITH N., DEATON C.D., ROBERTS C.A., HARRIS P.A., DUNSTER C. & KELLY F.J. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *The Journal of nutrition*, v. 132, n. 6, p. 1622S-1627S, 2002 Doi <https://doi.org/10.1093/jn/132.6.1622S>

MICHAEL A, ALEXOPOULOS C, PONTIKI E, HADJIPAVLOU-LITINA D, SARATSIS P, BOSCOS C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen

species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 68, n. 2, p. 204-212, 2007  
Doi <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.053>

MILTENBURG, TÂNIA ZÓIA. Propriedades nutricionais e funcionais de farinha de vísceras de aves obtida por hidrólise enzimática na dieta de gatos. 2021

MÖLLER, N. P., SCHOLZ-AHRENS, K. E., ROOS, N., & SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European journal of nutrition*, v. 47, n. 4, p. 171-182, 2008 Doi <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0710-2>

MONTJEAN, D., MÉNÉZO, Y., BENKHALIFA, M., COHEN, M., BELLOC, S., COHEN-BACRIE, P., & DE MOUZON, J. Malonaldehyde formation and DNA fragmentation: Two independent sperm decays linked to reactive oxygen species. *Zygote*, v. 18, n. 3, p. 265–268, 2010 Doi [10.1017/S0967199409990311](https://doi.org/10.1017/S0967199409990311)

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, n.2, p. 109-122, 2006  
Doi <https://doi.org/10.5216/ref.v3i2.2082>

NICHI M. Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2009

NICHI, M., GOOVAERTS, I. G. F., CORTADA, C. N. M., BARNABE, V. H., DE CLERCQ, J. B. P., & BOLS, P. E. J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 C. *Theriogenology*, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007 Doi <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.08.002>

NOLI, CHIARA; BELTRANDO, GIORGIA. The usefulness of a hydrolysed fish and rice starch elimination diet for the diagnosis of adverse food reactions in cats: an open clinical trial. *Veterinary Dermatology*, v. 32, n. 4, p. 326-e90, 2021 Doi <https://doi.org/10.1111/vde.12970>

OCHSENDORF, F. R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*, v. 5, n. 5, p. 399-420, 1999 Doi <https://doi.org/10.1093/humupd/5.5.399>

PASUPULETI, VIJAI K.; HOLMES, CHRIS; DEMAIN, ARNOLD L. Applications of protein hydrolysates in biotechnology. Springer Netherlands, 2010 Doi [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6674-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6674-0_1)

PAULO, OTÁVIO LUÍS DE OLIVEIRA HENRIQUES. Perfil proteico do sêmen de cães: em busca de um antígeno espermático para contracepção. 2020

PINTO, C. F. D., MONTEIRO, C. F. C., BORTOLO, M., MARX, F. R., MODEL, J. F. A., VINAGRE, A. S., & TREVIZAN, L. Effects of diets based on hydrolyzed chicken liver and different protein concentrations on the formation and deamination of biogenic amines and total antioxidant capacity of dogs. *Animals*, v. 13, n. 16, p. 2578, 2023 Doi <https://doi.org/10.3390/ani13162578>

POWER, OLIVE; JAKEMAN, P.; FITZGERALD, R. J. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino acids*, v. 44, p. 797-820, 2013

Del Prete, C., Ciani, F., Tafuri, S., Pasolini, M. P., Della Valle, G., Palumbo, V., ... & Cocchia, N. Effect of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase supplementation in the extender on chilled semen of fertile and hypofertile dogs. *Journal of Veterinary Science*, v. 19, n. 5, p. 667-675, 2018 Doi <https://doi.org/10.4142/jvs.2018.19.5.667>

RADAK, ZSOLT; CHUNG, HAE YOUNG; GOTO, SATARO. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 44, n. 2, p. 153-159, 2008 Doi <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.01.029>

RAMOS, ELOISE. Cristina de. Proteína hidrolisada de frango sobre parâmetros metabólicos, oxidativos e inflamatórios de gatos. 2022

RAO, M. B., A. M. TANKSALE, M. S. GHATGE, AND V. V. DESHPANDE. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 597-635 Doi <https://doi.org/10.1128/mubr.62.3.597-635.1998>

RISSE, A., PELLEGRINO, F. J., CORRADA, Y., & SCHINELLA, G. Evaluation of total antioxidant activity and oxidative stress in seminal plasma from dogs supplemented with

fish oil and vitamin E. *International Journal of Fertility & Sterility*, v. 15, n. 1, p. 15, 2021  
Doi 10.22074/IJFS.2021.6226

Rocha, C. C., Kawai, G. K. V., de Agostini Losano, J. D., Angrimani, D. D. S. R., Rui, B. R., de Cássia Bicudo, L., ... & Nichi, M. Carnosine as malondialdehyde scavenger in stallion seminal plasma and its role in sperm function and oxidative status. *Theriogenology*, v. 119, p. 10–17, 2018 Doi <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.06.016>

ROCHA, MAURÍCIO ADRIANO. Biotecnologia na nutrição de cães e gatos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 37, p. 42-48, 2008 Doi <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008001300006>

RODWELL, V. W., BENDER, D., BOTHAM, K. M., KENNELLY, P. J., & WEIL, P. A. *Bioquímica Ilustrada de Harper-31*. McGraw Hill Brasil, 2021

RUDENKO, P., VATNIKOV, Y., ENGASHEV, S., KVOCHKO, A., NOTINA, E., BYKOVA, I., ... & RUDENKO, V. The Role of Lipid Peroxidation Products and Antioxidant Enzymes in the Pathogenesis of Aseptic and Purulent Inflammation in Cats. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, v. 8, n. 2, p. 210–217, 2021  
Doi 10.5455/javar.2021.h504

SACCHETTI, G., DI MATTIA, C., PITTIA, P., & MARTINO, G. Application of a radical scavenging activity test to measure the total antioxidant activity of poultry meat. *Meat Science*, v. 80, n. 4, p. 1081-1085, 2008 Doi <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.04.030>

SAMPAIO, B. F. B.; ZÚCCARI, C. E. S. Addition of hydro and liposoluble antioxidants to the cooling extender of equine semen – review. *REDVET Rev. Electrón. vet.* V. 17 n. 11, 2016

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol. Int.* V.8 p.121-137, 2002 Doi <https://doi.org/10.1106/108201302026770>

SANTOS, J. F. P. D., GOSMES, E. T., SIQUEIRA, A. K. M., & CARDOSO, R. D. C. S. Andrologia e criopreservação de sêmen em cães. *R. bras. Reprod. Anim.*, p. 167-179, 2016

SCHLIECK, T. M. M., PETROLI, T. G., BISSACOTTI, B. F., COPETTI, P. M., BOTTARI, N. B., MORSCH, V. M., & DA SILVA, A. S. Addition of a blend of essential oils (cloves, rosemary and oregano) and vitamin E to replace conventional chemical antioxidants in dog feed: Effects on food quality and health of beagles. *Archives of Animal Nutrition*, v. 75, n. 5, p. 389-403, 2021 Doi <https://doi.org/10.1080/1745039X.2021.1960091>

SILVA AR. Avaliação andrológica de cães e gatos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.5, p.52-55, 2002

SHIMIZU, MAKOTO. Food-derived peptides and intestinal functions. *Biofactors*, v. 21, n. 1-4, p. 43-47, 2004

SOBRINHO, B., & DE ALMEIDA, C. Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozoides criopreservados de cães. 2009

SRTZEZEK R, KOZIOROWSKA-GILUN M, KOWALÓWKA J, SRTZEZEK J. Characteristics of antioxidant system in dog semen. *Pol J Vet Sci*, v. 12, n. 1, p. 55-60, 2009

SUN, Y., PAN, D., GUO, Y., & LI, J. Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 10, p. 3397-3404, 2012 Doi <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.07.047>

TAHERI, ALI; BAKHSHIZADEH G, ANAHITA. Antioxidant and ace inhibitory activities of kawakawa (*Euthynnus affinis*) protein hydrolysate produced by skipjack tuna pepsin. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, v. 29, n. 2, p. 148-166, 2020. Doi <https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1707924>

TOMEI, RAFAEL RODRIGUES; SALVADOR, MARCOS JOSÉ. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. *Encontro Latino Americano De Iniciação Científica*, v. 11, p. 1963-1967, 2007

TORRES, ELIZABETH APARECIDA FERRAZ DA SILVA. Oxidação lipídica em carnes: uma revisão. *Revista Nacional da Carne*, v. 17, n. 188, p. 13-22, 1992

TORRES, ELIZABETH APARECIDA FERRAZ DA SILVA; OKANI, ELIZA TIEKO. Teste de TBA: ranço em alimentos. *Revista Nacional da Carne*, n. 243, p. 1, 1997

TUFARELLI, V., RIZZO, A., LACALANDRA, G. M., GUARICCI, A. C., LAUDADIO, V., & VALENTINI, L. Effects of the supplementation with an high-polyphenols extra-virgin olive oil on kinetic sperm features and seminal plasma oxidative status in healthy dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 53, n. 3, p. 582–587, 2018 Doi <https://doi.org/10.1111/rda.13145>

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Reactive Oxygen Species (ROS) and the use of antioxidants on the boar semen criopreservation. 2007

VASCONCELLOS, RICARDO S.; VOLPATO, JOSIANE A.; SILVA, INGRID C. Bioactive peptides extracted from hydrolyzed animal byproducts for dogs and cats. **Animal Frontiers**, v. 14, n. 3, p. 38-45, 2024. Doi <https://doi.org/10.1093/af/vfae012>

VIEIRA, N. D. M. G. Estresse oxidativo seminal em cães: estudo da susceptibilidade dos espermatozoides e possíveis terapias durante a criopreservação. Diss. Universidade de São Paulo, 2018

WANG, DAOYING; SHAHIDI, FEREDOON. Protein hydrolysate from turkey meat and optimization of its antioxidant potential by response surface methodology. *Poultry science*, v. 97, n. 5, p. 1824-1831, 2018 Doi <https://doi.org/10.3382/ps/pex457>

WONG, W.Y., MERKUS, H.M., THOMAS, C.M. MENKVELD, R., ZIELHUIS, G.A., STEEGERS, R.P. Effects of acid folic and zinc sulfate on male factor subfertility: a doubleblind randomized, placebo-controlled trial. *Fertility and Sterility*, 77:491-498, 2002 Doi [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)03229-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(01)03229-0)

WU, H. C., SHIAU, C. Y., CHEN, H. M., & CHIOU, T. K. Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. *Journal of Food and Drug analysis*, v. 11, n. 2, p. 13, 2003 Doi <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2720>

ZALATA, A. A., CHRISTOPHE, A. B., DEPUYDT, C. E., SCHOONJANS, F., & COMHAIRE, F. H. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Molecular human reproduction*, v. 4, n. 2, p. 111-118, 1998 Doi <https://doi.org/10.1093/molehr/4.2.111>

ZHU, Y., LAO, F., PAN, X., & WU, J. Food protein-derived antioxidant peptides: Molecular mechanism, stability and bioavailability. *Biomolecules*, v. 12, n. 11, p. 1622, 2022 Doi <https://doi.org/10.3390/biom12111622>