

Eritrograma e estresse oxidativo em bovinos confinados alimentados com feno de *Brachiaria* sp. e suplementados com antioxidantes

Erythrogram and oxidative stress in confined cattle fed with Brachiaria sp. hay and supplemented with antioxidants

Roberta Dias da Silva Cunha^{1*}, Gustavo Lage Costa², Ulisses Reis Correia Pinto³, Juliana Job Serodio Ferezin¹, Paulo Henrique Jorge da Cunha¹, Maria Clorinda Soares Fioravanti¹

¹Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil.

²Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO), Goiânia, Goiás, Brasil.

³Instituto Federal Goiano (IFgoiano), Urutai, Goiás, Brasil.

*Correspondente: robertadias@ufg.br

Resumo

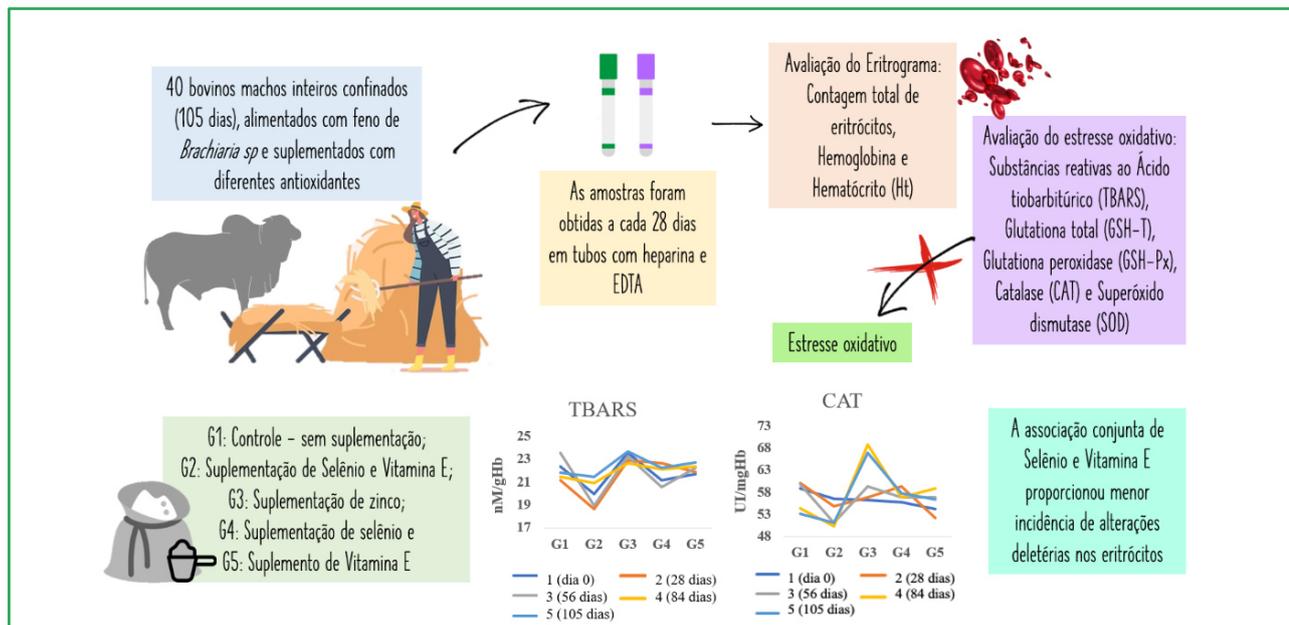
As *Brachiaria* sp contém esporidesminas que podem ser oxidadas por lipoperoxidação e ocasionar estresse oxidativo. No presente estudo foram avaliados os efeitos de diferentes antioxidantes na lipoperoxidação dos eritrócitos de bovinos da raça Nelore, alimentados com feno de *Brachiaria* sp. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em que 40 bovinos machos, inteiros, foram divididos, em cinco tratamentos (G1: controle - sem suplementação; G2: suplementação de selênio e vitamina E; G3: suplementação de zinco; G4: suplementação de selênio e G5: suplementação de vitamina E) e alocados em baias de confinamento, por 105 dias. As amostras de plasma heparinizado ou com ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA) foram obtidas a cada 28 dias para avaliação hematológica e de estresse oxidativo (0, 28, 56, 84 e 105 dias). No eritrograma foi mensurado a contagem total de eritrócitos, a hemoglobina e o hematócrito (Ht). Para a avaliação do estresse oxidativo, com o objetivo de analisar as características da membrana do eritrócito foram determinadas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutathione total (GSH-T), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Os resultados demonstraram que independente do tratamento não houve estresse oxidativo durante o período de confinamento experimental e que a associação conjunta de selênio e vitamina E na dieta dos bovinos proporcionaram menor incidência de alterações deletérias sobre os eritrócitos. **Palavras-chaves:** enzimas antioxidantes; eritrócito; espécies reativas de oxigênio (ROS); lipoperoxidação; Nelore.

Abstract

Brachiaria sp contains sporidesmin that can be oxidized by lipoperoxidation and cause oxidative stress. In the present study we evaluated the effects of different antioxidants on lipoperoxidation of erythrocytes from Nelore cattle fed with *Brachiaria* sp hay. The experimental design was entirely randomized, in which 40 whole male cattle were divided into five treatments (G1: control - no supplementation; G2: selenium and vitamin E supplementation; G3: zinc supplementation; G4: selenium supplementation and G5: vitamin E supplementation) and allocated in feedlot pens for 105 days. The samples heparinized and with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were obtained every 28 days for hematological and oxidative stress evaluation (0, 28, 56, 84 and 105 days). In the erythrogram total erythrocyte count, hemoglobin, and hematocrit (Ht) were measured. For the evaluation of oxidative stress, in order to analyze the characteristics of the erythrocyte membrane, the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), total glutathione (GSH-T), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) were determined. The results showed that regardless of the treatment there was no oxidative stress during the experimental confinement period and that the joint association of selenium and vitamin E in the bovine diet provided a lower incidence of deleterious alterations on erythrocytes. **Key words:** antioxidant enzymes; erythrocyte; reactive oxygen species (ROS); lipoperoxidation; Nelore.

Recebido : 20 de outubro de 2021. Aceito: 8 de fevereiro de 2022. Publicado: 8 de abril de 2022.





Resumo gráfico: Eritrograma e estresse oxidativo em bovinos confinados alimentados com feno de *Brachiaria sp.* e suplementados com antioxidantes

Introdução

A pecuária brasileira tem se desenvolvido muito nos últimos anos, o que resultou em uma contribuição de 491,2 bilhões de reais para economia, com valorização expressiva de 24,56% do PIB brasileiro de 2020⁽¹⁾. Uma das vantagens competitivas da cadeia produtiva da carne brasileira é o sistema extensivo, porém esse sistema de criação a pasto pode acarretar algumas ineficiências na produção⁽²⁾. Na tentativa de minimizar esses prejuízos, a incorporação de tecnologias relacionadas à nutrição animal, como a adição de alguns microminerais e vitaminas à dieta⁽³⁾, com o objetivo de melhorar a resposta antioxidante e imune dos animais e aprimorar a eficiência da cadeia produtiva tendo como foco a sustentabilidade^(4,5).

As espécies de gênero braquiária são importantes forrageiras consideradas como a salvação da pecuária nacional⁽⁴⁾. Entretanto, algumas espécies como *B. brizantha*, *B. humidicola* e, especialmente, *B. decumbens* foram descritas como causadoras de fotossensibilização hepatogênica em ruminantes⁽⁶⁾. A causa principal da fotossensibilização hepatogênica em bovinos é a ingestão da toxina esporidesmina, presente nos esporos do fungo *Pithomyces chartarum*^(7,8).

O principal efeito tóxico da esporidesmina deve-se à ocorrência da peroxidação de lipídeos e da carboxilação de proteínas presentes nas células, resultantes da quantidade excessiva de radicais livres⁽⁹⁾. Entretanto, alguns pesquisadores têm atribuído como causa da intoxicação as saponinas esteróides litogênicas presentes nas espécies de *Brachiaria sp.*^(10,11). Essas saponinas, ao serem metabolizadas no organismo animal formam sais insolúveis que se depositam sob a forma de cristais no

sistema biliar⁽¹²⁾. Os cristais causam inflamação e obstrução do sistema biliar, provocando necrose dos hepatócitos periportais e resultando em icterícia, fotossensibilização e hepatite.⁽¹³⁾

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes⁽¹⁴⁾, ocasionando alterações no balanço redox e controle ou danos moleculares, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em vários órgãos e tecidos.⁽¹⁵⁾ Do ponto de vista funcional, o dano oxidativo promove alterações sobre a fluidez, permeabilidade e função metabólica, o que resulta em um incremento em sua fragilidade da membrana eritrocitária⁽⁹⁾. Dentre os mamíferos, os bovinos exibem uma particularidade, na qual apresentam uma menor susceptibilidade à ação dos radicais livres⁽¹⁶⁾, em decorrência da composição e organização da membrana eritrocitária que contém baixas quantidades de fosfatidilcolina^(17,18), um fosfolípido altamente peroxidável⁽¹⁹⁾.

Devido ao transporte de oxigênio realizado pela hemoglobina, os eritrócitos estão constantemente expostos às espécies reativas de oxigênio (ERO)⁽¹⁹⁾. O eritrócito apresenta em sua membrana grande número de grupos sulfidrilas, que ao serem oxidados resultam em desnaturação das proteínas de membrana. Nesse processo, pode ocorrer lesão intracelular, com oxidação da hemoglobina à meta-hemoglobina, que precipita e forma os corpúsculos de Heinz^(18,20,21).

Para evitar os danos causados pela peroxidação, as células possuem sistema de defesa antioxidante composto pelas enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GSHpx)⁽²²⁾. Os agentes

antioxidantes não enzimáticos são constituídos pelo ácido ascórbico, vitamina E pela glutatona-redutase (GSH-Rd), glutatona reduzida (GSH), carotenos, ácido úrico, proteínas quelantes de metais de transição, dentre outros⁽²³⁾.

Um dos métodos de avaliação de peroxidação lipídica nas biomembranas de eritrócitos é a mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que quantificam o teor de malondialdeído (MDA) gerado na peroxidação de lipídeos de ácidos graxos polinsaturados^(24,25,26).

O emprego de antioxidantes adicionados à ração ofertada aos animais tem constituído uma opção eficiente de melhoramento no sistema produtivo. Sua utilização tem propiciado aos animais melhora na sanidade, reprodução e na produção (conversão alimentar e ganho de peso)^(3,27,28).

Nesse contexto, objetivou-se com o presente estudo avaliar se a suplementação de diferentes fontes de antioxidantes na dieta de bovinos confinados alimentados com feno de *Brachiaria sp* poderia evitar a ocorrência de estresse oxidativo sobre os eritrócitos.

Material e métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG) e foi registrado sob o número 360/2010. O estudo foi desenvolvido na Fazenda Tomé Pinto de propriedade da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG, localizada no município de São Francisco de Goiás, Estado de Goiás, distante 110 km da capital.

Foram utilizados 40 bovinos machos, não castrados e de peso médio inicial de 360 Kg e idade entre 24 e 36 meses, criados em pastos de *Brachiaria sp*. Os animais foram divididos em cinco grupos, com oito animais cada, que receberam os seguintes tratamentos: Grupo 1 (G1 = GC) - controle (sem suplementação); Grupo 2 (G2 = Se + Vit.E) - suplementação com 2g de acetato de α -tocoferol (1000UI Vitamina E/animal/dia) e 10g de selênio metionina (10mg de selênio/animal/dia); Grupo 3 (G3 = Zn) - suplementação de 6g na forma de zinco metionina (600mg de zinco/animal/dia); Grupo 4 (G4 = Se) - suplementação com 10g na forma de selênio metionina (10mg de selênio/animal/dia) e Grupo 5 (G5 = Vit.E) - suplementação com 2g de acetato de α -tocoferol (1000UI Vitamina E/animal/dia).

Após a constituição dos grupos, os animais foram encaminhados aos seus respectivos piquetes, com área de 15m² /animal, com área sombreada, cochos e bebedouros, e fornecimento de dieta duas vezes ao dia, às 8:00 e às 15:00 horas. O fornecimento de volumoso (feno de capim *Brachiaria sp*.) e a água foram *ad libitum*. O concentrado (ração) foi balanceado de acordo com a análise bromatológica do feno ofertado (Quadro 1), com base na estimativa de um ganho diário de 0,880kg/dia e para atender as exigências nutricionais dos animais⁽²⁹⁾. O concentrado formulado (Integral Nutrição Animal, Goiânia, GO) teve uma concentração de 34% de proteína e

71% de nutrientes digestíveis totais (NDT), sendo os principais constituintes, farelo de soja, farelo de milho e mistura mineral (Quadro 2). Os bovinos permaneceram confinados por 119 dias, sendo 14 de adaptação e 105 de experimento.

Quadro 1. Valores médios da composição bromatológica do feno de capim *Brachiaria sp*. utilizado no experimento

Parâmetros	%	DP
Matéria seca	94,43	2,34
Nutrientes digestíveis totais	55,13	14,29
Proteína bruta	1,43	0,27
Fibra detergente ácida	37,3	8,51
Fibra detergente neutra	72,36	5,06

Quadro 2. Composição da ração total formulada com base na matéria seca utilizada para alimentar os animais dos diferentes grupos experimentais

Ingredientes	% em matéria seca
Feno capim <i>Brachiaria sp</i>	70
Milho moído	20,5
Farelo de soja 45%	7,5
Minerais ¹	2

No período de experimentação ocorreu a suplementação com antioxidantes à dieta por um período de 105 dias. Os antioxidantes foram pesados diariamente em uma balança de precisão (Shimadzu®, modelo AY 220), em copos descartáveis, de forma a propiciar que cada animal recebesse a quantidade diária de antioxidante, conforme o seu tratamento no cocho. Para melhorar o consumo da quantidade fornecida, era colocado sobre o antioxidante um pouco de ração, com a oferta individual por animal. Os mesmos eram monitorados até a ingestão do antioxidante e do concentrado na sua totalidade, impedindo que outro bovino se aproximasse do cocho. A alimentação foi fornecida sob a forma de dieta total, sendo que as sobras de alimentos foram pesadas e descartadas diariamente antes do fornecimento matinal, para se determinar o consumo de alimento pelo grupo e evitar que as sobras não ultrapassassem mais de 10% do total fornecido.

Para a colheita das amostras, os bovinos foram mantidos em estação e contidos no brete. As amostras sanguíneas foram obtidas a cada 28 dias (0, 28, 56, 84 e 105 dias) por meio de punção da jugular em tubos contendo EDTA a 10% (ácido etilediaminotetracético, sal dissódico) e tubos com heparina.

Em seguida à colheita, os tubos foram armazenados em caixas térmicas a 10°C e encaminhados ao laboratório pelo período máximo de duas horas para a realização do hemograma e obtenção do hemolisado. Após a obtenção das alíquotas para a mensuração do TBARS e dos

antioxidantes: SOD, CAT, grupamento tióis, glutatonas), as amostras foram armazenadas no freezer a -80°C .

As amostras destinadas ao eritrograma foram processadas à medida que chegavam ao laboratório, não ultrapassando seis horas a partir do momento da colheita. Avaliou-se a contagem total de eritrócitos e a hemoglobina em equipamento semiautomático (BC 2800 VET, Mindray, Shenzhen). O volume globular (VG) foi obtido por meio de microcentrifugação pela técnica de microhematócrito⁽³⁰⁾.

A análise do TBARS nas amostras foi determinando de acordo com a metodologia proposta por Esterbauer e Cheeseman⁽³¹⁾. As avaliações de GSH-T e GSH-Px foram determinadas pelas técnicas descritas por Tietze⁽³²⁾ e Bayoumi e Rosalk⁽³³⁾, respectivamente. A atividade da SOD foi realizada segundo os procedimentos propostos por Beutler⁽³⁴⁾. A CAT foi estabelecida pelo método proposto por Aebi⁽³⁵⁾.

Os dados foram submetidos à estatística descritiva e posteriormente, foram analisados por análise de variância (ANOVA), empregando-se o teste de Tukey, por meio do software Statistical Analysis System (SAS v.9.3, Cary, North Carolina), com grau de significância de 5%.

Resultados

Os valores médios dos eritrócitos, da hemoglobina e do volume globular estão descritos na Tabela 1. Não

houve diferença da suplementação entre os grupos experimentais ($p < 0,05$). Os resultados referentes à quarta colheita foram descartados em virtude do equipamento não estar devidamente calibrado no dia da execução dos exames laboratoriais.

Na avaliação hematológica (eritrócitos, hemoglobina e VG) foram encontradas alterações numéricas nos parâmetros mensurados, porém essas alterações não produziram diferenças entre os diferentes tratamentos. As diferenças foram observadas somente dentro de cada grupo, entre os momentos experimentais. Na 2ª colheita, a contagem de eritrócitos em G4 apresentou menores resultados que G1 e G3 ($p < 0,05$). Na determinação de hemoglobina, nessa mesma colheita, houve variações significativas ($p < 0,05$) em que o maior valor encontrado foi em G3 e o menor em G4. O volume globular (%) não apresentou variações significativas ($p > 0,05$) no período experimental.

Na determinação de TBARS (Tabela 2) ao analisar as colheitas realizadas, verificou-se que houve interação grupos/tempo ($p < 0,05$), em que o G2 apresentou menores resultados em relação aos demais grupos 28, 56 e 105 dias. Foram identificadas diferenças ($p < 0,05$) entre as médias dos grupos avaliados, de modo que G3 apresentou a maior média de concentração de TBARS entre os tratamentos e o G2 a menor. As médias marginais entre as colheitas foram semelhantes ($p > 0,05$).

Tabela 1. Médias (\bar{X} = média em cada momento e Média = média geral considerando todos os momentos) de eritrócitos, hemoglobina e volume globular de bovinos da raça Nelore alimentados com feno *Brachiaria sp.* e suplementados com antioxidantes (G1- Grupo controle, G2- Grupo selênio e vitamina E, G3- Grupo zinco, G4- Grupo selênio e G5- Grupo vitamina E)

Colheitas	Eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$)		Hemoglobina (g/dL)		Volume globular (%)	
	\bar{X}	Média	\bar{X}	Média	\bar{X}	Média
G1	1º (Basal)	7,74		11,96		36,48
	2º	8,21 ^{A*}	7,81 ^a	11,95 ^{AB*}	11,37 ^a	39,24 ^{A*}
	3º	8,01 ^{A*}		10,99 ^{A*}		38,84 ^{A*}
	5º	7,27 ^{A*}		10,58 ^{A*}		36,15 ^{A*}
G2	1º (Basal)	7,33		11,78		35,09
	2º	7,44 ^{AB*}	7,35 ^a	11,06 ^{AB*}	11,05 ^a	36,68 ^{A*}
	3º	7,49 ^{A*}		10,61 ^{A*}		37,99 ^{A*}
	5º	7,12 ^{A*}		10,73 ^{A*}		36,91 ^{A*}
G3	1º (Basal)	7,51		11,74		35,98
	2º	8,42 ^{A*}	7,92 ^a	12,32 ^{A*}	11,44 ^a	40,95 ^{A*}
	3º	7,85 ^{A*}		10,74 ^{A*}		38,55 ^{A*}
	5º	7,58 ^{B*}		11,01 ^{B*}		38,60 ^{A*}
G4	1º (Basal)	7,45		11,65		34,95
	2º	7,33 ^{B*}	7,38 ^a	10,35 ^{B*}	10,68 ^a	34,41 ^{A*}
	3º	7,47 ^{A*}		10,24 ^{A*}		35,96 ^{A*}
	5º	7,26 ^{A*}		10,46 ^{A*}		36,38 ^{A*}
G5	1º (Basal)	8,09		12,45		36,28
	2º	7,91 ^{AB*}	7,84 ^a	11,06 ^{AB*}	11,42 ^a	36,66 ^{A*}
	3º	8,12 ^{A*}		11,05 ^{A*}		39,11 ^{A*}
	5º	7,56 ^{A*}		11,11 ^{A*}		37,80 ^{A*}
Média	7,66		11,19		37,15	
Probabilidade	0,471		0,528		0,215	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa entre grupos experimentais. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes com asterisco (*) nas colunas indicam diferença significativa entre os momentos experimentais dentro de cada grupo

Tabela 2. Médias da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nM/gHb) em eritrócitos de bovinos da raça Nelore alimentados com feno *Brachiaria sp.* e suplementados com antioxidantes (G1- Grupo controle, G2- Grupo selênio e vitamina E, G3- Grupo zinco, G4- Grupo selênio e G5- Grupo vitamina E)

Colheitas	G1	G2	G3	G4	G5	Média	Grupo	Tempo	Interação
1 (Dia 0)	22,38	19,98	23,58	21,13	21,72	21,76 ^a			
2 (28 dias)	21,18 ^{A*}	18,62 ^{B*}	22,88 ^{A*}	22,63 ^{A*}	21,90 ^{A*}	21,44 ^a			
3 (56 dias)	23,54 ^{A*}	18,93 ^{C*}	23,26 ^{A*}	20,55 ^{BC*}	22,23 ^{AB*}	21,70 ^a	<0,0001	0,1079	0,001
4 (84 dias)	21,44 ^{A*}	20,91 ^{A*}	22,68 ^{A*}	22,12 ^{A*}	22,38 ^{A*}	21,90 ^a			
5 (105 dias)	21,80 ^{B*}	21,45 ^{B*}	23,68 ^{A*}	22,23 ^{AB*}	22,69 ^{AB*}	22,37 ^a			
Média	21,99 ^B	19,98 ^C	23,12 ^A	21,88 ^B	22,30 ^{AB}				

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas indica diferença significativa entre grupos experimentais. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas indica diferença significativa entre colheita. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes com asterisco (*) nas linhas indicam diferença significativa entre grupos experimentais em função das colheitas

Na avaliação da atividade enzimática da GSH-T (Tabela 3), não foi observada interação em relação grupo/tempo ($p > 0,05$). Verificou-se diferença significativa entre as médias dos grupos ($p < 0,05$), sendo que o G5

apresentou o menor valor médio e o G1 o mais elevado. No entanto, entre as colheitas não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

Tabela 3. Médias de glutatona total ($\mu\text{M/gHb}$) em eritrócitos de bovinos da raça Nelore alimentados com feno *Brachiaria sp.* e suplementados com antioxidantes (G1- Grupo controle, G2- Grupo selênio e vitamina E, G3- Grupo zinco, G4- Grupo selênio e G5- Grupo vitamina E)

Colheitas	G1	G2	G3	G4	G5	Média	Grupo	Tempo	Interação
1 (Basal)	42,58	42,85	44,86	44,19	41,18	43,13 ^a			
2 (28 dias)	43,71 ^{A*}	42,63 ^{A*}	43,13 ^{A*}	42,04 ^{A*}	41,03 ^{A*}	42,51 ^a			
3 (56 dias)	45,26 ^{A*}	40,97 ^{A*}	46,09 ^{A*}	44,27 ^{A*}	40,45 ^{A*}	43,41 ^a	0,0112	0,4867	0,9196
4 (84 dias)	45,83 ^{A*}	42,01 ^{A*}	43,78 ^{A*}	45,48 ^{A*}	42,54 ^{A*}	43,93 ^a			
5 (105 dias)	43,62 ^{A*}	42,91 ^{A*}	42,81 ^{A*}	44,18 ^{A*}	39,05 ^{A*}	42,52 ^a			
Média	44,60 ^A	42,13 ^{AB}	43,95 ^{AB}	44,00 ^{AB}	40,77 ^B				

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas indica diferença significativa entre grupos experimentais. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas indica diferença significativa entre colheita. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes com asterisco (*) nas linhas indicam diferença significativa entre grupos experimentais em função das colheitas

Na determinação da atividade enzimática de GSH-Px houve interação em relação grupo/tempo ($p < 0,05$), com diferença significativa em todos os momentos de colheita. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais, sendo que o G3 apresentou o menor valor médio e o G2 os maiores (Tabela 4). Considerando os momentos de colheita, verificou-se as maiores médias no dia 56 e as menores aos 28 e 84 dias ($p < 0,05$), entretanto, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre o início e o fim do estudo.

Na mensuração da SOD foi observada interação em relação grupo/tempo ($p < 0,05$) nos valores médios, verificou-se diferença significativa entre os grupos experimentais 56, 84 e 105 dias (Tabela 5). Foram

identificadas diferenças ($p < 0,05$) entre os grupos avaliados, em que G3 apresentou o valor médio inferior aos dos demais tratamentos e que G1 e G4 apresentaram as médias mais elevadas. As médias marginais entre as colheitas foram semelhantes ($p > 0,05$).

A determinação da CAT apresentou interação em relação grupo/tempo ($p < 0,05$) nos grupos experimentais somente aos 84 e 105 dias (Tabela 6). Constatou-se, que no G3, o valor médio foi superior ($p < 0,05$) aos demais tratamentos, enquanto o G2 apresentou os menores valores ($p < 0,05$). As médias marginais entre as colheitas foram similares ($p > 0,05$).

Tabela 4. Médias de glutatona peroxidase (UI/gHb) em eritrócitos de bovinos da raça Nelore alimentados com feno *Brachiaria sp.* e suplementados com antioxidantes (G1- Grupo controle, G2- Grupo selênio e vitamina E, G3- Grupo zinco, G4- Grupo selênio e G5- Grupo vitamina E)

Colheitas	G1	G2	G3	G4	G5	Média	Grupo	Tempo	Interação
1 (Basal)	0,67	0,82	0,58	0,76	0,71	0,71 ^{ab}			
2 (28 dias)	0,66 ^{ABC*}	0,79 ^{A*}	0,53 ^{C*}	0,63 ^{BC*}	0,67 ^{AB*}	0,66 ^b			
3 (56 dias)	0,69 ^{AB*}	0,83 ^{A*}	0,61 ^{B*}	0,75 ^{AB*}	0,87 ^{A*}	0,75 ^a	<0,0001	0,0022	0,0352
4 (84 dias)	0,62 ^{B*}	0,86 ^{A*}	0,52 ^{B*}	0,67 ^{B*}	0,68 ^{B*}	0,67 ^b			
5 (105 dias)	0,72 ^{AB*}	0,82 ^{A*}	0,60 ^{B*}	0,70 ^{AB}	0,79 ^{A*}	0,73 ^{ab}			
Média	0,68 ^B	0,82 ^A	0,56 ^C	0,68 ^B	0,75 ^{AB}				

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas indica diferença significativa entre grupos experimentais. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas indica diferença significativa entre colheita. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes com asterisco (*) nas linhas indicam diferença significativa entre grupos experimentais em função das colheitas

Tabela 5. Médias de superóxido dismutase (UI/mgHb) em eritrócitos de bovinos da raça Nelore alimentados com feno *Brachiaria sp.* e submetidos a tratamento com diferentes antioxidantes (G1- Grupo controle, G2- Grupo selênio e vitamina E, G3- Grupo zinco, G4- Grupo selênio e G5- Grupo vitamina E)

Colheitas	G1	G2	G3	G4	G5	Média	Grupo	Tempo	Interação
1 (Basal)	276,38	280,38	267,25	264,5	265	270,70 ^a			
2 (28 dias)	278,12 ^{A*}	265,37 ^{A*}	253,87 ^{A*}	275,12 ^{A*}	266,62 ^{A*}	267,82 ^a			
3 (56 dias)	290,87 ^{A*}	279,87 ^{AB*}	255,00 ^{C*}	298,37 ^{A*}	266,00 ^{BC*}	278,02 ^a	<0,0001	0,0583	0,0125
4 (84 dias)	297,00 ^{A*}	274,87 ^{AB*}	246,75 ^{C*}	297,25 ^{A*}	268,50 ^{BC*}	276,87 ^a			
5 (105 dias)	284,50 ^{AB}	279,50 ^{AB*}	239,50 ^{C*}	304,00 ^{A*}	274,25 ^{B*}	276,35 ^a			
Média	287,63 ^A	274,90 ^B	248,78 ^C	293,69 ^A	268,84 ^B				

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas indica diferença significativa entre grupos experimentais. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas indica diferença significativa entre colheita. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes com asterisco (*) nas linhas indica diferença significativa entre grupos experimentais em função das colheitas

Tabela 6. Médias de catalase (UI/mgHb) em eritrócitos bovinos da raça Nelore alimentados com feno *Brachiaria sp.* e submetidos a tratamento com diferentes antioxidantes (G1- Grupo controle, G2- Grupo selênio e vitamina E, G3- Grupo zinco, G4- Grupo selênio e G5- Grupo vitamina E)

Colheitas	G1	G2	G3	G4	G5	Média	Grupo	Tempo	Interação
1 (Basal)	58,91	56,53	56,27	55,83	54,28	56,36 ^a			
2 (28 dias)	60,08 ^{A*}	54,87 ^{A*}	56,92 ^{A*}	59,28 ^{A*}	52,17 ^{A*}	56,66 ^a			
3 (56 dias)	59,78 ^{A*}	51,10 ^{A*}	59,36 ^{A*}	56,89 ^{A*}	56,84 ^{A*}	56,80 ^a	<0,0001	0,8829	0,0087
4 (84 dias)	54,32 ^{A*}	50,33 ^{A*}	68,73 ^{B*}	56,80 ^{A*}	58,95 ^{AB*}	57,82 ^a			
5 (105 dias)	53,13 ^{A*}	51,07 ^{A*}	66,88 ^{B*}	57,81 ^{A*}	56,33 ^{A*}	57,04 ^a			
Média	56,82 ^B	51,84 ^C	62,97 ^A	57,70 ^{AB}	56,07 ^{BC}				

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas indica diferença significativa entre grupos experimentais. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas indica diferença significativa entre colheita. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes com asterisco (*) nas linhas indica diferença significativa entre grupos experimentais em função das colheitas

Discussão

O perfil eritrocitário dos animais durante todo o experimento manteve-se dentro dos limites de referência⁽³⁶⁾. Em estudos anteriores, com bovinos alimentados com capim *Brachiaria sp.* observaram-se resultados similares ao perfil hematológico para a contagem de eritrócitos⁽³⁷⁾ e na concentração de hemoglobina para animais que receberam a suplementação na ração com selênio⁽⁹⁾ e com vitamina E⁽³⁸⁾. Entretanto,

resultados divergentes foram observados em trabalho⁽³⁹⁾ com a suplementação de diferentes fontes de selênio (orgânica e inorgânica) em dietas de vacas leiteiras, em que os valores médios de eritrócitos, hemoglobina e VG foram maiores aos obtidos no grupo controle. Ensaio de avaliação de lesão oxidativa eritrocitária⁽³⁷⁾ concluíram que, a associação de antioxidantes promove menos alterações eritrocitárias com benefícios potenciais do tratamento por meio da suplementação com

antioxidantes sobre os eritrócitos.

A elevação nos valores médios dos eritrócitos no G3 poderia ser explicada pela função que o zinco exerce na manutenção da integridade das membranas celulares dos eritrócitos⁽⁴⁰⁾. A ação desempenhada por esse microelemento favorece a associação das proteínas presentes na membrana com os demais componentes do citoesqueleto celular⁽⁴¹⁾, que por sua vez conferem a proteção antioxidante às membranas frente à oxidação de lipídeos e proteínas⁽⁴²⁾ e antagoniza possíveis efeitos deletérios por elementos iônicos⁽⁴³⁾.

A mensuração de TBARS nos eritrócitos ao longo do experimento evidenciou que durante as colheitas as médias dos animais não apresentaram diferença significativa. Porém, constatou-se diferença significativa entre os tratamentos propostos ($p < 0,05$). O malondialdeído (MDA) é um dos principais marcadores da peroxidação lipídica e por meio dele são mensuradas as TBARS. O acréscimo na concentração sanguínea desse marcador está relacionado ao aumento da peroxidação lipídica e dano oxidativo⁽⁴⁴⁾. Os animais que receberam a suplementação de selênio e vitamina E demonstraram maior estabilidade lipídica. Em experimento com suplementação isolada e associada de selênio e vitamina E em bovinos⁽⁴⁵⁾ verificou-se a melhoria no estado redox do sangue quando ocorreu a associação dos antioxidantes.

Os valores obtidos na mensuração de TBARS nos grupos suplementados, demonstraram resultados semelhantes aos observados em estudo com bovinos da raça Simental⁽⁴⁶⁾ com idade próxima a 20 meses alimentados com ração e volumoso. Ensaio sobre a influência de alguns antioxidantes (zinco e vitamina E, de forma isolada e associada) sobre a peroxidação lipídica no sangue de bovinos⁽⁴⁷⁾, observou-se que a associação dos antioxidantes ocasionou a obtenção de menores índices de lipoperoxidação. Porém, os resultados obtidos no presente estudo foram maiores aos encontrados na literatura em animais suplementados com antioxidantes ao se avaliar a lipoperoxidação em bovinos^(38,48-50). Este fato ocorreu provavelmente, pela utilização de diferentes metodologias e unidades de concentração que foram empregadas na mensuração do MDA como indicador de estresse oxidativo.

Cabe ressaltar também que a manutenção dos níveis de GSH-T deveu-se ao fato de que a glutatona em maior concentração na maioria das células, inclusive nos eritrócitos de mamíferos, está sob a forma reduzida (GSH). A depleção dos níveis de GSH pode ocorrer diretamente, por conjugação com radicais livres e, indiretamente por inibidores da sua síntese e regeneração⁽⁵¹⁻⁵²⁾.

Como o consumo de GSH provavelmente ocorreu apenas por sua propriedade antioxidante, a permanência de altas concentrações de GSH nos eritrócitos contribuiu

para a manutenção dos níveis de GSH-T. Aliado a isso, a manutenção dos valores de GSH-T pode ter ocorrido também em função do “aumento compensatório” na produção de GSH por outros órgãos, na tentativa de auxiliar o organismo a combater o aumento na produção das ERO⁽⁵³⁾. Essa geração excessiva de ERO pode aumentar o grau de peroxidação lipídica e danos celulares. Comportamento semelhante ao que ocorreu neste estudo foi relatado por outros autores⁽⁴⁵⁾, ao descreverem que a associação de selênio e vitamina E proporcionaram aos bovinos analisados um sinergismo entre o efeito dos antioxidantes administrados resultando em menor efeitos deletérios sobre as células eritrocitárias.

Ainda em relação à GSH, os resultados obtidos neste ensaio para a suplementação isolada de selênio e vitamina E foram menores aos encontrados em avaliação dos benefícios da suplementação de selênio em bovinos⁽⁹⁾ sobre a estabilidade da membrana dos eritrócitos. Em experimento para analisar os efeitos da adição de vitamina E em vacas em período de transição⁽³⁸⁾, encontraram resultados maiores e correlação negativa entre a atividade enzimática e o marcador de lipoperoxidação. Acredita-se que essa divergência ocorreu em virtude do sexo, da concentração de antioxidante fornecido e do estado fisiológico dos animais, além da metodologia empregada, com a utilização de reagentes comerciais diferentes dos empregados neste estudo.

As médias de SOD entre as colheitas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para os grupos analisados em função da variação na concentração de H_2O_2 provocada pela ação da SOD, indicando que houve ativação do ciclo redutor da glutatona, em que os grupos suplementados com selênio e vitamina E (G2), selênio (G4) e vitamina E (G5) apresentaram valores crescentes ao longo das colheitas. Pesquisadores ao trabalharem com mensurações de estresse oxidativo em bovinos⁽⁵⁴⁾, com dieta a base de feno, verificaram por meio da atividade de SOD e da CAT resultados similares ao deste estudo, o que demonstra que elevadas concentrações de H_2O_2 não produzem desequilíbrio com os antioxidantes. Em avaliação da influência de distúrbios metabólicos sobre o estresse oxidativo⁽⁵⁵⁾ verificaram que a inclusão de vitamina E não propiciou alterações em SOD e GSH-Px.

A avaliação da atividade enzimática da CAT promoveu elevação nas médias do grupo que recebeu a suplementação com zinco (G3) aos 84 e 105 dias. Essa enzima apresenta um papel importante na avaliação do estresse oxidativo, pois ela atua na neutralização do H_2O_2 em altas concentrações, formado por meio da dismutação do radical O_2^- promovida pela SOD. Entretanto, em baixas concentrações desse radical livre, a GSH atua exercendo a neutralização do H_2O_2 ⁽⁵¹⁾. Alguns autores⁽⁵⁶⁾

relatam a importância na determinação da inter-relação entre as atividades dessas enzimas para avaliar os mecanismos de defesa dos antioxidantes presentes no organismo. A mensuração da atividade das enzimas SOD, GSH-Px e CAT é comumente utilizada para avaliar a capacidade de defesa do organismo contra a ação das EROs⁽⁵⁷⁾. As observações de variações entre as colheitas para CAT foram análogas ao estudo para ruminantes⁽⁵⁰⁾, indicando que essa variação é provavelmente atribuída à condição de estresse.

A avaliação conjunta dos biomarcadores de estresse oxidativo avaliados neste estudo revela que os eritrócitos não sofreram peroxidação lipídica, o que foi confirmado principalmente pela não alteração dos valores de TBARS nas células eritrocitárias.

Conclusão

A suplementação, de bovinos da raça Nelore confinados e alimentados com feno de *Brachiaria sp*, contendo antioxidantes, de forma isolada (zinco, selênio e vitamina E) ou associada (selênio e vitamina E), não altera o estresse oxidativo nos eritrócitos.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não existir conflito de interesse.

Contribuições do autor

Curadoria dos dados: R. D. da S. Cunha, G. L. Costa, U. R. C. Pinto, J. J. S. Ferezin; *Análise formal:* R. D. da S. Cunha, P. H. J. da Cunha, M. C. S. Fioravanti; *Aquisição do financiamento:* M. C. S. Fioravanti; *Investigação:* R. D. da S. Cunha, G. L. Costa, U. R. C. Pinto, J. J. S. Ferezin; *Gerenciamento do projeto:* R. D. da S. Cunha, G. L. Costa; *Recursos:* P. H. J. da Cunha, M. C. S. Fioravanti; *Supervisão:* P. H. J. da Cunha, M. C. S. Fioravanti; *Validação:* R. D. da S. Cunha, J. J. S. Ferezin; *Visualização:* R. D. da S. Cunha, P. H. J. da Cunha, M. C. S. Fioravanti; *Redação (esboço original):* R. D. da S. Cunha, P. H. J. da Cunha, M. C. S. Fioravanti.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq) pelas concessões de financiamento ao projeto de pesquisa e a bolsa de doutorado.

Referências

1. CEPEA 2020 - CEPAE/USP. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Desenvolvido pela Universidade de São Paulo, 2020 [Internet]. Disponível em: <https://cepea.esalq.usp.br/br/releases/cepea-retrospectivas-de-2020.aspx>. Acesso em: 09 out 2021.
2. Seixas JN, Pinto CA, Rodrigues A, Tokarnia CH, França TN, Graça F.S, d'Ávila MS, Peixoto PV. Comparative study between *Brachiaria spp.* and *Pithomyces chartarum* poisoning in cattle. Rev. Bras. Med. Vet. 2016; 38(Supl.2):1-10. <https://rbmv.org/BJVM/article/view/192>
3. Sordillo LM. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. J. Dairy Sci. 2016; 99(6):4967-4982. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10354>.
4. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio: Brasil 2012/2013 a 2022/2023. Assessoria de Gestão Estratégica, 4ª ed., Brasília, 2013. 96 p.
5. Soares CO, Rosinha GMS. Segurança alimentar, sustentabilidade e produção de proteína de origem animal. In: Vilela, E. F.; Callegaro, G. M.; Fernandes, G. W. Coord. Biomass e agricultura: oportunidades e desafios. Rio de Janeiro: Vertente edições, 2019. p.149-162.
6. Clayton MJ, Davis TZ, Knoppel EL, Stegelmeier BL. Hepatotoxic Plants that Poison Livestock. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 2020; 36(3):715-723. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.08.003>.
7. Motta AC, Riet-Correa Rivero G, Schild AL, Riet-Correa F, Méndez MC, Ferreira JL. Fotossensibilização hepatogena em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. Ciênc. Rural. 2000; 30(1):143-149. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782000000100023>.
8. Macedo MF, Bezerra MB, Soto Blanco B. Fotossensibilização em animais de produção na região semi-árida do Rio Grande do Norte. Arq. Inst. Biol. 2006; 73(2):251-254. <https://www.researchgate.net/publication/242143971>.
9. Vivanco RHC, Menge FGW, Barriga PAC. Variations of the erythrocyte osmotic fragility in cattle grazing on pastures with low selenium content with or without supplement with selenium. Rev. Cient. 2006; 16(3):227-231. <https://www.researchgate.net/publication/286828714>.
10. Cruz C, Driemeier D, Pires VS, Schenkel EP. Experimentally induced cholangiopathy by dosing sheep with fractionated extracts from *Brachiaria decumbens*. J. Vet. Diagn. Invest. 2001; 13(2):170-172. <http://doi.org/10.1177/104063870101300215>.
11. Brum KB, Haraguchi M, Garutti MB, Nóbrega FN, Rosa B, Fioravanti MCS. Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at different developmental stages. Ciênc. Rural. 2009; 39(1):279-281. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008005000034>.
12. Miles CO, Munday SC, Holland PT, Smith BL, Embling PP, Wilkins AL. Identification of a saponin glucuronide in the bile of sheep affected by *Panicum dichotomiflorum* toxicosis. N Z Vet J. 1991; 39(4):150-152. <http://doi.org/10.1080/00480169.1991.35684>.
13. Santos JCA, Riet-Correa F, Simiões SV, Barros CSL. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e equinos no Brasil. Pesqui. Vet. Bras. 2008; 28(1):1-14. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2008000100001>.
14. Sies H. 2019. Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. In: Fink G. (Ed.) Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology, Handbook of Stress Series, London: Academic Press, Vol. 3, Chapter 13, p.153-163. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8>.
15. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol. Rev. 2002; 82(1):47-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
16. Brezezinska-Slebodziska E. Species differences in the susceptibility of erythrocytes exposed to free radicals in vitro. Vet. Res. Comm. 2003; 27(3):211-217. <https://doi.org/10.1023/a:1023344607691>.
17. Oliveira S, Saldanha C. An overview about erythrocyte membrane. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2010; 44(1):63-74. <https://doi.org/10.3233/CH-2010-1253>.
18. Pandey KB, Rizvi SI. Biomarkers of oxidative stress in red

- blood cells. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub. 2011; 155(2):131-136. <https://doi.org/10.5507/bp.2011.027>.
19. Florin-Christensen J, Suarez CE, Florin-Christensen M, Wainszelbaum M, Brown WC, Mcelwain TF, Palmer GH. A unique phospholipid organization in bovine erythrocyte membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98(14):7736-7741. <https://doi.org/10.1073/pnas.131580998>.
20. Caldin M, Carli E, Furlanello T, Solano-Gallego L, Tasca S, Patron C, Lubas G. A retrospective study of 60 cases of eccentrocytosis in the dog. Vet. Clin. Pathol. 2005; 34(3):224-231. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2005.tb00045.x>.
21. Tang X, Xia Z, Yu J. An experimental study of hemolysis induced by onion (*Allium cepa*) poisoning in dogs. J. Vet. Pharmacol. Ther. 2008; 31(2):143-149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00930.x>.
22. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. Rev. Nutr. 2010; 23(4):629-643. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
23. Cimen MY. Free radical metabolism in human erythrocytes. Clin. Chim. Acta. 2008; 390(1-2):1-11. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.12.025>.
24. Todovora I, Simeonova G, Kyuchukova D, Dinev D, Gadjeva V. Reference values of oxidative stress parameters (MDA, SOD, CAT) in dogs and cats. Comp. Clin. Pathol. 2005; 13(4):190-194. <https://doi.org/10.1007/s00580-005-0547-5>.
25. Machado LP, Watanabe MJ, Kohayagawa A, Saito ME, Da Silveira VF, Yonezawa LA. Malondialdeído eritrocitário como índice de estresse oxidativo em equinos da raça Árabe. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2007; 29:237. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000094>.
26. Ciampi F, Sordillo LM, Gandy JC, Caroprese M, Sevi A, Albenzio M, Santillo A. Evaluation of natural plant extracts as antioxidants in a bovine in vitro model of oxidative stress. J. Dairy Sci. 2020; 103(10):8938-8947. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18182>.
27. Spears JW, Weiss WP. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. Vet J. 2008; 176(1):70-76. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.015>.
28. Mattioli GA, Rosa DE, Turic E, Picco SJ, Raggio SJ, Minerino AHH, Fazio LE. Effects of Parenteral Supplementation with Minerals and Vitamins on Oxidative Stress and Humoral Immune Response of Weaning Calves. Animals (Basel). 2020; 10(8):1298. <https://doi.org/10.3390/ani10081298>.
29. NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of beef cattle. 7.ed. Washington: National Academy Press, 1996. 242p.
30. Jain NC. Essentials of veterinary hematology. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 407p.
31. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol. 1990; 186:407-21. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-h).
32. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. Anal. Biochem. 1969; 27(3):502-22. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(69\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(69)90064-5).
33. Bayoumi RA, Rosalki SB. Evaluation of methods of coenzyme activation of erythrocyte enzymes for detection of deficiency of vitamins B1, B2, and B6. Clin. Chem. 1976; 22(3):327-335.
34. Beutler E. Superoxide dismutase. In: Beutler E (Editor), Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. Philadelphia: Grune & Stratton, 1984. p.83-85.
35. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984; 105:121-126. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)05016-3).
36. Fagliari JJ, Santana AE, Lucas FA, Campos Filho E, Curi PR. Constituintes sanguíneos de bovinos lactantes, desmamados e adultos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*), e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 1998; 50(3):263-271. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/38249>.
37. Machado LP, Kohayagawa A, Saito ME, Da Silveira VF, Yonezawa LA. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na Medicina Veterinária. Rev. Ciênc. Agrovet. 2009; 8(1):84-94. <https://www.revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/5317/3523>
38. Sharma N, Singh NK, Singh OP, Pandey V, Verma PK. Oxidative stress and antioxidant status during transition period in dairy cows. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2011; 24(4):479-484. <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10220>.
39. Calamari L, Petrera F, Abeni F, Bertin G. Metabolic and hematological profiles in heat stressed lactating dairy cows fed diets supplemented with different selenium sources and doses. Livest. Sci. 2011; 142(1-3):128-137. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.07.005>.
40. Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. Rev. Nutr. 2003; 16(4):433-441. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732003000400007>.
41. Bian X, Teng T, Zhao H, Qin J, Qiao Z, Sun Y, Liun Z, Xu Z. Zinc prevents mitochondrial superoxide generation by inducing mitophagy in the setting of hypoxia/reoxygenation in cardiac cells. Free Radic. Res. 2018; 52(1):80-91. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1414949>.
42. Kloubert V, Rink L. Zinc as a micronutrient and its preventive role of oxidative damage in cells. Food Funct. 2015;6(10):3195-3204. <https://doi.org/10.1039/c5fo00630a>.
43. Oteiza PI. Zinc and the modulation of redox homeostasis. Free Radic. Biol. Med. 2012; 53(9):1748-1759. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.08.568>.
44. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1990; 186:421-431. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-i](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-i).
45. Liu ZL, Yang P, Chen P, Dong WX, Wang DM. Supplementation with selenium and vitamin E improves milk fat depression in a fatty acid composition in dairy cows fed fat diet. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2008; 21(6): 38-844. <https://doi.org/10.5713/ajas.2008.70618>.
46. Križanović D, Sušić V, Božić P, Štoković I, Ekert-Kabalin A. Changes of bovine blood lipid peroxides and some antioxidants in the course of growth. Veterinarski Arhiv. 2008; 78(4):269-278. <https://hrcak.srce.hr/26534>.
47. Chandra G, Aggarwal A, Singh K, Kumar M, Upadhyay RC. Effect of vitamin E and zinc supplementation on energy metabolites, lipid peroxidation, and milk production in peripartum sahiwal cows. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2013; 26(11):1569-1576. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12682>.
48. Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. Vet J. 2005; 169(2):286-292. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.02.001>.

49. Castillo C, Hernandez J, Valverde I, Pereira V. Plasma malonaldehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 2006; 80(2):133-139. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.06.003>.
50. Kumar A, Gyanendra Singh BV, Meur SK. Modulation of antioxidant status and lipid peroxidation in erythrocyte by dietary supplementation during heat stress in buffaloes. *Livest. Sci.* 2011; 138(1-3):299-303. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.12.021>.
51. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press, 2007, 543p.
52. Ma X, Deng D, Chen W. Inhibitors and Activators of SOD, GSH-Px, and CAT. In: Murat Senturk. *Enzyme inhibitors and activators*. 1st ed. Croatia: IntechOpen; 2017. Chapter 9. <https://doi.org/10.5772/65936>.
53. Machefer G, Groussard C, Ranou-Bekono F, Zouhal H, Faure H, Vicent S, Cillard J, Gratas-Delamarche A. Extreme running competition decrease blood antioxidant defense capacity. *J. Am. Coll. Nutr.* 2004; 23(4):358-364. <https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719379>.
54. Abd Ellah MR, Okada K, Goryo M, Oishi A, Yasuda J. Superoxide dismutase activity as a measure of hepatic oxidative stress in cattle following ethionine administration. *Vet. J.* 2009; 182(2):336-341. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.05.013>.
55. Dobbelaar P, Bouwstra RJ, Goselink RMA, Jorritsma R, Van Den Borne JJGC, Jansen EHJM. Effects of vitamin e supplementation on and the association of body condition score with changes in peroxidative biomarkers and antioxidants around calving in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 2010; 93(7):3103-3113. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2677>.
56. Felton GW, Summers CB. Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 1995; 29(2):187-197. <https://doi.org/10.1002/arch.940290208>.
57. Linke A, Adams V, Schulze PC, Erbs S, Gielen S, Fiehn E. Antioxidative effects of exercise training patients with chronic heart failure increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation.* 2005; 111(14):1763-1770. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000165503.08661.E5>.