



**UDESC**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Produção de ração de cães com um blend de óleos essenciais (cravo, alecrim e orégano) e vitamina E em substituição a antioxidante químico convencional: efeitos sobre qualidade de ração e saúde dos beagles**

**TAÍSE MENDES MALDANER SCHLIECK**

**CHAPECÓ, 2021**

**TAÍSE MENDES MALDANER SCHLIECK**

**PRODUÇÃO DE RAÇÃO DE CÃES COM UM BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS  
(CRAVO, ALECRIM E ORÉGANO) E VITAMINA E EM SUBSTITUIÇÃO A  
ANTIOXIDANTE QUÍMICO CONVENCIONAL: EFEITOS SOBRE QUALIDADE DE  
RAÇÃO E SAÚDE DOS BEAGLES**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado  
do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia,  
Área de Concentração Ciência e Produção  
Animal, da Universidade do Estado de Santa  
Catarina (UDESC), como requisito parcial para  
obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**  
**Orientador: Aleksandro Schafer da Silva**  
Co-orientador: Tiago Goulart Petrolli

Chapecó, SC, Brasil

2021

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Schlieck, Taíse

Produção de ração de cães com um blend de óleos essenciais (cravo, alecrim e orégano) e vitamina e em substituição a antioxidante químico convencional: efeitos sobre qualidade de ração e saúde dos beagles / Taíse Schlieck. -- 2021.

60 p.

Orientador: Aleksandro Schafer da Silva

Coorientador: Tiago Goulart Petrolli

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2021.

1. Cães. 2. conservante. 3. nutrição animal. 4. saúde animal. I. Schafer da Silva, Aleksandro . II. Goulart Petrolli, Tiago . III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

**Universidade do Estado de Santa Catarina  
UDESC Oeste  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ADIÇÃO DE UMA BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS (CRAVO, ALECRIM E ORÉGANO) E  
VITAMINA E PARA SUBSTITUIR ANTIOXIDANTES QUÍMICOS CONVENCIONAIS NA  
ALIMENTAÇÃO DE CÃES: EFEITOS NA QUALIDADE DA RAÇÃO E NA SAÚDE DOS BEAGLES**

Elaborada por  
**Táise Mendes Maldaner Schlieck**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

Comissão Examinadora:



---

Aleksandro Schafer da Silva (Presidente/Orientador) (UDESC)



---

Carine Freitas Souza (UFSM)



---

Juliana Sarubbi (UFSM)

Chapecó, 12 de março de 2021.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, o qual permitiu minha chegada até aqui, o qual me mostrou o caminho, me fortaleceu e é presença constante em minha vida.

Ao meu marido Rodrigo André Schlieck, meu porto seguro, companheiro de todas as horas, exemplo de ser humano e profissional, pela sua compreensão, respeito, tolerância, por presentear-me com a família que sempre sonhei e por todo apoio desde os tempos da graduação. Agradeço por todo auxílio na realização das análises sanguíneas dos animais desse experimento

Aos meus filhos, Afonso e Helena, que ocupam primeiro lugar em minha vida e que são o combustível para me tornar uma pessoa melhor.

Aos meus pais, Claudério e Maria Maldaner, pelo exemplo de dignidade e perseverança, pela confiança na minha capacidade e pela sólida formação moral, ética e acadêmica que me proporcionaram, agradeço o incentivo até a chegada deste mestrado, minha eterna gratidão.

De uma maneira especial a toda minha família e amigos, pelo apoio e incentivo.

Ao meu Orientador, Professor Aleksandro, minha admiração e gratidão pelos seus ensinamentos, paciência, amizade, trocas de experiências e por me guiar nessa minha retomada a vida acadêmica.

Ao meu co-orientador, Professor Tiago Petrolli, por fornecer as rações e realizar as análises dos alimentos do experimento.

Aos meus colegas do grupo GANA por todo suporte e amizade durante esse período, mesmo em meio a pandemia, o pouco tempo que convivemos levarei para sempre, sigam sempre incríveis e solidários.

Aos colegas de mestrado, mesmo convivendo pouco de forma presencial, o apoio de vocês foi fundamental para seguir nessa jornada e finalizar com êxito.

A todos os professores que participaram desta caminhada, sempre solícitos, mesmo em formato on-line estiveram presentes.

A Universidade do Estado de Santa Catarina por oferecer um curso de Pós-Graduação em Zootecnia gratuito e de qualidade. A Capes pela bolsa recebida durante a realização do mestrado que foi fundamental, ao CNPq pelo suporte financeiro, e a Vipet Food's por produzir a ração utilizada no experimento.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

### **PRODUÇÃO DE RAÇÃO DE CÃES COM UM BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS (CRAVO, ALECRIM E ORÉGANO) E VITAMINA E EM SUBSTITUIÇÃO A ANTIOXIDANTE QUÍMICO CONVENCIONAL: EFEITOS SOBRE QUALIDADE DE RAÇÃO E SAÚDE DOS BEAGLES**

AUTOR: Taíse Mendes Maldaner Schlieck  
ORIENTADOR: Aleksandro Schafer da Silva  
Chapecó, 12 de março de 2021

Diversos tipos de aditivos, sejam eles naturais ou sintéticos, estão disponíveis para utilização na formulação de alimentos para cães, sendo os antioxidantes os mais importantes, pois visam a conservação do alimento e segurança alimentar aos animais. Entretanto, existem poucos dados científicos sobre a segurança da utilização de aditivos naturais nas formulações de alimentos para cães, bem como sobre os efeitos no alimento e saúde dos animais. Frente a isso, objetivou-se verificar se a utilização de um *blend* de óleos essenciais (cravo, alecrim e orégano) e vitamina E possui ação antioxidante na ração para cães e os efeitos na saúde dos animais. O experimento foi conduzido no Canil de Manutenção da UDESC em Guatambu SC (FECEO), sendo utilizado 10 cães da raça beagle, machos(± 12kg), adultos. O experimento foi composto em tratamento controle (TCON) – ração extrusada (premium) com antioxidante sintético (BHT (butilhidroxitolueno) (n=5) e tratamento teste (TNAT) - ração extrusada (premium) com antioxidantes naturais (blend de óleos essenciais de cravo (6%), alecrim (2%), orégano (1%) e vitamina E (3,3%)) (n=5). O experimento teve duração de 28 dias, e foi repetido após intervalo de 10 dias. Importante ressaltar, que todos os animais (n=10) consumiram as duas rações, na primeira ou segunda fase do experimento; isto é, os cães que estavam no grupo TCON na primeira fase, obrigatoriamente estavam no grupo TNAT na segunda fase. Os animais foram alimentados 2 vezes/dia (180g ração/animal/dia) em canis individuais. As rações foram produzidas em fábrica comercial, com a adição dos conservantes químicos e natural (dose de 1% na ração) na etapa de banho de óleo, juntamente com os demais minerais e vitaminas adicionados à ração. Amostras de sangue e fezes foram coletadas nos dias 1, 14 e 28 de experimento, de cada fase experimental. Foram realizadas análises de hemograma (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e leucócitos) e dos níveis séricos de colesterol, LDL, HDL, triglicérides, glicemia, albumina, ureia, creatinina, AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) e Gama GT (gamaglutamiltransferase). Foi realizada a análise sérica de status oxidante/antioxidantes através da análise das espécies reativas de oxigênio (EROs), tióis não proteicos (NPSH), e atividades das enzimas glutathione S-transferase (GST) e glutathione peroxidase GPx. Foi realizada contagem bacteriana total (CBT) das fezes. Os cães foram pesados no início e no fim de cada etapa experimental. O peso corporal não diferiu entre os tratamentos. Em ambos os tratamentos, observou-se eficiência de conservação alimentar, que demonstra a viabilidade do uso de fontes naturais como antioxidantes na alimentação de cães, pois as variáveis químicas e oxidativas não diferem independentemente do antioxidante utilizado durante a produção. As variáveis bioquímicas séricas e hemograma dos animais não foram influenciadas pelos tratamentos (P>0.05) porém observou-se uma

redução no número de linfócitos com passar do tempo somente nos cães do grupo TNAT. Também foi observado efeito de dia para contagem de leucócitos total, neutrófilos e eritrócitos somente nos animais do TNAT, onde houve aumento significativo ( $P \leq 0,05$ ) no dia 28. Na variável CBT de fezes, houve efeito do tratamento e a interação tratamento x dia, onde observou-se a diminuição da contagem bacteriana ( $P \leq 0,05$ ) nas fezes dos cães do TNAT nos dias 14 e 28. Os cães alimentados com a ração do TNAT apresentaram diminuição significativa nos níveis de EROs (considerando a média) ( $P \leq 0,05$ ). Houve efeito de tratamento nos níveis de NPSH e atividade de GST no TNAT, isto é, houve aumento de níveis dessas variáveis. Conclui-se que a substituição dos antioxidantes sintéticos por aditivos de fontes naturais em alimentos para cães, preserva o alimento da mesma forma garantindo a segurança alimentar, além de estimular os níveis de antioxidantes sistêmicos, podendo minimizar os impactos causados pelos radicais livres no sangue dos cães, além de demonstrar propriedades antibacterianas e modulador imunológico.

**Palavras-chave:** Cães, conservante, nutrição animal, saúde animal.

## ABSTRACT

Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

### **PRODUCTION OF DOG FEED WITH A BLEND OF ESSENTIAL OILS (CLOVE, ROSEMARY AND OREGAN) AND VITAMIN E IN REPLACEMENT TO CONVENTIONAL CHEMICAL ANTIOXIDANT: EFFECTS ON BEAGLE FEED AND HEALTH QUALITY**

AUTHOR: Taíse Mendes Maldaner Schlieck  
ADVISER: Aleksandro Schafer da Silva  
Chapecó, March 12, 2021

Several types of additives, whether natural or synthetic, are available for use in the formulation of dog food, with antioxidants being the most important, as they aim at food conservation and food safety for animals. However, there is little scientific data on the safety of using natural additives in dog food formulations, as well as on the effects on food and health of animals. In view of this, the objective was to verify if the use of a blend of essential oils (cloves, rosemary and oregano) and vitamin E has antioxidant action in the dog food and the effects on the health of the animals. The experiment was carried out at the UDESC Maintenance Kennel in Guatambu SC (FECEO), using 10 male beagle dogs ( $\pm$  12kg), adults. The experiment consisted of control treatment (TCON) - extruded feed (premium) with synthetic antioxidant (BHT (butylhydroxytoluene) (n = 5) and test treatment (TNAT) - extruded feed (premium) with natural antioxidants (blend of essential oils from cloves (6%), rosemary (2%), oregano (1%) and vitamin E (3.3%)) (n = 5). The experiment lasted 28 days, and was repeated after a 10-day interval. It is important to note that all animals (n = 10) consumed both rations, in the first or second phase of the experiment, that is, the dogs that were in the TCON group in the first phase, were mandatorily in the TNAT group in the second phase. The dogs were fed 2 times / day (180g ration / animal / day) in individual kennels. The rations were produced in a commercial factory, with the addition of chemical and natural preservatives (1% dose in the ration) in the oil bath stage, together with the other minerals and vitamins added to the feed. Blood and feces samples were collected on days 1, 14 and 28 of experiment, from each experimental phase. Analysis of blood count (erythrocytes, hemoglobin, hematocrit and leukocytes) and serum cholesterol levels, LDL, HDL, triglycerides, glycemia, albumin, urea, creatinine, AST (aspartate aminotransferase) and ALT (alanine aminotransferase) and Gamma GT (gammaglutamyltransferase). The serum analysis of oxidant / antioxidant status was carried out through the analysis of reactive oxygen species (ROS), non-protein thiols (NPSH), and activities of the enzymes glutathione S-transferase (GST) and glutathione peroxidase GPx. Total bacterial count (TBC) of feces was performed. The dogs were weighed at the beginning and at the end of each experimental stage. Body weight did not differ between treatments. In both treatments, food conservation efficiency was observed, which demonstrates the feasibility of using natural sources as antioxidants in dog food, since the chemical and oxidative variables do not differ regardless of the antioxidant used during production. The serum biochemical variables and blood count of the animals were not influenced by the treatments ( $P > 0.05$ ), but there was a reduction in the number of lymphocytes over time only in the dogs of the TNAT group. A day effect was also observed for total leukocyte, neutrophil and erythrocyte count only in TNAT animals,

where there was a significant increase ( $P \leq 0.05$ ) on day 28. In the feces TBC variable, there was an effect of the treatment and the treatment x day interaction, where a decrease in the bacterial count ( $P \leq 0.05$ ) was observed in the feces of the TNAT dogs on days 14 and 28. TNAT ration showed a significant decrease in ROS levels (considering the mean) ( $P \leq 0.05$ ). There was a treatment effect on NPSH levels and GST activity on TNAT, that is, there was an increase in the levels of these variables. It is concluded that the substitution of synthetic antioxidants by additives from natural sources in dog food, preserves the food in the same way ensuring food safety, in addition to stimulating the levels of systemic antioxidants, being able to minimize the impacts caused by free radicals in the blood of the dogs, in addition to demonstrating antibacterial properties and immune modulator.

**Keywords:** Dogs, preservative, animal nutrition, animal health.

## SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA.....	10
1.1	Relação cães e humanos: reflexos na nutrição pet.....	10
1.2	Lipídeos, oxidação, radicais livres e peróxidos.....	10
1.3	Estresse oxidativo e radicais livres em cães.....	12
1.4	Antioxidantes.....	13
1.4.1	Óleo essencial de cravo-da-índia.....	16
1.4.2	Óleo essencial de orégano.....	16
1.4.3	Óleo essencial de alecrim.....	17
1.4.4	Vitamina E.....	18
1.4.5	Blend antioxidante.....	19
1.5	Objetivo.....	19
1.5.1	Geral.....	19
1.5.2	Específicos.....	19
2	CAPÍTULO II.....	20
2.1	MANUSCRITO I.....	21
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

# 1. CAPÍTULO I

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Relação cães e humanos: reflexos na nutrição pet

A proximidade entre humanos e os animais de estimação, como os cães e gatos, tem aumentado ao longo dos anos. Atualmente, esses animais, ocupam um lugar cativo nas famílias. Segundo Pauliuc & Fu (2018), a proximidade entre pets e humanos está diretamente relacionada a mudança na forma de alimentar esses animais, há algumas décadas eram alimentados com restos de comida, mas com o passar do tempo e, com o auxílio das pesquisas voltadas a nutrição de pets, os alimentos passaram a ser completos, atendendo as exigências nutricionais desses animais e facilitando a vida dos proprietários. Os alimentos comerciais para animais de estimação são formulados com o objetivo de atender às necessidades específicas de nutrientes para suprir os diferentes estados fisiológicos de cães e gatos, como filhotes, crescimento e manutenção, de acordo com a Association of American Feed Control Officials - AAFCO (França, et al., 2011).

Segundo Case et al. (2000) o alimento seco é mais econômico do que outros tipos de alimentos, sobretudo para os proprietários que possuem um maior número de animais e buscam maior praticidade e qualidade. O cuidado com a alimentação dos pets possui grande influência na expansão da produção de ração industrializada (Carciofi & Jeremias, 2010).

De acordo com a ABINPET (2019), o mercado pet tem tido grande expressividade na economia nacional movimentando cerca de 22,3 bilhões de reais. São cerca de 55,1 milhões de cães, 24,7 milhões de gatos e 62 milhões de outros pets que fazem do Brasil o segundo país com maior população de animais de estimação do mundo, assim como o terceiro maior em faturamento dentro do mercado pet. Dentro de todos os setores que esse mercado abrange, o setor pet food tem sido o mais rentável, responsável por 73,3% do total de faturamento do mercado de animais de estimação em 2019 (ABINPET, 2019). O avanço econômico no mercado petfood alavancou a produção de alimentos variados, é possível encontrar em agropecuárias, supermercados, pet shops produtos específicos para raças diferentes, comorbidades, como doença renal e obesidade por exemplo, entre outros.

### 1.2 Lipídeos, oxidação, radicais livres e peróxidos

Conforme Case (2011), na elaboração de alimentos para cães e gatos, a inclusão de gorduras e óleos, pois visam fornecer energia e ácidos graxos essenciais (AGE),

além de melhorar a palatabilidade do alimento. Os AGE estão associados ao transporte de vitaminas lipossolúveis, as funções neurológicas e estruturais. Além de servir de fluído para as membranas celulares e estão relacionados com a manutenção da saúde da pele e a pelagem dos animais (NRC, 2006). Esses elementos são constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio, sendo classificados pelo tamanho de sua cadeia carbônica (curta, média, longa ou muito longa) as quais variam de 2-36 carbonos, podendo ser saturadas (sem ligações duplas) ou insaturadas (presença de ligações duplas) (Araújo, 2011). Ácidos graxos da série ômega-6 e ômega-3 (linoleico, araquidônico, ácido  $\alpha$ -linolênico, EPA e DHA) não são sintetizados pelo organismo e por isso são essenciais na dieta para cães e gatos (NRC, 2006). Segundo ABINPET (2019) as fontes de gordura mais utilizadas na indústria pet food são: gordura de frango, sebo bovino, banha suína, óleo de peixe, óleo de abacate, óleo de palma, óleo de linhaça, óleo de girassol, óleo de soja. Embora óleos e gorduras tenham grande importância nutricional, assim como os subprodutos que contém esses ingredientes em sua composição, esses elementos são altamente susceptíveis ao processo de oxidação lipídica (Silva, et al. 1999).

Segundo Ordóñez et al. (2005) a oxidação lipídica é um grande limitante na indústria de alimentos, pois implica no aparecimento de sabores e odores anômalos. Além de causar a perda de ácidos graxos essenciais e geração de produtos potencialmente tóxicos, podendo reduzir o valor e a segurança nutricional dos produtos comercializados (Almeida, 2016). A oxidação lipídica se dá pela associação do oxigênio com lipídeos insaturados, essa associação ocorre através de mecanismos enzimáticos e químicos. São eles: autooxidação, fotoxidação e lipoxigenase. A autooxidação (rancidez) é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras (Araújo, 2011), processo bioquímico que envolve as ligações insaturadas presentes nos óleos e gorduras. A reação em cadeia ocorre três fases distintas: iniciação, propagação e terminação (Oliveira et al. 2012).

A reação inicial se dá no momento que há a remoção do átomo de hidrogênio do ácido graxo insaturado, gerando um radical livre (Oliveira et al. 2012). Essa fase ocorre a partir de iniciadores externos, como calor, luz, enzimas catalisadoras e íons metálicos de transição como o cobre e o ferro (Coneglian, 2011). Na fase de propagação, quando já existe o radical livre, este reage com o oxigênio para formar o radical peróxil. Esses radicais possuem a capacidade de remover átomos de hidrogênio de outros ácidos graxos insaturados para estabilizarem-se, e acabam produzindo o hidroperóxido (Coneglian, 2011). Esta propagação continua produzindo hidroperóxido e consumindo gordura insaturada, até que um dos radicais seja removido por reação com outro radical ou com um antioxidante, formando por fim produtos estáveis, e inibindo essa reação (Melo & Guerra, 2002). Dessa forma, os peróxidos e os radicais livres são formados

a partir da influência mútua do oxigênio com o lipídio insaturado, na presença de alguma fonte externa (calor, luz, temperatura ou íons metálicos). A decomposição dos peróxidos resulta em diversos compostos (aldeídos, cetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos, polímeros), sendo que estes, dão origem a um odor desagradável denominado ranço, que deteriora o sabor dos alimentos (Araújo, 2011). A rancidez do alimento além de causar alteração de cor, sabor e odor, pode afetar a saúde e o bem-estar dos consumidores, devido os compostos tóxicos e reativos envolvidos na deterioração (Hilton, 1989).

### **1.3 Estresse oxidativo e radicais livres em cães**

O estresse oxidativo é definido como o excesso de formação e/ou remoção insuficiente de moléculas reativas (radicais livres), tais como: espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Carocho & Ferreira, 2013). Durante a redução do oxigênio molecular, EROs são formadas e existe a necessidade permanente de inativar estes radicais livres. As consequências do estresse oxidativo podem ser variadas, de acordo com o tipo celular e com sua intensidade. Segundo Halliwell & Gutteridge (2007), os principais efeitos são:

1. Dano celular: pode envolver dano a um ou mais tipos de biomoléculas, como lipídios, proteínas, DNA e carboidratos. Em casos de dano menor, a célula pode sobreviver com algum dano oxidativo persistente e irreparável, ou ainda promover o seu reparo.
2. Senescência: sobrevivência da célula, mas com o sistema de divisão celular comprometido.
3. Morte celular: após o dano a célula pode desencadear o processo de morte celular. Danos oxidativos ao DNA, mitocôndria, ou em outros alvos celulares, podem causar morte celular por apoptose ou por necrose.
4. Proliferação celular: algumas células podem responder ao estresse oxidativo através do aumento da taxa de divisão celular.
5. Adaptação: aumento das defesas celulares, como catalase, superóxido dismutase e glutatona, deixando a célula totalmente, parcialmente ou superprotegida (a célula estará mais resistente frente a futuros insultos oxidativos mais intensos).

Além disto, os alvos de dano oxidativo podem ser redirecionados, ou ainda, a produção basal de EROs pode ser reduzida

Os radicais livres são compostos instáveis gerados em muitos processos fisiológicos e exercem funções importantes no organismo. São formados em um cenário de reações de óxido redução, provocando essas reações ou delas resultando. Podem ceder o elétron desemparelhado e serem oxidados ou podem receber outro elétron e serem reduzidos (Okezie, 1998). Essas reações ocorrem no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana citoplasmática, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e moléculas de DNA) está relacionado com seu local de

formação (Manach et al., 2004). O principal local de formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres ocorre nas mitocôndrias, pois estas consomem mais de 90% do oxigênio disponível no organismo. A enzima citocromo oxidase adiciona quatro elétrons à molécula de oxigênio e a reduz a água, seguindo quatro passos sequenciais, nos quais libera sucessivas espécies reativas (Valko et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem radicais livres, como: ânion superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxil (OH), peróxil ( $RO_2$ ), hidroperóxil ( $HRO_2^-$ ), assim como espécies não radicais, que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados são muito instáveis, como por exemplo: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ácido hipocloroso (HOCL). As espécies reativas ao nitrogênio (ERN) incluem radicais livres como o óxido nítrico (ON) e dióxido de nitrogênio ( $NO_2^-$ ), assim como espécies não radicais, por exemplo: peroxinitrito (ONOO-), óxido nitroso ( $HNO_2$ ) e peroxinitrato (RONOO) (Turko et al., 2001; Evans et al., 2002; Edeas, 2011). Os radicais livres podem ser originados de outra forma endógena, como os fagócitos, que destroem células infectadas por bactérias ou vírus, liberando oxidantes: óxido nítrico, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Desse modo, os radicais livres também possuem um papel de destaque no organismo, fazendo parte da defesa imune primária (Valko et al., 2007).

#### 1.4 Antioxidantes

Alguns aditivos são utilizados na indústria de alimentos para animais de companhia, sendo que dentro destes, a classe mais importante são os antioxidantes que atuam como mecanismo de defesa contra a formação de radicais livres, controlando reações de oxidação lipídica dos alimentos, preservando suas características organolépticas, qualidade e segurança nutricional (Gross, et al., 2013). Os antioxidantes sintéticos foram aprovados em 1948 para o uso em alimentos de consumo humano e animal, desde então, a sua utilização se tornou fundamental para garantir a vida de prateleira de muitos produtos (Vasconcellos, 2011). Antioxidantes sintéticos como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), terc-butil hidroquinona (TBHQ) e etoxiquin são substâncias autorizadas utilizadas de acordo com o teor de gordura da ração e concentração preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 1974). Estes compostos, se utilizados em doses excessivas, podem apresentar danos à saúde dos animais (NRC, 2006; Botterweck, 2000; Hilton, 1989;).

O etoxiquin já possui proibições de uso em toda Europa, e no Brasil a sua utilização é quase nula na indústria de alimentos para animais de estimação, e quando utilizadas, sob dose segura a saúde dos animais (Bunghez, 2012). Os cães são mais suscetíveis aos efeitos nocivos do

etoxiquin, e os primeiros relatos de tais efeitos foram recebidos pela FDA (Food and Drug Administration) em 1988. Os sinais clínicos observados por donos de cães e veterinários foram lesões no fígado, rim, tireoide e disfunção reprodutiva, efeitos teratogênicos e cancerígenos, reações alérgicas e uma série de anormalidades na pele e pelo (Dzanis, 1991).

A regulamentação da utilização de antioxidantes é regida individualmente por cada país (Pokorny, 2001). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é órgão responsável por classificar os antioxidantes como aditivos alimentares e determina as doses máximas permitidas desses compostos na alimentação animal, buscando efeitos na conservação do alimento, assim como conferir segurança aos alimentos destinados ao consumo animal. Misturados ou individualmente o BHA e o BHT não devem exceder o valor de 150 mg/kg de dieta total; para cães etoxiquin é permitido com teor máximo de 100 mg/kg de dieta total; TBHQ não parece ter restrições na dieta total para animais de companhia, no entanto, o limite máximo recomendado pela AAFCO é de 200 mg/kg de gordura da ração completa (MAPA, 2016), sendo dentro desses, o BHT e BHA os antioxidantes mais utilizados no Brasil.

Os avanços nas pesquisas na área de nutrigenômica em cães e gatos, demonstram a ação da composição dos alimentos e aditivos em marcadores genéticos ligados a enfermidades, como o câncer por exemplo, estas descobertas também sugerem que um aumento na expectativa de vida pode ser atingido mediante o aumento no status antioxidante dos animais. Existe um potencial considerável para elevar a atividade enzimática antioxidante mediante a suplementação nutricional: a) com selênio aumentando a atividade de glutathione peroxidase; b) cobre, zinco e manganês aumentando a atividade da superóxido dismutase, e c) com ferro aumentando a atividade da catalase (Heaton et al., 2002).

Em vista das demandas de mercado atuais e de proprietários de cães e gatos cada vez mais exigentes com relação à nutrição e saúde de seus animais, existe na indústria a tendência de substituir antioxidantes sintéticos em alimentos comerciais por compostos naturais com potencial antioxidante, com o intuito de manter a estabilidade do produto sem adição de componentes artificiais. As rações com apelo natural e saudável, grande tendência no mercado pet, surgiu devido a cobrança de proprietários relacionadas aos malefícios e toxicidade de ingredientes artificiais, como antioxidantes sintéticos, a saúde dos seus animais de estimação (Carciofi & Jeremias, 2010).

O animal possui um sistema elaborado e complexo de defesa antioxidante para tratar dos ataques de radicais livres. Entretanto, evidências estão aumentando o indicativo dos benefícios de adicionar antioxidantes em dietas para dar suporte ao sistema de produção própria do organismo, e sabemos que o adicionamento de mais de um antioxidante teremos um efeito

sinérgico no combate aos radicais livres produzidos no organismo (Rocha, 2008). Estudos toxicológicos realizados com roedores alimentados com alimentos conservados por aditivos sintéticos, demonstraram a possibilidade de apresentarem efeito carcinogênico e hiperplasia gastrointestinal (Ramalho & Jorge, 2006). Os antioxidantes sintéticos, por motivo de risco potencial a saúde humana e animal, vêm sendo substituídos por antioxidantes naturais provenientes de fontes vegetais, considerados mais seguros a saúde (Coneglian, et al., 2011).

Os antioxidantes naturais estão presentes em ervas e especiarias, frutas e vegetais (Sikora, 2008). A ação desses compostos consiste no combate aos radicais livres através da doação de um átomo de hidrogênio; quelando metais de transição, interrompendo a propagação dos radicais livres; e reparando a lesão a moléculas atacadas por esses (Podsdek, 2007). Os efeitos antibacterianos, antiparasitários e antioxidantes de substâncias bioativas, originárias de extratos de plantas são bem conhecidos e demonstram excelente efeito na dieta dos animais (Knowles 2002).

Dentre as especiarias, o extrato de alecrim é o que apresenta o maior poder antioxidante, e este efeito deve-se principalmente à capacidade antioxidante dos seus constituintes fenólicos (ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarínico, ácido caféico e éster do ácido hidroxicinâmico) sequestrar radicais peróxidos (Ramalho & Jorge, 2006). A sua utilização no Brasil como antioxidante alimentar já é autorizada (ANVISA, 2019), e amplamente utilizada em alimentos da linha humana. Os extratos de alecrim em solventes de diferentes polaridades, como o óleo essencial, apresentaram atividade antioxidante superior ou semelhante ao BHA, BHT e TBHQ (Mariutti & Bragagnolo, 2007). Os óleos essenciais são produzidos por células secretoras e resultam em produtos aromáticos do metabolismo secundário de plantas, podendo estar concentrados em uma região do vegetal, como nas folhas, casca ou frutos (Conner, 2003). Inúmeros relatos são encontrados na literatura sobre a atividade biológica de extratos vegetais, como ação antibacteriana (Al-Turki et al., 2008), atividade antioxidante (Starzyniska- Janiszewska et al., 2008), ação anti-inflamatória e analgésica (Bose et al., 2007; Díaz-Viciedo et al., 2008), ação antifúngica (Korukluoglu et al., 2008), atividade antitumoral (Kaileh et al., 2007), dentre outras.

As especiarias e seus derivados, elementos conhecidos como agentes para conferir sabor e odor aos alimentos, assumiram papel de destaque por serem usados como potenciais agentes inibitórios de microrganismos, revelando uma nova perspectiva para a indústria de alimentação animal.

### 1.4.1 Óleo essencial de cravo-da-índia

O cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata Thunb.*) é uma planta arbórea, nativa das Ilhas Molucas (Arquipélago da Insulíndia, Indonésia), possui odor fortemente aromático, sabor ardente e característico (Costa, 2000). Das sementes, extrai-se o ácido eugênico, incolor e de sabor picante; sendo sua composição química constituída principalmente por fenilpropanóides, eugenol, acetato de eugenol, beta-cariofileno, ácido oleânico, e substâncias das classes: triterpeno, ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis.

Os principais produtos derivados do cravo comercializados no mercado são o óleo essencial puro ou produtos derivados dele, cuja principal aplicação é como anestésico local em odontologia e indústria cosmética (Sritabutra & Soonwera, 2013), e, também é utilizado na produção animal com as funções antioxidante, antimicrobiana, antisséptica e anestésica (Karre et al., 2013). A atividade antioxidante do óleo essencial de cravo-da-índia é atribuída aos compostos fenilpropanóides que podem atuar como antioxidantes primários pelo sequestro de radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação de oxidação (Biesalski, 2000). Conforme estudos conduzidos por Legault & Pichett (2007) o óleo de cravo demonstrou ação terapêutica em infecções produzidas por estafilococos, especialmente quando aplicado de forma tópica, em feridas contaminadas. O eugenol apresenta efeito anti-inflamatório, cicatrizante, analgésico e é eficaz no combate e diminuição de bactérias (Nascimento et al., 2000). Seus efeitos medicinais compreendem o tratamento de náuseas, flatulências, indigestão, diarreia, também é usado como anestésico e antisséptico para o alívio de dores de dente (Nascimento et al., 2000). Além do cravo, o eugenol é constituinte de vários outros óleos essenciais, como canela, sassafrás e a mirra (Kim et al., 1997). De acordo com Mau et al. (2001) os extratos de cravo-da-índia reduzem a contagem de *Escherichia coli* e outras bactérias durante a armazenagem de sucos, leites e chás.

### 1.4.2 Óleo essencial de orégano

O óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), contém em sua composição carvacrol, timol, terpenos, ácido rosmarínico, além de outras substâncias ditas como benéficas a saúde, incluindo também flavonoides, magnésio, cálcio, zinco, ferro, potássio, cobre, boro, manganês, vitaminas A, E, C e niacina, o que proporciona inúmeras propriedades medicinais (Bharti & Vasudeva, 2013). Devido a presença de ácido fenólico e flavonoides, o óleo essencial de orégano possui alta atividade antioxidante, além de propriedades antimicrobianas contra patógenos

presentes em alimentos, tornando a planta em um potente conservante natural de alimentos (Coskun et al., 2014). Experimentos mostraram a utilização do seu óleo essencial prorroga a vida útil de alimentos, reduzindo o risco de contaminação do alimento (Nascimento et al., 2007).

O estudo de Pitaro et al. (2012) que focou na mensuração da estabilidade oxidativa, o forte potencial antioxidante de extratos de manjeriço e orégano em óleo de soja. A maioria dos estudos mostram aplicações do óleo essencial de orégano em alimentos focados no aspecto antimicrobiano, como Busatta et. al (2007) mostrando o controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça fresca pela ação de nisina sinergicamente com óleo essencial de orégano, relatando que com uma concentração relativamente baixa do óleo proporcionou uma maior vida útil do produto com alteração mínima em parâmetros sensoriais. De acordo com os diversos trabalhos relatados é possível observar que o óleo essencial de orégano possui atividade antimicrobiana reconhecida o que favorece a conservação dos alimentos.

### 1.4.3 Óleo essencial de alecrim

A espécie de planta *Rosmarinus officinalis L.*, conhecida usualmente como alecrim, é procedente da Região Mediterrânea e possui porte subarborescente lenhoso, ereto e pouco ramificado de até 1,5 m de altura. As folhas, muito aromáticas, medem de 1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura (Lorenzi & Matos, 2006). Dentre as ervas aromáticas, o alecrim é uma das que apresenta maior poder antioxidante (Cuvelier, 1994). Borrás-Linares et al. (2014) demonstraram que o alecrim pode ser usado como fonte natural de vários compostos bioativos, em particular, o carnosol, o ácido carnósico e os triterpenos, os quais podem ser ingredientes relacionados às aplicações na medicina complementar, bem como na conservação de alimentos, como antioxidantes naturais. O óleo de alecrim possui atividade farmacológica atribuída ao seu conteúdo de compostos fenólicos (Afonso et al., 2010).

O efeito antioxidante do alecrim deve-se, principalmente, à capacidade dos constituintes fenólicos (ácido carnósico, carnosol, ácido rosmarínico, ácido caféico e éster do ácido hidroxicinâmico) de doar hidrogênio para os radicais livres, formando radicais estáveis, e em parte à capacidade de sequestrar radicais superóxidos (Doria, 2000). Além de antioxidante, estudos demonstram que o óleo essencial de alecrim possui efeito antibacteriano contra bactérias Grampositivas e Gram negativas (Karamanoli et al., 2000; Inouye et al., 2001). Hras et al. (2000) observaram que o extrato de alecrim, comparado com antioxidantes sintéticos e naturais, apresentou os menores índices de oxidação para o óleo de girassol. Já Nassu et al. (2003) demonstraram que o extrato de alecrim foi efetivo na proteção contra a oxidação de embutido fermentado de carne de caprinos.

#### 1.4.4 Vitamina E

A vitamina E é um termo universal utilizado para referir-se a uma família de oito compostos que exibe atividade antioxidante, sendo a forma mais ativa o RRR-alfa-tocoferol, responsável por cerca de 90% da vitamina E encontrada no tecido animal (Debier & Larondelle, 2005; Traber, 2012). O alfa-tocoferol possui a capacidade de eliminar os radicais peroxil durante a propagação da peroxidação lipídica, consistindo em um antioxidante de quebra de cadeia, pois impede a reação em cadeia da peroxidação lipídica, mas não impede a formação inicial do radical peroxil lipídico (Burton & Ingold, 1981). Além de possuir a capacidade de proteger os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), especialmente o ácido araquidônico e o ácido docosahexanóico (DHA) (Lebold & Traber, 2014).

Os isômeros de vitamina E estão presentes nos vegetais, desempenhando função antioxidante para a manutenção dos tecidos, como também nos animais. A legislação brasileira permite a adição de 300 mg/kg de tocoferóis em óleos e gorduras, como aditivos intencionais, com função de antioxidante (Abia, 1999). A vitamina E é o maior antioxidante lipossolúvel no plasma, eritrócitos e demais tecidos, nos quais sua principal função é o sequestro de radicais livres para prevenir a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, grupos tióis de proteínas e ácidos nucleicos (Zaine, et al., 2014). A vitamina E também apresenta funções na modulação da síntese de prostaglandinas, regulação na síntese de proteína quinase e síntese da xantina oxidase, no entanto, a função antioxidante parece ser a principal (NRC, 2006).

As informações sobre toxicidade da vitamina E são pouco estudadas em cães, no entanto, sabe-se que a utilização de elevadas concentrações nos alimentos prejudica a absorção das vitaminas A e K, apesar de estudos com dosagens extremamente elevadas em cães terem falhado em demonstrar efeitos tóxicos (Zaine, et al., 2014). Cães adultos suplementados com um blend de antioxidantes, em dosagens quatro vezes superiores às recomendadas de vitamina E em alimentos para animais adultos, apresentaram elevação nas concentrações séricas de taurina e vitamina E, que foram associadas com menor dano sofrido ao DNA, melhora na resposta vacinal e melhor atividade antioxidante do plasma sanguíneo (Heaton et al., 2002). São raros os trabalhos encontrados com vitamina E na nutrição clínica de cães e gatos, apesar de ser relatado seu possível uso como tratamento adjuvante para doenças dermatológicas e hepatobiliares (Vandeweerd, et al., 2013).

### 1.4.5 Blend antioxidante

Uma variedade de diferentes antioxidantes naturais já é conhecida como ácidos fenólicos, carotenoides e vitaminas (Xu, et al., 2017). No entanto, há uma diferença de polaridades entre os antioxidantes, caracterizando a “teoria do paradoxo polar”, existem antioxidantes naturais hidrofóbicos e hidrofílicos, que quando utilizados de forma individual levam a estabilizações insuficientes dependendo da matéria prima a ser preservada (Frankel & Meyer, 2000). Um produto comercial na forma de blend antioxidante deve buscar combinar componentes ou ingredientes que tenham atividade antioxidante potente; capaz de potencializar ainda mais a funcionalidade desejada; motivo pelo qual será utilizado nessa dissertação um produto em fase de teste a base de óleos essenciais (cravo, alecrim e orégano) e vitamina E.

## 1.5 Objetivos

### 1.5.1 Geral

Verificar se a adição de um blend de óleos essenciais de alecrim, cravo, orégano e vitamina E demonstrará efeitos positivos na conservação da ração, e se apresentará benefícios à saúde dos cães comparada a uma ração com aditivos sintéticos.

### 1.5.2 Específicos

- Utilizar o *blend* de óleos essenciais de alecrim, cravo, orégano e vitamina E como conservante na ração experimental em substituição a antioxidantes sintéticos e analisar qualidade (reações oxidativas e peroxidação lipídica) após armazenamento da ração.

- Determinar se o consumo de ração com adição de conservantes naturais (blend de óleos essenciais) afetará positivamente o metabolismo proteico, lipídico e de carboidrato sérico em cães.

- Analisar se o consumo de ração contendo o blend de óleos essenciais de alecrim, cravo, orégano e vitamina E na dieta causará alterações no status antioxidante em cães.

- Avaliar os efeitos antibacterianos do blend de óleos essenciais de alecrim, cravo, orégano e vitamina E através da contagem bacteriana total das fezes do cães.

## **2. CAPÍTULO II**

### **MANUSCRITO**

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de um manuscrito, com sua formatação de acordo com as orientações da revista ao qual foi submetido:

## 2.1 MANUSCRITO I

**Adição de uma mistura de óleos essenciais (cravo, alecrim e orégano) e vitamina E para substituir os antioxidantes químicos convencionais na ração para cães: efeitos na qualidade da ração e saúde dos beagles**

Taíse Mendes Maldaner Schlieck<sup>1</sup>, Tiago Goulart Petrolli<sup>2</sup>, Bianca Bissacotti<sup>3</sup>, Priscila M. Copetti<sup>3</sup>, Nathieli B. Bottari<sup>3</sup>, Vera M. Morsch<sup>3</sup>, Aleksandro Schafer da Silva<sup>4</sup>

De acordo com normas para publicação em:

*Archives of Animal Nutrition*

**Addition of a blend of essential oils (cloves, rosemary, and oregano) and  
vitamin E to replace conventional chemical antioxidants in dog feed:  
effects on feed quality and health of beagles**

Táise Mendes Maldaner Schlieck<sup>1</sup>, Tiago Goulart Petrolli<sup>2</sup>, Bianca Bissacotti<sup>3</sup>, Priscila M.  
Copetti<sup>3</sup>, Nathieli B. Bottari<sup>3</sup>, Vera M. Morsch<sup>3</sup>, Aleksandro Schafer da Silva<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Programa de pós-graduação em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina  
(UDESC), Chapecó, Brazil

<sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Xanxerê, Brazil.

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa  
Maria (UFSM), Santa Maria, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Zootecnia, UDESC, Chapecó, Brazil

Corresponding author: [aleksandro\\_ss@yahoo.com.br](mailto:aleksandro_ss@yahoo.com.br)

## ABSTRACT

The aim of this study was to produce dog feed containing natural antioxidants (blend of essential oils of rosemary, oregano, cloves, and vitamin E) to replace synthetic antioxidants, as well as to determine the effects on feed conservation and animal health sequentially. The feeds were produced in a commercial factory, and the antioxidants were added at the oil bath stage. Ten adult beagle dogs were used, divided into two treatments; control treatment (TCON; synthetic antioxidant feed [butylhydroxytoluene] n = 5) and test treatment (TNAT; natural antioxidant feed; blend of essential clove oils, rosemary, oregano, and vitamin E; n = 5). The experiment was carried out in two time points with an interval of 15 days each, at the first time point, the dogs that were part of the TCON group were placed in the TNAT group during the second period, which allowed us an “n” sample of ten for each treatment. The dogs were weighed at the beginning and end of each experimental period, and it was found that there was no difference between treatments for body weight ( $P > 0.05$ ). In both treatments, feed conservation efficiency was observed, which demonstrate the feasibility of using natural sources as antioxidants in dog feed because chemical and oxidative variables did not differ regardless of the antioxidant used during production. The animals' metabolic and hematological variables were not influenced by the treatments ( $P > 0.05$ ); however, a reduction in the number of lymphocytes was observed over time only in the dogs of the TNAT group. There was also a day effect for total leukocyte, neutrophil, and erythrocyte counts only in TNAT animals, which means that there was a significant increase ( $P \leq 0.05$ ) in the variables on day 28. There was an effect of the treatment and a interaction treatment x day for TBC, whereas a decrease in the bacterial count ( $P < 0.05$ ) was observed in TNAT dogs' feces on days 14 and 28. Dogs fed the TNAT diet had lower reactive oxygen species (ROS) ( $P \leq 0.05$ ) that can minimize oxidative stress. There was a treatment effect on the levels of NPSH and glutathione S-transferase in TNAT; which means, there was an increase in these variables, which may explain the decrease in ROS levels. We conclude that natural antioxidants in dog

feed, in addition to promoting feed conservation, stimulate levels of systemic antioxidants and minimize the impacts caused by free radicals in the dogs' blood.

**KEYWORDS:** Animal health, conservants; feed; natural antioxidant.

## 1. INTRODUCTION

The closeness between humans and pets, such as dogs and cats has increased over the years and is directly related to changes in feeding these animals (Pauliuc & Fu, 2018). Commercial pet feeds are formulated to meet specific nutrient needs to supply dogs and cats' various physiological states (França et al., 2011). Some additives are used in the pet feed industry, as the antioxidants, that are the most important, as they act as defense mechanisms against the formation of free radicals, controlling feed oxidation reactions, and preserving their organoleptic characteristics, quality, and nutritional safety (Vasconcellos, 2011). In Brazil, synthetic antioxidants such as butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tert-butyl hydroquinone, and ethoxyquin are authorized substances that are used according to the fat content of the feed and the concentration recommended by the Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (Brasil, 1974). If used in excessive doses, these compounds can damage animal health (NRC, 2006; Botterweck, 2000; Hilton, 1989). The advances in research in nutrigenomics in dogs and cats demonstrate the effects of the composition of feed and additives on genetic markers linked to diseases, including cancer. These findings suggest an increase in life expectancy, and it can be achieved by increasing the animals' antioxidant status (Heaton et al., 2002). Pet feed with natural and healthy appeal appears on the market; as a consequence of reports from owners and veterinarians related to allergic processes and toxicity of artificial ingredients, such as synthetic antioxidants (Carciofi & Jeremias, 2010). Spices and their derivatives, agents that impart flavor and odor to feeds,

assumed a prominent role because they are used as potential inhibitory agents for microorganisms, revealing a new perspective for the animal feed industry.

Among the primary products derived from cloves are pure essential oils or, products derived from them. Their primary application is local anesthesia and antiseptics in dentistry (Sritabutra & Soonwera, 2013). The antioxidant activity of the essential oil of cloves is attributed to phenylpropanoid compounds, that act as primary antioxidants by sequestering free radicals formed during the initiation or propagation of the oxidation reaction (Biesalski, 2000). The essential oil of oregano (*Origanum vulgare*) composed of carvacrol, thymol, terpenes, rosmarinic acid, in addition to other beneficial substances, including flavonoids, magnesium, calcium, zinc, iron, potassium, copper, boron, manganese, vitamins A, E, C and niacin, has numerous medicinal properties (Bharti & Vasudeva, 2013). Experiments have shown that the essential oregano oil extends feed shelf life, and reduce contamination risk (Nascimento et al., 2007). Rosemary oil has antioxidant activity, which one is attributed to its phenolic compounds' content (Afonso et al., 2010). Other studies showed that rosemary essential oil has anti-bacterial effects against Gram-positive and Gram-negative bacteria (Karamanoli et al., 2000; Inouye et al., 2001). Vitamin E is the largest fat-soluble antioxidant in plasma, erythrocytes, and other tissues. Vitamin E primary function is the sequestration of free radicals to prevent the oxidation of polyunsaturated fatty acids in cell membranes, thiol groups of proteins, and nucleic acids (Zaine et al., 2014).

Antioxidants have various polarities, described in the "polar paradox theory." Hydrophilic antioxidants with more affinity for water are more effective in nonpolar media; in contrast, hydrophobic compounds, which have greater affinity and solubility in lipids, are the best antioxidants in polar media (Frankel & Meyer, 2000). This theory suggests antioxidants may carry out various activities according to the medium (water and oil or aqueous emulsion) where they are applied. Because of this, industries have invested in the

production of commercial products in the form of blends. This is because combining one or more assets potentiates the desired effects and increases the spectra of action.

Research related to the use of alternative antioxidants is in the early stages of animal nutrition; however, human nutrition benefits are already well known. Thus, the aim of this study was to produce dog feed containing natural antioxidants (blend of essential oils of rosemary, oregano, cloves, and vitamin E) to replace synthetic antioxidants and then determine their effects on feed conservation and animal health.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Blend of essential oils**

The natural antioxidant (commercial product) was a blend of essential oils of clove (6%), rosemary (2%), oregano (1%) and vitamin E (3.3%), and vehicle (soybean oil, 87.7%). The dosage of natural antioxidant was 1% (1000 mg per kg of feed produced), the same amount of synthetic antioxidant (BHT) was used in the control treatment.

### **2.2 Feed production**

The feed was manufactured using extrusion technology at 100 °C for 2.5 minutes in pre-extrusion, at 120 °C for 20 seconds in extrusion, and 120 °C in the drying for 25 minutes, leaving 9% moisture. Following this procedure, the feed particles were added to a flavoring bath with liver hydrolysate using in-line spray nozzles, followed by a fat bath with poultry fat, and the addition of the essential oils blend, also by in-line sprinklers. Subsequently, the feed was cooled, reducing its temperature to 10 °C above room temperature for subsequent packaging. The entire process was carried out in a commercial dog feed mill factory; 1000 kg of feed was produced, corresponding to the facility's minimum capacity. The feed was classified commercially as premium; that is, it used higher quality and digestibility

ingredients. The experimental diets had the same nutritional value as described in Table 1, the only difference being the inclusion of antioxidants.

### 2.3. Feed preparation to assess time effect and analysis

The feed produced was stored in commercial packaging, opened at 60-day intervals for 12 months for sampling and analysis of its composition, as described below.

### 2.4 Chemical composition of the feed

The analyses of dry matter, mineral matter, crude protein, and neutral detergent fiber were carried out following Silva and Queiroz (2002).

### 2.5 Feed levels of oxidants and antioxidants

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reactive oxygen species (ROS), protein thiols (PSH), and non-protein thiols (NPSH) were measured in the feed. The feed was homogenized in a physiological solution (1/9 v), centrifuged (2800 g for 10 min), and the supernatant was frozen until further analysis. The analysis were performed according to the techniques described by Campigotto et al. (2020), standardized for dog feed samples.

### 2.6 Animals and experimental design

Ten adult male beagle dogs were used as experimental models. The animals were housed in an experimental kennel under controlled temperature (24 °C), with two collective kennels and ten pens for individual feeding. Externally, there was a shaded area which the animals had access during the day. Two groups were formed with five animals each; one group of dogs consumed a diet containing natural antioxidants (a blend of essential oils; TNAT). The other group was composed by dogs consuming a control diet containing BHT (TCON). It is important to note that all animals (n = 10) consumed both feeds, as the experiment had

two time periods of 28 days, with an interval of 15 days between them; that is, the dogs that were in the TCON group at the first period necessarily were in the TNAT group at the second period. In this way, they provided us with a large sample size, i.e., ten animals per treatment. The animals were fed twice per day (180 g feed/animal/day) in individual kennels. The amount of feed offered was calculated based on the animals' metabolic energy requirements according to the energy density of the feed, following the methodology of the NRC Dogs and Cats (2006). Dogs had access to drinking water *ad libitum*.

## 2.7 Sampling

Blood samples were collected on days 1, 14, and 28 of the experiment, in each experimental stage, after 12 hours of fasting. The dogs were manually restrained, and blood was collected through the jugular vein using a syringe (5 mL) and needle (25/7 caliber). The collected blood was placed in tubes containing anticoagulant (EDTA) for blood count analysis, and tubes without anticoagulant, centrifuged (5,500 g for 10 min) to obtain serum. Fresh feces samples were collected on days 1, 14, and 28 of each experimental step to analyze total bacterial count (TBC). The feces were collected immediately after excretion, identified, and stored in a thermal container until arriving at the laboratory.

## 2.8 Hemogram

The number of erythrocytes and leukocytes, hemoglobin concentration, and hematocrit were obtained using an automatic counter (I COUNTER 3D®). Leukocyte differential counts were performed using blood smear stained using the Romanowsky technique, with 100 cells/slide identified under an optical microscope (1000x).

## 2.9 Serum biochemistry

Serum levels of cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), triglycerides, blood glucose, albumin, urea, creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and gamma-glutamyl transferase (GGT) were analyzed in an automatic Labmax Plenno® equipment using commercial Kovalent® kits.

### 2.10 Prooxidant/antioxidant analysis

Serum analysis of oxidant/antioxidant status was performed: reactive oxygen species (ROS), non-protein thiols (NPSH), glutathione S-transferase (GST), and glutathione peroxidase (GPx) were assayed according to the methodologies described below.

#### 2.10.1 ROS

Serum ROS levels were measured using the method described by Ali et al. (1992). Serum (10  $\mu$ L) was incubated with 12  $\mu$ L of dichlorofluorescein (DFC) per mL at 37 °C for 1 h in the dark. Fluorescence was determined using 488 nm for excitation and 520 nm for emission. The results were expressed as U DCFA/ $\mu$ L.

#### 2.10.2 Non-protein thiols (NPSH)

The method using 5,5-dithiobis 2-nitrobenzoic acid (Sigma) was used to measure NPSH as described by Sedlak and Lindsay (1968). In NPSH, the samples were measured after deproteinization with acid trichloroacetic (50%). The absorbance readings (405 nm) were performed using a spectrofluorometer (Biotek, Synergy HT) values were expressed as mMol NPSH/mL.

#### 2.10.3 GST activity

GST activity was measured according to Mannervik and Guthenberg (1981), with modifications. Briefly, GST activity was measured by the rate of formation of dinitrophenyl-

S-glutathione at 340 nm in a medium containing 50 mM potassium phosphate at pH 6.5, 1 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate and tissue supernatants (approximately 0.045 mg protein). The results were expressed as  $\mu\text{mol CDNB}/\text{min}$ .

#### 2.10.4 Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was measured using tert-butyl hydroperoxide as a substrate (Wendel 1981). The enzyme activity was determined by monitoring the disappearance of NADPH at 340 nm in a medium containing 100 mM potassium phosphate buffer / 1 mM EDTA at pH 7.7 and 2 mM GSH, 0.1 U/mL GR, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide, 0.1 mM NADPH, and tissue supernatants. The results were expressed as  $\mu\text{mol oxidized NADPH}/\text{min}/\text{mL}$ .

#### 2.11 TBC in stool

Aseptically, 1 gram of each stool sample was weighed and diluted in 9 mL of buffered peptone water in a sterile test tube, homogenized in a vortex shaker, which resulted in the  $10^{-1}$  dilution, continuing dilutions up to  $10^{-6}$ , always inoculating 1 mL of the previous dilution in 9 mL of buffered peptone water. Then, 200  $\mu\text{L}$  of the  $10^{-6}$  dilution of each sample were inoculated in a Petri dish, previously prepared with standard agar for counting and incubated in a bacteriological oven at 37 °C for 48 hours. Counting was performed using a colony counter, and the results expressed in colony-forming units per gram.

#### 2.12 Statistical analysis

Each animal was considered the experimental unit for all analyses. Data were tested for normality and homogeneity of variance using the Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively. The results of TBC in feces and serum concentration of ROS required log-transformation to achieve normality ( $W > 0.90$ ) and homogeneity ( $P \geq 0.10$ ) and were back-

transformed to original units for description. All data were analyzed using the MIXED procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA; version 9.4) with the Satterthwaite approximation to determine the denominator degrees of freedom for the test of fixed effects. The results of body weight (BW) changes were tested for fixed effects of treatment and using animal and period as a random variable. All other variables (BW, TBC in feces, serum biochemistry, serum antioxidant responses, and hemogram) were analyzed as repeated measures and tested for fixed effects of treatment, day, and treatment  $\times$  day, and using animal and period as random variables. The results of day 1 were also included as independent covariates in each respective analysis but were removed from the model when  $P > 0.10$ . The compound symmetric covariance structure was selected as TBC in feces. A Toeplitz covariance structure was selected for serum concentration of LDL and HDL; a first-order autoregressive covariance structure was selected for all other variables. The covariance structures were selected according to the lowest Akaike information criterion. Means were separated using PDIFF, and all results were reported as LSMEANS followed by SEM. Significance was defined when  $P \leq 0.05$ , and tendency to significance when  $P > 0.05$  and  $\leq 0.10$ .

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Feed analysis**

##### **3.1.1 Chemical composition**

The results from feed's chemical composition are presented in Table 2. The contents of dry matter (DM), mineral matter (MM), crude protein (CP), and neutral detergent fiber (NDF) did not differ between treatments, regardless of the type of antioxidant used. This result demonstrates the feasibility of using a preservative from a natural source because the blend-

type combination tested in this study provided stability in dogs' feed chemical composition, guaranteeing the nutritional value of the feed over 12 months.

### 3.1.2 Oxidant and antioxidant levels

The levels of antioxidants and oxidants in the diets are presented in Table 2. Levels of TBARS, ROS, PSH, and NPSH were similar between treatments, demonstrating guaranteed feed stability using natural sources in blend form as substitute synthetic antioxidants.

### 3.3 Body weight

There was no significant difference between groups for BW in all experimental stages (Table 3). However, over time, a decrease in body weight was observed in both groups ( $P < 0.05$ ).

### 3.4 Hematological analysis

The blood count results are presented in Table 4. There were no significant differences ( $P > 0.05$ ) between treatments for blood count analysis. An increase in the total erythrocyte was observed (days 14 and 28) ( $P < 0.05$ ) in both treatments. There was an interaction between treatment and day for the number of total leukocytes; which means that there was an increase ( $P < 0.05$ ) on day 28 in the TNAT group, and a trend ( $P = 0.07$ ) of an increase in neutrophil count in the day 28 in the same group. There was an influence ( $P < 0.05$ ) of day on the number of lymphocytes on days 14 and 28 in the dogs in the TNAT group; that is, the number of cells reduced over time.

### 3.5 Serum biochemical analysis

There were no significant differences ( $P > 0.05$ ) between groups for serum biochemical variables cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, glycemia, albumin, urea, creatinine, AST, ALT, or GGT. There were no interactions of the type of antioxidant used in feed with the animals' metabolic variables.

### 3.6 Plasma oxidant and antioxidant status

ROS levels were lower (21.5%) in animals in the TNAT group than in the TCON group ( $P < 0.05$ ), as demonstrated in Table 5. GPx did not differ between groups or, over the time ( $P > 0.05$ ). GST was higher (on days 14 to 28) in animals in the TNAT group ( $P < 0.05$ ) than in the TCON group. NSPH levels (days 14 and 28) were higher (33.3%) in dogs in the TNAT group ( $P < 0.05$ ) than in the TCON group.

### 3.7 Bacterial stool count

There was a decrease ( $P < 0.05$ ) of 17.28% in the bacterial count in the feces of dogs fed the diet of the TNAT group, compared to the TCON group (Figure 1).

## 4. Discussion

We observed that the inclusion of the natural antioxidant, composed of a blend of essential oils and vitamin E, provided stability to the feed in the same way as the diet containing synthetic preservatives (BHT). Similar results were reported by Mariutti & Bragagnolo (2009), who used extracts of sage, oregano, and thyme and observed that the natural extracts showed antioxidant activity superior or similar to butylated hydroxyanisole, BHT, and tert-butyl hydroquinone in chicken meat. We believe that the dosage of natural antioxidants used in the present study effectively protects the feed without interfering with the feed's chemical composition. Gross et al. (1994) analyzed extruded feeds stored for dogs, and concluded that feed preserved with natural antioxidants showed greater deterioration during

storage at various temperatures than diets preserved with synthetic antioxidants. This phenomenon was related to the low concentration of tocopherols in the feed, requiring dosage adjustments to achieve the same effects as the synthetic antioxidant. In the present study, feed intake was calculated to meet the needs for maintaining ideal BW for adult beagle dogs, regardless of treatment, which may have influenced the BW values.

Hematological and serum parameters are good indicators of an animal's physiological, pathological, and nutritional status; changes in these parameters can be used to elucidate the impact of additives provided in the diet (Toghyani et al., 2010). Because no significant differences were observed in the blood count and serum biochemistry variables, we suggest an absence of diseases or infectious conditions in the animals during the experiment. The feed, considered to be highly digestible, was adequate for maintaining dogs' homeostasis. We observed an increase in leukocyte counts over time in the TNAT group, similar to findings reported by Al-Kassie (2009), who added the essential oil of thyme and cinnamon to the diet broilers. The authors concluded that essential oils could be growth promoters for chickens. However, in the present study, this increase within the normal range may be associated with an improvement in dogs' immune system, partly related to the quality of the feed provided, classified as super-premium feed, with greater digestibility of ingredients and consequent better use of nutrients.

Oxidative stress is defined as the imbalance between free radicals' production and their neutralization through biological enzymatic and non-enzymatic systems. It occurs when there is an excess of production or reduced antioxidant functions (Machlin & Bendich, 1987). A potentially effective way to combat oxidative stress is through dietary intervention with antioxidants (Cantuti-Castelvetri et al., 2000). In the present study, we observed that dogs belonging to the TNAT group had better antioxidant responses than did the TCON group; there was an increase in the GST activity and NPSH levels associated with a decrease in levels of ROS, suggesting less oxidative stress in these animals. For ROS to have beneficial effects

without causing damage to cells, their concentrations must be kept low by controlling their formation and neutralization (Valko et al., 2007). Superoxide dismutase, catalase, GPx, glutathione reductase, and GST participate in ROS's neutralization (Ferreira & Matsubara, 1997). Even though the average ROS levels have shown significant differences between treatments (Table 5), we observed an increase in ROS levels on the 28th day at TNAT, which may be associated with the consumption of a more digestible diet that ends up accelerating the metabolism of the dogs. Vitamin E is the primary protective agent against lipid peroxidation in biological membranes. Despite being fat-soluble, and therefore acting against lipid peroxidation, oregano can also neutralize free radicals in the cytoplasm (Cervato et al., 2000). The increase in antioxidant enzyme activity, with a concomitant reduction in lipid peroxidation, was also observed by Gümüs et al. (2017) in lambs supplemented with oregano essential oil. In a study conducted by Oliveira e Silva et al. (2011), testing the effects of rosemary extract on oxidative stress in diabetic rats, the authors observed increased GST activity, concluding that the inclusion of antioxidants in the diet can contribute to the reduction of oxidative stress caused by hyperglycemia and by increased activity of the enzyme defense system. The significant antioxidant capacity of rosemary is attributed to the presence of phenolic compounds (Macedo et al., 2020).

The decrease in bacterial count in the feces of dogs in the TNAT group may be associated with the antimicrobial potential of essential oils, corroborating Oliveira et al. (2019), who analyzed the antimicrobial activity of essential oils (cloves and lemongrass) in feces from swine, cattle, and poultry; the authors found that essential oils exerted effects against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Xie et al. (2015) observed that, among essential clove oil components, eugenol is the primary compound that may be responsible for antimicrobial activity. According to the authors, eugenol inhibits the production of amylase and proteases by the bacterium and its deterioration and lysis. This active ingredient is widely used in dentistry as a sealant and antiseptic products. The combination of various antioxidant substances represents an excellent protection strategy against oxidative stress because the

several mechanisms of action of each component act synergistically.

## CONCLUSION

The blend of essential oils' inclusion in beagle dogs' feed was a viable and dual-purpose option. The components' synergy provided feed stability, prevented oxidation, favored feed quality, and enhanced dog health. We conclude that the replacement of synthetic antioxidants by additives from natural sources in feeds for beagles increases systemic antioxidants' impacts and minimizes the impacts caused by free radicals in their blood, and also demonstrating antimicrobial properties at the intestinal level.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their financial support. The Vipet Food's factory that produced the ration used in this experiment.

## REFERENCES

- Afonso, MS., Sant'ana, LS., Mancini-filho, J., 2010. Interaction between natural antioxidants and reactive oxygen species in cardiovascular diseases: perspectives to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) contribution. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, 35.1, 129-148.
- Al-kassie, GAM., 2009. Influence of two plant extracts derived from thyme and cinnamon on broiler performance. *Pakistan Veterinary Journal*, 29.4, 169-173.
- Bharti, V., Vasudeva, N., 2013. *Oreganum vulgare* Linn. leaf: An Extensive Pharmacognostical and Phytochemical Quality Assessment. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(2), 277-281.

Biesalski, H. K., 2000. The role of antioxidants in nutritional support. *Nutrition*, 16(7-8), 593-596.

Botterweck, AAM., Verhagen, H., Goldbohm, RA., Kleinjans, J PA. Brandt, VD, 2000. Intake of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene and Stomach Cancer Risk: Results from Analyses in the Netherlands Cohort Study. *Food and Chemical Toxicology*, 38,599 – 605.

Brazil. Law No. 6198, of December 26, 1974. Provides for the Mandatory Inspection and Inspection of Products for Animal Feed, and provides other provisions. In: BRASIL. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply MAPA. Brasília, December 26, 1974; 153rd of Independence and 86th of the Republic.

Campigotto, G., Alba, DV., Sulzbach, MM., Santos, D., Souza, CF., Baldissera, MD., Gundel, S., Ourique, AF., Zimmer, F., Petrolli, TG., Paiano, D., Da Silva, AS. 2020. Dog feed production using curcumin as antioxidant: effects of intake on animal growth, health and feed conservation. *Archives of Animal Nutrition*. 74, 397-413.

Cantuti-castelvetri, I., Shukitt-hale, B., Joseph, JA. 2000. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 18(4-5), 367-381.

Carciofi, AC.; Jeremias, JT, 2010. Scientific progress on pet animal nutrition in the first decade of the 21<sup>st</sup> century. *Brazilian Journal of Animal Science*, 39, 35-41.

Cervato, G., Carabelli, M., Gervasio, S., Cittera, A., Cazzola, R., & Cestaro, B. 2000. Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) Leaf extracts. *Journal of Feed Biochemistry*, 24(6), 453-465.

França, J.; Saad, FMOB.; Saad, CEP.; Silva, RC.; Reis, JS., 2011. Evaluation of conventional and alternative ingredients in dog and cat food. *Brazilian Journal of Animal Science*. 40, 222-231.

Frankel, EN.; Meyer, AS. 2000. Review: the problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional feed and biological antioxidants. *Journal of the Science of Feed Agriculture*, London, 80, 1925-1941.

Ferreira, ALA; Matsubara, LS. 1997. Free radicals: concepts, related diseases, defense system and oxidative stress. *Brazilian Medical Association Magazine*, 43.1, 61–68.

Gross KL., Bollinger R., Thawngmungj P., Collings GF., 2013. Effect of Three Different Preservative Systems on the Stability of Extruded Dog Feed Subjected to Ambient and High Temperature Storage. *Nutrition Through the Life Cycle*. 124, 2638 – 2642.

Gümüş, R., Erol, HS., Imik, H., Halice, M. 2017. The Effects of the Supplementation of Lamb Rations with Oregano Essential Oil on the Performance, Some Blood Parameters and Antioxidant Metabolism in Meat and Liver Tissues. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(3), 395-401.

Heaton, PR.; Reed, CF.; Mann, SJ.; Ransley, R.; Stevenson, J.; Charlton, CJ.; Smith, BH.; Harper, EJ.; Rawlings, JM., 2002. Role of dietary antioxidants to protect against DNA damage in adult dogs. *The Journal of Nutrition*, 132. 6, 1720-1724.

Hilton, JW., 1989. Antioxidants: function, types and necessity of inclusion in pet feeds. *Canadian Veterinary Journal*. 30, 682-684.

Inouye S., Takizawa T., Yamaguchi H., 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 565-573.

Karamanoli, K.; Vokou, D.; menkissoglu, U.; Constantinidou, I.H., 2000. Bacterial colonization of phyllosphere of mediterranean aromatic plants. *Journal of Chemical Ecology*, 26, 2035-2048.

Macedo, LM de; Santos EM dos; Militão, L; Tundisi, LL; Ataide, JA; Souto, EB; Mazzola, PG. 2020. Rosemary (*Rosmarinus officinalis L., syn Salvia rosmarinus Spenn.*) and Its Topical Applications: A Review. *Plants*, 9, 651.

Machlin, L.J.; Bendich, A. 1987. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *Faseb Journal* 1: 441-445.

Mannervik, B., Guthenberg, C, 1981. Glutathione transferase (human placenta). *Methods Enzymology* 77, 231–235.

Mariutti, LRB.; Bragagnolo, N., 2007. Review: Natural Antioxidants of the *Lamiaceae* Family. Application in Food Products. *Brazilian Journal of Feed Technology*, 10, 96-103.

Nascimento, PFC., Nascimento, AC., Rodrigues, CS., Antoliolli, AR., Santos, PO., Barbosa, AMJ., Trindade, RC., 2007. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. *Brazilian Journal Pharmacognosia*, 17(1), 108-113.

National research council - NRC, 2006. Nutrient requirements of dogs and cats. Washington: National Academy 398 p.

Oliveira, SP. de; Cunha, GSP.; Prates, JPB.; Fonseca, FSA.; Souza, KSS. de; Azevedo, AM.; Xavier, ARE.; Santos, EMS.; Santos, HO.; Almeida, AC. de. 2019. Antimicrobial activity of essential oils extracted from clove and lemongrass against pathogenic bacteria isolated from bovine, swine and poultry feces. *The Journal Semina Ciencias Agrarias*. 40(5), 1937-1950.

Oliveira e Silva, AM., Andrade-Wartha, ERS., Carvalho, EBT., Lima, A., Novoa, AV., Mancini-Filho, J. 2011. Effect of the aqueous extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) on oxidative stress in diabetic rats. *Nutrition Magazine*. 24.1, 121-130.

Pauliuc, D., Fu, Y., 2018. A study on the attachment in between owner and pet and its influence on the consumption of pet feed. Jönköping University. *International business School*. 95.

Sedlak, J., Lindsay, RH. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochemistry*. 25, 192–205.

Silva, DJ.; Queiroz, AC. Food analysis (chemical and biological methods) 3.ed. Viçosa, MG: Publisher UFV, 2002. 235p.

Sritabutra, D., Soonwera, M., 2013. Repellent activity of herbal essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.). Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 3(4), 271-276.

Toghyani, M., Gheisari A., Ghalamkari, G., Mohammadrezaei, M. 2010. Growth performance, serum biochemistry and blood hematology of broiler chicks fed different levels of black seed (*Nigella sativa*) and peppermint (*Mentha piperita*). Livestock Science. 129, 173-178.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39, 44-84.

Vasconcellos, R. S. 2011. The safety of using synthetic antioxidants in pet feed. Rev. Pet Feed Brazil, 16, 16-18.

Wendel, A, 1981. Glutathione peroxidase. Methods Enzymology. 77, 325-33.

Xie, YJ., Yang, Z., Cao, D., Rong, F., Ding, H., Zhang, D. 2015. Antitermitic and antifungal activities of eugenol and its congeners from the flower buds of *Syzygium aromaticum* (clove). Industrial Crops and Products. 77, 780-786.

Zaine, L.; Monti, M.; Vasconcellos, R. S.; Carciofi, AC., 2014. Immunomodulatory nutraceuticals with potential clinical use for dogs and cats. Semina: Agricultural Sciences, Londrina, 35.4, supplement, 2513-2530.

**Table 1.** Ingredients and nutritional composition of experimental diets

Ingredient (g/kg)	Control (TCON)	Control + natural antioxidant (TNAT)
Ground corn	331.06	331.06
Soybean meal	250.00	250.00
Meat and Bone Meal (45%)	244.04	244.04
Rice bran	51.85	51.85
Chicken fat	50.00	50.00
Limestone	40.00	40.00
Hydrolyzed liver	25.00	25.00
Premix <sup>1</sup>	4.00	4.00
Propionic Acid	2.00	2.00
BHT	1.00	-
Natural antioxidant (oil blend)	-	1.00
Phosphoric acid	0.50	0.50
L-Taurine	0.40	0.40
Yucca extract	0.25	0.25
Calculated values	g/kg	g/kg
Crude protein (g/kg)	260.00	260.00
Crude fat (g/kg)	100.00	100.00
Crude fiber (g/kg)	30.00	30.00
Calcium (g/kg)	40.00	40.00
Phosphor (g/kg)	15.53	15.53
Sodium (g/kg)	2.00	2.00
Potassium (g/kg)	7.95	7.95
Chloride (g/kg)	1.68	1.68

<sup>1</sup>Supplementary vitamins containing, per kg of product: Vit. A - 10,000,000 IU; Vit. D3 - 2,000,000 IU; Vit. E - 30,000 IU; Vit. B1 - 2.0 g; Vit. B2 - 6.0 g; Vit. B6 - 4.0 g; Vit. B12 - 0.015 g; Pantothenic acid - 12.0 g; Biotin - 0.1 g; Vit. K3 - 3.0 g; Folic acid - 1.0 g; Nicotinamide acid - 50.0 g; Selenium - 250.0 mg; and Excipient q.s.p - 1000 g; Supplementary mineral content per kg of product: Iron - 100.0 g; Cobalt - 2.0 g; Copper - 20.0 g; Manganese - 160.0 g; Zinc - 100.0 g; Iodine - 2.0 g; and Excipient q.s.p - 1000 g.

**Table 2.** Composition of the diet with natural antioxidant - Blend of essential oils and Vitamin E (TNAT) and diet with synthetic antioxidant (TCON) 1, 30, 60, 90, 120, and 150 days after production and storage.

Chemical composition	Days after production	TNAT Feed	TCON Feed
Dry matter (%)	30	91.67	92.83
	90	91.86	92.79
	150	92.30	92.64
	210	92.17	92.67
	270	92.09	93.23
	330	91.98	93.09
Mineral matter (% of DM)	30	11.44	11.29
	90	11.56	11.40
	150	11.54	11.80
	210	11.55	11.56
	270	11.61	11.61
	330	11.83	11.58
Crude protein (% of DM)	30	24.49	25.09
	90	24.46	25.25
	150	25.08	25.49
	210	24.91	25.51
	270	24.62	25.46
	330	24.81	25.98
Neutral detergent fiber (% of DM)	30	2.39	2.26
	90	2.30	2.35
	150	2.37	2.43
	210	2.28	2.39
	270	2.24	2.33
	330	2.26	2.51
<sup>1</sup> TBARS (nmol MDA/mg protein)	30	5.782	5.276
	90	5.822	4.066
	150	5.476	4.700
	210	5.253	4.036
	270	5.158	4.229
	330	4.986	4.770
<sup>1</sup> ROS (DCFH/mg protein)	30	4.491	4.142
	90	4.132	3.168
	150	3.844	3.698
	210	3.844	3.334
	270	3.475	3.120
	330	3.930	3.685
<sup>1</sup> PSH ( $\mu$ mol SH/mg protein)	30	7.025	5.555
	90	5.452	5.482
	150	7.153	5.775
	210	6.475	4.321
	270	6.452	5.425
	330	6.902	3.741
<sup>1</sup> NPSH (nmol NPSH/mL)	30	100.417	119.082
	90	109.032	121.109

---

150	122.882	136.649
210	98.728	120.518
270	113.592	133.102
330	109.116	118.237

---

<sup>1</sup>Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reactive oxygen species (ROS), Protein thiols (PSH) and non-protein thiols (NPSH).

**Table 3.** Body weight of beagle dogs receiving experimental diets

Variable	Treatments		DP	P-Value		
	Control (TCON)	Natural antioxidan t (TNAT)		Trt	day	Trt × day
Body weight (kg)				0.98	<0. 01	0.94
Day 1	12.09 <sup>A</sup>	12.11 <sup>A</sup>	0.22	-		
Day 28	11.33 <sup>B</sup>	11.31 <sup>B</sup>	0.22	-		
Mean	11.71	11.71	0.15	-	-	
Change in body weight (kg)	-0.765	-0.798	0.33	0.94	-	-

<sup>A-B</sup> Within a treatment, underwriting differs ( $P \leq 0.05$ ) or tends to differ ( $P \leq 0.10$ ).

<sup>x-y</sup> In a line, without the common subscript, it differs ( $P \leq 0.05$ ) or tends to differ ( $P \leq 0.10$ ).

**Table 4.** Complete blood counts of beagle dogs receiving experimental diets

	Treatments		DP	P-value		
	Control (TCON )	Natural antioxidant (TNAT)		Trt	day	Trt × day
Hematocrit (%)				0.12	<0.01	0.90
day 1	43.80 <sup>B</sup>	44.08 <sup>B</sup>	0.58			
day 14	45.16 <sup>AB</sup>	45.88 <sup>A</sup>	0.58			
day 28	45.92 <sup>A</sup>	46.63 <sup>A</sup>	0.58			
Mean	44.96	45.53	0.30			
Hemoglobin (g/dL)				0.33	<0.01	0.78
day 1	16.34 <sup>B</sup>	16.41 <sup>C</sup>	0.20			
day 14	16.79 <sup>AB</sup>	17.12 <sup>B</sup>	0.20			
day 28	16.98 <sup>A</sup>	27.12 <sup>A</sup>	0.20			
Mean	16.70	16.88	0.13			
Erythrocytes (x 10 <sup>6</sup> μL)				0.32	0.01	0.81
day 1	6.38 <sup>B</sup>	6.40 <sup>B</sup>	0.07			
day 14	6.57 <sup>A</sup>	6.62 <sup>A</sup>	0.07			
day 28	6.55 <sup>A</sup>	6.65 <sup>A</sup>	0.07			
Mean	6.50	6.56	0.05			
Leukocytes (x10 <sup>3</sup> μL)				0.62	0.16	0.05
day 1	11.21	11.16	0.47			
day 14	10.80	10.17	0.47			
day 28	10.51 <sup>y</sup>	11.77 <sup>x</sup>	0.47			
Mean	10.84	11.04	0.33			
Neutrophils (μL)				0.70	0.31	0.07
day 1	6960.30	6852.00	375.76			
day 14	6965.70	6461.30	375.76			
day 28	6756.10 <sup>y</sup>	7729.20 <sup>x</sup>	375.76			
Mean	6894.03	7014.17	248.81			
Lymphocytes (μL)				0.93	0.02	0.81
day 1	2866.39	2960.71 <sup>A</sup>	154.21			
day 14	2596.89	2507.01 <sup>B</sup>	154.21			
day 28	2507.29	2540.71 <sup>B</sup>	154.21			
Mean	2656.86	2669.48	94.36			

Monocytes (/μL)				0.76	0.0	0.34
					8	
day 1	936.77 <sup>A</sup>	875.83 <sup>AB</sup>	60.75			
day 14	784.37 <sup>B</sup>	785.03 <sup>B</sup>	60.75			
day 28	809.97 <sup>A</sup>	922.53 <sup>A</sup>	60.75			
	B					
Mean	843.70	861.13	39.60			
Eosinophils (/μL)				0.42	0.7	0.73
					1	
day 1	402.51	382.86	131.53			
day 14	409.01	539.66	131.53			
day 28	393.61	493.76	131.53			
Mean	401.71	472.09	103.84			

<sup>A-C</sup> Within a treatment, underwriting differs ( $P \leq 0.05$ ) or tends to differ ( $P \leq 0.10$ ).

<sup>x-y</sup> In a line, without the common subscript, it differs ( $P \leq 0.05$ ) or tends to differ ( $P \leq 0.10$ ).

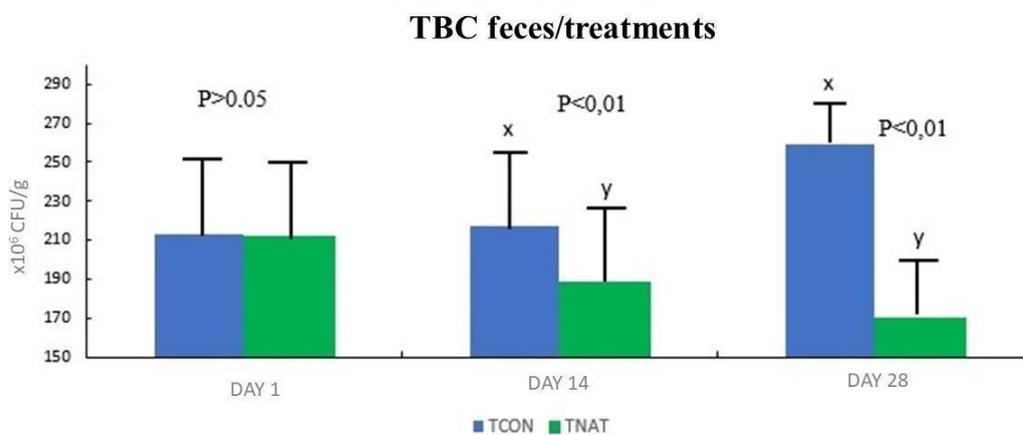
**Table 5.** Antioxidant/oxidant responses of beagle dogs receiving experimental diets

Variable <sup>1</sup>	Treatments			P-value		
	Control (TCON)	Natural antioxidant (TNAT)	DP	Trt	Day	Trt × day
GST (μmol				<0.01	<0.01	0.23
day 1	1.88 <sup>B</sup>	1.99 <sup>C</sup>	0.19			
day 14	6.86 <sup>B</sup>	7.12 <sup>B</sup>	0.19			
day 28	7.26 <sup>A</sup>	7.92 <sup>A</sup>	0.19			
Mean	5.33 <sup>y</sup>	5.68 <sup>x</sup>	0.12			
GPx (μmol NADPH oxidate/min/mL)				0.09	0.09	<0.01
day 1	3.70 <sup>B</sup>	3.77 <sup>A</sup>	0.13			
day 14	3.47 <sup>AB</sup>	3.67 <sup>A</sup>	0.13			
day 28	3.84 <sup>Ax</sup>	3.07 <sup>By</sup>	0.13			
Mean	3.67 <sup>x</sup>	3.50 <sup>y</sup>	0.08			
NPSH (mMol NPSH/mL)				<0.01	<0.01	0.60
day 1	0.21 <sup>A</sup>	0.24 <sup>A</sup>	0.02			
day 14	0.10 <sup>B</sup>	0.15 <sup>B</sup>	0.02			
day 28	0.07 <sup>B</sup>	0.15 <sup>B</sup>	0.02			
Mean	0.12 <sup>y</sup>	0.18 <sup>x</sup>	0.01			
ROS (U DCFA/μL)				0.02	<0.01	0.21
day 1	305.33 <sup>B</sup>	481.63 <sup>B</sup>	907.26			
day 14	3212.45 <sup>A</sup>	1513.33 <sup>AB</sup>	907.26			
day 28	2880.52 <sup>A</sup>	3024.30 <sup>A</sup>	907.26			
Mean	2132.77 <sup>x</sup>	1673.09 <sup>y</sup>	740.47			

<sup>1</sup> GST (glutathione S-transferase activity); GPx (glutathione peroxidase activity); non-protein thiols (NPSH); reactive oxygen species (ROS).

<sup>A-C</sup> Within a treatment, underwriting differs ( $P \leq 0.05$ ) or tends to differ ( $P \leq 0.10$ ).

<sup>x-y</sup> In a line, without the common subscript, it differs ( $P \leq 0.05$ ) or tends to differ ( $P \leq 0.10$ ).



**Fig. 1:** Graph of the total bacterial count (TBC) in the dog's feces between treatments (TNAT and TCON) different letters in the same period when  $P < 0.05$ .

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O experimento conduzido nessa dissertação nos permitiu concluir que a substituição de antioxidantes sintéticos por antioxidantes em forma de blend advindo de fontes naturais proporciona a manutenção da qualidade do alimento e resultados positivos em marcadores metabólicos importantes nos cães.

A inclusão do blend de óleos essenciais composto por alecrim, cravo, orégano e vitamina E mostrou efeitos no estímulo dos níveis de antioxidantes sistêmicos dos beagles, o que está associado a diminuição de condições de estresse oxidativo, reduzindo o número de radicais livres no sangue dos cães, além de demonstrar propriedades antibactericidas e modulador imunológico.

## REFERÊNCIAS

ABIA – Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação, 1999. **Compêndio da Legislação de Alimentos**: Consolidação das Normas e Padrões de Alimentos, 7ª ver., São Paulo, vol. 1.

ABINPET, 2019. Perfil Pet Food. **Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação**. [online]. Disponível em: <http://www.abinpet.or.com.br>. Acesso em: 20 de outubro de 2020, 08h36min20s.

AFONSO, M. S.; SANT'ANA, L. S.; MANCINI-FILHO, J., 2010. Interaction between natural antioxidants and reactive oxygen species in cardiovascular diseases: perspectives to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) contribution. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v.35, n.1, p.129-148.

ALMEIDA-DORIA R. F., REGITANO-D'ARCE M. A. B., 2016. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência Tecnologia de Alimentos**; 20: 01-14.

AL-TURKI, A.I., EL-ZINEY M. G., ABDEL-SALAM, A. M., 2008. Chemical and anti-bacterial characterization of aqueous extracts of oregano, marjoram, sage and licorice and their application in milk and labneh. **Journal of Food Agriculture and Environment**. v.6, p.39-44.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. **D.O.U nº 83 – Diário Oficial da União**; Poder executivo; Brasil; 02 de maio.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5 ed. Viçosa, MG: UFV, 2011.

BHARTI, V., VASUDEVA, N. , 2013. *Oreganum vulgare* Linn. leaf: An Extensive Pharmacognostical and Phytochemical Quality Assessment. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**,3(2), 277-281.

BIESALSKI, H. K., 2000. The role of antioxidants in nutritional support. **Nutrition**, 16(7-8), 593-596.

BŁASZCZYK, A., SKOLIMOWSKI, E J., 2005. Apoptosis and cytotoxicity caused by ethoxyquin and two of its salts. **Letters of Cellular and Molecular Biology**, vol. 10, n° 1, pp. 15-21.

BORRÁS-LINARES, I.; STOJANOVIĆ, Z.; QUIRANTES-PINÉ, R., 2014. Rosmarinus officinalis Leaves as a Natural Source of Bioactive Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, n.11, p. 20585-20606.

BOSE, A., MONDALA S., GUPTAB J. K., GHOSH T., G. K. DASH S. S., 2007. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. **Fitoterapia**, v.78, p.515-20.

BOTTERWECK, A.A.M., VERHAGEN, H., GOLDBOHM, R.A., KLEINJANS, J., P.A. BRANDT, V. D., 2000. Intake of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene and Stomach Cancer Risk: Results from Analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, p.599 – 605.

BRASIL. Lei nº 6198, de 26 de dezembro de 1974. Dispõe sobre a Inspeção e a Fiscalização Obrigatórias dos Produtos à Alimentação Animal, e dá outras Providências. **In: BRASIL.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA. Brasília, 26 de dezembro de 1974; 153º da Independência e 86º da República.

BUNGHEZ, F., SOCACIU, C., CATUNESCU, G. M., 2012. Antioxidants used in pet feed. **Bulletin of university of agricultural sciences and veterinary medicine cluj- napoca Agriculture**. V. 69 n. 2, p 488-489.

BURTON, G.W; INGOLD, K. U., 1981. The Antioxidant Activity of Vitamin E and Related Chain-Breaking Phenolic Antioxidants in Vitro. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, p. 6472-6477.

BUSATTA, C. et al., 2007. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 610-616.

CAMO, J.; BELTRÁN, J. A.; RONCALÉS, P., 2008. Extension of the display life of lamb with an antioxidant active packaging. **Meat Science**, Oxford, v. 80, n. 4, p. 1086-1091.

CARCIOFI, A.C.; JEREMIAS, J. T, 2010. Progresso científico sobre nutrição de animais de companhia na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.35-41.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A, 2013. Review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15-25.

CASE, L. P.; CAREY, D. P.; HIDREAKEWA, D. A., 2000. History and regulation of pet foods. **Canine and feline nutrition: A resource for companion animal professionals**. 2. 143-151.

CASE, L. P., L. DARISTOTLE, M. G. HAYEK, M. F., 2011. **Canine and feline nutrition: A resource for companion animal professionals**. ed. 3, Mosby Elsevier, Missouri.

CONEGLIAN, S. M; LIMA, B. S.; SILVA, L. G.; LAZZARI , C. M.; SERRANO, R. D.C.; TONELLO , C. L., 2011. Utilização de antioxidantes nas rações. **PUBVET**, Londrina, V.5, N. 5, Ed. 152, Art. 1026.

CONNER, D. E., 1993. Naturally occurring compounds. In: DAVIDSON P.; BRANEN A.L. **Antimicrobials in foods**. New York: Marcel Dekker, Inc.. p.441-68.

COSKUN, B. K., ÇALIKOGLU, E., EMIROGLU, Z. K., CANDOGAN, K., 2014. Antioxidant active packaging with soy edible films and oregano ou thyme essential oils for oxidative stability of ground beef patties. **Journal of Food Quality**, 37, 203–212.

COSTA, P. R. R., 2000. Safrol e eugenol: estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 357-369.

CUVELIER M. E., BERSSET C., RICHARD H., 1994. Antioxidant constituents in sage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; 42: 665-9.

DEBIER, C.; LARONDELLE, Y., 2005. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer o offspring. **British Journal of Nutrition**, v.93, p.153-174.

DÍAZ-VICIEDO, R. HORTELANO S., GIRÓN N., MASSÓA J., RODRIGUEZ B., VILLAR A., B. HERAS., 2008. Modulation of anti-inflammatory responses by diterpene acids from *Helianthus annuus* L. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.369, p.761-6.

DORIA R. F., D'ARCE M. A. B., 2000. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência Tecnologia de Alimentos**; 20: 01-14.

DZANIS, D. A., 1991. Safety of ethoxyquin in dog food, **Journal of Nutrition**, vol. 121, nº 11, pp. S163-164.

EDEAS, M., 2011. Strategies to target mitochondria and oxidative stress by antioxidants: key points and perspectives. **Pharmaceutical Research**, v.28, p.2771-2779.

EVANS, J.L., GOLDFINE, I. D., MADDUX. B. A., GRODSKY, G. M., 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocrinology Reviews**, v.23, p.599-622.

FRANÇA, J.; SAAD, F. M. O. B.; SAAD, C. E. P.; SILVA, R. C.; REIS, J. S., 2011. Avaliação de ingredientes convencionais e alternativos em rações de cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40, 222-231.

GROSS K. L., BOLLINGER R., THAWNGHMUNGJ P., COLLINGS G. F., 2013. Effect of Three Different Preservative Systems on the Stability of Extruded Dog Food Subjected to Ambient and High Temperature Storage. **Nutrition Through the Life Cycle**, p 2638S – 2642S.

HALLIWELL, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v.18, p.685-716.

HEATON, P. R.; REED, C. F.; MANN, S. J.; RANSLEY, R.; STEVENSON, J.; CHARLTON, C. J.; SMITH, B. H.; HARPER, E. J.; RAWLINGS, J. M., 2002. Role of dietary antioxidants to protect against DNA damage in adult dogs. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 6, p. 1720-1724.

HILTON, J. W., 1989. Antioxidants: function, types and necessity of inclusion in pet foods. **Canadian Veterinary Journal**. v.30, p.682-684.

HRAS, A. R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D., 2000. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, Oxford, v. 71, n. 2, p. 229-233.

INOUYE S., TAKIZAWA T., YAMAGUCHI H., 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 47, pp. 565-573.

KAILEH, W. BERGHE V. M., BOONE E., ESSAWI T., HAEGEMAN G., 2007. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p.510-6.

KARAMANOLI, K.; VOKOU, D.; MENKISSOGLU, U.; CONSTANTINIDOU, I. H., 2000. Bacterial colonization of phyllosphere of mediterranean aromatic plants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. [s/n], p. 2035-2048.

KARRE, L., LOPEZ, K., GETTY, K. J. K., 2013. Natural antioxidants in meat and poultry 450 products. **Meat Science**, 94(2), 220-227.

KIM, H. M; LEE, E. H; KIM, C. Y; CHUNG, J. G; KIM, S. H; LIM, J.P; SHIN, T. Y., 1997. Antianaphylactic properties of eugenol. **Pharmaceutical Research**, v 48, p. 3620-3632.

KNOWLES, J. R. , 2002. Microbial adhesion and its control using natural and synthetic biocides. **United Kingdom: South Bank University**, London.

KORUKLUOGLU, M., SAHAN Y., YIGIT A., 2008. Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. **Journal of Food Safety**, v.28, p.76-87.

LEBOLD, K. M.; TRABER, M. G., 2014. Interactions between  $\alpha$ -tocopherol, polyunsaturated fatty acids, and lipoxygenases during embryogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v, 66, p. 13 – 19.

LEGAULT, J., PICHETTE, A., 2007. Potentiating effect of  $\beta$ - caryophyllene on anticâncer activity of  $\alpha$ - humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 59(12), 1643-1647.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A., 2002. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. 512 p.

MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C., JIMÉNEZ, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.5, p.727-747.

MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N., 2007. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, p. 96-103, abr./jun.

MAU J.L., CHEN C. P., HSIEH P.C., 2001. Antimicrobial effects of extracts from Chinese chive, cinnamon and corn fructus. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49:183-188.

MELO, E. A., GUERRA, N. B., 2002. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 1, p. 1-11.

NASCIMENTO G. G. F., LOCATELLI J., FREITAS P. C., 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, 31:247-256.

NASCIMENTO, P. F. C., NASCIMENTO, A. C., RODRIGUES, C. S., ANTOLIOLLI, A. R., SANTOS, P. O., BARBOSA, A. M. J., TRINDADE, R. C., 2007. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. **Revista Brasileira Farmacognosia**, 17(1), 108-113.

NASSU, R. T.; GONÇALVES, L. A. G.; SILVA, M. A. A. P.; BESERRA, F. J., 2003. Oxidative stability of fermented goat meat sausage with different levels of natural antioxidant. **Meat Science**, Oxford, v. 63, n. 1, p. 43-49.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2006. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington: National Academy 398 p.

OKEZIE, I.A., 1998. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, n.2, p.199-212.

OLIVEIRA, R.R., LAGE, M. E., NETO, O. J. S., SALES, M. C., 2012. Antioxidantes naturais em produtos cárneos. **Revista PUBVET**, v.6, n.10, Ed. 197, Art. 1324.

ORDÓÑEZ, J. A. Tecnologia de alimentos: Alimentos de origem animal. ed.1. Porto Alegre: **Artmed**, 2005.

PAULIUC, D., FU, Y., 2018. A study on the attachment in between owner and pet and its influence on the consumption of pet food. Jönköping univesitary. **International business**. 95.

PITARO, S.P.; FIORANI, L.V.; JORGE, N., 2012. Potencial antioxidante dos extratos de manjeriço (*Ocimum basilicum* Lamiaceae) e orégano (*Origanum vulgare* Lamiaceae) em óleo de soja. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.4, p.686-691.

POKORNY J., YANISHLIEVA N., GORDON M., 2001. Antioxidants in food: practical applications. Boca, Raton, Boston, New York, Washington, D.C.: **Woodhead Publishing**, CRC Press. p 268-283.

PODSEDEK, A., 2007. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.40, p.1-11.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N., 2006. Atividade antioxidante do  $\alpha$ -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 65, 15-20.

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

SIKORA E., CIESLIK E., TOPOLSKA K., 2008. The Sources of Natural Antioxidants. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**; 7(1): 5-17.

SILVA, F. A. M., BORGES, M. F. M., FERREIRA, M. A., 1999. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Revista Química Nova**, v.22, p.94-103.

SRITABUTRA, D., SOONWEREA, M., 2013. Repellent activity of herbal essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.). **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, 3(4), 271-276.

STARZYŃSKA-JANISZEWSKA A., STODOLAK B., JAMRÓZ M., 2008. Antioxidant properties of extracts from fermented and cooked seeds of Polish cultivars of *Lathyrus sativus*. **Food Chemistry**, v.109, n.2, p.285-92.

TRABER, M. G., 2014. Vitamin E Inadequacy in Humans: Causes and Consequences. **American Society for Nutrition**, v. 5, p. 503–514.

TURKO, I.V., MARCONDES, S., MURAD, F., 2001. Diabetes- associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v.281, p.H2289-H2294.

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

VANDEWEERD, J-M.; CAMBIER, C.; GUSTIN, P., 2013. Nutraceuticals for canine liver disease: assessing the evidence. *The Veterinary clinics of North America*. **Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 43, n. 5, p. 1171-1179.

VASCONCELOS, S. M. L., SILVA, M. A. M., GOULART, M. O. F., 2011. Low molecular weight pro-antioxidants and antioxidants from diet: structure and function. **Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition**, v. 31, n. 3, p. 95-118.

ZAINE, L.; MONTI, M.; VASCONCELLOS, R. S.; CARCIOFI, A. C., 2014. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 4, suplemento, p. 2513-2530.

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Óleo essencial de alecrim e vitamina E como antioxidantes na alimentação de cães", protocolada sob o CEUA nº 5978081019 (ID 001058), sob a responsabilidade de **Aleksandro Schafer da Silva** - que envolve produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 11/10/2019.

We certify that the proposal "Rosemary Essential Oil and Vitamin E as Antioxidants in Dog Food", utilizing 10 Dogs (10 males), protocol number CEUA 5978081019 (ID 001058), under the responsibility of **Aleksandro Schafer da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 10/11/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [11/2019](#) a [12/2020](#)

Área: [Zootecnia](#)

Origem: [Animais provenientes de outros projetos](#)

Espécie: [Cães](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [15 a 16 meses](#)

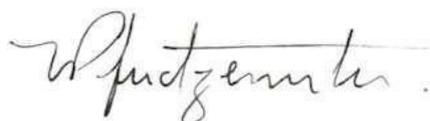
N: [10](#)

Linhagem: [Beagle](#)

Peso: [10 a 12 kg](#)

Local do experimento: CANIL de MANUTENÇÃO da FECEO (UDESC Oeste). Local cadastrado no CIUCA

Lages, 15 de fevereiro de 2021



José Cristani  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina