

Aplicação de antioxidantes naturais na reprodução animal

Application of natural antioxidants in animal reproduction

Camila da Silva Castro¹ , Carlos Filipe Camilo Cotrim¹ , Igor Romeiro dos Santos¹ , Klayto José Gonçalves dos Santos¹ , Joelma Abadia Marciano de Paula¹ , Samantha Salomão Caramori¹ , Luciane Madureira de Almeida¹ , Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão¹ , Leonardo Luiz Borges^{*1,2} 

¹Universidade Estadual de Goiás (UEG), Anápolis, Goiás, Brasil.

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

*correspondente: leonardo.borges@ueg.br

Resumo

Antioxidantes são substâncias naturais ou sintéticas que facilitam o retardo da oxidação por um ou mais mecanismos, como sequestrar radicais livres, inibir a peroxidação lipídica e complexar com metais, inibindo a destruição tecidual via oxidação. Antioxidantes são comumente usados na alimentação animal e na indústria alimentícia para prevenir a oxidação de produtos de origem animal. Além disso, os oxidantes naturais estão sendo cada vez mais aplicados na reprodução animal, principalmente na preservação do sêmen. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo revisar a aplicação de antioxidantes naturais na reprodução animal. Observamos que os antioxidantes naturais foram geralmente adquiridos comercialmente (80,4%) e utilizados principalmente no resfriamento/congelamento de sêmen (72%) com resultados promissores (90%) em *Sus scrofa* (javali), *Capra aegagrus hircus* (cabra), *Gallus gallus domesticus* (galo) e *Ovis aries* (carneiro). No entanto, mais estudos devem ser realizados para ajudar a regular a dosagem de antioxidantes naturais para sua aplicação.

Palavras-chave: criopreservação; radicais livres; peroxidação lipídica; estresse oxidativo; vitamina E.

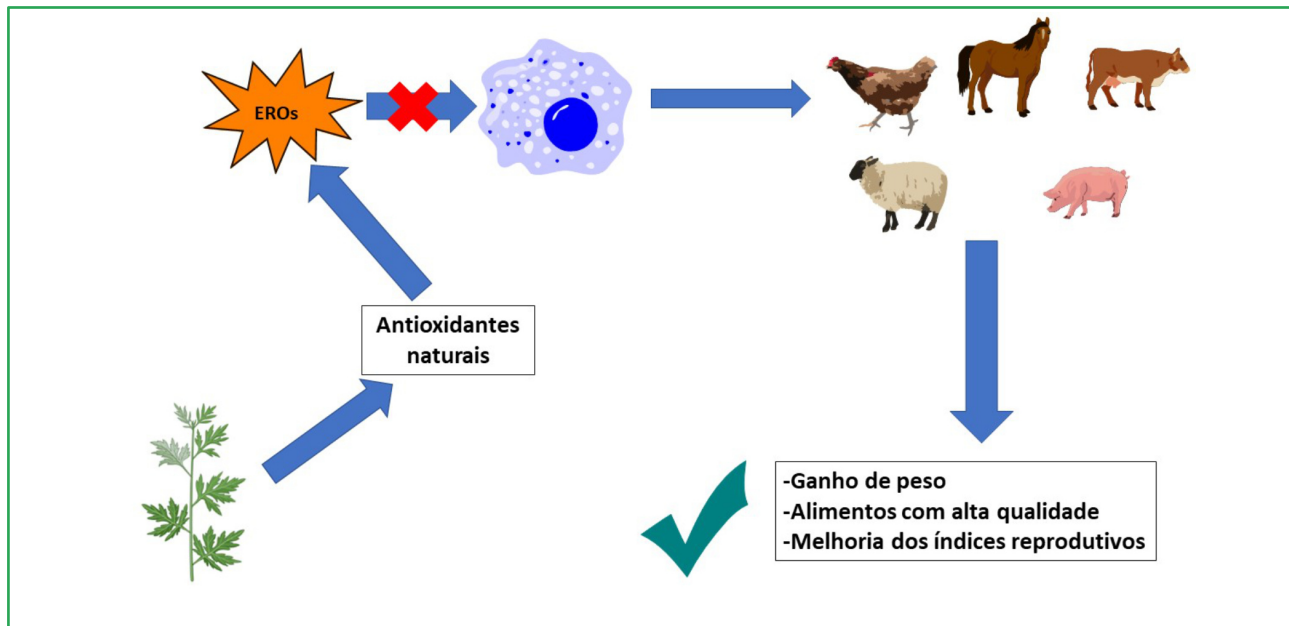
Abstract

Antioxidants are natural or synthetic substances that delay oxidation through one or more mechanisms, such as scavenging free radicals, inhibiting lipid peroxidation, and complexing with metals, inhibiting tissue destruction via oxidation. Antioxidants are commonly used in animal feed and the food industry to prevent the oxidation of animal-origin products. Moreover, natural oxidants are used increasingly in animal reproduction, especially for semen preservation. In this context, this study aimed to review the applications of natural antioxidants in animal reproduction. We observed that the bulk of the natural antioxidants, approximately 80.4%, were commercially acquired and used mainly for semen cooling/freezing (72%) with promising results (90%) in *Sus scrofa* (boar), *Capra aegagrus hircus* (goat), *Gallus gallus domesticus* (rooster), and *Ovis aries* (ram). However, further studies are needed to help determine the appropriate dosage of natural antioxidants for applications.

Keywords: cryopreservation; free radicals; lipid peroxidation; oxidative stress; vitamin E.

Recebido: 8 de junho de 2022. Aceito: 4 de outubro de 2022. Publicado: 4 de novembro de 2022.





Resumo gráfico: Aplicação de antioxidantes naturais na reprodução animal

Introdução

Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados ⁽¹⁾ e são gerados durante processos biológicos engendrados por compostos endógenos ou pelo metabolismo de compostos exógenos. As espécies de radicais livres são produzidas principalmente no citoplasma, mitocôndrias e membranas celulares, e seus alvos celulares, ou seja, proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, estão relacionados ao local de sua formação ⁽²⁾. Durante um estado fisiológico normal, uma produção moderada de espécies reativas de oxigênio (ERO) é parte integrante do metabolismo. As EROs são produzidas durante processos fisiológicos envolvidos na produção de energia, crescimento celular, fagocitose, sinalização intracelular e síntese de substâncias essenciais, como hormônios e enzimas ^(3,4).

Em resposta à produção de EROs e seus potenciais efeitos adversos, os organismos desenvolveram sistemas antioxidantes. No entanto, em situações de desequilíbrio, comprometendo os sistemas de defesa antioxidante, o excesso de ERO gerado causa estresse oxidativo em diversas estruturas celulares ^(5,6), e o processo é dividido em três fases: síndrome geral de adaptação, resistência e exaustão. A princípio, há um alerta rápido do sistema quando um organismo tenta se adaptar e recuperar a homeostase celular das EROs. A ausência dessa recuperação causada pela duração ou intensidade do estresse leva à exaustão, comprometendo a saúde e a vida do organismo ⁽⁷⁾.

O sistema de defesa antioxidante natural do corpo

reduz parcialmente o estresse oxidativo através da ação de enzimas, incluindo superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase ⁽⁸⁾, que estão envolvidas na remoção de oxigênio e peróxido de hidrogênio ⁽⁹⁾. Além disso, a ingestão de compostos bioativos com propriedades antioxidantes pode estabilizar os radicais livres, gerando competição pelos sítios ativos e receptores de várias estruturas celulares e modula a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas na defesa contra processos oxidativos e degenerativos em tais sistemas celulares ⁽¹⁰⁾. Esses compostos bioativos podem ser nutrientes essenciais para as funções do corpo, assim como não nutrientes não essenciais para o funcionamento regular do corpo, mas capazes de melhorar a saúde por meio de papéis ativos e protetores ⁽¹¹⁾.

Geralmente, os antioxidantes são classificados como nutrientes, sequestrantes de oxigênio, antioxidantes biológicos, agentes quelantes ou antioxidantes mistos. Os nutrientes antioxidantes são compostos fenólicos que removem ou inativam os radicais livres formados durante as reações metabólicas. Os captadores de oxigênio capturam O_2 do meio, tornando-o indisponível para autooxidação. Antioxidantes biológicos são enzimas, como a glicose oxidase, que removem oxigênio ou compostos reativos de alimentos prontos para o consumo. Os agentes quelantes atuam na complexação de íons metálicos, catalisando assim a oxidação lipídica. Finalmente, antioxidantes mistos compreendem compostos derivados de animais e plantas, como flavonóides e proteínas hidrolisadas ^(12,13).

Antioxidantes fitoquímicos

A maioria dos antioxidantes naturais são derivados de plantas. Esses fitoquímicos são não nutrientes ativos que, ao entrarem na célula, inativam os radicais livres, gerando sinais químicos ou eletrofilicos de estresse, regulando, por sua vez, inúmeras vias de sinalização celular⁽¹⁹⁾. Os polifenóis são o principal grupo de compostos responsáveis pelas atividades antioxidantes nas plantas. Além de desempenhar um papel na pigmentação, fotoproteção e defesa contra microrganismos e insetos, os polifenóis inibem a produção de radicais livres, proliferação celular e inflamação e modulam a atividade de enzimas específicas nas plantas⁽²⁰⁾. Dentre os compostos fenólicos, podemos citar: ácidos fenólicos, lignanas, estilbenos, por exemplo, resveratrol e flavonoides, ou seja, flavonas, flavanonas, catequinas e antocianinas. A distribuição e quantidade desses compostos variam entre as plantas, influenciando na capacidade antioxidante de cada espécie^(21,22).

A atividade antioxidante de compostos naturais derivados de plantas é tão alta quanto a atividade de antioxidantes sintéticos, tornando esses produtos atrativos para as indústrias, principalmente devido à crescente demanda dos consumidores por ingredientes naturais⁽²³⁾. A extração de antioxidantes usando solventes de diferentes polaridades é necessária para isolar e identificar os compostos antioxidantes em fontes naturais, como frutas, sementes e especiarias. No entanto, antes de iniciar o processo de extração, são necessários alguns passos preliminares para facilitar o processo e preservar as propriedades dos compostos antioxidantes, que são altamente sensíveis à ação da luz, oxigênio e calor⁽²⁴⁾. Assim, os vegetais são geralmente desidratados, liofilizados ou congelados, posteriormente moídos e tamisados antes da extração para aumentar a exposição das superfícies de contato do substrato ao solvente extrator e para inativar as enzimas lipoxigenase e polifenol oxidase, que oxidam compostos fenólicos. Essas enzimas estão naturalmente presentes nas plantas e são responsáveis pelo ranço oxidativo enzimático⁽²⁵⁾.

O teor de antioxidantes em amostras derivadas de plantas é determinado em misturas complexas ou compostos isolados para bioprospecção ou para confirmação e quantificação da eficiência dos métodos extrativos. As medições da atividade antioxidante podem ser realizadas de várias maneiras⁽¹⁷⁾, sendo a mais simples a medição do teor de fenóis totais, que quantifica todos os fenóis da amostra. Uma curva padrão é traçada usando um composto fenólico conhecido, como por exemplo, ácido gálico, para analisar o teor total de fenóis. Assim, o resultado é expresso em unidades do composto fenólico utilizado, por exemplo, em equivalentes de ácido gálico. No entanto, a análise

não é a mais representativa, pois vários compostos fenólicos possuem uma função pró-oxidante e não antioxidante. Também existem métodos para determinar o teor total de antocianinas e flavonoides em amostras de espécies vegetais. Além disso, existem técnicas cromatográficas são usadas para identificar e quantificar compostos antioxidantes específicos⁽²⁶⁾.

Vários métodos analíticos têm sido utilizados para determinar as atividades antioxidantes em extratos vegetais ou compostos isolados com base em diferentes reações redox. Assim, os resultados desses vários métodos não podem ser comparados diretamente⁽¹⁷⁾. Ensaio *in vitro* determinam a capacidade de antioxidantes de plantas de eliminar radicais livres gerados no meio de reação, espécies de radicais estáveis induzidas por antioxidantes ou radicais de oxigênio gerados por processos enzimáticos⁽²¹⁾.

Entre os métodos espectrofotométricos mais conhecidos para determinar a capacidade antioxidante de substâncias derivadas de plantas estão o poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), a capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), o sal de diamônio sequestrante de cátions 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina Ensaio de eliminação de radicais de ácido -6-sulfônico (ABTS) e 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Este último é o método mais utilizado, adequado para análise de antioxidantes solúveis em meio orgânico e amplamente aplicado na avaliação da atividade antioxidante em frutas.^(27,28)

O método FRAP é baseado na medição direta da capacidade dos antioxidantes em reduzir o complexo Fe³⁺/tripiridiltriázina. Pulido et al.⁽²⁹⁾ descreveram o método FRAP como uma alternativa para determinar a redução do teor de ferro nas soluções aquosas de compostos puros e fluidos biológicos^(21,30).

O método ORAC detecta danos químicos à beta- ou R-ficoeritrina, proteínas que funcionam como componentes de captação de luz. A diminuição da fluorescência causada por espécies reativas na presença de radicais livres atua como um índice de dano oxidativo às proteínas⁽²¹⁾.

O método ABTS mede a capacidade dos antioxidantes de inativar os cátions ABTS gerados por meio de reações químicas, eletroquímicas ou enzimáticas, permitindo a medição das atividades antioxidantes de compostos hidrofílicos e lipofílicos. A eliminação do cátion causa uma diminuição na absorbância, que é calculada na mistura radical/antioxidante em tempos diferentes. Uma curva de calibração é gerada usando o antioxidante Trolox, e o resultado é expresso em termos de Trolox equivalente^(21,31).

No método DPPH, baseado na eliminação do radical livre DPPH, esta espécie atua como substrato

oxidável reduzido por um antioxidante e como indicador da resposta antioxidante. O DPPH é um radical instável de cor violeta que recebe um elétron ou um radical de hidrogênio para se tornar uma molécula estável e muda a coloração para amarelo quando reduzido. Assim, o ensaio avalia apenas o poder redutor do antioxidante, oxidado na doação de um elétron, e não detecta substâncias pró-oxidantes^(32,33).

Vários estudos comparativos estimaram a atividade antioxidante total em extratos vegetais usando os métodos ABTS, DPPH, FRAP e ORAC. Thaipong et al. (34) utilizaram extratos de *Psidium guajava* (goiaba) e observaram que o FRAP foi a técnica mais reprodutível para determinação da atividade antioxidante, apresentando alta correlação com os níveis de ácido ascórbico e grupos fenólicos. Ou et al. (35) mediram as propriedades antioxidantes de amostras vegetais liofilizadas, concluindo que o método ORAC é quimicamente mais apropriado para determinar a atividade antioxidante de quebra de cadeia, enquanto o FRAP apresenta algumas desvantagens, como interferência, cinética de reação e técnicas de quantificação. Além disso, Duarte-Almeida et al. (32) concluíram que as frutas frescas de acerola possuem a maior capacidade de sequestrar os radicais livres DPPH em comparação com os extratos de amora, açaí e morango, em grande parte devido ao alto teor de ácido ascórbico presente nos frutos, demonstrando assim a capacidade antioxidante do ácido ascórbico.

Os antioxidantes têm um papel essencial na prevenção de doenças decorrentes do estresse oxidativo⁽¹⁴⁾. Assim, a busca por substâncias de origem natural com propriedades antioxidantes e menos efeitos colaterais que os antioxidantes sintéticos⁽¹⁵⁾ tem crescido nos últimos anos, principalmente por sua importância econômica e clínica e pela crescente valorização dos produtos naturais⁽¹⁶⁾. Ao longo dos anos, o interesse científico pelos extratos vegetais aumentou devido às grandes quantidades de substâncias naturais biologicamente ativas com potencial antioxidante que foram isoladas e caracterizadas^(17,18). Os antioxidantes naturais mais conhecidos são as vitaminas C e E, carotenoides e flavonoides como quercetina, rutina, hesperidina, naringina, naringenina e sakuranetina⁽¹⁴⁾. Assim, esta revisão destaca a aplicação de antioxidantes naturais na reprodução animal, considerando a evolução das publicações na literatura científica mundial nas últimas três décadas.

Material e métodos

A revisão de literatura foi realizada entre agosto e setembro de 2022 e teve como foco recuperar artigos científicos sobre antioxidantes naturais aplicados à reprodução animal. A base de dados Science Direct foi

pesquisada usando os seguintes termos de pesquisa e operadores booleanos: "natural antioxidant" AND "animal reproduction" incluídos no título, resumo e palavras-chave em artigos publicados entre 1991 e 2022. Apenas artigos de pesquisa foram considerados nesta revisão. Nesse sentido, dos 93 artigos obtidos na triagem inicial, 51 foram analisados.

Análise de dados

A análise de correlação de Spearman foi utilizada para avaliar se houve aumento de publicações ao longo dos anos (foi considerado um nível de significância de 5%). O teste de Pettit foi utilizado para verificar o ano a partir do qual os artigos de pesquisa começaram a se tornar mais frequentes e aumentaram em número. Foi elaborada uma nuvem de palavras utilizando as palavras-chave dos artigos para demonstrar o foco dos mesmos. As análises foram realizadas nos softwares R, versão 3.6.1, e RStudio, versão 1.2.1335. Os resultados da análise da distribuição dos artigos por país foram representados em um mapa criado no QGIS, versão 3.4. Os gráficos foram gerados usando o programa GraphPad Prism, versão 9.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA, www.graphpad.com). As figuras foram criadas no Adobe Illustrator, versão 24.0.1 (www.adobe.com/products/illustrator).

Aplicação de antioxidantes naturais na reprodução animal

Tendências de publicação

As tendências de publicação temporal sobre o uso de antioxidantes naturais na reprodução animal aumentaram significativamente desde 1991 (coeficiente de correlação de Spearman, $r_s = 0,74$; $p < 0,0001$), com uma taxa anual de 2,3% (Fig. 1). O número de citações também aumentou ao longo dos anos (Fig. 1). As mudanças nas tendências de publicação dividiram a série histórica em dois períodos (teste de Pettit, $p < 0,001$). De 1991 a 2009, houveram poucas publicações, com uma média de 9,8% dos artigos publicados representando o estágio inicial da aplicação de antioxidantes naturais na reprodução animal. De 2010 a 2022, foram publicados em média 90,2% dos artigos, representando o período de crescimento (Fig. 1). O crescente número de publicações pode resultar de um aumento nos movimentos de química verde neste século também refletidos na ciência animal. A química verde envolve projetar e desenvolver produtos químicos e implementar políticas e processos para reduzir ou eliminar o uso ou geração de substâncias nocivas^(36, 37).

Em relação à distribuição mundial das publicações, 22 países estudaram o uso de antioxidantes naturais para reprodução animal (Fig. 3). A China apresentou o maior número de publicações (15,7%), seguida pelo Brasil (9,8%) e Índia (9,8%). China e Índia têm tradição no uso de plantas medicinais, ganhando aceitação de inúmeras pessoas ^(38, 39), e assim, os fitoquímicos são amplamente aceitos pela comunidade, e as investigações de outras aplicações destes moléculas tendem a ser maiores que de outros países. O Brasil possui alta biodiversidade e foco econômico na agricultura. O desafio é aproximar o setor agrícola da agenda da biodiversidade, fazendo uma aliança

significativa ⁽⁴⁰⁾. Em busca da sustentabilidade, o governo brasileiro criou o Programa Nacional de Bioinsumos em 2020 para incentivar novos padrões de produção ou consumo. Bioinsumos são produtos, processos ou tecnologias de origem animal, vegetal ou microbiana que podem afetar positivamente a produção agrícola. A adesão dos produtores rurais a práticas agrícolas sustentáveis e econômicas que utilizam bioinsumos está crescendo no Brasil ⁽⁴¹⁾. Portanto, no futuro, espera-se que o número de estudos investigando a utilidade de antioxidantes naturais para a preservação do sêmen animal aumente no Brasil.

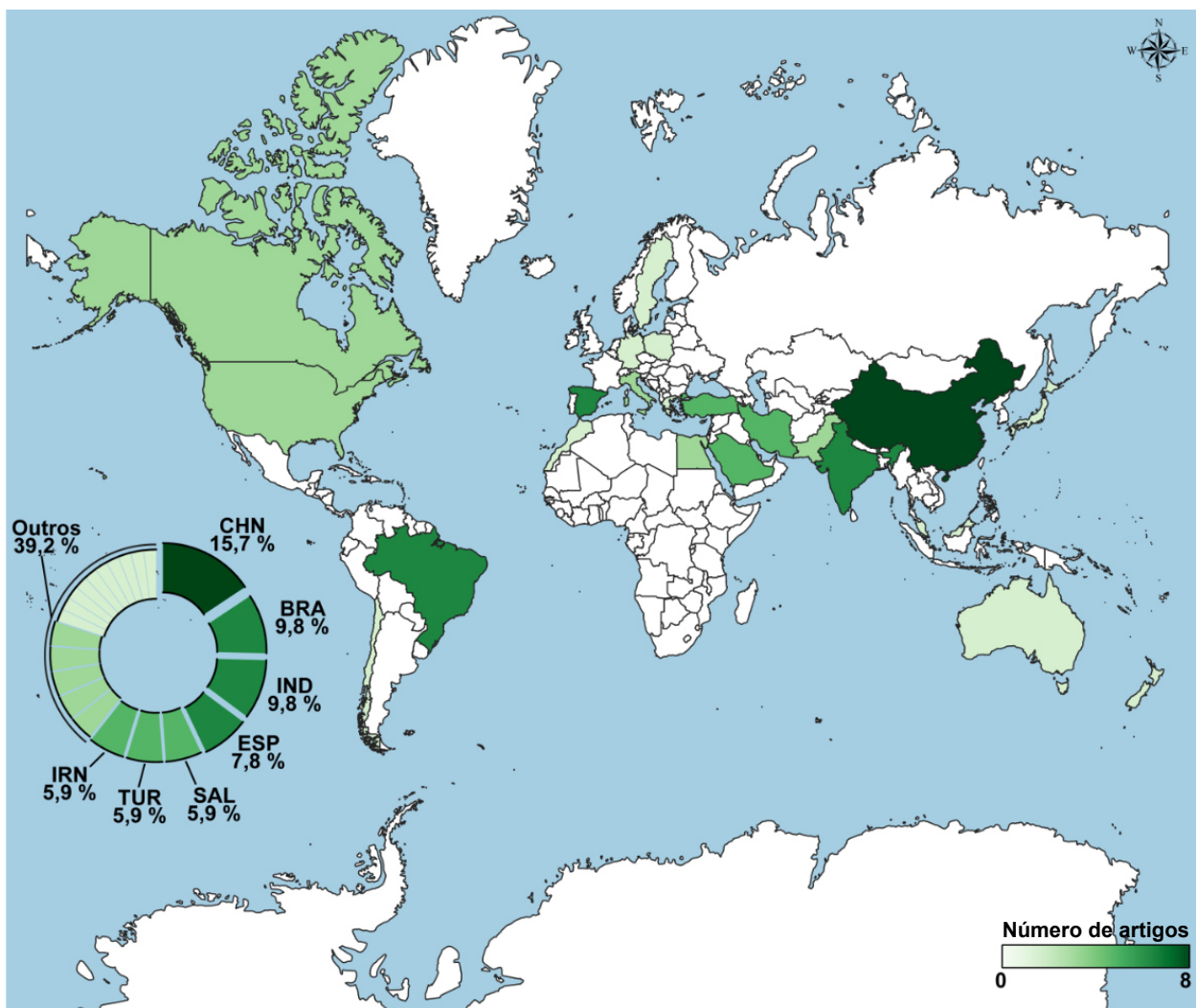


Figura 3. Distribuição mundial de estudos realizados sobre antioxidantes naturais na reprodução animal. A distribuição geográfica dos artigos publicados está relacionada à cor de cada país, proporcional ao número de publicações.

A promissora aplicação de antioxidantes naturais na reprodução animal

O estresse oxidativo tem sido proposto como uma das principais causas de infertilidade em animais porque pode danificar gravemente o esperma e reduzir a qualidade do sêmen criopreservado (42). A membrana plasmática do espermatozóide é composta por 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios, o que torna o espermatozóide suscetível a danos causados pela peroxidação lipídica, e a vulnerabilidade aumenta ainda mais no congelamento devido a alterações na integridade da membrana que diminuem a motilidade do esperma e sua capacidade de fertilizar (43).

A criopreservação tem efeitos adversos nas células espermáticas, sendo um importante deles as alterações

irreversíveis na motilidade espermática e nos componentes da membrana devido a mudanças drásticas de temperatura (curva de resfriamento/congelamento) e osmolaridade. Além disso, o processo de congelamento-descongelamento induz estresse oxidativo e aumenta a produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (44).

A adição de oxidantes naturais durante o processo de criopreservação melhorou a qualidade do sêmen e aumentou a proteção da membrana plasmática, reduzindo os danos induzidos pelo congelamento (Tabela Complementar 1). Os antioxidantes naturais foram geralmente adquiridos comercialmente (80,4%) e utilizados principalmente para resfriamento/congelamento de sêmen (72%), com resultados promissores (90%) em *Sus scrofa* (javali), *Capra aegagrus hircus* (cabra), *Gallus gallus domesticus* (galo), e *Ovis aries* (carneiro) (Fig. 4).

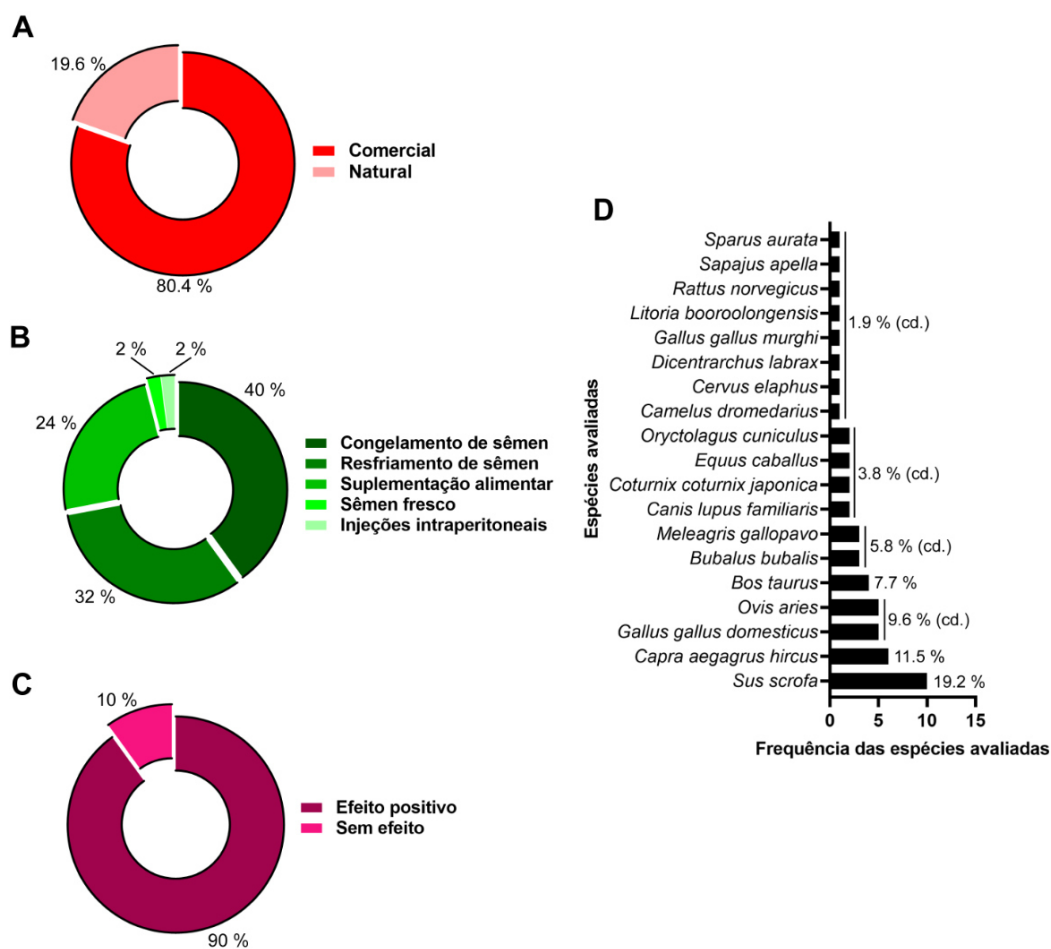


Figura 4. A promissora aplicação de antioxidantes naturais na reprodução animal. A) A origem dos antioxidantes naturais (comerciais ou recentemente extraídos de fonte natural). B) As áreas de reprodução animal onde os oxidantes naturais foram aplicados. C) Os resultados obtidos com a pesquisa foram geralmente positivos. D) Frequências relativas da aplicação de antioxidantes na reprodução das várias espécies animais avaliadas.

Conclusão

Como os antioxidantes naturais não prejudicam os animais e subprodutos animais devido à sua solubilidade em diferentes meios e não são ecotóxicos, contribuindo para os princípios da química verde, seu uso está aumentando em todo o mundo. A aplicação desses antioxidantes na reprodução animal pode aumentar a qualidade espermática e a viabilidade do sêmen, facilitando o processo de criopreservação do sêmen. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para estabelecer legislação sobre as dosagens adequadas e regulamentação dessas substâncias antioxidantes para seu uso correto e evitar danos aos animais.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições dos autores

Conceituação: C. S. Castro and L. L. Borges. *Curadoria de dados:* C. S. Castro, C. F. C. Cotrim, I. R. dos Santos. *Análise formal:* C. S. Castro, C. F. C. Cotrim and L. M. de Almeida. *Metodologia:* C. S. Castro, C. F. C. Cotrim, I. R. dos Santos and E. F. L. C. Bailão. *Supervisão:* L. L. Borges. *Redação (rascunho original):* C. S. Castro, C. F. C. Cotrim, I. R. dos Santos, L. M. de Almeida, E. F. L. C. Bailão, S. S. Caramori. *Redação (revisão e edição):* K. J. G. dos Santos and J. A. M. de Paula

Material suplementar

<https://revistas.ufg.br/vet/article/view/73061/38947>

Referências

- Ugbogu EA, Elghandour MMY, Ikpeazu VO, Buendía GR, Molina OM, Arunsi OM, Arunsi UO, Emmanuel O, Salem AZM. The potential impacts of dietary plant natural products on the sustainable mitigation of methane emission from livestock farming. *J. Clean. Prod.* 2019; 213: 915-925.
- Martelli F, Nunes FMF. Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Ciência e Cultura*, São Paulo. 2014; 66(3): 54-57.
- Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol.* 2006; 533:222-39.
- Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I. Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(4):799-811.
- Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr. Med. Chem.* 2004;11: 1163-82.
- Vasconcelos TB, Cardoso ARNR, Josino JB, Macena RHM, Bastos VPD. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? *Cient Ciênc Biol Saúde.* 2014; 16(3):213-9.
- Tort L. Stress and immune modulation in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 2011; 35:1366-75.
- Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismo de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte.* 2004; 10: 303-13.
- Jiménez MH, Cerrila MEO, Peralta MC, Haro JGH, Díaz-cruz A, Perrusquía RG. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América.* 2005; 30: 728-34.
- Oliveira RS, Lucas CB, Antonucci C, Silva SC. Natural Bioactive Compounds: Promoting Agents in The Reduction of Oxidative Extress and Inflammatory Processes. *South American Journal of basic education, technical en technological.* 2018; 5(1):258-73.
- Campigotto G, Alba DF, Sulzbach MM, Santos DS, Souza CF. Dog food production using curcumin as antioxidant: effects of intake on animal growth, health and feed conservation. *Arch Anim Nutr.* 2020; 74(5): 397-413.
- Brazil. Food Ingredients. Dossiê Antioxidantes. *Os antioxidantes.* 2009; 6:16.
- Lee MT, Lin WC, Yu B, Lee TT. Antioxidant capacity of phytochemicals and their potential effects on oxidative status in animals - A review. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 2017; 30(3): 299.
- Carocho M, Morales P, Ferreira ICFR. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends Food Sci Technol.* 2018; 71107- 120.
- Wong FC, Xiao J, Wang S, Ee KY, Chai TT. Advances on the antioxidant peptides from edible plant sources. *Trends Food Sci Technol.* 2020; 99: 44-57.
- Torres BP, Pires JS, Santos DYAC, Chow F. Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS•+ em microplaca. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo – SP, 2017.
- Zhong R, Zhou D. Oxidative Stress and Role of Natural Plant Derived Antioxidants in Animal Reproduction. *J Integr Agric.* 2013; 12(10): 1826-1838.
- Mazur M, Zwyrzykowska-Wodzińska A, Wojtas E, Zachwieja A, Salejda AM. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) supplementation on oxidative stress in Ruminants. *Chil. J. Agric. Res.* 2019; 79(2).
- Wu X, Zhou Q, Xu K. Are isothiocyanates potential anti-cancer drugs? *Acta Pharmacologica Sinica*, 2009; 30 (5): 501.
- Manganaris GA, Goulas V, Vicente AR, Terry LA. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits: Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2014; 94(5): 825 833.
- Tiveron AP. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos Piracicaba: Universidade de São Paulo – SP, 2010.
- Zhang H, Yin M, Huang L, Wang J, Gong L, Liu J, Sun B. Evaluation of the cellular and animal models for the study of antioxidant activity: a review. *Journal of Food Science.* 2017; 82(2): 278-88.
- Leão LL, Oliveira FS, Souza RS, Farias PKS, Da Fonseca FSA, Martins ER, De Souza RM. Uso de antioxidantes naturais em carnes e seus subprodutos. *Caderno de Ciências Agrárias.* 2017; 9(1): 94-100.
- Damodaran S, Parkin K, Fennema O. *Química de Alimentos de Fennema.* Porto Alegre-RS: Artmed. 2008.
- Gámez-Meza N, Noriega-Rodríguez JÁ, Medina-Juárez LA, Ortega-García J, Cázarez-Casanova R, Ángulo-Guerrero O. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompsons grape bagasse. *Journal of the American Oil Chemists Society;*

- 1999; 76(12): 1445-47.
26. Silva JB, Costa KFM, Coelho WAC, Paiva KAR, Costa GAV, Salatino A, Freitas CIA, Batista JS. Quantificação de fenóis, flavonoides totais e atividades farmacológicas de geoprópolis de *Plebeia* aff. *Flavocincta* do Rio Grande do Norte. *Pesquisa Vet Braz*. 2016; 36(9): 874-880.
27. Sucupira NR, Silva AB, Pereira G, Costa JN. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*. 2012; 14(4):263-9.
28. Silveira AC, Kassuia YS, Domahovski RC, Lazzarotto M. Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível. *Comunicado Técnico 421*. EMBRAPA Colombo-PR, 2018.
29. Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. Antioxidant activity of dietary as determined by modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal Agriculture and Food Chemistry*. 2000; 48(8): 3396-3402.
30. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Sampaio CG, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto FD. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). *Comunicado Técnico 125*, Embrapa Agroindústria Tropical. 2006.
31. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Sampaio CG, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto FD. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +. *Comunicado Técnico 128*, Embrapa Agroindústria Tropical. 2007a.
32. Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI, Lajolo FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH•. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*. 2006, 26(2): 446-452.
33. Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Sampaio CG, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto FD. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. *Comunicado Técnico 127*, Embrapa Agroindústria Tropical. 2007b.
34. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneroszevallos L, Byrne DH. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 2006; 19: 669-75.
35. Ou B, Huang D, Hampsch-Woodil, M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 3122–3128.
36. Lenardão EJ, Freitag RA, Dabdoub MJ, Silveira CC. “Green chemistry” – os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Quim. Nova* 2003; 26, 1: 123-129.
37. Doble M, Rollinsk, Kumar A. *Green Chemistry and Engineering* 2007.
38. Chien T, Liu C, Chang Y, Fang C, Pai Juo-Hsiang, Wu Y, Chen S. Therapeutic effects of herbal-medicine combined therapy for COVID-19: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Front. Pharma*. 2022; 13.
39. Prasathkumar M, Anischa S, Dhriya C, Robert Becky R, Sadhasivam S. Therapeutic and pharmacological efficacy of selective Indian medicinal plants – A review. *Phytom. Plus* 2021; 1.
40. Joly CA, Scarano FR, Bustamante M, Gadda TMC, Metzger JPW, Seixas CS, Ometto JPHB, Pires APF, Boesing AL, Sousa FDR, Quintão JMB, Gonçalves LR, Padgurschi MCG, Aquino MFS, Castro PFD. Brazilian assessment on biodiversity and ecosystem services: summary for policy makers. *Biota Neotrop*. 2019; 19, 4.
41. Souza FP, Castilho TPR, Macedo LOB. An institutional framework for Bioinputs in Brazilian agriculture based on Ecological Economics. *Sust. Debate* 2022; 13, 1.
42. Potts RJ, Notarianni LJ, Jefferies TM. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. *Mutation Research*. 2000; 447: 249-256.
43. Arguello FAPB, Zervoudakis LKH, Zervoudakis JT, Duarte Júnior MF, Tsuneda PP, Marinho WAS, Silva LES, Moraes JO, Barbosa EA. Efeito da suplementação oral de selênio e tocoferol sobre a membrana plasmática espermática em touros da raça Brangus. *Rev. Bras. Ciênc. Vet*. 2017; 24(3):157-161.
44. Pezo F, Yest M, Zambrano FA, Uribe P, Risopatrona J, Sanchez R. Antioxidants and their effect on the oxidative/nitrosative stress of frozen-thawed boar sperm. *Cryobiology*. 2021; 98: 5-11.