

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SEMENTE DO URUCUM COMO FONTE DE
ANTIOXIDANTES EM DIETA COM ÓLEO DE LINHAÇA
PARA VACAS LEITEIRAS

Autor: Jesus Alberto Cardozo Osorio
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu Dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. João Luiz Daniel

MARINGÁ
Estado do Paraná
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SEMENTE DE URUCUM COMO FONTE DE
ANTIOXIDANTES EM DIETA COM ÓLEO DE LINHAÇA
PARA VACAS LEITEIRAS

Autor: Jesus Alberto Cardozo Osorio
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu Dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. João Luiz Daniel

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
(CIP) (Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR,
Brasil)

O83s Osorio, Jesus Alberto Cardozo
Semente do urucum como fonte de antioxidantes
em dieta com óleo de linhaça para vacas leiteiras
/ Jesus Alberto Cardozo Osorio. -- Maringá,
2018.
48 f. : il. color., fig., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos.
Coorientador: Prof. Dr. João Luiz Daniel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia, 2018.

1. Ácido graxo poli-insaturado. 2. Vacas leiteiras
- Digestibilidade. 3. Lipoperoxidação. 4. Ômega-3.
5. Semente de urucum. I. Santos, Geraldo Tadeu,
orient. II. Daniel, João Luiz. III.
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências
Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.
IV. Título.

CDD 21.ed. 636.085

ECSL-1202/9



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SEMENTE DO URUCUM COMO FONTE DE
ANTIOXIDANTES EM DIETA COM
ÓLEO DE LINHAÇA PARA VACAS LEITEIRAS

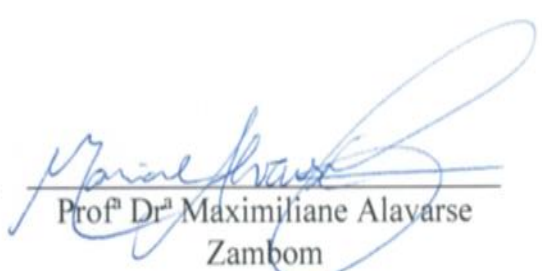
Autor: Jseús Alberto Cardozo Osorio
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal


APROVADO em 02 de março de 2018.



Prof.ª Dr.ª Francilaine Eloise de
Marchi



Prof.ª Dr.ª Maximiliane Alavarse
Zambom



Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
(Orientador)

“Aprendí que el coraje no es la ausencia de miedo, sino el triunfo sobre él. El hombre valiente no es aquel que no siente miedo, sino el que conquista ese miedo”

Nelson Mandel

A Deus, muita gratidão por permitir dar este grande passo na minha vida, ser Mestre, por guiar meu caminho no dia a dia, dando-me força, consolando minhas tristezas e cuidar de minha família.

À minha mãe, Maria Adela Osorio Torres, por ser o motor de minhas conquistas, por apoiar meus sonhos, por escutar e guiar-me, pelos conselhos, ensinamentos e orações, e muita gratidão por ser uma mãe tão especial.

Aos meus irmãos, Diego Armando Cardozo Osorio, Juan Carlos Cardozo Osorio e Jhon Fredy Cardozo, pelo apoio, amor e amizade.

A minha namorada, Yesica Milena Garzón Pacheco, pelo carinho, por todo amor e compressão, pelas palavras, os conselhos e apoio nos momentos difícil.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, por ter permitido realizar meu projeto de mestrado.

À embaixada do Brasil e ao Programa Estudante Convênio de Pós-graduação (PEC-PG), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, por toda orientação, ensinamento, respeito e amizade.

Ao professor João Daniel, pela coorientação, apoio e disposição para me ajudar.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pelos conhecimentos e ensinamentos.

Aos colegas de grupo Francilaine Eloise de Marchi, Jakeline Fernandes Cabral, Micheli Regiani Sippert, Jean Carlos Steinmacher, Kleves Vieira de Almeida e Rodolpho Prado.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi, em especial aos funcionários do Setor de Ensino/Pesquisa e Extensão em Bovinocultura de Leite.

Ao Engenheiro Agrônomo Antonio Carlos Mullon de Araçatuba, SP, pela doação da semente de Urucum utilizada neste experimento.

Ao Prof. Dr. João Pedro Velho da UFSM, campus de Palmeira das Missões, RS pelo empenho em conseguir o óleo de linhaça utilizado neste experimento.

Ao funcionário do Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia de Leite – Região Noroeste, Ranulfo Junior, pela amizade e o e suporte durante a realização das minhas análises.

À colega Nadine Woruby, pela ajuda e os ensinamentos para análises dos antioxidantes.

A todos àqueles que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho e com meu crescimento pessoal e acadêmico.

BIOGRAFIA

JESUS ALBERTO CARDOZO OSORIO, filho de Maria Adela Osorio Torres e Armando Cardozo Gonzáles, nasceu em Dolores, Tolima, no dia 10 de maio de 1990.

Em fevereiro de 2008, iniciou o Curso de Graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia, na Fundación Universitaria San Martin, Bogotá – Colômbia.

Em dezembro de 2013, foi graduado em Medicina Veterinária e Zootecnia, na Fundación Universitária San Martin.

Em 2016, iniciou no mestrado em Produção Animal, subárea de Nutrição de ruminantes da Pós-graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2018, submeteu-se à banca examinadora para defesa da dissertação.

ÍNDICE

	Página.
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
I – INTRODUÇÃO	1
1.1 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1.1.1 Efeito da suplementação de lipídeos na alimentação de ruminantes.....	6
1.1.2 Oxidação de lipídios no leite.....	9
1.1.3 Sistemas de antioxidantes.....	9
1.1.4 Carotenoides na alimentação de ruminantes.....	2
1.1.5 Semente de urucum.....	3
1.1.6 Estudos da atividade antioxidante da semente de urucum.....	10
Referências.....	12
II – OBJETIVOS GERAL.....	17
2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	17
III - Semente de urucum como fonte de antioxidantes em dieta com óleo de linhaça para vacas leiteiras	18
Resumo.....	18
Abstract.....	20
Introdução.....	22
Material e métodos.....	23
Resultados.....	29

Discussão.....	33
Conclusão.....	38
Referências.....	40

LISTA DE TABELAS

	Página.
Tabela 1. Composição química dos ingredientes utilizados nas rações.....	23
Tabela 2. Proporção dos ingredientes e composição química das dietas com adição de semente de urucum e suplementação de óleo de linhaça.....	24
Tabela 3. Consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes em vacas da raça Holandês alimentadas com semente urucum e óleo de linhaça.....	29
Tabela 4. Produção, composição e qualidade oxidativa do leite de vacas da raça Holandês alimentadas com semente urucum e óleo de linhaça.....	30
Tabela 5. Composição de ácidos graxos no leite (g/100g de lipídios totais) de vacas da raça Holandês alimentadas com semente urucum e óleo de linhaça.....	31
Tabela 6. Concentrações percentuais e razões de ácidos graxos agrupados no leite de vacas da raça Holandês alimentadas com semente urucum e óleo de linhaça	32
Tabela 7. Parâmetros sanguíneos e capacidade antioxidante de vacas da raça Holandês alimentadas com semente urucum e óleo de linhaça.....	33

LISTA DE FIGURAS

	Página.
Figura 1. Planta, folhas, flores, fruto, sementes e corantes do urucum	8
Figura 2. Rota proposta da biossíntese da bixina a partir do licopeno.....	9

..

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da adição da semente de urucum e de óleo de linhaça na dieta de vacas leiteiras, sobre o consumo e a digestibilidade de matéria seca e dos nutrientes, a composição, perfil lipídico e estabilidade oxidativa do leite, atividade antioxidante no sangue e no leite. O experimento foi conduzido no Setor de Ensino/Pesquisa e Extensão em Bovinocultura de Leite da Fazenda Experimental de Iguatemi. Foram utilizadas quatro vacas da raça holandesa, confinadas em sistema *tie stall*, com peso vivo médio de 566 ± 64 kg e 120 ± 43 dias de lactação, distribuídas em um quadrado Latino 4×4 , em esquema fatorial 2×2 . As dietas experimentais foram: 1) controle, sem adição semente de urucum e sem suplementação de óleo de linhaça; 2) com adição de semente de urucum (1,5% na MS), sem suplementação óleo de linhaça; 3) com suplementação de óleo de linhaça (3% na MS), sem adição semente de urucum, 4) com adição de semente de urucum (1,5% na MS) e com suplementação de óleo de linhaça (3% na MS), cuja proporção volumoso:concentrado foi de 60:40. Foram determinados o consumo e digestibilidade aparente da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), cinzas, proteína bruta e fibra em detergente neutro (FDN), parâmetros sanguíneos, atividade antioxidante no sangue e no leite, perfil de ácidos graxos, composição e estabilidade oxidativa do leite. A adição de semente de urucum reduziu o consumo de MS, a produção leite e a secreção diária de proteína e lactose ($P<0,05$). A semente de urucum aumentou o teor de gordura e sólidos totais no leite ($P<0,05$). Não houve efeito ($P>0,05$) da semente de urucum na digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes. A suplementação de óleo sem semente de urucum diminuiu o teor de gordura no leite ($P<0,05$). A suplementação de óleo aumentou o consumo de EE, digestibilidade de EE ($P<0,05$), houve tendência de aumentar a digestibilidade de PB ($P=0,09$) e diminuir a digestibilidade da FDN ($P=0,07$).

A adição de semente de urucum aumentou as concentrações dos AGCC (C6:0 e C8:0) ($P < 0,05$), na ausência de óleo de linhaça, enquanto na presença de óleo reduziu a concentração dos AG C18:2 n6t e n-6. O óleo de linhaça reduziu a concentração dos AGCM ($P < 0,05$), e aumentou AGCL ($P < 0,05$), apresentou tendência a reduzir os AGS ($P = 0,08$) e AGMI ($P = 0,08$), e aumentar AGPI ($P = 0,06$) no leite. Também houve aumento do AG n-3 ($P > 0,05$) e redução da razão n-6/n-3 ($P > 0,05$), tendência de aumentar o HDL no sangue ($P = 0,08$) e dienos conjugados no leite ($P = 0,07$) com a suplementação de lipídeos. A produção de leite corrigida para gordura não foi influenciada pela adição de semente de urucum e a suplementação de óleo ($P > 0,05$). Desta forma, conclui-se que a adição de semente de urucum de 1,5% da MS não influenciou a capacidade antioxidante do leite. A suplementação de óleo de linhaça melhorou o perfil de ácidos graxos no leite, aumentando a concentração de n-3. A associação da semente de urucum e óleo de linhaça não influenciou os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: ácido graxo poli-insaturado, digestibilidade, lipoperoxidação, ômega-3.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of annatto seed (*Bixa orellana L*) and linseed oil in diet of dairy cows, on the intake and digestibility of dry matter and nutrients, composition, lipid profile and oxidative stability of milk, antioxidant activity in blood and milk. The experiment was carried out in the Teaching / Research and Extension Milk Cattle Production System of the Iguatemi Experimental Farm. Four lactating Holstein cows (566 ± 64 kg of body weight and 120 ± 43 days in milk) were housed in a tie stall barn and assigned to a 4x4 Latin square design, with a 2x2 factorial arrangement. The experimental diets were: 1) control, without addition of annatto seed addition and linseed oil supplementation; 2) annatto seed addition (1.5% in DM), without linseed oil supplementation; 3) linseed oil supplementation (3% in DM), without annatto seed addition, 4) annatto seed addition (1.5% in DM) and linseed oil supplementation (3% in MS), whose forage: concentrate ratio was 60:40. There were evaluated intake and apparent digestibility of dry matter (DM), organic matter (OM), ash, crude protein (CP), ether extract (EE) and neutral detergent fiber (NDF), blood parameters, antioxidant activity in blood and milk, fatty acid profile, composition and oxidative stability of the milk. The annatto seed addition reduced DM intake, and yield of milk, protein and lactose yield ($P < 0.05$). Annatto seed increase of fat and solids contents ($P < 0.05$). Annatto seed did not show effect ($P > 0.05$) on DM and nutrient digestibility. The oil supplementation without annatto seed decreased milk fat content ($P < 0.05$). The linseed oil supplementation increased EE intake, EE digestibility ($P < 0.05$), there was a tendency to increase CP digestibility ($P = 0.09$) and to decrease NDF digestibility ($P = 0.07$). Annatto seed increased SCFA (C6:0 and C8:0) concentration ($P < 0.05$), in the absence of linseed oil, whereas in the oil presence it reduced the AG 18:2 n6t and omega-6 concentrations.

Additionally, oil supplementation reduced MCFA ($P<0.05$), increased LCFA ($P<0.05$) in milk and showed a tendency to reduce SFA ($P=0.07$) and MUFA ($P=0.08$), as well as to increase PUFA ($P=0.06$). There was also an increase in omega-3 FA ($P>0.05$) and a reduction in the omega-6/omega-3 ratio ($P>0.05$), a tendency to increase HDL in the blood ($P=0.08$), and conjugated diene hydroperoxides in milk ($P=0.07$) with lipid supplementation. The production of 3.5% fat-corrected milk production was not affected by the annatto seed addition and oil supplementation ($P>0.05$). Thus, it was concluded that 1.5% of annatto seed addition in DM did not influence the milk antioxidant capacity. The linseed oil supplementation improved the fatty acid profile in milk, increasing the omega-3 concentration. The association of annatto seed and linseed oil did not influence the evaluated parameters.

Key words: polyunsaturated fatty acid, digestibility, lipoperoxidation, omega-3.

INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados são fonte importante de ácidos graxos, proteínas, minerais e vitaminas para a alimentação humana (Murphy and Allen, 2003). O gordura do leite contém aproximadamente 70% de ácidos graxos saturados (AGS) 25% e 5% de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), respectivamente (Grummer, 1991).

A suplementação de sementes ou de óleos de oleaginosas na dieta de vacas leiteiras é uma estratégia para melhorar o perfil de ácidos graxos, segundo Glasser et al. (2008) que exploraram mais de 100 trabalhos em uma meta-análise, a suplementação com sementes ou óleos de oleaginosas na dieta de vacas leiteiras induz a redução dos AGS e aumento dos AGMI e/ou AGPI. O aumento dos AGPI nos produtos lácteos traz benefícios para saúde humana, eles têm mostrado efeitos anticancerígenos, antiateroscleróticos, anti-hipertensivos, anti-inflamatórios, antibacterianos, reduzir o risco de doenças cardiovasculares e dá reforço à imunidade (Rose e Connolly, 1999; Nakamura et al., 2008; Barlowska e Litwinczuk, 2009; Kromhout et al., 2011).

Desta forma, tem aumentado o interesse pelo consumo de produtos lácteos ricos em AGPI (Howe et al., 2006; Lopez, 2010). Os AGPI no leite são susceptíveis de sofrer reações de oxidação resultando na produção de aromas e sabores desagradáveis nos produtos lácteos, tornando-os inaceitáveis ao consumo (Timmons et al., 2001), a utilização de antioxidantes na alimentação de ruminantes promove a proteção dos AGPI da oxidação lipídica (Baldi et al., 2000; Gobert et al., 2009).

Os carotenoides são um grupo importante de antioxidantes, conhecido por sequestrar o oxigênio singlete, proteger organismo dos danos causados pelos radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (Santamaria et al., 1988). O urucum (*Bixa orellana*

L) é uma planta da família Bixaceae, cuja semente contém carotenoides sendo os mais abundantes a bixina e norbixina (Satyanarayana et al., 2003), a bixina pertence à família de apocarotenoides (Satyanarayana et al., 2003), cujo poder antioxidante é conferido pela extensa cadeia de duplas ligações, e permite combater o oxigênio singlete (Kiokias e Gordon, 2003). Ademais a semente de urucum tem tocotrienóis que combinados com a bixina atuam sinergicamente para proteger os AGPI da oxidação (Castro et al., 2011)

A hipótese levantada no presente estudo foi que adição de semente urucum como fonte antioxidante para vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça, aumenta o status oxidativo do organismo, a estabilidade oxidativa do leite, retardando assim a oxidação dos AGPI do leite.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Efeito da suplementação de lipídeos na alimentação de ruminantes

Ao longo dos anos, centenas de pesquisas e revisões foram publicadas sobre a reposta da suplementação de lipídeos na alimentação de vacas leiteiras e na composição da gordura do leite, enfocando-se em melhorar o perfil de ácidos graxos (AG) do leite, em especial aumentar as concentrações dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) tais como o ácido linoleico conjugado, o ácido linoleico (C18:2n-6), e α -linolênico (C18:3n-3), conforme como o demonstra em um estudo de metanálise realizado por Glasser et al. (2008).

O aumento do teor de C18:3n-3 e CLA na gordura do leite é desejável para saúde humana, o consumo de alimentos rico em C18:3n-3 reduz o risco de doenças cardiovasculares (Dewailly et al., 2003; Marik e Varon, 2009). Além disso o aumento C18:3n-3 no leite poderia reduzir a incidência de arteriosclerose (Kromhout et al., 2011), o CLA tem efeitos na saúde humana como anticarcinogênicos (Rose e Connolly, 1999), antiaterogênicos (Nakamura et al., 2008) e aumenta a resposta imune (Song et al., 2005).

As principais fontes de lipídeos utilizadas nas pesquisas de vacas leiteiras são sementes de oleaginosas, como soja, algodão, girassol e linhaça, na forma integral ou processada, também óleos vegetais de soja, girassol e linhaça (Chilliard et al., 2009). Dentro do grupo de sementes de oleaginosas cabe ressaltar que a linhaça é uma fonte importante de C18:3n-3, esta contém alto nível de óleo, que representa em 40% do peso

total da semente, e aproximadamente 55% do total de ácidos graxos do óleo de linhaça é C18:3n-3 (Mustafa et al., 2002; Petit, 2002). O C18:3n-3 é precursor da síntese do CLA durante a biohidrogenação ruminal (Harfoot e Hazlewood, 1997).

A biohidrogenação ruminal é um processo que sofre os AGPI como forma de defesa dos micro-organismos, pois estes são tóxicos para as bactérias (Bauman et al., 2003). Para ocorrer a biohidrogenação, primeiramente as bactérias promovem a hidrólise dos triglicerídeos provenientes da dieta, e as ligações de éster encontradas nos triglicerídeos são quebradas liberando os ácidos graxos saturados (AGS), AGPI e glicerol (Doreau e Ferlay, 1994; Doreau e Chilliard, 1997). O desaparecimento dos AGPI C18:3n-3 e C18: 2n6 no rúmen é ao redor do 93% e 85%, respectivamente (Doreau e Ferlay, 1994).

Posteriormente, os AGPI sofrem isomerização da ligação *cis*-12 à ligação *trans*-11, formando assim o AG *cis*-9, *trans*-11-CLA a partir da isomerização do C18:2n-6, ou formando o AG C18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 a partir isomerização do C18:3n-3. Em seguida, a dupla ligação *cis*-9 é hidrogenada, formando o C18:1 *trans*-11 e C18:2 *trans*-11, *cis*-15 para o C18:2n-6 e o C18:3n-3, respectivamente. O C18:2 *trans*-11, *cis*-15 sofre uma hidrogenação na dupla ligação *cis*-15, formando assim o C18:1 *trans*-11. Este ainda pode sofrer mais hidrogenação no rúmen produzindo o C18:0. O C18:1 *trans*-11, o C18:0, outros produtos intermediários da biohidrogenação e os AGS liberados na hidrólise dos triglicerídeos são absorvidos no intestino delgado e, são posteriormente incorporados na gordura do leite (Harrison et al., 1976).

O C18:1 *trans*-11 na glândula mamária sofre dessaturação por ação da enzima Δ^9 – dessaturase, produzindo o *cis*-9, *trans*-11-CLA, mais de 82% do CLA em produtos lácteos é o isômero *cis*-9, *trans*-11-CLA, o qual é um agente protetor contra doença cardiovascular e câncer (Chin et al., 1992). Os AGPI podem provocar redução no teor de gordura do leite, já que no processo de biohidrogenação as sementes de oleaginosas e os óleos podem formar compostos intermediários tais como, o *trans*-9, *cis*-11-CLA, *cis*-10, *trans*-12-CLA e o *trans*-10, *cis*-12-CLA (Dhiman et al., 2000; Sæbø et al., 2005; Perfield et al., 2007). Estes intermediários são inibidores da síntese de gordura do leite na glândula mamária, especialmente o *trans*-10, *cis*-12-CLA, que é um potente inibidor desta (Dhiman et al., 2000; Bauman e Griinari, 2003).

Em quanto o perfil de ácidos graxo no leite, as pesquisas com vacas leiteiras demonstraram que a suplementação com óleo de linhaça aumenta a concentração de

C18:3n-3 e CLA (Chouinard et al., 1998; Dhiman et al., 2000). Segundo Chouinard et al. (1998) a suplementação de 4% de sais de cálcio de óleo de linhaça da MS na dieta de vacas em lactação aumentou em um 29% a concentração de C18:3n-3 na gordura do leite, comparado à dieta controle. Kelly et al. (1998) adicionaram 5,3% de óleo de linhaça à dieta de vacas leiteiras, observando um aumento de 26% no teor de CLA do leite. Dhiman et al. (2000) incluíram 1% óleo linhaça na dieta de vacas leiteiras, observando um aumento de 30 e 56% nas concentrações de C18:3n-3 e CLA, respectivamente. Em outra pesquisa de Dhiman et al. (2000) encontraram que o teor de CLA na gordura do leite aumentou 312,5% e 212,5% em vacas alimentadas com 2,2% e 4,4% de óleo de linhaça, respectivamente.

Do ponto de vista nutricional, os ácidos graxos representam importante combustível fisiológico, porque tem elevado valor energético, e, seu consumo aumenta a disponibilidade de energia e melhora o status energético para a síntese de leite (Palmquist e Jenkins, 1980). Embora a suplementação seja uma alternativa viável para melhorar o perfil de ácidos graxos e a densidade energética da dieta, pode apresentar algumas desvantagens para o animal, tais como a redução no consumo de matéria seca, de matéria mineral, da digestibilidade da fibra (Jenkins, 1993; NRC, 2001), do teor de gordura no leite (Dhiman et al., 2000) e susceptibilidade do organismo aos produtos da lipoperoxidação (Halliwell e Chirico, 1993).

Muitos são os fatores relacionados como a redução no consumo de matéria: o nível de inclusão de lipídeo na dieta, o tipo de volumoso, o estágio de lactação dos animais e digestibilidade da fração fibrosa utilizada (NRC, 2001; Glasser et al., 2008). Um outro fator importante é a aceitabilidade dos suplementos de gordura por parte dos animais (Grummer et al., 1990). Segundo Palmquist e Mattos (2006), a suplementação de lipídeos acima de 5%, provoca maior disponibilidade de energia, que levaria à saciedade por parte do organismo, sendo este um fator fisiológico limitante do consumo de matéria seca, neste caso, as exigências do animal controlariam o consumo (Mertens, 1994)

Segundo Jenkins (1993) a suplementação de AGPI pode reduzir até 50% a degradação de carboidratos estruturais, em dietas com até 10% de gordura suplementar. Nessa condição, as fontes de lipídeos atrapalham a formação do biofilme, especialmente quando a fonte de lipídeos é o óleo, este pode formar uma película nas partículas de fibras, dificultando o acesso e adesão dos microrganismos, assim diminuindo a digestibilidade da fração fibrosa.

Essa redução na digestão leva menor produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), de maneira especial a baixa relação acetato: propionato, menor produção de metano e hidrogênio (Jenkins, 1993). A redução da digestão da fibra também pode ser afetada pela toxicidade dos AGPI sobre a população de microrganismos celulolíticos do rúmen (Palmquist e Jenkins, 1980; Jenkins, 1993)

1.1.2 Oxidação de lipídios no leite

Em contrapartida a melhoria nutricional do leite com aumento do teor de AGPI, faz o com que ele se torne mais suscetível à oxidação (Charmley e Nicholson, 1994). Os danos oxidativos são causados pela reação em cadeia dos radicais livres nas membranas da gordura. Os AGPI têm duplas ligações que são suscetíveis às perdas de elétrons, desencadeando a lipoperoxidação dos AGPI (O'Connor e O'Brien, 2006).

A oxidação lipídica é uma reação em cadeia que apresenta a fase de iniciação, propagação e finalização. Na fase de iniciação, ocorre o ataque do ácido graxo por uma espécie reativa, provocando a remoção de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH₂-), gerando um radical lipídico (R[•]). A formação de R[•] é influenciada pela exposição à luz, catalisadores metálicos, calor, espécies ativas de oxigênio e outros fatores (O'Connor e O'Brien, 2006).

Na fase de propagação o radical lipídico (R[•]) é extremamente reativo e pode-se combinar com oxigênio molecular para produzir um radical peroxila lipídico (ROO[•]), que ataca outra molécula de AGPI e abstrai um átomo de hidrogênio para gerar um hidroperóxido lipídico (ROOH[•]) e um novo radical lipídico (R[•]), dando início a um novo estágio de propagação (O'Connor e O'Brien, 2006). Desta maneira, muitas moléculas de AGPI podem ser oxidadas até um hidroperóxido lipídico (ROOH[•]), sendo este chamado de produto primário da oxidação. O estágio de finalização se dá quando há o consumo dos radicais, os radicais formados no estágio de propagação reagem e formam os chamados produtos secundários da oxidação, tais como cetonas, ácidos e aldeídos, os quais são responsáveis pelo surgimento de odores e sabores indesejáveis, provocados pela lipoperoxidação (Charmley e Nicholson, 1994).

1.1.5 Sistema de antioxidantes

No organismo dos ruminantes existe um equilíbrio entre a formação de radicais livre e a capacidade antioxidante endógena do animal, que é composto pelas enzimas

catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX), que são capazes de retardar a lipoperoxidação (Halliwell e Chirico, 1993). Apesar disso, quando as vacas leiteiras são alimentadas com AGPI, a capacidade antioxidante endógena é ineficiente para a intensa e constante produção de radicais livres (Sordillo e Aitken, 2009). A maior concentração de radicais livres é conhecida como *stress* oxidativo, que pode causar danos aos lipídios sanguíneos, desordem e modificações nas vias metabólicas, e alterações fisiológicas em vacas leiteiras (Halliwell e Chirico, 1993), provocando imunossupressão e problemas de saúde, tais como a mastite, o edema mamário, problemas reprodutivos e desordens hormonais (Miller et al., 1993; Sordillo e Aitken, 2009).

Além da capacidade antioxidante endógena, existem antioxidantes exógenos, que podem ser suplementados via dieta, tais como as vitaminas lipossolúveis (vitamina A e vitamina E), vitaminas hidrossolúveis (vitamina C), carotenoides e composto secundários (Polifenóis) (Bianchi e Antunes, 1999; Cardoso et al., 2010; Wojcik et al., 2010). A atividade antioxidante da vitamina A e os carotenoides é conferida pela cadeia hidrofóbica das unidades de polieno que podem suprimir o oxigênio singlete, neutralizar os radicais livres e combinar e estabilizar os radicais peroxila (Palace et al., 1999).

A vitamina E, cuja função é interromper a propagação do processo de oxidação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres (Niki, 1987). A vitamina C é o antioxidante presente nos fluidos extracelulares protegendo as biomembranas contra os danos da lipoperoxidação, também prevenir o dano celular mediado por ROS (Catani et al., 2005). A atividade antioxidante dos polifenóis se dá pela eliminação de radicais livres com especial impacto sobre os radicais hidroxila e peroxila (Carocho e Ferreira, 2013)

1.1.1 Carotenoides na alimentação de ruminantes

A literatura reporta a existência de cerca de 600 carotenoides que são sintetizados por plantas e algas, e estão envolvidos no processo fotossintético, presentes em muitas frutas e vegetais que são responsáveis pelos pigmentos, amarelos, laranjas e vermelhos (Nozière et al., 2006).

A estrutura química dos carotenoides é caracterizada por uma cadeia linear de polieno, com sistema duplas ligações conjugadas, o sistema é rico em elétrons de polieno que são responsáveis pela atividade antioxidante dos carotenoides, tanto pela extinção do

oxigênio singlete, quanto pelos radicais eliminadores para finalizar as reações em cadeia (McNulty et al., 2007).

Os carotenoides são classificados em dois grupos, o primeiro grupo são os carotenos, caracteriza-se pela presença de uma cadeia hidrocarbônica linear ou cíclica em um ou nos dois terminais da molécula, por exemplo (α e β -caroteno e licopeno), o segundo grupo são as xantofilas que compreendem os derivados oxigenados dos carotenos são: hidroxila (β -criptoxantina), ceto (cantaxantina), epóxido (violaxantina) e aldeído (β -citraurina) (De Quirós e Costa, 2006). Na alimentação de ruminantes a principal fonte de carotenoides é a pastagem, que podem modificar a cor do leite e produtos lácteos e gorduras corporais. (Nozière et al., 2006).

Rafałowski et al. (2014) avaliaram a estabilidade oxidativa da gordura do leite ao longo de um ano em rebanhos com dois sistemas alimentação: pastagem e confinamento, e encontraram maior estabilidade oxidativa na gordura do leite de vacas em pastagem do que de vacas em confinamento. Segundo estes autores, a estabilidade oxidativa da gordura do leite foi afetada pelo teor de α -tocoferol, β -caroteno, ácido cis e trans C18: 1 e CLA da pastagem. No entanto, é particularmente difícil identificar a atividade antioxidante dos carotenoides, já que os leites ricos em caroteno também são ricos em α -tocoferóis, que dificulta a identificação do papel específico do β -caroteno.

A vitamina A (retinol) é o carotenóide mais importante na alimentação de ruminantes, que não é sintetizada pelas plantas, mas seus precursores são os carotenóides. A literatura relata que foram identificados cerca de 60 dos 600 carotenóides que apresentam alguma atividade de pró-vitamina A (Yang e Tume, 1993). Dentre os carotenóides, o α -caroteno e o β -caroteno apresentam maior atividade pró-vitáminica A, que posteriormente é convertida no organismo em vitamina A, sendo esta indispensável para a manutenção normal do metabolismo fisiológico dos animais. A vitamina A tem efeito sobre a visão, crescimento celular e dos epitélios, e melhora a integridade e estabilidade da superfície da mucosa (Donoghue et al., 1981; McDowell, 2012). Alguns estudos mostraram que Vitamina A pode melhorar o sistema de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo (Kleczkowski et al., 2004; MA et al., 2005). O β -caroteno é incorporado nas membranas celulares atuando como um eliminador de radicais de oxigênio.

1.1.2 Semente de urucum

O urucum é uma planta da família Bixaceae, árvore perene que pode atingir nove metros de altura com flores brancas ou rosa e frutos (Fig 1), nativa de Centro e a Sul América (Rodrigues et al., 2007; Raddatz-Mota et al., 2017). O fruto da árvore de urucum tem forma de capsulas ovoides globulares, que contém ao redor entre 10 – 50 sementes com uma fina camada de coloração vermelho-laranja intenso (Alonso, 2007; Fonnegra, 2007).

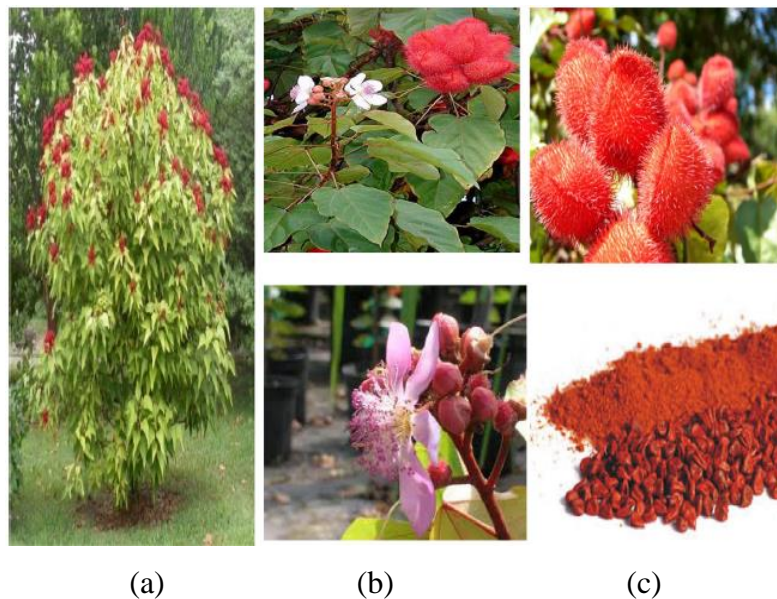


Fig 1. (a) Planta (b) folhas e flores, e (c) Fruto, sementes e corantes. Fonte (Rather e Mohammad, 2016).

A América Latina produz 60% da semente urucum do mundo, seguida de África (27%) e Ásia (12%) (Giuliano et al., 2003), sendo Brasil o maior produtor com 12,5 mil toneladas de sementes no ano 2014 (IBGE, 2016). Estas sementes são usadas como corantes na indústrias alimentícias, por exemplo, no setor de embutidos, na indústria de laticínios e na indústria de sorvete, também é usada nas indústrias de cosméticos e farmacêuticos, e por último na alimentação das galinhas poedeiras para dar intensidade de coloração da gema (Giuliano et al., 2003; Kang et al., 2010; Mesquita et al., 2017).

A semente de urucum contém carotenoides (bixina e norbixina) (Satyanarayana et al., 2003), terpenóides (Geranilgeraniol, tocotrienóis e tocoferóis) (Moraes et al., 2015; Silva e Meireles, 2015; Raddatz-Mota et al., 2017) e flavonoides (Van Cuong e Chin, 2016). Dequigiovani et al. (2017) avaliaram a diversidade genética de 63 acessos do

urucum do banco de germoplasma do Instituto Agronômico, São Paulo, Brasil, observando uma variação para os compostos fitoquímicos da semente de urucum; a bixina de 2 a 7,31 g / 100 g de MS, os lipídeos de 2,14 a 7,11 g / 100 g de MS, os tocotrienóis de 0,25 a 1,05 g / 100 g de MS e o geranylgeraniol de 0,49 a 2,61 g / 100 g de MS).

A bixina é um carotenoide que pertence à família de apocarotenoides naturais obtido do pericarpo da semente de urucum (*Bixa orellana* L), está representa ao redor de 80% dos carotenoides do urucum (Satyanarayana et al., 2003). Segundo Bouvier et al. (2003) e Cruz e Hernández (2003) provavelmente o licopeno (Carotenoide lineal) pode ser o substrato para síntese da bixina (Fig 2).

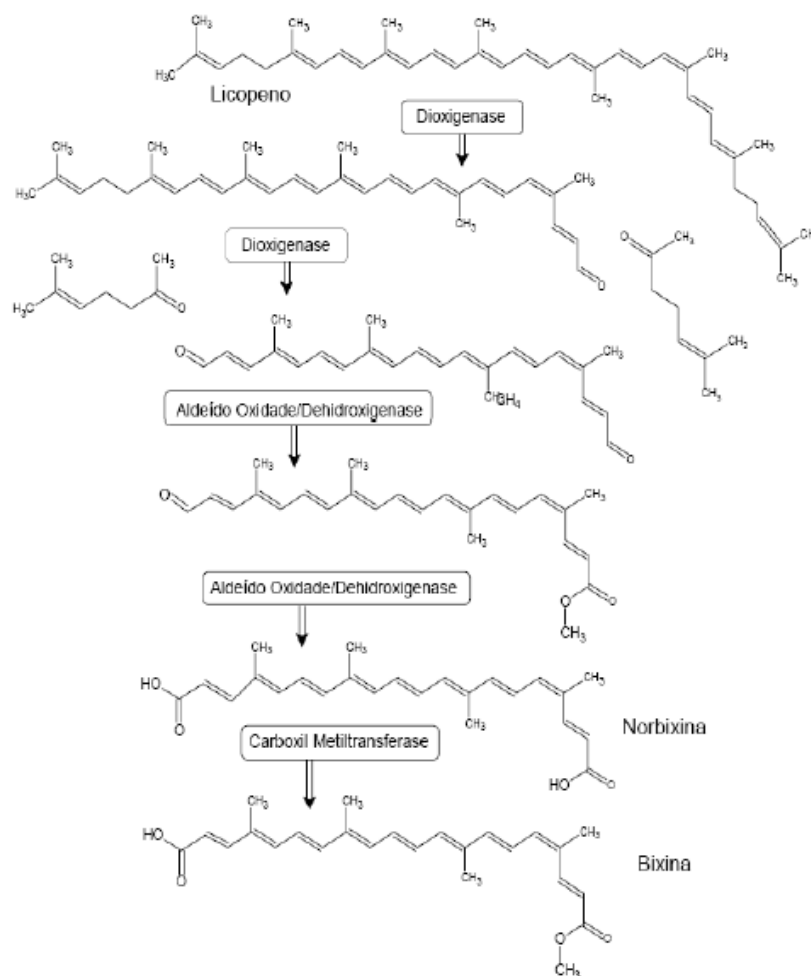


Fig 2. Rota proposta da biossíntese da bixina a partir do licopeno. Fonte (Jako et al., 2002)

Além da bixina, a semente de urucum apresenta outro apocarotenóide chamado norbixina, esta dá uma coloração amarelo-avermelhada junto com a bixina, sendo a norbixina hidrossolúvel (Insolúvel em álcool, propileno, glicol, óleo e gordura) e a bixina

lipossolúvel (Solúvel em clorofórmio, acetona, éter, etílico e etanol) (Giuliano et al., 2003; Taham et al., 2015). O urucum apresenta outros carotenoides tais como metilbixina, trans-bixina, β -caroteno, luteína, criptoxantina e zeaxantina (Srivastava et al., 1999).

O principal uso da semente urucum na indústria é como fonte de corante natural (Mercadante et al., 1997), mas também apresenta grande potencial como fonte de antioxidante, pois o poder antioxidante da bixina é conferida pela extensa cadeia de duplas ligações proporciona variações de distribuição eletrônica que permitem a adição de radicais livres aos carbonos adjacentes às insaturações, característica que proporciona maior reatividade dessas moléculas frente a agentes oxidantes, sobretudo derivados oxigenados, proporcionando relativa estabilidade (Kiokias and Gordon, 2003).

Os terpenos são fonte importante de antioxidantes, o geranylgeraniol é o principal constituinte terpênico da semente de urucum, e joga um papel como intermediário importante na síntese de vitaminas K e E (Hyatt et al., 2002). Além ser o geranylgeraniol intermediário para síntese de vitamina E, a semente de urucum apresenta tocoferol (α β γ e δ) e tocotrienol (α β γ e δ), que são classificados como vitamina E (Gallagher, 1990). Segundo Moraes et al. (2015) óleo da semente urucum é a maior fonte natural de δ -tocotrienol, que são compostos antioxidantes e anticancerígenos mais eficazes que os tocoferóis (Sylvester e Shah, 2005). Ademais os tocotrienóis combinados com a bixina atuam sinergicamente para proteger os AGPI da oxidação (Castro et al., 2011).

1.1.6 Estudos de atividade antioxidante da semente de urucum

Haila et al. (1996) estudaram o efeito da luteína, licopeno, γ -tocoferol e antioxidante derivado do urucum (a bixina) e destacaram o efeito antioxidante desta, reduzindo a formação de hidroperóxidos em triacilglicéridos oxidados pela luz. Souza et al. (2000) avaliaram o efeito de três doses de bixina, 70 mg, 350 mg e 700 mg sobre os níveis de colesterol plasmático em ratos, concluindo que as doses fornecidas apresentaram efeito hiperlipidêmico em comparação com o controle. Lima et al. (2001), estudaram o efeito da adição de bixina na dieta de coelhos rica em colesterol, observando redução do colesterol e a manutenção dos níveis de colesterol-HDL mais elevados

Carvalho et al. (2004) adicionaram bixina ao leite em pó de cabra, na dieta de coelhos, encontrando diminuição nas concentrações de colesterol e aumento na

concentração de colesterol-HDL de 40% destes animais. Paula et al. (2009) observaram que ratos que receberam uma dieta rica em lipídios e extrato aquoso de urucum diminuíram a concentração de colesterol total e LDL, e aumentaram o teor de colesterol-HDL. A diminuição do colesterol provocada nos anteriores estudos descrito que utilizaram a bixina, é em função de ser um carotenoide, já que este pode aumentar a concentração de HDL, cuja função do HDL é retirar o colesterol da corrente sanguínea e o leva ao fígado para ser metabolizado (Bendich, 1994).

Harder et al. (2007) incluíram 0,5% a 2% de bixina na MS nas dietas de galinhas poedeiras, observando que a inclusão de 2% da MS provocou redução de 60% na concentração de colesterol das gemas de ovos. Rocha (2014) observou que a adição da bixina nas dietas de ovinos promoveu proteção oxidativa da carne congelada, diminuiu em 70% a concentração do colesterol da carne e promoveu alteração do perfil de ácidos graxos da carne com redução na concentração de ácidos graxos da cadeia ímpar (C15:0 e C17:0). Os estudos desta revisão indicam o potencial da semente de urucum como fonte de antioxidantes na alimentação de ruminantes.

Referências

- Alonso, J. 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos. p. 1144. 1.ed. Rosario, Corpus. Rosario, AR.
- Baldi, A., Savoini, G., Pinotti, L., Monfardini, E., Cheli, F., Orto, V.D., 2000. Effects of vitamin E and different energy sources on vitamin E status, milk quality and reproduction in transition cows. *Transbound. Emerg. Dis.* 47, 599-608.
- Barlowska, J., Litwinczuk, Z., 2009. Wlasciwosci odzywczce i prozdrowotne tluszczu mleka. *Medycyna Weterynaryjna* 65, 171-174.
- Bauman, D., Perfield, J., De Veth, M., Lock, A., 2003. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. *Proc Cornell Nutr Conf.* 175-189.
- Bauman, D.E., Griinari, J.M., 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23, 203-227
- Bendich, A., 1994. Recent advances in clinical research involving carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 66, 1017-1024.
- Bianchi, M. P., Antunes, L. G., 1999. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Rev. Nutr.* 12, 123-130.
- Bouvier, F., Dogbo, O., Camara, B., 2003. Biosynthesis of the food and cosmetic plant pigment bixin (annatto). *Science.* 300, 2089-2091.
- Cardoso, M. L., Silva, R., dos Santos, A., Bello, M. G., 2010. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciênc. Agrár.* 31, 669-682.
- Carocho, M., Ferreira, I. C., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15-25.
- Carvalho, R., Toledo de O, T., Nagem, T. J., Stringheta, P. C., Junior, B. F., 2004. Efeitos de naringenina e bixina associados com leite de cabra sobre o metabolismo lipídico de coelhos. *Rev. Chile. Nutr.* 31, 177-182.
- Castro, W., Mariutti, L., Bragagnolo, N., 2011. The effects of colorifico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage. *Food. Chem.* 124, 126-131.
- Catani, M.V., Savini, I., Rossi, A., Melino, G., Avigliano, L., 2005. Biological role of vitamin C in keratinocytes. *Nutr. Rev.* 63, 81-90.
- Charmley, E., Nicholson, J., 1994. Influence of dietary fat source on oxidative stability and fatty acid composition of milk from cows receiving a low or high level of dietary vitamin E. *Can J Anim Sci.* 74, 657-664.
- Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J., Doreau, M., 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J Dairy Sci.* 92, 5199-5211.
- Chin, S., Liu, W., Storkson, J., Ha, Y., Pariza, M., 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Compos Anal.* 5, 185-197.
- Chouinard, P., Girard, V., Brisson, G., 1998. Fatty Acid Profile and Physical Properties of Milk Fat from Cows fed Calcium Salts of Fatty Acids with Varying Unsaturation. *J Dairy Sci.* 81, 471-481.
- Cruz, J., Hernández, G., 2003. El licopeno es el sustrato para la biosíntesis de bixina. *Rev. Edu. Bio.* 22, 146-154.

- De Quirós, A. R., Costa, H. S., 2006. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *J Food Compos Anal.* 19, 97-111.
- Dequigiovani, G., Ramos, S. L., Alves-Pereira, A., Fabri, E. G., Carvalho, P. R., Da Silva, M. G., Abdo, M. T., Martins, A. L., Clement, C.R., Veasey, E. A., 2017. Genetic diversity and structure in a major Brazilian annatto (*Bixa orellana*) germplasm bank revealed by microsatellites and phytochemical compounds. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 64, 1775-1788.
- Dewailly, É., Blanchet, C., Gingras, S., Lemieux, S., Holub, B.J., 2003. Fish consumption and blood lipids in three ethnic groups of Québec (Canada). *Lipids* 38, 359-365.
- Dhiman, T., Satter, L., Pariza, M., Galli, M., Albright, K., Tolosa, M., 2000. Conjugated Linoleic Acid (CLA) Content of Milk from Cows Offered Diets Rich in Linoleic and Linolenic Acid. *J Dairy Sci.* 83, 1016-1027.
- Donoghue, S., Kronfeld, D. S., Berkowitz, S. J., Copp, R. L., 1981. Vitamin A nutrition of the equine: growth, serum biochemistry and hematology. *J Nutr.* 111, 365-374
- Doreau, M., Chilliard, Y., 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *Br J Nutr.* 78, 15-35.
- Doreau, M., Ferlay, A., 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45, 379-396.
- Fonnegra, G. R., Jiménez, R. S., 2007. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. p. 15. 2. ed. Universidad de Antioquia. Medellín, Col.
- Gallagher, M. L., 1990. Vitamins in Animal Nutrition: Comparative Aspects to Human Nutrition. *BioScience* 40, 693-695.
- Giuliano, G., Rosati, C., Bramley, P. M., 2003. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. *Trends in Biotechnol.* 21, 513-516.
- Glasser, F., Ferlay, A., Chilliard, Y., 2008. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: a meta-analysis. *J Dairy Sci.* 91, 4687-4703.
- Gobert, M., Martin, B., Ferlay, A., Chilliard, Y., Graulet, B., Pradel, P., Bauchart, D., Durand, D., 2009. Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Dairy Sci.* 92, 6095-6104.
- Grummer, R. R., 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *J Dairy Sci.* 74, 3244-3257.
- Grummer, R. R., Hatfield, M., Dentine, M., 1990. Acceptability of fat supplements in four dairy herds. *J Dairy Sci.* 73, 852-857.
- Haila, K. M., Lievonen, S. M., Heinonen, M. I., 1996. Effects of lutein, lycopene, annatto, and γ -tocopherol on autoxidation of triglycerides. *J Agric Food Chem.* 44, 2096-2100.
- Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 57, 715S-724.
- Harder, M., Canniatti-Brazaca, S., Coelho, A., Savino, V., Franco, C., 2007. Cholesterol and iron availability in yolk of laying hens feed with annatto (*Bixa orellana*). *Animal.* 1, 477-482.
- Harfoot, C., Hazlewood, G., 1997. Lipid metabolism in the rumen, The rumen microbial ecosystem, p. 382-426. 2. ed. Springer. Londo, UK.
- Harrison, D.G., Beever, D.E., Thomson, D.J., Osbourn, D.F., 1976. Manipulation of fermentation in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 27, 617-620.
- Howe, P., Meyer, B., Record, S., Baghurst, K., 2006. Dietary intake of long-chain ω -3 polyunsaturated fatty acids: contribution of meat sources. *Nutrition* 22, 47-53.

- Hyatt, J. A., Kottas, G. S., Effler, J., 2002. Development of synthetic routes to d, l- α -tocopherol (vitamin E) from biologically produced geranylgeraniol. *Org Process Res Dev.* 6, 782-787.
- Jako, C., Coutu, C., Roewer, I., Reed, D. W., Pelcher, L. E., Covello, P. S., 2002. Probing carotenoid biosynthesis in developing seed coats of *Bixa orellana* (Bixaceae) through expressed sequence tag analysis. *Plant Science* 163, 141-145.
- Jenkins, T., 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J Dairy Sci.* 76, 3851-3863.
- Kang, E., Campbell, R., Bastian, E., Drake, M., 2010. Invited review: Annatto usage and bleaching in dairy foods. *J Dairy Sci.* 93, 3891-3901.
- Kelly, M. L., Berry, J. R., Dwyer, D. A., Griinari, J., Chouinard, P. Y., Van Amburgh, M. E., Bauman, D. E., 1998. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J Nutr.* 128, 881-885.
- Kiokias, S., Gordon, M. H., 2003. Antioxidant properties of annatto carotenoids. *Food Chemistry.* 83, 523-529.
- Kleczkowski, M., Kluciński, W., Sikora, J., Zdanowicz, M., 2004. Role of antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle--trace elements and enzymatic mechanisms (Part 3). *Pol J Vet Sci.* 7, 233-240.
- Kromhout, D., Yasuda, S., Geleijnse, J. M., Shimokawa, H., 2011. Fish oil and omega-3 fatty acids in cardiovascular disease: do they really work? *Eur Heart J.* 33, 436-443.
- Lima, C.S.D.O., 2016. Bioquímica e perfil de ácidos graxos plasmático de vacas em lactação ingerindo dietas contendo colorífico de urucum, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns - PE, 2016. p. 66.
- Lima, L. R., Oliveira, T. T., Nagem, T. J., Pinto, A. D., Stringheta, P. C., Tinoco, A. L., Silva, J. F., 2001. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. *Braz J Vet Res Na Sci.* 38, 196-200.
- Lopez, H., E., 2010. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol Res.* 61, 200-207.
- Ma, X. M., Yang, Z. B., Yang, W. R., Song, M. L., 2005. Effect of different vitamin A levels in diets on antioxidant ability of beef cattle. *Acta Zoonut Sinica.* 4, 01-07.
- Marik, P. E., Varon, J., 2009. Omega-3 dietary supplements and the risk of cardiovascular events: a systematic review. *Clin Cardiol.* 32, 365-372.
- McDowell, L. R., 2012. Vitamins in animal nutrition: comparative aspects to human nutrition. 2. ed. Academic Press. Ames - IA.
- McNulty, H. P., Byun, J., Lockwood, S. F., Jacob, R. F., Mason, R. P., 2007. Differential effects of carotenoids on lipid peroxidation due to membrane interactions: X-ray diffraction analysis. *Biochim. Biophys. Acta. Biochimie.* 1768, 167-174.
- Mercadante, A., Steck, A., Pfander, H., 1997. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. *J Agric Food Chem.* 45, 1050-1054.
- Mertens, D. R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.) Forage quality, evaluation and utilization. American Society of Agronomy. National conference on forage quality, evaluation and utilization. Madison: American Society of Agronomy, 1994. p. 450-493.
- Mesquita, S., Teixeira, C., Servulo, E., 2017. Carotenoides: propriedades, aplicações e mercado. *Rev. Virtual Quim.* 9.
- Miller, J., Brzezinska-Slebodzinska, E., Madsen, F., 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci.* 76, 2812-2823.

- Moraes, M. N., Zobot, G. L., Meireles, M. A., 2015. Extraction of tocotrienols from annatto seeds by a pseudo continuously operated SFE process integrated with low-pressure solvent extraction for bixin production. *J Supercrit Fluids*. 96, 262-271.
- Murphy, S. P., Allen, L. H., 2003. Nutritional importance of animal source foods. *J Nutr*. 133, 3932S-3935S.
- Mustafa, A., McKinnon, J., Christensen, D., He, T., 2002. Effects of micronization of flaxseed on nutrient disappearance in the gastrointestinal tract of steers. *Anim Feed Sci Technol*. 95, 123-132.
- Nakamura, Y. K., Flintoff-Dye, N., Omaye, S. T., 2008. Conjugated linoleic acid modulation of risk factors associated with atherosclerosis. *Nutr Metab*. 5, 22.
- Niki, E., 1987. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44, 227-253.
- Nozière, P., Graulet, B., Lucas, A., Martin, B., Grolier, P., Doreau, M., 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim Feed Sci Technol*. 131, 418-450.
- National Research Council (NRC). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- O'Connor, T., O'Brien, N., 2006. Lipid oxidation, *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*, 3 th ed., Springer, New York – NY.
- Palace, V. P., Khaper, N., Qin, Q., Singal, P. K., 1999. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med*. 26, 746-761.
- Palmquist, D., Jenkins, T., 1980. Fat in Lactation Rations. *J Dairy Sci*. 63, 1-14.
- Palmquist, D. L., Mattos, W. R., 2006. Metabolismo de Lipídeos, In: Berchieli, T.T., Pires, A.V., Oliveira, S.G. (Eds.), *Metabolismo de Lipídeos*, Funep, Jaboticabal. 287 - 310.
- Paula, H. D., Pedrosa, M. L., Rossoni Júnior, J. V., Haraguchi, F. K., Santos, R. C, Silva, M. E., 2009. Effect of an aqueous extract of annatto (*Bixa orellana*) seeds on lipid profile and biochemical markers of renal and hepatic function in hipercholesterolemic rats. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 52, 1373-1378.
- Perfield, J., Lock, A., Griinari, J., Sæbø, A., Delmonte, P., Dwyer, D., Bauman, D., 2007. Trans-9, Cis-11 Conjugated Linoleic Acid Reduces Milk Fat Synthesis in Lactating Dairy Cows1. *J Dairy Sci*. 90, 2211-2218.
- Petit, H. V., 2002. Digestion, Milk Production, Milk Composition, and Blood Composition of Dairy Cows Fed Whole Flaxseed. *J Dairy Sci*. 85, 1482-1490.
- Raddatz-Mota, D., Pérez-Flores, L.J., Carrari, F., Mendoza-Espinoza, J.A., de León-Sánchez, F.D., Pinzón-López, L.L., Godoy-Hernández, G., Rivera-Cabrera, F., 2017. Achioté (*Bixa orellana* L.): a natural source of pigment and vitamin E. *Journal of food science and technology*. *J Food Sci Technol*. 54, 1729-1741.
- Rafałowski, R., Żegarska, Z., Kuncewicz, A., Borejszo, Z., 2014. Oxidative stability of milk fat in respect to its chemical composition. *Int Dairy J*. 36, 82-87.
- Rather, L. J., Mohammad, F., 2016. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications—A review. *J Adv Res*. 7, 499-514.
- Rocha, D.V., 2014. Qualidade e estabilidade da carne de ovinos alimentados com dietas contendo bixina. *Dissertação Ciência Animal e Pastagens - Universidade Federal Rural de Pernambuco*. 78. Garanhuns - PE.
- Rodrigues, S. M., Soares, V. L., De Oliveira, T. M., Gesteira, A. S., Otoni, W. C., Costa, M. G., 2007. Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols,

- polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana* L.). *Mol Biotechnol.* 37, 220-224.
- Rose, D. P., Connolly, J. M., 1999. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacology & therapeutics.* 83, 217-244.
- Sæbø, A., Sæbø, P. C., Griinari, J. M., Shingfield, K. J., 2005. Effect of abomasal infusions of geometric isomers of 10, 12 conjugated linoleic acid on milk fat synthesis in dairy cows. *Lipids* 40, 823-832.
- Santamaria, L., Bianchi, A., Arnaboldi, A., Ravetto, C., Bianchi, L., Pizzala, R., Andreoni, L., Santagati, G., Bermond, P., 1988. Chemoprevention of indirect and direct chemical carcinogenesis by carotenoids as oxygen radical quenchers. *Ann N Y Acad Sci.* 534, 584-596.
- Satyanarayana, A., Prabhakara Rao, P., Rao, D., 2003. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). *J Food Sci Technol.* 40, 131-141.
- Silva, E.K., Meireles, M.A.A., 2015. Influence of the degree of inulin polymerization on the ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil. *Carbohydr Polym.* 133, 578-586.
- Song, H., Grant, I., Rotondo, D., Mohede, I., Sattar, N., Heys, S., Wahle, K., 2005. Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers. *Eur J Clin Nutr.* 59, 508.
- Sordillo, L. M., Aitken, S. L., 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 128, 104-109.
- Souza, E., Oliveira, T., Nagem, T., Stringheta, P., Leão, M., Pinto, A., Silva, J., 2000. Efeitos de bixina sobre o metabolismo lipídico. 23^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG. Proceedings: Sociedade Brasileira de Química.
- Srivastava, A., Shukla, Y., Jain, S., Kumar, S., 1999. Chemistry, pharmacology and uses of *Bixa orellana*—a review. *J Med Arom Plant Sci.* 21, 1145-1154.
- Sylvester, P. W., Shah, S. J., 2005. Mechanisms mediating the antiproliferative and apoptotic effects of vitamin E in mammary cancer cells. *Front Biosci.* 10, 699.
- Taham, T., Cabral, F. A., Barrozo, M. A., 2015. Extraction of bixin from annatto seeds using combined technologies. *J Supercrit Fluids.* 100, 175-183.
- Timmons, J., Weiss, W., Palmquist, D., Harper, W., 2001. Relationships Among Dietary Roasted Soybeans, Milk Components, and Spontaneous Oxidized Flavor of Milk. *J Dairy Sci.* 84, 2440-2449.
- Van Cuong, T., Chin, K. B., 2016. Effects of Annatto (*Bixa orellana* L.) seeds powder on physicochemical properties, antioxidant and antimicrobial activities of pork patties during refrigerated storage. *Korean J. Food Sci.* 36, 476.
- Wojcik, M., Burzynska-Pedziwiatr, I., Wozniak, L., 2010. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Curr. Med. Chem.* 17, 3262-3288.
- Yang, A., Tume, R., 1993. A comparison of beta-carotene-splitting activity isolated from intestinal mucosa of pasture-grazed sheep, goats and cattle. *Biochem Mol Biol Int.* 30, 209-217.

OBJETIVOS GERAIS

- Objetivou-se avaliar o efeito antioxidante da semente de urucum na alimentação de vacas da raça Holandês em lactação com ou sem a suplementação com óleo de linhaça.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito da semente de urucum no consumo e na digestibilidade de nutrientes de dietas com ou sem óleo de linhaça para vacas leiteiras;
- Avaliar a influência da adição da semente de urucum em dietas com ou sem de óleo de linhaça nos parâmetros sanguíneos e na composição e no perfil lipídico do leite.
- Determinar o efeito da adição de semente de urucum associado ou não ao óleo de linhaça na capacidade antioxidante e estabilidade oxidativa dos ácidos graxos do sangue e do leite.

II. Semente de urucum como fonte de antioxidantes em dieta com óleo de linhaça para vacas leiteiras (Animal Feed Science and Technology)

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da adição da semente de urucum (*Bixa orellana L*) e de óleo de linhaça na dieta de vacas leiteiras, sobre o consumo e a digestibilidade de matéria seca e dos nutrientes, a composição, perfil lipídico e estabilidade oxidativa do leite, atividade antioxidante no sangue e no leite. O experimento foi conduzido no Setor de Ensino/Pesquisa e Extensão em Bovinocultura de Leite da Fazenda Experimental de Iguatemi. Foram utilizadas quatro vacas da raça holandesa, confinadas em sistema *tie stall*, com peso vivo médio de 566 ± 64 kg e 120 ± 43 dias de lactação, distribuídas em um quadrado Latino 4×4 , em esquema fatorial 2×2 . As dietas experimentais foram: 1) controle, sem adição semente de urucum e sem suplementação de óleo de linhaça; 2) com adição de semente de urucum (1,5% na MS), sem suplementação óleo de linhaça; 3) com suplementação de óleo de linhaça (3% na MS), sem adição semente de urucum, 4) com adição de semente de urucum (1,5% na MS) e com suplementação de óleo de linhaça (3% na MS). A adição de semente de urucum reduziu o consumo de MS, a produção leite e a secreção diária de proteína e lactose ($P < 0,05$). A semente de urucum aumentou o teor de gordura e sólidos totais no leite ($P < 0,05$). Não houve efeito ($P > 0,05$) da semente de urucum na digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes. A suplementação de óleo sem semente de urucum diminuiu o teor de gordura no leite ($P < 0,05$). A suplementação de óleo aumentou o consumo de EE, digestibilidade de EE ($P < 0,05$), houve tendência de aumentar a digestibilidade de PB ($P = 0,09$) e diminuir a digestibilidade da FDN ($P = 0,07$). A adição de semente de urucum aumentou a concentrações dos AGCC (C6:0 e C8:0) ($P < 0,05$), na ausência de óleo de linhaça, enquanto na presença de óleo reduziu a concentração dos AG C18:2 n6t e n-6. O óleo de linhaça reduziu a concentração dos AGCM ($P < 0,05$), e aumentou AGCL ($P < 0,05$), apresentou tendência a reduzir os AGS ($P = 0,08$) e AGMI ($P = 0,08$), e aumentar AGPI ($P = 0,06$) no leite. Também houve aumento do AG n-3 ($P > 0,05$) e redução da razão n-6/n-3 ($P > 0,05$), tendência de aumentar o HDL no sangue ($P = 0,08$) e dienos conjugados no leite ($P = 0,07$) com a suplementação de lipídeos. A produção leite corrigida para gordura não foi influenciada pela adição de semente de urucum e a suplementação de óleo ($P > 0,05$). Desta forma, conclui-se o que adição de semente de urucum de 1,5% da MS não influenciou a capacidade antioxidante do leite. A suplementação de óleo de linhaça melhorou o perfil de ácidos graxos no leite,

aumentando a concentração de n-3. A associação da semente de urucum e óleo linhaça não influenciou os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: ácido graxo poli-insaturado, digestibilidade, lipoperoxidação, ômega-3.

II. Annatto seed as antioxidants source with linseed oil for dairy cows diets

Abstract

The objective was to evaluate the effect of annatto seed (*Bixa orellana L*) and linseed oil in the diet of dairy cows, on the intake and digestibility of dry matter and nutrients, composition, lipid profile and oxidative stability of milk, antioxidant activity in blood and milk. The experiment was conducted in the Teaching / Research and Extension Milk Cattle System Production of the Iguatemi Experimental Farm. Four lactating Holstein cows (566 ± 64 kg of body weight and 120 ± 43 days in milk) were housed in a tie stall barn and assigned to a 4x4 Latin square design, with a 2x2 factorial arrangement. The experimental diets were: 1) control, without addition of annatto seed addition linseed oil supplementation; 2) with annatto seed addition (1.5% in DM), without linseed oil supplementation; 3) with linseed oil supplementation (3% in DM), without annatto seed addition, 4) with annatto seed addition (1.5% in DM) and linseed oil supplementation (3% in MS). The annatto seed addition reduced DM intake, and milk, protein and lactose milk ($P < 0.05$). Annatto seed increase of fat and solids contents ($P < 0.05$). Annatto seed did not show effect ($P > 0.05$) on DM and nutrient digestibility. The oil supplementation without annatto seed decreased milk fat content ($P < 0.05$). The linseed oil supplementation increased EE intake, EE digestibility ($P < 0.05$), there was a tendency to increase the CP digestibility ($P = 0.09$) and to decrease NDF digestibility ($P = 0.07$). Annatto seed increased the SCFA (C6:0 and C8:0) ($P < 0.05$) concentration, in the absence of linseed oil, whereas in the oil presence it reduced AG 18:2 n6t and omega-6 concentration. Additionally, oil supplementation reduced MCFA ($P < 0.05$), increased LCFA ($P < 0.05$) in milk, and showed a tendency to reduce SFA ($P = 0.07$) and MUFA ($P = 0.08$), as well as to increase PUFA ($P = 0.06$). There was also an increase in omega-3 FA ($P > 0.05$) and a reduction in the omega-6/omega-3 ratio ($P > 0.05$), a tendency to increase HDL in the blood ($P = 0.08$), and conjugated diene hydroperoxides in milk ($P = 0.07$) with lipid supplementation. The 3.5% fat-corrected milk production was not affected by the annatto seed addition and oil supplementation ($P > 0.05$). Thus, it was concluded that 1.5% of annatto seed addition in DM did not influence the milk antioxidant capacity. The linseed oil supplementation improved the fatty acid profile in milk, increasing the omega-3 concentrations. The association of annatto seed and linseed oil did not influence the evaluated parameters.

Key words: polyunsaturated fatty acid, digestibility, lipoperoxidation, omega-3.

Introdução

O leite contém maior proporção de ácidos graxos saturados, que representam 70% da gordura, enquanto ácidos graxos mono e poli-insaturados, representam 25% e 5% da gordura do leite, respectivamente (Grummer, 1991). O consumo de alimentos enriquecidos com ácidos graxos ômega 3 podem reduzir o risco de doenças cardiovascular (Dewailly et al., 2003), câncer de próstata, colón e mama (Rose e Connolly, 1999). Desta maneira, tem-se aumentado o interesse pelo consumo de produtos lácteos ricos em AGPI, pelos benefícios que apresentam na saúde humana (Howe et al., 2006; Lopez, 2010).

O óleo de linhaça é uma fonte rica em C18:3n-3 (ácido α -linolênico) e na alimentação de vacas leiteiras melhora o perfil de AGPI do leite (Glasser et al., 2008). O aumento do teor AGPI na gordura do leite é desejável para saúde humana, mas torna o leite mais suscetível à oxidação (Charmley e Nicholson, 1994). Uma vez que os AGPI têm duplas ligações ou mais que são suscetíveis à perda de elétrons, por ação dos radicais livres e luz, provocando a oxidação dos AGPI (O'Connor e O'Brien, 2006). No organismo, existe um equilíbrio entre a formação de radicais livres e a capacidade antioxidante endógena do animal, esta é composta pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPX), que são capazes de retardar a lipoperoxidação (Halliwell e Chirico, 1993)

Além da capacidade antioxidante endógena, existem antioxidantes que são exógenos, e que podem ser suplementados na dieta. Na alimentação de ruminantes, o antioxidante mais estudado é vitamina E, que ajuda a prevenir a oxidação dos AGPI no leite aumentando o tempo de prateleira dos produtos lácteos (Niki, 1987). Os carotenoides e vitamina A são importante grupo de antioxidantes, conhecidos por sequestrar o oxigênio singlete, proteger o organismo dos danos causados pelos radicais livres ou espécies reativas de oxigênios (Palace et al., 1999)

O urucum (*Bixa orellana L*) é uma planta da família Bixaceae, a semente de urucum contém carotenoides (Bixina e Norbixina), a bixina é um carotenoide que pertence à família de apocarotenoides (Satyanarayana et al., 2003), e cujo poder antioxidante é conferido pela extensa cadeia de duplas ligações, que permite combater o oxigênio singlete (Kiokias e Gordon, 2003). Ademais a semente de urucum tem tocotrienóis que combinados com a bixina atuam sinergicamente para proteger os AGPI da oxidação (Castro et al., 2011). O fornecimento de outras fontes de antioxidantes como

lignanais, vitamina E e vitamina A nas dietas de vacas leiteiras aumenta a atividade antioxidante do leite. Portanto, a adição de carotenoides na alimentação de ruminantes pode melhorar as características organolépticas do produto final, tanto na carne como o leite, assim pode trazer benefícios para proteger o perfil lipídico dos ruminantes, visando melhorar a qualidade oxidativa da carne ou o leite.

Nesse estudo, objetivou-se avaliar o efeito da adição da semente de urucum em dietas com e sem óleo de linhaça na alimentação de vaca leiteira, sobre o consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes, composição, perfil de ácidos graxos no leite, capacidade antioxidante e estabilidade oxidativa no sangue e no leite.

2. Material e Métodos

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, PR, (nº 6450240117). Foram utilizadas quatro vacas da raça Holandês, múltiparas, com peso corporal de 566±64 kg, com aproximadamente 120±43 dias de lactação, ordenhadas duas vezes ao dia, às 06h e às 16h, alojadas em confinamento do tipo *tie stall*.

2.1 Delineamento e dietas experimentais

Os animais foram distribuídos em um delineamento em quadrado Latino 4 x 4, em esquema fatorial 2 × 2, (Semente de urucum: com ou sem adição: Óleo de linhaça com ou sem suplementação) com quatro períodos experimentais de 21 dias, sendo 16 dias para adaptação e 5 dias para coleta. As vacas foram alimentadas duas vezes ao dia, às 8h e 16h. A quantidade de alimento fornecido foi ajustada para obter 10% de sobras.

Tabela 1. Composição química dos ingredientes utilizados nas rações

Item	%			
	MS ¹	PB	EE	FDN
Silagem de milho	31,24	7,54	2,68	49,43
Milho moído	88,44	8,27	4,31	9,89
Farelo de soja	88,62	50,38	1,82	9,18
Óleo de linhaça	100,00	0,00	100,00	0,00
Semente de Urucum	90,47	11,36	5,16	25,44
Melaço Pó	94,90	2,51	0,80	0,84
Suplemento mineral e vitamínico	100,00	0,00	0,00	0,00
Calcário	100,00	0,00	0,00	0,00

¹ MS= Matéria seca, PB= proteína bruta, EE= extrato etéreo, FDN= fibra em detergente neutro.

A proporção volumoso:concentrado foi de 60:40, sendo as dietas isoproteicas, de modo a atender as exigências nutricionais de vacas em lactação, conforme NRC (2001) para vacas em lactação de 580 kg de peso corporal, com produção diária de leite de 25 kg, com 3,5 g/kg de gordura, e 120 dias em lactação. Os tratamentos foram obtidos pela combinação destes fatores: 1) controle, sem adição de semente de urucum e sem suplementação de óleo de linhaça; 2) com adição de semente de urucum (1,5% na MS), sem suplementação de óleo de linhaça; 3) com suplementação de óleo de linhaça (3% na MS), sem adição de semente de urucum, 4) com adição de semente de urucum (1,5% na MS) e sem suplementação de óleo de linhaça (3% na MS) (Tabela 2).

Tabela 2. Proporção dos ingredientes e composição química das dietas com adição de semente de urucum e suplementação de óleo de linhaça

Item ¹	Dietas			
	Sem Óleo		Com Óleo	
	Sem Urucum	Com Urucum	Sem Urucum	Com Urucum
Ingredientes (g/kg de MS)				
Silagem de milho	600	600	600	600
Milho moído	202,8	189,1	166,1	152,5
Farelo de soja	165,2	163,9	171,9	170,5
Óleo de linhaça	0	0	30	30
Semente de Urucum	0	15	0	15
Melaço Pó	5	5	5	5
Suplemento mineral e vitamínico ²	22	22	22	22
Calcário	5	5	5	5
Nutrientes				
Matéria seca (g/kg de MN)	453	453	448	448
Matéria orgânica (g/kg de MS)	934	933	934	933
Proteína bruta (g/kg de MS)	145	145	146	146
Extrato etéreo (g/kg de MS)	27,8	28,0	56,4	56,5
Fibra em detergente neutro (g/kg de MS)	332	334	329	331
Carboidratos não fibrosos (g/kg de MS)	427	426	401	400
Nutrientes digestíveis totais (g/kg de MS)	694	694	724	723

¹MS= matéria seca; MN= matéria natural.

²Composição do suplemento mineral e vitamínico (por kg de produto): 145g de cálcio, 51 g de fósforo, 20 g de enxofre, 33 g de magnésio, 28 g de potássio, 93 g de sódio, 30 mg de cobalto, 400 mg de cobre, 10 mg de cromo, 2000 mg de ferro, 40 mg de iodo, 1350 mg de manganês, 15 mg de selênio, 1700 mg de zinco, 510 mg de flúor

A semente de urucum apresenta uma capacidade antioxidante total de 358 µM Trolox/mL, um poder redutor de 1,25 mg/g EAG e uma atividade antioxidante total pela captura do radical livre (DPPH) de 32,6 mg/mL. Para assegurar a ingestão da

semente urucum e óleo de linhaça, antes de fornecer toda a alimentação, estes foram previamente pesados e misturados no concentrado, diariamente. Foi pesado e registrado a quantidade de volumoso e concentrado fornecido e as sobras de cada animal, diariamente. As amostras das sobras e das dietas fornecidas foram coletadas e congeladas durante todo o período, perfazendo uma amostra composta por animal e período. As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal, na seguinte distribuição: 17º dia (8 e 17h), 18º dia (2, 11 e 20 h), 19º dia (5, 14 e 23 h), totalizando 8 amostras/animal em cada período. Posteriormente as amostras de alimentos, sobras e fezes foram desidratadas em estufa com ventilação forçada (55°C por 72 h), e processadas em moinho do tipo Willey com peneira de crivo de 2 mm para a determinação do FDNi (fibra em detergente neutro indisponível) e em seguida a 1 mm para as análises bromatológicas.

As coletas de sangue foram realizadas no 19º dia de cada período, quatro horas após o fornecimento da alimentação da manhã, por meio de punção na veia coccígea em tubos a vácuo (Vacutainer®) contendo K₂EDTA. Imediatamente após as coletas as amostras foram submetidas à centrifugação a 3000 rpm durante 15 minutos, para a separação do plasma. O plasma obtido foi transferido para *ependorf* e imediatamente congelados para posteriores determinações de ureia, triglicerídeos, colesterol total, HDL e antioxidantes.

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, às 6h e às 16h, sendo a produção de leite registrada diariamente durante todo o período experimental e a produção média foi considerada apenas os últimos 5 dias de cada período. As amostras de leite, foram obtidas no 20º dia de cada período experimental, na qual cada amostra proveniente da duas ordenhas diárias, com amostragens proporcionais, foram acondicionadas em frascos de polietileno identificados contendo conservante bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol) para posterior análise de gordura, proteína, lactose, nitrogênio ureico, sólidos totais e contagem de células somáticas. As amostras sem conservantes foram congeladas a -20°C para determinação do perfil de ácidos graxos e dos antioxidantes.

2.2 Análises químicas

As análises foram realizadas para determinação dos teores de matéria seca de acordo com o método 934.01 da AOAC (1998). A matéria inorgânica foi determinada por

combustão de acordo com o método 942.05 da AOAC (1998). O nitrogênio total foi determinado no aparelho Tecnal TE-036/1 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil) seguindo o método 988.05 da AOAC (1998) e a proteína bruta foi estimada como $N \times 6,25$. O extrato etéreo foi determinado no aparelho Ankom[®] TX15 (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA) de acordo com o método 920.39 de AOAC (1998). A fibra em detergente neutro foi determinada conforme a técnica descrita por Mertens (2002) adaptada para utilização num aparelho Ankom[®] 200 Fiber Analyzer (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA) usando α -amilase e sulfito de sódio. Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram obtidos através da equação descritas por Sniffen et al. (1992): $CNF (g/kg) = 1000 - (g/kg PB + g/kg FDN + g/kg EE + g/kg MM)$. Os nutrientes digestíveis totais foram calculados conforme equações de Weiss (1999), descrita no NRC (2001), em que: $NDT (g/kg) = g/kg CNF \text{ digestível} + g/kg PB \text{ digestível} + g/kg FDN \text{ digestível} + (g/kg EE \text{ digestível} \times 2,25)$.

A excreção total de fezes de cada animal foi estimada a partir da concentração do indicador interno em detergente neutro indigestível (FDNi), estimada nas amostras do alimento fornecido, sobras e fezes. As amostras moídas a 2 mm foram acondicionadas em saquinhos F57 da Ankom[®]. Os saquinhos foram incubados por 288 horas no rúmen de uma vaca holandesa, previamente adaptada com concentrados à base de farelo de soja e milho e volumoso à base de silagem de milho, de acordo com a metodologia por Huhtanen et al. (1994). Após a retirada do rúmen, os sacos foram lavados com água corrente, e posteriormente os sacos submetidos ao tratamento com detergente neutro por uma hora e lavados duas vezes com água quente durante 15 minutos, no equipamento analisador de fibra da Ankom[®] 200 Fiber Analyzer a 100°C. Após este período, foram imersos em acetona durante 5 minutos e secos em estufas de ventilação forçada de ar a 55°C durante 24 horas e mantidos 2 horas em estufa a 105°C.

As concentrações sanguíneas de triglicerídeos, colesterol total e HDL foram determinadas por meio de kits comerciais (Gold Analisa[®], Belo Horizonte), sendo as leituras realizadas em um espectrofotômetro (Bioplus 2000[®], São Paulo, SP).

O poder redutor e a capacidade antioxidante total do leite foram analisados a partir dos extratos das amostras do leite, sendo obtidos através da adição de 9 mL de metanol em 1 mL de leite. Posteriormente a mistura foi agitada em vortex durante 5 minutos e centrifugada a 1080 g x 10 minutos. O poder redutor do leite foi determinado

como descrito por Zhu et al. (2002) com modificações: 1 mL do extrato foi misturada com 2,5 mL de solução tampão (50 mmol/L, pH 7,0) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio $[K_3Fe(CN)_6]$ (1%). Posteriormente, as amostras foram incubadas a 50°C, por 20 minutos. Após incubação, foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético (10%) à mistura, em seguida foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. Depois da centrifugação, 2,5 mL do sobrenadante foram misturados com 0,25 mL de $FeCl_3$ (0,1%). A leitura da absorbância foi realizada espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA) a 700 nm. Os resultados foram expressos como teor de redutores equivalentes ao ácido gálico (μg EAG/mL).

A capacidade antioxidante total (CAT) das amostras de leite foi determinada como descrito por Rufino et al. (2007) com a adição de 40 μL do extrato e 1,96 mL radical ABTS+ (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) ao extrato. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA) a 734 nm após 6 minutos de reação. A CAT foi expressa em equivalente Trolox (μM Trolox/mL).

As concentrações de nitrogênio-ureico e os teores de gordura, proteína e lactose no leite foram realizadas utilizando espectrofotômetro (Bentley 2000; Bentley Instrument, Inc., Chaska, MN) no laboratório do Programa de Análises de Rebanhos Leiteiros da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa em Curitiba –PR. A contagem de células somáticas foi obtida utilizando um contador eletrônico (Somacount 500[®], Chaska, MN) conforme descrito por Voltolini et al. (2001).

A produção de dienos conjugados (DC) no leite foi avaliada pela metodologia descrita por Kiokias et al. (2006), cuja finalidade é medir oxidação lipídica do leite, para isso foi adicionado 50 μL de leite à 2,5 mL de uma solução isooctano/2-propanol (2:1, v/v) e misturados por vortex durante 1 min. A mistura foi filtrada em filtro de membrana PTFE, 0,22 μm , e a absorbância foi medida com um espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA), sendo expressos os resultados em mmol/kg de gordura.

A análise de TBARS no leite foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Vyncke (1970), uma alíquota de 500 μL do leite foi transferida para tubos falcon de 15 mL contendo 2,0 mL de solução de Ácido tiobarbitúrico (TBA 1%, TCA 15% e HCl 562,5 mM). As amostras foram aquecidas em banho fervente (100°C) durante 15 minutos, esfriadas em água gelada durante cinco minutos e depois foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido a uma cubeta para posterior leitura a 532

nm com um espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA). Os resultados foram expressos em concentração de (mmol/kg de gordura).

Para determinar a composição de ácidos graxos do leite, a gordura foi extraída por centrifugação, de acordo com a metodologia descrita por Murphy et al. (1995) e os ácidos graxos foram esterificados conforme o método 5509 da ISO (1978) usando KOH/metanol e n-heptano. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (Trace GC 52 Ultra, Thermo Scientific, West Palm Beach, Florida, USA) autoamostrador, equipado com detector de ionização de chama a 240°C e coluna capilar de sílica fundida (100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 µm, Restek 2560). O fluxo de gases foi de 45 mL/min de H₂ (gás de arraste), 45 mL/min para N₂ (gás auxiliar) e 45 e 400 mL/min de ar sintético (gases para chama). A temperatura inicial da coluna foi estabelecida em 50°C, mantida por 4 minutos, elevada de 10°C em 10°C até 200°C, e mantida por 15 minutos, depois foi elevada de 20°C em 20°C chegando a 240°C, e mantida por 8 minutos de temperatura final. A quantificação dos ácidos graxos da amostra foi efetuada por comparação com o tempo de retenção de ésteres metílicos de ácidos graxos de amostras padrões (Sigma Aldrich).

2.3 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o procedimento MIXED do SAS (Statistical Analysis System, 9.3) de acordo seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + U_i + O_j + U \times O_{ij} + p_k + a_l + e_{ijkl}$$

Com $p_k \approx N(0, \sigma_p^2)$, $a_l \approx N(0, \sigma_a^2)$ e $e_{ijkl} \approx N(0, \sigma_e^2)$, em que Y_{ijkl} é o valor observado; μ é a média geral; U_i é o efeito fixo de urucum ($i= 1$ e 2); O_j é o efeito fixo do óleo de linhaça ($j= 1$ e 2); $U \times O_{ij}$ é o efeito fixo da interação entre urucum e óleo de linhaça; p_k é o efeito aleatório de período; a_l é o efeito aleatório do animal; e_{ijkl} é o erro residual; N indica distribuição normal; e σ_p^2 , σ_a^2 e σ_e^2 são as variâncias associada aos efeitos aleatórios associados ao período e animal, e variância residual, respectivamente. Quando houve interação entre os fatores óleo e urucum foi aplicado o teste de diferença mínima significativa de Fisher (LSD) para desmembramento da interação, foi considerado como nível de significância de $P \leq 0,05$ e tendência de $P \leq 0,10$.

3. Resultados

Não houve interação da semente de urucum e óleo de linhaça sobre o consumo de MS, mas houve interação para o consumo de EE ($P < 0,05$) (Tabela 3), em que a adição de semente urucum reduziu o consumo de EE na presença e na ausência de óleo de linhaça. Além disso, a adição de semente de urucum reduziu o consumo de MS, MO, PB, FDN, EE e CNF ($P < 0,05$). A suplementação de óleo linhaça, aumentou o consumo de EE ($P < 0,05$) e reduziu o consumo de CNF ($P < 0,05$).

Tabela 3. Consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes em vacas da raça Holandês alimentadas com semente urucum e óleo de linhaça

Item ³	Dietas				EPM ¹	<i>P</i> ²		
	Sem Óleo		Com Óleo			URU	LIN	INT
	Sem Urucum	Com Urucum	Sem Urucum	Com Urucum				
Consumo (kg/d)								
MS (kg/100 kg PC)	2,44	2,23	2,43	2,27	0,09	<0,001	0,62	0,45
MS	14,12	12,30	13,76	12,20	0,19	<0,001	0,13	0,30
MO	13,25	11,47	12,87	11,39	0,18	<0,001	0,17	0,34
PB	2,11	1,84	2,04	1,86	0,02	<0,001	0,36	0,24
FDN	4,53	3,89	4,38	3,87	0,09	<0,001	0,34	0,47
EE	0,40 ^c	0,35 ^d	0,76 ^a	0,69 ^b	0,01	<0,001	<0,001	0,03
CNF	6,22	5,39	5,67	5,01	0,10	<0,001	0,004	0,33
Digestibilidade aparente (kg/kg)								
MS	0,69	0,69	0,68	0,68	0,01	0,86	0,14	0,67
MO	0,71	0,71	0,71	0,72	0,01	0,77	0,96	0,74
PB	0,72	0,72	0,74	0,74	0,01	0,76	0,09	0,85
FDN	0,56	0,55	0,53	0,55	0,01	0,74	0,07	0,21
EE	0,82	0,82	0,87	0,86	0,01	0,73	0,005	0,62
CNF	0,81	0,82	0,82	0,82	0,01	0,83	0,85	0,92

^{a-d} Valores na mesma linha com diferentes sobre escrito diferem ($P < 0,05$).

¹ EPM = erro padrão da média.

² URU = efeito da adição do Urucum; LIN = adição do óleo de linhaça; INT = efeito da interação entre urucum e óleo.

³ MS= matéria seca; MO= matéria orgânica; FDN= fibra detergente neutra; EE= extrato etéreo; CNF= carboidratos não fibrosos.

Não houve interação entre os efeitos de semente urucum e óleo ($P > 0,05$) sobre a digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes, nem a adição de semente de urucum afetou tais variáveis. Entretanto, a suplementação de óleo linhaça aumentou a digestibilidade do EE ($P > 0,05$), e apresentou tendência a diminuir a digestibilidade do FDN ($P = 0,07$) e aumentar a digestibilidade da PB ($P = 0,09$).

As dietas contendo semente de urucum, independentemente da suplementação de óleo de linhaça, reduziram a produção de leite ($P<0,05$), proteína ($P<0,05$) e lactose ($P<0,05$). Houve aumento no teor de gordura ($P<0,05$) e nos teores de sólidos totais ($P<0,05$), com a adição de semente de urucum à dieta (Tabela 4). A produção de leite corrigida para gordura não foi influenciada pela adição de semente de urucum e pela suplementação de óleo ($P>0,05$). Não houve interação entre semente de urucum e óleo de linhaça ($P>0,05$) para a produção e composição do leite e atividade antioxidante. A suplementação de óleo linhaça diminuiu o teor de gordura no leite e a síntese de novo de ácidos graxos ($P<0,05$), e apresentou tendência de aumentar a concentração de DC ($P=0,07$).

Tabela 4. Produção, composição e qualidade oxidativa do leite de vacas da raça Holandês alimentadas com semente urucum e óleo de linhaça

Item ³	Sem Óleo		Com Óleo		EPM ¹	P ²		
	Sem Urucum	Com Urucum	Sem Urucum	Com Urucum		URU	LIN	INT
Produção, kg/dia								
Produção de leite	18,20	14,42	17,15	14,15	1,45	0,01	0,49	0,67
LCG	17,28	15,18	14,64	14,93	1,18	0,39	0,19	0,27
Gordura	0,58	0,55	0,44	0,54	0,03	0,42	0,12	0,16
Proteína	0,58	0,48	0,60	0,47	0,04	0,01	0,90	0,73
Lactose	0,81	0,63	0,76	0,61	0,06	0,01	0,37	0,66
Concentrações (g/kg)								
Gordura	33,87	39,65	26,85	38,62	1,15	<0,001	0,03	0,10
Proteína	32,62	34,07	35,32	33,60	0,71	0,92	0,43	0,27
Lactose	45,02	43,70	44,25	43,57	0,03	0,08	0,39	0,53
Sólidos totais	110,52	117,42	106,42	115,80	1,74	0,01	0,25	0,60
NUL (mg/dL)	12,83	11,22	13,63	13,11	0,91	0,25	0,17	0,55
CCS log	2,14	2,39	2,29	2,30	0,09	0,42	0,84	0,47
Antioxidantes								
PR (mg/L EAG)	34,37	34,711	33,32	36,96	2,67	0,67	0,89	0,72
CAT								
(μ M Trolox/mL)	241,00	242,81	239,96	252,89	2,25	0,78	0,73	0,86
TBARS								
(mmol/kg gord)	13,23	14,72	16,71	13,67	1,00	0,57	0,38	0,12
DC								
(mmol/kg gord)	47,47	45,79	59,50	56,68	2,62	0,68	0,07	0,91

¹ EPM = erro padrão da média;

² URU = efeito da adição do Urucum; LIN = adição do óleo de linhaça; INT = efeito da interação entre urucum e óleo

³ LCG = Produção de leite corrigida para 35 g/kg de gordura = $(0,432 + 0,1625 \times \text{g/kg gordura}) \times \text{produção de leite (kg/dia)}$ (Sklan et al., 1992); NUL = nitrogênio ureico no leite; CCS = contagem de células somáticas, base log 10; CAT = capacidade antioxidante total; TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Foi observado efeito de interação entre semente de urucum e óleo sobre C6:0, C8:0 e C18:2 n6t ($P < 0,05$) (Tabela 5). A adição de semente de urucum aumentou as concentrações dos ácidos C6:0 e C8:0 na ausência de óleo de linhaça, enquanto na presença de óleo não alterou as concentrações destes ácidos graxos. A suplementação de

Tabela 5. Composição de ácidos graxos no leite (g/100g de lipídios totais) de vacas da raça Holandês alimentadas com semente urucum e óleo de linhaça

Item	Sem Óleo		Com Óleo		EPM ¹	P ²		
	Sem Urucum	Com Urucum	Sem Urucum	Com Urucum		URU	LIN	INT
C6:0	0,17 ^b	0,65 ^a	0,33 ^b	0,16 ^b	0,02	0,02	0,01	0,007
C8:0	0,44 ^b	0,76 ^a	0,44 ^b	0,29 ^b	0,04	0,20	0,01	0,01
C10:0	2,27	2,66	1,67	1,50	0,18	0,76	0,04	0,43
C11:0	0,04	0,20	0,04	0,05	0,02	0,03	0,04	0,06
C12:0	3,66	3,61	2,77	2,38	0,22	0,58	0,03	0,67
C13:0	0,19	0,19	0,15	0,1	0,01	0,32	0,01	0,18
C14:0	13,75	12,18	11,00	10,35	0,56	0,35	0,08	0,69
C14:1	1,19	1,20	1,02	0,72	0,07	0,23	0,02	0,19
C15:0	1,19	1,08	1,00	0,87	0,05	0,18	0,04	0,90
C15:1	0,02	0,02	0,07	0,01	0,01	0,30	0,50	0,31
C16:0	33,34	30,92	26,57	27,63	0,87	0,69	0,02	0,33
C16:1	1,90	2,10	1,55	1,74	0,02	0,36	0,12	0,72
C17:0	0,75	0,78	0,72	0,72	0,02	0,71	0,40	0,71
C17:1	0,32	0,31	0,17	0,22	0,04	0,82	0,17	0,74
C18:0	10,60	10,93	13,43	15,97	0,56	0,25	0,01	0,36
C18:1 n9t	4,21	3,76	7,72	5,47	0,39	0,07	0,005	0,19
C18:1 n9c	23,11	25,89	27,51	28,81	1,20	0,42	0,16	0,77
C18:2 n6t	0,11 ^b	0,09 ^b	0,41 ^a	0,20 ^b	0,03	0,03	0,002	0,04
C18:2 n6c	1,53	1,56	1,75	1,41	0,06	0,23	0,82	0,18
C18:3 n6	0,06	0,05	0,05	0,04	0,01	0,09	0,25	0,90
C18:3 n3	0,10	0,10	0,34	0,23	0,01	0,18	0,002	0,19
C20:0	0,12	0,13	0,13	0,16	0,01	0,18	0,16	0,50
C20:1	0,04	0,05	0,07	0,05	0,01	0,74	0,25	0,30
C20:2	0,01	0,02	0,03	0,03	0,01	0,75	0,31	0,50
C20:3 n6	0,04	0,04	0,02	0,03	0,01	0,62	0,01	0,33
C20:3 n3	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,40	0,41	0,44
C20:4 n6	0,12	0,12	0,07	0,09	0,01	0,27	0,005	0,18
C20:5 n3	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,54	0,79	0,72
C21:0	0,60	0,55	0,97	0,74	0,09	0,21	0,03	0,42
C22	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,99	0,75	0,57
C24:0	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,89	0,52	0,16
C24:1	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,56	0,07	0,51

^{a-c} Valores na mesma linha com diferentes sobre escrito diferem ($P < 0,05$)

¹ EPM = erro padrão da média;

² URU = efeito da adição do Urucum; LIN = adição do óleo de linhaça; INT = efeito da interação entre urucum e óleo

óleo aumentou o ácido graxo C18:2 n6t na ausência de urucum, mas na presença não alterou a concentração deste ácido graxo.

De modo geral, a suplementação de óleo linhaça reduziu ($P<0,05$) a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta e média, C10:0, C12:0, C13:0, C14:1, C15:0 e C16:0, e aumentou ($P<0,05$) a concentração dos ácidos graxos de cadeia longa C18:0, C18:1 n9t, C18:2 n6t, C18:3 n3, C20:3 n6, C20:4 n6 e C21:0. A dieta com semente apresentou tendência a diminuir o C18:1 n9t ($P=0,066$). Não houve diferença significativa ($P>0,05$) para os ácidos graxos C15:1, C16:1, C17:1, C18:1 n9c, C18:2 n6c, C18:3 n6, C20:0, C20:1, C20:2, C20:3 n3, C20:5 n3, C22 e C24:0.

Tabela 6. Concentrações percentuais e razões de ácidos graxos agrupados no leite de vacas da raça Holandês alimentadas com semente urucum e óleo de linhaça

Item ³	Sem Óleo		Com Óleo		EPM ¹	<i>P</i> ²		
	Sem Urucum	Com Urucum	Sem Urucum	Com Urucum		URU	LIN	INT
AGCC	0,61 ^b	1,41 ^a	0,76 ^b	0,45 ^b	0,06	0,05	0,01	0,002
AGCM	55,60	52,06	44,27	43,58	1,49	0,47	0,01	0,62
AGCL	43,72	46,52	54,96	55,95	1,66	0,58	0,02	0,79
AGS	67,15	64,68	59,22	60,93	1,39	0,89	0,07	0,47
AGMI	30,87	33,36	38,14	37,05	1,26	0,80	0,08	0,52
AGPI	1,97	1,96	2,64	2,01	0,08	0,09	0,06	0,10
n-3	0,11	0,11	0,36	0,24	0,01	0,20	0,001	0,19
n-6	1,86	1,85	2,29	1,77	0,06	0,08	0,23	0,10
n-6/n-3	16,47	16,53	6,58	7,30	0,54	0,88	<0,001	0,61

^{a-c} Valores na mesma linha com diferentes sobre escrito diferem ($P<0,10$) EPM= erro padrão da média.

¹URU = efeito da adição do Urucum; LIN = adição do óleo de linhaça; INT = efeito da interação entre urucum e óleo.

²AGCC= ácidos graxos de cadeia curta (4 a 8 carbonos); AGCM= ácidos graxos de cadeia média (10 a 16 carbonos); AGCL= ácidos graxos de cadeia longa (>16 carbonos) (Bauman e Griinari, 2003); AGS= ácidos graxos saturados; AGMI= ácidos graxos monoinsaturados; AGPI= ácidos graxos poli-insaturados.

Foi observado efeito de interação entre semente de urucum e óleo sobre AGCC ($P<0,05$), a adição de semente de urucum aumentou as concentrações dos AGCC na ausência de óleo de linhaça, enquanto na presença de óleo não alterou as concentrações destes ácidos graxos (Tabela 6). Houve tendência de interação ($P<0,10$) entre a semente do urucum e o óleo linhaça sobre o AG n-6, em que a suplementação de óleo aumentou o AG n-6 na ausência de urucum, mas na presença de urucum, está reduziu este ácido graxo. Contudo as dietas com óleo de linhaça diminuíram os AGCM ($P<0,05$), e aumentou os AGCL ($P<0,05$). Além disso, a suplementação de óleo de linhaça apresentou

tendência de reduzir os AGS ($P=0,08$) e AGMI ($P=0,08$) e aumentar os AGPI ($P=0,06$). Também houve aumento do n-3 ($P>0,05$) e redução da razão de n-6/n-3 ($P>0,05$) com a suplementação lipídica.

Tabela 7. Parâmetros e capacidade antioxidante sanguínea de vacas da raça Holandês alimentadas com semente urucum e óleo de linhaça.

Item ³	Dietas				EPM ¹	Probabilidades ²		
	Sem Óleo		Com Óleo			URU	LIN	INT
	Sem Urucum	Com Urucum	Sem Urucum	Com Urucum				
Composição (mg/100mL)								
Colesterol	95,37	102,88	101,00	97,85	4,79	0,82	0,97	0,59
Triglicerídeos	9,00	10,50	9,00	8,50	0,82	0,51	0,74	0,33
HDL	66,00	62,62	71,87	74,50	2,15	0,93	0,08	0,51
Antioxidantes								
CAT								
(μ MTrolox/mL)	313,140	337,300	318.460	336.330	24,72	0,50	0,94	0,91

¹ EPM = erro padrão da média;

² URU = efeito da adição do Urucum; LIN = adição do óleo de linhaça; INT = efeito da interação entre urucum e óleo

³ CAT= capacidade antioxidante total.

Houve tendência da suplementação de óleo de linhaça para aumentar o colesterol-HDL ($P=0,08$). Não houve interação ($P>0,05$) da semente do urucum e óleo linhaça, assim como efeito da adição da semente de urucum (Tabela 7).

4. Discussão

Até o presente momento não se observou na literatura estudos semelhantes que avaliaram a associação de semente de urucum com lipídeos e seus efeitos sobre o consumo e digestibilidade de nutrientes, produção, composição e atividade antioxidante no leite de vacas leiteiras. Deste modo, não são possíveis comparações diretas das observações do presente estudo com outros estudos publicados.

A adição de semente de urucum reduziu o consumo de MS, e levou a diminuição na ingestão de nutrientes. Portanto, a redução do consumo da MS no presente estudo pode estar associada a regulação psicogênica provocada pela semente de urucum. Por meio de observações visuais, notou-se a rejeição dos animais à semente de urucum, em função possivelmente da sua palatabilidade, textura e odor. Da mesma forma, Tonani et al. (2000) relataram baixa aceitabilidade dos animais ao consumo de resíduo de urucum, e observaram decréscimo de 15% na ingestão de MS, em relação ao tratamento controle,

com inclusão de 45% da MS da dieta. No presente estudo, foi observado decréscimo de 14% no consumo de MS, com a inclusão de 1,5% de semente de urucum.

A semente de urucum apresenta carotenoides, terpenóides e terpenos (Jondiko e Pattenden, 1989; Mercadante et al., 1997; Rather e Mohammad, 2016), estes últimos compostos têm efeito na ingestão de matéria seca (Dziba e Provenza, 2008; Dziba, 2006). Os terpenóides e terpenos podem estar estocados em forma de óleos essenciais e liberados através de estruturas como as glândulas secretoras e tricomas, conseqüentemente, estes compostos são concentrados nas papilas gustativas (Personius et al., 1987). Os principais componentes de óleo essencial da semente de urucum são dois monoterpênicos chamados α -Pinene e β -Pinene (Giwa-Ajeniya et al., 2016). Segundo Estell et al. (2002) o efeito de alguns compostos voláteis no consumo de pellets de alfafa por ovinos, entre eles o α -Pinene, foi depressor do consumo de pellets de alfafa, possivelmente o monoterpêneo α -Pinene pode estar associado à rejeição dos animais à semente de urucum.

Apesar do consumo de MS e nutrientes serem influenciados pela adição de semente de urucum, a suplementação de 3% da MS com óleo de linhaça não afetou o consumo da MS, este fato pode estar com o nível de inclusão de lipídeo na dieta, o tipo de volumoso e o estágio de lactação dos animais do presente estudo. O nível de suplementação de óleo foi de 3% da MS, utilizando como fonte de volumoso a silagem de milho na alimentação de vacas na fase intermediária (meio) de lactação. Santos (2014) encontrou resultados semelhantes com a suplementação de 2,5% da MS com óleo de linhaça, na dieta de vacas leiteiras, utilizando dieta com 60% de silagem de milho. Da mesma forma, Suksombat et al. (2016) suplementaram com maiores quantidades de óleo de linhaça (500 g/dia) do que no presente estudo e não observaram alteração no consumo de MS, utilizando 60% de silagem de milho e 40% de concentrado na dieta.

A adição de semente de urucum reduziu o consumo de EE, isto está relacionado com a diminuição no consumo de matéria seca provocada pela adição de semente de urucum. Contudo, a suplementação com óleo sem adição de semente de urucum aumentou o consumo de EE, porém, reduziu o consumo de CNF. Segundo o NRC (2001) o adensamento energético da dieta leva uma substituição de carboidratos por lipídeos, de modo que resulta em maior teor de EE na dieta e menor proporção de carboidratos. A suplementação lipídica aumentou a digestibilidade do EE, PB e NDT, resultados semelhantes foram encontrados por Santos (2014) quando suplementou com 2,5% de óleo linhaça para vacas leiteiras em lactação. O óleo de linhaça tem maior proporção de AGPI

e baixo ponto de fusão, facilitando a formação de micelas e aumentando a taxa de absorção no intestino (NRC, 2001). Desta forma, a adição de óleo de linhaça nas dietas aumentou a digestibilidade do EE.

Ultrapassar 5% de lipídeo da MS da dieta pode ter alguns efeitos adversos como inibir o crescimento de microrganismo que degradam a fração fibrosa do volumoso, afetando a digestibilidade da fibra e da MO (Lock e Shingfield, 2004). A porcentagem de EE nas dietas com óleo foi de 5,6%, podendo explicar a tendência da redução da digestibilidade do FDN. Entretanto, ultrapassar o limite de 7% de lipídeos pode ter efeitos mais evidentes sobre a redução do consumo de MS, digestibilidade da MS, MO e FDN (Palmquist e Jenkins, 1980).

No presente estudo, a adição de 1,5 % de semente de urucum na MS das dietas de vacas leiteiras não alterou a digestibilidade dos nutrientes. Estes resultados estão corroborados pelos dados de Barbosa (2012) que utilizou inclusão maior de semente de urucum (10%, 23% e 35% na MS) em dietas para ovinos, observando também, que a semente de urucum não influenciou a digestibilidade dos nutrientes ($P>0,05$). De Lima Júnior et al. (2014) relataram que a inclusão de níveis crescentes (0, 100, 200 e 300 g/kg MS total) do subproduto de urucum na alimentação de ovino, em que o subproduto não afetou a digestibilidade das dietas. Além disso, Tonani et al. (2000) também encontraram que a inclusão do resíduo de urucum em até 45%, em substituição ao feno de braquiária e farelo de algodão em dieta para bovinos de corte, não influenciou a digestibilidade dos nutrientes.

Os tratamentos avaliados não afetaram as concentrações de ureia, colesterol, triglicerídeos e HDL no sangue. Estes parâmetros estão de acordo com os valores padrões segundo Kaneko et al. (2008). Apesar de algumas referências destacarem os potenciais efeitos de antioxidantes sobre estes parâmetros (Carvalho et al., 2004; Rossoni Júnior, 2008; Paula et al., 2009). Deve-se considerar que o modelo animal utilizado foi a vaca leiteira, que tradicionalmente apresenta elevadas concentração de colesterol circulante, com um metabolismo acelerado para atender as elevadas exigências energéticas de manutenção e produção.

Resultados semelhantes foram relatados por Lima (2016) quando suplementou colorífico de urucum (colorau) em 0,08, 0,12 e 0,16 g por kg de MS na alimentação de vacas em lactação e, não observou alterações na concentração de colesterol plasmático, mas promoveu alteração do perfil de ácido graxo plasmático. A suplementação de óleo

de linhaça promoveu aumento na concentração de HDL no plasma dos animais, isso pode ser atribuído ao consumo de lipídeos.

A produção de leite e lactose foram reduzidas com as dietas contendo semente de urucum, que também apresentaram o menor consumo de MS e nutrientes. Segundo Dado e Allen (1994) a produção de leite está positivamente correlacionada com o consumo de MS, resultando em menor consumo de energia de líquida disponível para a síntese do leite, em comparação com a dieta controle que apresentaram maior produção por causa do maior consumo de MS. Além disso, o menor consumo de MS e nutrientes pode ter levado a deficiência de precursores de glicose. A síntese de lactose é dependente da glicose, possivelmente um menor conteúdo de glicose traz diminuição na produção de lactose, que possivelmente aconteceu nos tratamentos com adição de semente urucum, levando a menor produção de leite com relação à dieta controle.

O teor de gordura e sólidos totais aumentou nas dietas com semente de urucum, provavelmente foi um efeito de concentração, já que estas dietas apresentaram redução na produção leite (Holdaway, 1990; Bruckmaier et al., 2004; Pleguezuelos et al., 2015). A adição de semente de urucum não afetou as proporções e as razões de ácidos graxos agrupados no leite, em especial os ácidos de cadeia média que são responsáveis por aumentar o teor de gordura, justificando que a semente não foi à causa principal do aumento do teor de gordura. Além disso, a produção do leite corrigida para gordura e a produção de gordura no leite não apresentaram efeitos significativos para adição de semente de urucum e suplementação de lipídeo.

A suplementação com óleo de linhaça reduziu o teor de gordura, isto pode estar associado ao efeito de diluição na concentração de gordura pelo aumento da produção de leite (Leduc et al., 2017). Outro fator que reduz a concentração de gordura no leite é que os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) do óleo linhaça provocam depressão da gordura no leite (Shingfield et al., 2006; Chilliard et al., 2009) pela alteração da biohidrogenação ruminal resultando em produtos intermediários tais como o AG *trans*-9, *cis*-11-CLA e o *trans*-10, *cis*-12-CLA, sendo estes também inibidores sobre a síntese de gordura do leite na glândula mamária (Sæbø et al., 2005; Perfield et al., 2007).

Com respeito à atividade antioxidante no leite no sangue, a suplementação lipídica aumentou a concentração de DC devido ao aumento no consumo de AGPI, que duplas ligações que predispõem à lipoperoxidação a causa da perda de elétrons (Zhao et al., 2013), assim aumentado os DC no leite. A suplementação de semente de urucum não

afetou o status oxidativo do animal, isso pode ser pela baixa % de absorção dos carotenoides, a bixina é um carotenoide que pertence ao grupo dos carotenos, cujo processo absorptivo destes é muito semelhante ao dos lipídeos, já que os carotenos são pigmento lipossolúveis (Furr e Clark, 1997). Os carotenos são moléculas menos polares, encontrando-se no centro das emulsões, que cuja eficiência absorptiva depende da transferência da emulsão para as micelas, que não é tão eficaz para o grupo dos carotenos comparado para com o grupo das xantofilas (Furr e Clark, 1997).

Yan et al. (2007) avaliaram o efeito do betacaroteno sobre a fermentação ruminal *in vitro* e observaram aumento da concentração de ácido acético após de 24 de incubação com a adição de betacaroteno, sendo este ácido graxo fonte principal para a formação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) na glândula mamária, e possivelmente levou a maior concentração dos AGCC (C6:0 e C8:0), quando se adicionou semente de urucum na ausência de óleo de linhaça do presente estudo.

As dietas com óleo de linhaça reduziram os ácidos graxos de cadeia média (AGCM), isso pode ser pela maior concentração dos AGPI que contém o óleo de linhaça (Harvatine e Bauman, 2011). Os AGPI do óleo de linhaça podem sofrer biohidrogenação incompleta dando origem as AG *trans*-9, *cis*-11-CLA e *trans*-10, *cis*-12-CLA (Sæbø et al., 2005; Perfield et al., 2007). Estes AG são inibidor da expressão dos genes que estão envolvidos na síntese de *novo* (Sæbø et al., 2005; Perfield et al., 2007), de tal modo estes CLA possivelmente reduziram os AGCM (C10:0, C12:0, C13:0, C14:1, C15:0, C16:0) e levou apresentar tendência de reduzir o C14:0. Cabe ressaltar que estes AG são de origem mista, oriundos da síntese *de novo* que ocorre na glândula mamária e da alimentação.

De modo geral, a suplementação com óleo linhaça aumentou os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) (C18:0, C18:1 n9t, C18:2 n6t, C18:3 n3, C20:3 n6, C20:4 n6 e C21:0), sendo estes pré-formados. Isto pode ser explicado pela composição do óleo de linhaça, que é rico em C18:3 n-3, e quando chega no rúmen pode sofrer biohidrogenação, com a finalidade de proteger as bactérias ruminais e, gerar ácidos graxos intermediários e finais que podem ser incorporados na gordura do leite, aumentando assim os AGCL no leite (Chilliard et al., 2007).

O AG C18:2 n6t é pré-formado durante o processo de biohidrogenação, cuja diminuição pode estar associada a adição de carotenoides. Hino et al. (1993) realizaram um ensaio *in vitro*, em que adicionaram 5 ou 10 mg de β -caroteno, 5 mg α -tocoferol e 1 g de glicose por cada litro de líquido ruminal, observando crescimento dos

microrganismos ruminais, enquanto associação de β -caroteno e α -tocoferol com óleo girassol diminuiu a inibição do crescimento destes microrganismos provocada por óleo, assim aumentou a utilização dos AGCL pelas bactérias ruminas. Possivelmente os carotenoides da semente de urucum promoveram a utilização do ácido graxo C18:2 n6 na presença de óleo, resultando em menor concentração de n-6 em comparação da dieta com óleo de linhaça.

A suplementação com óleo de linhaça influenciou os ácidos graxos do leite, diminuindo AGS, aumentando os AGMI e AGPI. O aumento dos AGPI resulta em melhor perfil de ácidos graxos para o consumo humano. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os estudos realizados por Santos et al. (2016) e Suksombat et al. (2016) que relataram mudanças semelhantes nos ácidos graxos do leite quando utilizaram óleo de linhaça, e também estão de acordo com os resultados observados por Caroprese et al. (2010) e Petit e Côrtes (2010) quando utilizaram a semente linhaça na alimentação de vacas leiteiras.

O aumento da concentração de n-3 e a redução da razão n-6/n-3 foram observados nas dietas com suplementação lipídica. O óleo de linhaça é uma fonte rica em C18:3 n-3, sendo este parcialmente biohidrogenado, e grande parte deste torna-se sobrepassante, o que promove aumento da concentração de n-3 na gordura do leite. Observou-se aumento aproximadamente de 270% na concentração de n-3 no leite em comparação com as dietas sem suplementação. Outros estudos prévios demonstram aumento de n-3 com a suplementação de óleo de linhaça (Chilliard et al., 2009; Benchaar et al., 2012; Santos et al., 2016). Os AG n-3 exercem efeito importante na saúde humana, pois podem reduzir o risco de doenças cardiovasculares (Dewailly et al., 2003), câncer de próstata, de colón e de mama (Rose e Connolly, 1999). A suplementação com óleo reduziu a razão n6/n3 em 59%, isso torna o leite mais saudável segundo World Health Organization (2003).

5. Conclusão

A adição 1,5% da MS de semente de urucum reduziu o consumo de matéria seca e os nutrientes, e aumentou o teor de gordura. A produção de leite corrigida para gordura não foi influenciada pela adição de semente de urucum e a suplementação de óleo adição de semente de urucum não influenciou a capacidade antioxidante do leite. A suplementação 3% da MS de óleo de linhaça melhorou o perfil de ácidos graxos no leite,

aumentando a concentração de n-3. A associação da semente de urucum e óleo linhaça não influenciou os parâmetros avaliados.

Referências

- AOAC., 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC International, Arlington, VA, USA.
- Barbosa, J., 2012. Valor nutritivo de dietas contendo sementes de urucum para ovinos em terminação. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Estadual Vale do Acaraú. 81. Sobral - CE.
- Benchaar, C., Romero-Pérez, G., Chouinard, P., Hassanat, F., Eugene, M., Petit, H., Côrtes, C., 2012. Supplementation of increasing amounts of linseed oil to dairy cows fed total mixed rations: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, protozoal populations, and milk fatty acid composition. *J Dairy Sci.* 95, 4578-4590.
- Bruckmaier, R., Ontsouka, C., Blum, J., 2004. Fractionized milk composition in dairy cows with subclinical mastitis. *Vet. Med.* 49, 283–290.
- Castro, W., Mariutti, L., Bragagnolo, N., 2011. The effects of colorifico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage. *Food. Chem.* 124, 126-131.
- Caroprese, M., Marzano, A., Marino, R., Gliatta, G., Muscio, A., Sevi, A., 2010. Flaxseed supplementation improves fatty acid profile of cow milk. *J Dairy Sci.* 93, 2580-2588.
- Carvalho, R., Toledo de O, T., Nagem, T.J., Stringheta, P.C., Junior, B.F., 2004. Efeitos de naringenina e bixina associados com leite de cabra sobre o metabolismo lipídico de coelhos. *Rev. Chil. Nutr.* 31, 177-182.
- Charmley, E., Nicholson, J., 1994. Influence of dietary fat source on oxidative stability and fatty acid composition of milk from cows receiving a low or high level of dietary vitamin E. *Can J Anim Sci.* 74, 657-664.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., Doreau, M., 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 828-855.
- Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J., Doreau, M., 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J Dairy Sci.* 92, 5199-5211.
- Dado, R., Allen, M., 1994. Variation in and relationships among feeding, chewing, and drinking variables for lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 77, 132-144.
- De Lima Júnior, D.M., de Carvalho, F.F., Clementino, R.H., Batista, Â.M., Maciel, M.V., Ferreira, J.C., Neto, J.D.P., 2014. Performance of sheep fed on annatto byproduct. *Ital J Anim Sci.* 13, 3147.
- Dewailly, É., Blanchet, C., Gingras, S., Lemieux, S., Holub, B.J., 2003. Fish consumption and blood lipids in three ethnic groups of Québec (canada). *Lipids.* 38, 359-365.
- Dziba, L., Provenza, F.D., 2008. Dietary monoterpene concentrations influence feeding patterns of lambs. *Appl Anim Behav Sci.* 109, 49-57.

- Dziba, L.E., Hall, J.O., Provenza, F.D., 2006. Feeding behavior of lambs in relation to kinetics of 1, 8-cineole dosed intravenously or into the rumen. *J. Chem. Ecol.* 32, 391.
- Estell, R. E., Fredrickson, E. L., Anderson, D. M., Havstad, K. M., Remmenga, M. D., 2002. Effects of four mono- and sesquiterpenes on the consumption of alfalfa pellets by sheep. *J Anim Sciv.* 80, 3301-3306.
- Furr, H. C., Clark, R. M., 1997. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *J Nutri Bioche.* 8, 364-377.
- Giwa-Ajeniya, A.O., Ademefun, A., Lawal, O.A., Ogunwande, I.A., 2016. Chemical Composition of Essential Oils from the Leaves, Seeds, Seed-pods and Stems of *Bixa orellana* L.(Bixaceae). *A Cur Res Int.* 6, 1-6.
- Glasser, F., Ferlay, A., Chilliard, Y., 2008. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: a meta-analysis. *J Dairy Sci.* 91, 4687-4703.
- Grummer, R.R., 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *J Dairy Sci.* 74, 3244-3257.
- Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 57, 715-724.
- Harvatine, K., Bauman, D., 2011. Characterization of the acute lactational response to trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *J Dairy Sci.* 94, 6047-6056.
- Hino, T., Andoh, N., Ohgi, H., 1993. Effects of β -carotene and α -tocopherol on rumen bacteria in the utilization of long-chain fatty acids and cellulose. *J Dairy Sci.* 76, 600-605.
- Holdaway, R.J., 1990. A comparison of methods for the diagnosis of bovine subclinical mastitis within New Zealand dairy herds: Tesis (Doctor of Philosophy in veterinary clinical science) Massey University, New Zealanda.
- Howe, P., Meyer, B., Record, S., Baghurst, K., 2006. Dietary intake of long-chain ω -3 polyunsaturated fatty acids: contribution of meat sources. *Nutrition.* 22, 47-53.
- Jondiko, I.J., Pattenden, G., 1989. Terpenoids and an apocarotenoid from seeds of *Bixa orellana*. *Phytochemistry.* 28, 3159-3162.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 6 th ed. Academic press. San Diego – CA.
- Kiokias, S.N., Dimakou, C.P., Tsaprouni, I.V., Oreopoulou, V., 2006. Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. *Food Biophys.* 1, 115.
- Leduc, M., Létourneau-Montminy, M.-P., Gervais, R., Chouinard, P., 2017. Effect of dietary flax seed and oil on milk yield, gross composition, and fatty acid profile in dairy cows: A meta-analysis and meta-regression. *J Dairy Sci.* 100, 8906-8927.
- Lima, C.S., 2016. Bioquímica e perfil de ácidos graxos plasmático de vacas em lactação ingerindo dietas contendo colorífico de urucum. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens). Universidade Federal Rural de Pernambuco. 66. Garanhuns – PE.
- Lock, A., Shingfield, K., 2004. *Optimising milk composition.* BSAS Occasional Publication, 107-188.

- Lopez, H., E.. 2010. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol Res.* 61, 200-207.
- Mercadante, A., Steck, A., Pfander, H., 1997. Isolation and identification of new apocarotenoids from annatto (*Bixa orellana*) seeds. *J Agric Food Chem.* 45, 1050-1054.
- Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J AOAC Int* 85, 1217-1240.
- Niki, E., 1987. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44, 227-253
- NRC, 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 6th ed. National Academic Press,, Washinton, D.C.
- O'Connor, T., O'Brien, N., 2006. Lipid oxidation, *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*, 3 th ed., Springer, New York – NY.
- Palace, V. P., Khaper, N., Qin, Q., Singal, P. K., 1999. Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med.* 26, 746-761.
- Palmquist, D., Jenkins, T., 1980. Fat in Lactation Rations^{1, 2}. *J Dairy Sci.* 63, 1-14.
- Paula, H.D., Pedrosa, M.L., Rossoni Júnior, J.V., Haraguchi, F.K., Santos, R.C., Silva, M.E., 2009. Effect of an aqueous extract of annatto (*Bixa orellana*) seeds on lipid profile and biochemical markers of renal and hepatic function in hipercholesterolemic rats. *Braz. arch. biol. technol.* 52, 1373-1378.
- Perfield, J., Lock, A., Grinari, J., Sæbø, A., Delmonte, P., Dwyer, D., Bauman, D., 2007. Trans-9, Cis-11 Conjugated Linoleic Acid Reduces Milk Fat Synthesis in Lactating Dairy Cows¹. *J Dairy Sci.* 90, 2211-2218.
- Personius, T.L., C.L. Wamholdt, Stephens, J.R., Kelsey, R., 1987. Crude terpenoid infhtences on mule deer preferences for sagebrush. *J. Range Manage.* 40384-88.
- Petit, H., Côrtes, C., 2010. Milk production and composition, milk fatty acid profile, and blood composition of dairy cows fed whole or ground flaxseed in the first half of lactation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158, 36-43.
- Pleguezuelos, F.J., Fern, L., Gonzalo, C., 2015. Variation in milk yield, contents and incomes according to somatic cell count in a large dairy goat population. . *J Adv Dairy Res.* 3, 145.
- Rather, L.J., Mohammad, F., 2016. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications–A review. *J Adv Dairy Res.* 7, 499-514.
- Rose, D.P., Connolly, J.M., 1999. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacology & therapeutics.* 83, 217-244
- Rossoni, J. V., 2008. Perfil lipídico, defesas antioxidantes e marcadores de função hepática e renal em hamsteres tratados com extratos de sementes de urucum. *Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)*. Universidade Federal de Ouro Preto. 97. Ouro Preto – MG.

- Rufino, M., Alves, R.E., de Brito, E.S., de Morais, S.M., Sampaio, C.d.G., Pérez-Jimenez, J., Saura-Calixto, F.D., 2007. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{o+}. Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico. 128. Fortaleza – CE.
- Sæbø, A., Sæbø, P. C., Griinari, J. M., Shingfield, K. J., 2005. Effect of abomasal infusions of geometric isomers of 10, 12 conjugated linoleic acid on milk fat synthesis in dairy cows. *Lipids* 40, 823-832.
- Santos, N.W., 2014. Própolis e vitamina e na dieta de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça sobre a qualidade e funcionalidade do leite. Teses (Doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá. 108. Maringá – PR.
- Santos, N. W., Yoshimura, E.H., Machado, E., Matumoto-Pintro, P.T., Montanher, P.F., Visentainer, J.V., dos Santos, G.T., Zeoula, L.M., 2016. Antioxidant effects of a propolis extract and vitamin E in blood and milk of dairy cows fed diet containing flaxseed oil. *Livest Sci.* 191, 132-138.
- Satyanarayana, A., Prabhakara Rao, P., Rao, D., 2003. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). *J Food Sci Technol.* 40, 131-141.
- Shingfield, K., Reynolds, C., Hervas, G., Griinari, J.M., Grandison, A.S., Beever, D.E., 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *J Dairy Sci.* 89, 714-732.
- Sniffen, C.J., O'connor, J., Van Soest, P., Fox, D., Russell, J., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J Anim Sci.* 70, 3562-3577.
- Suksombat, W., Thanh, L.P., Meeprom, C., Mirattanaphrai, R., 2016. Effect of linseed oil supplementation on performance and milk fatty acid composition in dairy cows. *J Anim Sci.* 87, 1545-1553.
- Tonani, F., Ruggieri, A., Guim, A., De Andrade, P., De Queiroz, A., Santos, H., Milheiros, E., 2000. Avaliação nutricional do resíduo de urucum (*Bixa orellana*, L.), após a extração do corante. *Ars Veterinaria.* 16, 118-121.
- Vyncke, W., 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 72, 1084-1087.
- Weiss, W. 1999. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. Proc, Ithaca: Cornell University. 61, 176-185.
- Yan, A., Sun, L. S., Zhao, G. Q., 2007. Effect of β -carotene on selected indices of in vitro rumen fermentation in goat. *J Anim Feed Sci.* 16, 581-585.
- World Health Organization (Who). 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of joint WHO/FAO expert consultation. WHO Technical Report Series 916. Geneva, Suíça.
- Zhao, X., Wang, J., Yang, Y., Bu, D., Cui, H., Sun, Y., Xu, X., Zhou, L., 2013. Effects of different fat mixtures on milk fatty acid composition and oxidative stability of milk fat. *Anim. Feed Sci. Technol.* 185, 35-42.
- Zhu, Q.Y., Hackman, R.M., Ensunsa, J.L., Holt, R.R., Keen, C.L., 2002. Antioxidative activities of oolong tea. *J Agric Food Chem.* 50, 6929-6934.

