

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PRÓPOLIS E VITAMINA E NA DIETA DE VACAS  
LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM ÓLEO DE LINHAÇA  
SOBRE A QUALIDADE E FUNCIONALIDADE DO LEITE

Autora: Nadine Woruby Santos  
Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria Zeoula

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Novembro - 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PRÓPOLIS E VITAMINA E NA DIETA DE VACAS  
LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM ÓLEO DE LINHAÇA  
SOBRE A QUALIDADE E FUNCIONALIDADE DO LEITE

Autora: Nadine Woruby Santos  
Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria Zeoula

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

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Novembro - 2014

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

S237p Santos, Nadine Woruby  
Própolis e vitamina E na dieta de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça sobre a qualidade e funcionalidade do leite / Nadine Woruby Santos. -- Maringá, 2014.  
91 f. : il. col., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Maria Zeoula.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2014.

1. Vacas leiteiras - Produtos à base de própolis - Dieta. 2. Vacas leiteiras - Vitamina E - Dieta. 3. Vacas leiteiras - Suplemento - Óleo de linhaça - Dieta. I. Zeoula, Lucia Maria, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 21.ed. 636.2085

ECSL-001866



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

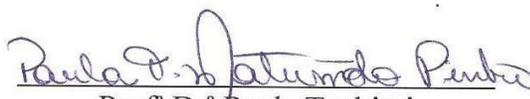
**PRÓPOLIS E VITAMINA E NA DIETA DE VACAS  
LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM ÓLEO DE  
LINHAÇA SOBRE A QUALIDADE E  
FUNCIONALIDADE DO LEITE**

Autora: Nadine Woruby Santos  
Orientadora: Profª Drª Lúcia Maria Zeoula

TITULAÇÃO: Doutora em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 26 de novembro de 2014.

  
Prof. Dr. Antonio Ferriani Branco

  
Profª Drª Paula Toshimi  
Matumoto Pinto

  
Profª Drª Odimári Pricila  
Pires do Prado

  
Profª Drª Adriana de Souza  
Martins

  
Profª Drª Lúcia Maria Zeoula  
(Orientadora)

*Confia no Senhor com todo o teu coração,  
não te fies em tua própria inteligência;  
em todos os teus caminhos, reconhece-o,  
e ele endireitará as tuas veredas.*

*Provérbios 3:5-6*

*Feliz o homem que encontrou a sabedoria,  
o homem que alcançou o entendimento!  
Ganhá-la vale mais do que a prata,  
e o seu lucro mais do que o ouro.  
É mais valiosa do que as pérolas;  
nada que desejas a iguala.*

*Provérbios 3:13-15*

Aos meus pais Rosa Woruby Santos e Paulo Santos e minha tia Geny Woruby, pelo ensinamento dos valores que foram minha base para desenvolver este estudo com esforço e honestidade.

Aos meus irmãos Tiago Woruby Santos e Lucas Woruby Santos e ao Nicolas Woruby Santos, pelo amor, amizade e apoio.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, pelo dom da vida, por todas as minhas conquistas e por ter me trazido até aqui.

À Universidade Estadual de Maringá, ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e ao Institut National de la Recherche Agronomique, Saint-Genès Champanelle-França, por terem possibilitado o desenvolvimento desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Programa Ciência sem Fronteiras), pela concessão das bolsas de estudos no Brasil e no exterior.

À professora Dr<sup>a</sup> Lucia Maria Zeoula, pela orientação em todo o trabalho, pelos preciosos ensinamentos, confiança no meu trabalho e amizade.

Ao professor Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, pela colaboração neste trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup> Paula Matumoto Pintro, por todo ensinamento e amizade durante os anos de meu estudo.

À professora Dr<sup>a</sup> Cecília Edna Mareze da Costa, pela confiança e ensinamentos.

Aos pesquisadores Dr<sup>a</sup> Agnès Cornu, Dr. Didier Macheboeuf e Roger Bergeault pela boa acolhida na França, pelos ensinamentos e bons momentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UEM, pelos ensinamentos.

Aos bons colegas, os quais sem o auxílio, este trabalho não seria possível, Emerson Yoshimura, Erica Machado e Sílvia Cristina de Aguiar.

Aos colegas de grupo, pelos bons momentos de trabalho, descontração e troca de experiências, Fabio José Maia, Eduardo Marostegan de Paula, Rafael Barreiros Samensari, Lucélia Moura, Bruna Calvo Agostinho, Bruno Abreu, Jocasta Carraro, Cecília Aparecida Spada, Aline Bravo, João Gustavo Franceschi, Natalia Galoro, Fernando Alves.

À professora Dr<sup>a</sup> Selma Lucy Franco pela contribuição no trabalho. Ao apoio nas análises do leite do professor Dr. Jesuí Virgílio Visentainer e Paula Fernandes Montanher.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi, Vicente Faleiros, Célio Aparecido Passolongo e, especialmente, ao Ezupério Salim da Silva pela contribuição na execução deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal, Cleuza Volpato, Creuza Azevedo e Diógenes Augusto, pelo auxílio durante o período de análises. À Rosinéia Pereira do Laboratório de Farmácia, pelo suporte nas análises laboratoriais.

Às funcionárias do Laboratório Multi-usuário do Departamento de Ciências Fisiológicas, Márcia Fabrício, Valéria Schoffen Romão e Elizete Rosa dos Santos, por todo o auxílio e ensinamentos.

Aos amigos de trabalho, pelos bons momentos e parceria, Tiago Junior Pasquetti, Ana Lucia Teodoro, Ivan Graça Araújo, Bruna Ponciano Neto, Ana Paula Possamai. Aos velhos e novos amigos, pelo apoio e alegrias, Ana Maria Krüger, Julienne Moro, Adriane Kruppa, João Carlos Dias Filho, Tainara Bertolazo, Vanessa Reinhardt, Yunlong Huo e Clara Leguay.

À minha família, que sempre me amou, me apoiou e acreditou na minha capacidade.

Ao Juscelino Pereira Neto, que se esforçou comigo para que este trabalho desse certo, pelo apoio em todos os momentos e pela espera.

## BIOGRAFIA

Nadine Woruby Santos, filha de Paulo dos Santos e Rosa Woruby Santos, nasceu na cidade de Ponta Grossa, no dia 25 de agosto de 1986.

Em agosto de 2008, foi graduada em Zootecnia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Em fevereiro de 2009, ingressou no mestrado e em março de 2011, recebeu o título de Mestre em Produção Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2011, ingressou no doutorado em Nutrição Animal do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

De maio de 2013 a maio de 2014, foi contemplada com bolsa de doutorado-sanduiche pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Ciências sem Fronteiras para a realização de estágio no Institut National de la Recherche Agronomique – INRA, na cidade de Clermont-Ferrand, França.

Em 26 de novembro de 2014, submeteu-se à banca para defesa da Tese.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO .....	1
LITERATURA CITADA .....	9
OBJETIVOS GERAIS.....	13
CAPÍTULO I – Effect of propolis on <i>in vitro</i> fermentation and methane emissions by the rumen microbial population in dairy cows	
Abstract.....	14
Introduction.....	15
Material and methods .....	16
Results.....	20
Discussion.....	24
Conclusions.....	27
References.....	27
CAPÍTULO II – Consumo e digestibilidade de dietas com óleo de linhaça e suplementadas com extrato de própolis e vitamina E fornecidas a vacas leiteiras	
Resumo .....	31
Introdução .....	32
Material e métodos .....	33
Resultados.....	39
Discussão .....	42
Conclusões.....	46

Referências .....	46
CAPÍTULO III – Extrato de própolis e vitamina E para vacas leiteiras: lipoperoxidação sanguínea, produção de leite, composição de ácidos graxos e qualidade oxidativa do leite	
Resumo .....	49
Introdução .....	50
Material e métodos .....	52
Resultados .....	58
Discussão .....	63
Conclusões .....	67
Referências .....	68
CAPÍTULO IV – Suplementação com leite de vaca rico em ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes a ratos normais em crescimento	
Resumo .....	72
Introdução .....	73
Material e métodos .....	74
Resultados .....	78
Discussão .....	84
Referências .....	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	91

## LISTA DE TABELAS

	Página
 <b>CAPÍTULO I</b>	
Table 1. Chemical composition of ingredients and fermentation substrate.....	17
Table 2. Composition of phenolic compounds of the propolis extract .....	21
Table 3. Ruminal pH and <i>in vitro</i> fermentation products using propolis extract at 24h .....	22
Table 4. <i>In vitro</i> gas production using propolis extract .....	23
 <b>CAPÍTULO II</b>	
Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais .....	34
Tabela 2. Composição de compostos fenólicos do produto à base de própolis e dos alimentos constituintes das dietas .....	35
Tabela 3. Consumo, digestibilidade aparente e parâmetros ruminais de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça contendo produto à base de própolis (LLOS) associado ou não à vitamina E na dieta .....	36
Tabela 4. Produção microbiana ruminal e metabólitos nitrogenados de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça (OL) contendo produto à base de própolis (LLOS) associado ou não a vitamina E (LLOS-E) na dieta .....	37
 <b>CAPÍTULO III</b>	
Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais.....	53

Tabela 2. Composição de compostos fenólicos do produto à base de própolis e dos alimentos constituintes das dietas .....	54
Tabela 3. Parâmetros sanguíneos e lipoperoxidação em vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça contendo produto à base de própolis (LLOS) associado ou não à vitamina E na dieta .....	60
Tabela 4. Produção e composição do leite em vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça contendo produto à base de própolis (LLOS) associado ou não à vitamina E na dieta.....	60
Tabela 5. Composição de ácidos graxos da gordura do leite de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça contendo produto à base de própolis (LLOS) associado ou não à vitamina E na dieta .....	61
Tabela 6. Qualidade oxidativa do leite de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça contendo produto à base de própolis (LLOS) associado ou não à vitamina E na dieta.....	62

#### CAPÍTULO IV

Tabela 1. Composição do leite comum, leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados, e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes fornecidos aos grupos experimentais .....	75
Tabela 2. Ingestão média de nutrientes do leite em ratos normais suplementados com leite comum, leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados, e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes.....	78
Tabela 3. Consumo, absorção intestinal, peso e comprimento corporal e ganho médio diário em ratos normais suplementados com leite comum, leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados, e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes .....	80
Tabela 4. Perfil bioquímico sanguíneo de ratos normais suplementados com leite comum, leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados, e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes.....	81
Tabela 5. Concentrações sanguíneas de glicose em teste de tolerância a glicose intravenosa em ratos normais suplementados com leite comum, leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados, e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes .....	82
Tabela 6. Peso de órgãos e tecido adiposo em razão ao peso corporal de ratos normais suplementados com leite comum, leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados, e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes .	83

## LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I	
Figure 1. Peak areas of components appearing in in the fermentation medium as function of propolis dose initially added .....	21
CAPÍTULO II	
Figura 1. pH e concentração de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça contendo produto à base de própolis associado ou não à vitamina E na dieta .....	36

## RESUMO

Estudos foram conduzidos para avaliar o potencial do extrato de própolis como fonte de compostos antioxidantes para vacas leiteiras. No primeiro experimento, um extrato de própolis foi incubado com população microbiana proveniente de vacas leiteiras para determinar, *in vitro*, sua influência sobre a fermentação e emissão de gases. O extrato de própolis foi empregado nas doses: 1,1, 2,2, 6,7, 11,1, 16,7, 22,2, 27,8, 38,9, e 55,6 µg/mg de substrato. O extrato de própolis reduziu linearmente o pH final do meio e elevou linearmente a produção de propionato. De forma linear, o uso do extrato de própolis reduziu a produção de metano e elevou a produção de dióxido de carbono em cinco horas e 24 horas de fermentação. No segundo experimento, produto à base de própolis e vitamina E foram adicionados, em associação ou não, em dietas com óleo de linhaça para vacas leiteiras para determinar os efeitos sobre a digestibilidade e o aproveitamento de nutrientes. Utilizaram-se quatro vacas da raça Holandesa, portadoras de cânulas ruminais, com média de  $584 \pm 52$  kg de peso corporal e  $90 \pm 39$  dias de lactação, em delineamento quadrado latino 4×4, com quatro dietas e quatro períodos. As dietas experimentais foram: 1) dieta controle; 2) dieta com óleo de linhaça, 25 g/kg de MS; 3) dieta com óleo de linhaça + produto à base de própolis, 1,2 g/kg de MS; 4) dieta com óleo de linhaça + produto à base de própolis + vitamina E, 375 UI/kg de MS. O fornecimento do produto à base de própolis em associação ou não à vitamina E não apresentou efeitos sobre o consumo e digestibilidades ruminal e total da dieta. Os parâmetros pH, teor de nitrogênio amoniacal, produção microbiana ruminal, eficiência de síntese microbiana e excreção de metabólitos nitrogenados não foram alterados pelas dietas. No terceiro experimento, produto à base de própolis e vitamina E, em associação ou não, foram adicionados às dietas contendo óleo de linhaça para vacas leiteiras a fim de avaliar a influência sobre os parâmetros sanguíneos, lipoperoxidação sanguínea,

composição química do leite, composição de ácidos graxos e qualidade antioxidante. Os animais e dietas utilizadas foram os mesmos daqueles do segundo experimento. O produto à base de própolis, associada ou não à vitamina E nas dietas das vacas, causou diminuição das concentrações sanguíneas de colesterol total, do HDL e da lipoperoxidação sanguínea. O fornecimento de produto à base de própolis e do produto com vitamina E às vacas não apresentou efeitos sobre a produção de leite e composição química. A adição do produto à base de própolis às dietas resultou em elevação das concentrações dos ácidos graxos 18:1 trans9 e 18:2 cis9,trans11, assim como a concentração total de CLA no leite. A associação de própolis e vitamina E nas dietas também causou aumento do teor de CLA no leite. A concentração de polifenóis totais no leite foi elevada com a adição de extrato de própolis a dieta e também com a associação de aditivos. A própolis aumentou a atividade antioxidante do leite pelo método do poder redutor. O fornecimento de produto à base de própolis em associação ou não a vitamina E não melhorou a estabilidade oxidativa do leite. No quarto experimento, leite enriquecido naturalmente com ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e antioxidantes, pela alimentação das vacas e obtido no terceiro experimento, foi suplementado a ratos em crescimento visando verificar a funcionalidade do leite na saúde destes animais. Quarenta ratos machos *Wistar* com 21 dias de idade foram utilizados em delineamento inteiramente casualizado, com período experimental de 85 dias. A suplementação foi realizada por gavagem, em dose 0,005 ml/kg de peso corporal. Os grupos experimentais foram: controle, com água; leite comum; leite rico em AGPI; e leite rico em AGPI e antioxidantes. O fornecimento de leite enriquecido com AGPI e antioxidantes aos ratos não modificou o consumo, a absorção intestinal, a glicemia, a capacidade antioxidante sanguínea, o peso dos órgãos e o crescimento dos ratos. A suplementação com este leite elevou moderadamente as concentrações sanguíneas de colesterol total e LDL e elevou significativamente o acúmulo de gorduras viscerais. A própolis mostrou-se uma boa fonte de compostos fenólicos para vacas leiteiras, não influenciando a digestão e aproveitamento de nutrientes da dieta, com melhora da composição de ácidos graxos e antioxidantes do leite. O leite rico em ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes não modificou o crescimento de ratos, embora um maior acúmulo de gorduras viscerais tenha sido observado.

**Palavras-chave:** ácidos fenólicos, ácidos graxos poli-insaturados, composição de leite, digestibilidade, própolis, vitamina E

## ABSTRACT

Studies were carried out to evaluate a propolis extract as a source of antioxidants for dairy cows. In the first experiment a propolis extract was incubated with microbial population from dairy cows to determine, *in vitro*, its influence on fermentation and gas emission. Propolis extract was used in doses: 1.1, 2.2, 6.7, 11.1, 16.7, 22.2, 27.8, 38.9, and 55.6 ug/mg of substrate. Propolis extract linearly reduced the final pH of the medium and linearly increased propionate production. In a linear form, use of propolis extract reduced methane production and increased carbon dioxide production at five and 24 hours of fermentation. In the second experiment, a propolis-based product and vitamin E were supplemented, in association or not, in diets with flaxseed oil to dairy cows to determine the effects on digestibility and nutrient utilization. Four Holstein cows with rumen cannula, averaging  $584 \pm 52$  kg body weight and  $90 \pm 39$  days in milk were used in a Latin square design  $4 \times 4$ , with four treatments and four periods. Experimental diets were: 1) control diet; 2) diet with flaxseed oil, 25 g/kg DM; 3) diet containing flaxseed oil + propolis-based product, 1.2 g/kg DM; 4) diet containing flaxseed oil + propolis-based product + vitamin E, 375 IU/kg DM. Supplying propolis-based product in association or not with vitamin E had no effect on intake and ruminal and total tract digestibility of the diet. Rumen pH, ammonia nitrogen content, rumen microbial production, efficiency of microbial synthesis and excretion of nitrogenous metabolites were not altered by diets. In the third experiment, propolis-based product and vitamin E, in association or not, were added to diets containing flaxseed oil to dairy cows in order to assess the influence on blood parameters, blood lipid peroxidation, milk chemical composition, fatty acid composition and antioxidant quality of milk. Animals and treatments were the same as in the second experiment. Propolis-based product associated or not to vitamin E in diets caused a decrease in blood concentrations

of total cholesterol, HDL and blood lipid peroxidation. Providing propolis extract with or without vitamin E to cows had no effect on milk yield and composition. Addition of Propolis-based product in diets elevated concentrations of FA 18:1 and cis9, trans11 18:2, and also the total CLA concentration in milk. Association of propolis extract and vitamin E in diets also caused an increase on milk CLA content. Total polyphenols concentration in milk was increased by using propolis extract isolated or with vitamin E in diets. Propolis-based product provided higher antioxidant activity of milk by the reducing power method. Providing propolis extract combined or not to vitamin E did not improve the oxidative stability of milk. In the fourth experiment, a milk naturally enriched with polyunsaturated fatty acids and antioxidants, by feeding the cows and obtained in the third experiment, was supplemented to growing rats in order to verify the milk functionality on health of these animals. Forty male *Wistar* rats presenting 21 days-old were used in a completely randomized design, with experimental period of 85 days. Supplementation was performed by gavage at dose 0.005 mL/kg body weight. Experimental groups were: control with water, common milk, PUFA-enriched milk, and PUFA and antioxidants-enriched milk. The supply of milk enriched with PUFA and antioxidants to rats did not modify the feed intake, digestibility, blood glucose, blood antioxidant capacity, organs weight and growth of rats. Supplementation with this milk moderately elevated blood concentrations of total and LDL cholesterol and significantly increased the accumulation of visceral adipose tissue. Propolis showed being a good source of phenolic compounds for dairy cows not influencing digestion and nutrient utilization of diet, with improvement of fatty acid composition and antioxidant content of milk. Milk rich in polyunsaturated fatty acids and antioxidants did not modify the rat growth, although a higher accumulation of visceral adipose tissue was observed.

**Key words:** digestibility, milk composition, phenolic acids, polyunsaturated fatty acids, propolis, vitamin E

## INTRODUÇÃO

O leite bovino é considerado um dos alimentos mais completos em concentração e diversidade de nutrientes para alimentação humana. Ele é fonte de proteínas, lipídios e açúcares, também de vitaminas e minerais essenciais. Os lipídios do leite são compostos, principalmente, por triacilgliceróis, os quais contêm essencialmente ácidos graxos saturados (70%), com menor proporção de ácidos graxos monoinsaturados (25%) e poli-insaturados (5%) (Grummer, 1991). Apesar de conferir importantes propriedades sensoriais, físicas e de fabricação aos produtos lácteos (Lock & Bauman, 2004), o perfil da gordura do leite não é considerado balanceado para as necessidades humanas (Lucas et al., 2005).

A relação da ocorrência de doenças cardíacas com o consumo de gorduras saturadas (Lock & Bauman, 2004) fez com que o leite fosse colocado na lista de alimentos a serem evitados. Indicou-se o consumo de alimentos mais saudáveis e os ditos funcionais, aqueles que, além de nutrir, podem proporcionar benefícios à saúde e evitar doenças. Para atender a essa demanda, pesquisas foram direcionadas para elucidação da síntese da gordura do leite, objetivando melhorar o perfil de ácidos graxos no leite por meio da alimentação das vacas leiteiras.

Entre outros efeitos, o uso de grãos de oleaginosas e óleos vegetais nas dietas para vacas em lactação pode alterar a proporção que os ácidos graxos são sintetizados e incorporados à gordura do leite (Chilliard et al., 2007). Sendo ruminantes, toda estratégia alimentar adotada para vacas está sujeita aos efeitos da fermentação no rúmen, e, portanto, este é um fator que influencia o metabolismo lipídico da glândula mamária e a composição da gordura do leite. Os grãos de oleaginosas e óleos vegetais são fontes de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) os quais, no rúmen, hidrolizam-se dos triacilgliceróis pela lipólise e são parcialmente transformados pela biohidrogenação

em ácidos graxos saturados (AGS), um processo de natureza protetiva dos microrganismos ruminais contra a toxicidade dos AGPI. Desta forma, à gordura do leite são incorporados os AGPIs que passam intactos pelo rúmen, além de compostos intermediários e finais de biohidrogenação.

Com o uso de grãos de oleaginosas em dietas para vacas leiteiras, é possível obter perfil de gordura de leite próximo ao perfil preconizado relatado por Grummer (1991), o qual deveria conter 8% de AGS, 10% de AGPI (incluindo o ácido linoleico conjugado – CLA) e 82% de ácidos graxos monoinsaturados. Estudos biomédicos com modelos animais têm mostrado que o isômero *cis9,trans11*-CLA tem propriedades anticancerígenas e anti-aterogênicas (Lock & Bauman, 2004). Décadas de estudos renderam avanços acerca da manipulação da gordura do leite através da alimentação das vacas (Jenkins & McGuire, 2006) e foi constatado seu potencial para redução do risco de doenças coronarianas, visto o efeito de diminuição das concentrações sanguíneas de colesterol em humanos (Noakes et al., 1996).

Alterar a composição da gordura do leite é desejável do ponto de vista da saúde humana, mas isto pode modificar o equilíbrio presente no leite, pois, em condições normais, os nutrientes são secretados em proporções adequadas, assim o leite apresenta natureza bastante estável à oxidação, também referida como lipoperoxidação (Lindmark-Mansson & Akesson, 2000). O aumento da concentração de ácidos graxos insaturados na gordura do leite pode tornar a gordura instável, uma vez que as duplas ligações da cadeia conferem maior suscetibilidade de perda de elétrons para radicais livres ou por ação de outra fonte externa de energia como luz e íons metálicos (Timmons et al., 2001, Charmley & Nicholson, 1994).

Um radical livre é definido como uma espécie de existência independente que contém um ou mais elétrons não pareados em um orbital. Como exemplo de radicais livres, tem-se os radicais oxigenados superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), e o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ); para designar todas essas espécies reativas utiliza-se o termo coletivo espécies reativas de oxigênio. A natureza reativa dos radicais livres faz com que busquem constantemente outras moléculas para transferência de elétrons para sua estabilização. Os radicais livres são continuamente produzidos *in vivo* e em processos essenciais à vida, como por exemplo: mediante ligação de elétrons da cadeia transportadora de elétrons com oxigênio, evento final da fosforilação oxidativa, por fagócitos ativados, fibroblastos e linfócitos (Halliwell & Chirico, 1993). Sendo assim, a oxidação lipídica provocada por radicais livres é um evento de ocorrência nas células

vivas e nos alimentos.

A oxidação lipídica é iniciada pelo ataque de um ácido graxo por uma espécie reativa, com abstração de um elétron ou hidrogênio do carbono metileno da cadeia. O radical formado é altamente reativo ao oxigênio e após esta ligação (radical peroxil) ele atua na remoção de elétrons de outras moléculas ou ácidos graxos insaturados, originando a reação em cadeia. Assim, a oxidação é descrita em fases como iniciação, propagação e terminação (Frankel, 1980). Durante a propagação, produtos intermediários são produzidos e denominados como primários e secundários, os chamados hidroperóxidos dieno conjugados (Kiokias et al., 2006) e o malonaldeído (Vincke, 1970), respectivamente. A decomposição dos hidroperóxidos origina produtos finais de oxidação, como cetonas, ácidos e aldeídos, que conferem sabor e odor rançosos ao leite (Charmley & Nicholson, 1994).

A reação termina com a interação de dois radicais formando um composto não radical ou com a interferência de compostos antioxidantes. A ação antioxidante se dá pela inativação de radicais livres ou pela ligação com íons metálicos de transição e, como consequência, inibe ou atrasa a oxidação das moléculas oxidáveis. Os organismos vivos possuem uma multiplicidade de defesas antioxidantes que incluem a síntese das moléculas com essa capacidade e sua obtenção por meio da alimentação. O sistema antioxidante endógeno é composto pelas enzimas superóxido dismutase, glutathione peroxidase, catalase (Halliwell & Chirico, 1993), ácido úrico (Niki, 1987). Os compostos antioxidantes providos pelos alimentos complementam a defesa endógena e são diversos, como os tocoferóis, carotenoides e compostos fenólicos.

A depleção da defesa antioxidante ou aumento da produção de radicais livres causa um desequilíbrio nessa relação chamado estresse oxidativo (Halliwell & Chirico, 1993), que nos organismos pode resultar em oxidação e lesão em moléculas, como DNA, e tecidos. A oxidação nos alimentos pode causar a degradação das propriedades sensoriais, com rejeição do consumo. A detecção de produtos finais da oxidação lipídica é a evidência mais frequentemente citada no estudo do papel dos radicais livres nas lesões nos organismos, e uma compreensão deste processo é de grande importância na indústria de alimentos (Halliwell & Chirico, 1993).

A oxidação lipídica não foi observada somente no leite, mas também em lipídios sanguíneos de vacas, quando alimentadas com fontes de gorduras poli-insaturadas, tornando-as suscetíveis ao estresse oxidativo (Gobert et al., 2009). Os radicais livres, em excesso, podem causar danos a lipídios e macromoléculas importantes e até mesmo

modificar as vias metabólicas com alterações fisiológicas, causando, com isso, a ocorrência de desordens metabólicas (Miller et al., 1993). De fato, a suplementação lipídica às vacas acarreta o desequilíbrio oxidativo no animal e no leite que ele produz.

A presença de antioxidantes no leite é considerada o método apropriado de diminuir a oxidação lipídica (Ashes et al., 1997). Mais do que adicionar antioxidantes ao leite, incorporá-los por meio da alimentação animal poderia melhorar a defesa antioxidante e trazer benefícios também à saúde de vacas leiteiras de alta produção (Miller et al., 1993). Os antioxidantes mais conhecidos em nutrição animal são as vitaminas, e seus precursores que possuem esta propriedade, como os carotenoides e os tocoferóis.

Vitamina E é um termo referente a um ou mais compostos fenólicos relacionados estruturalmente, chamados tocoferóis e tocotrienóis. Sua solubilidade lipídica confere importante proteção das membranas lipídicas contra a oxidação, sendo o  $\alpha$ -tocoferol, o isômero de mais alta atividade biológica. A vitamina E atua rapidamente na redução dos radicais peroxil e interrompe a propagação da reação (Niki, 1984). Ela também está envolvida no funcionamento do sistema imune, e, em alguns casos, níveis elevados de suplementação resultam em melhora nas respostas imunológicas (Baldi, 2005). Em função da alta atividade metabólica de nutrientes para produção de leite, atenção especial é voltada para vacas leiteiras em lactação em relação às exigências de vitamina E, assim como vacas nos períodos de transição e pós-parto (Bouwstra et al., 2008), considerados intervalo de tempo de maior estresse oxidativo na vida desses animais.

A recomendação atual de vitamina E para vacas leiteiras em lactação é 20 UI/kg de matéria seca ingerida (NRC, 2001). Apesar de ser mínima a perda de vitamina E na fermentação ruminal, a eficiência de absorção intestinal é de somente 30% do ingerido. As concentrações plasmáticas da vitamina se elevam com o aumento da dose ingerida (Baldi, 2005).

A vitamina E pode atuar em sinergismo com a vitamina C, uma vitamina hidrossolúvel. A vitamina E apresenta a capacidade de reduzir o radical tocoferil formado a partir do tocoferol durante a redução de radicais livres, de modo que uma única molécula de vitamina E pode atuar em vários radicais. Essa ação da vitamina C também é referida como regeneração da vitamina E (Niki, 1984). Estudos também apontam que a vitamina E pode ter sinergismo com compostos fenólicos de plantas (Manach et al., 2004, Gobert et al., 2009).

O fornecimento da vitamina E durante o período seco de vacas leiteiras (680 UI/dia) está associado à menor ocorrência de retenção de placenta (Bourne et al., 2007). Para vacas em início de lactação, a vitamina E em dose 2000 UI/dia mostrou potencial para redução da contagem de células somáticas no leite (Baldi et al., 2000).

A vitamina E fornecida na dieta em dosagens superiores àquelas indicadas pelo NRC (2001) pode trazer benefícios nas funções citadas, porém seu excesso no organismo pode ser excretado. Contudo, sua eliminação pelo leite é interessante do ponto de vista da estabilidade oxidativa, pois esta vitamina pode atuar na proteção da gordura contra a oxidação.

Dosagens dietéticas de vitamina E de 400 UI/kg de matéria seca, que são superiores à dose preconizada pelo NRC (2001) para vacas, foram capazes de elevar a concentração de vitamina E no leite; uma vez transferida, foi verificado que a vitamina E atuou na proteção da gordura do leite e aumentou o tempo de prateleira (Atwal et al., 1991). A suplementação na dieta de 8000 UI/dia de vitamina E resultou em transferência de 0,25% ao leite e sua associação com selênio reduziu o odor rançoso (Charmley et al., 1993). Doses ainda maiores (9616 UI/dia) modificaram a concentração da vitamina no leite, com aumento de 45% em relação ao controle e foram suficientes para prevenir a oxidação (Focant et al., 1998).

O limite biológico de utilização da vitamina E sugere que outras fontes de antioxidantes possam ser utilizadas como aliadas na proteção contra o estresse oxidativo. Antioxidantes de natureza lipofílica e hidrofílica podem atuar em sinergismo. Ao usar a vitamina E associada a um extrato natural de plantas, composto por alecrim, uva, laranja e calêndula na dieta de vacas, o estresse oxidativo causado pela suplementação lipídica pode ser atenuado (Gobert et al., 2009).

Os extratos vegetais sempre foram utilizados pelo homem ao longo do tempo a fim de aproveitar suas propriedades biológicas. É possível transmitir esta prática para a produção animal, pois atualmente é preconizado o uso de aditivos naturais na nutrição animal em razão das preocupações de ordem sanitária e de segurança da parte dos consumidores.

As propriedades biológicas dos extratos vegetais se devem aos compostos secundários, produzidos pelas plantas superiores, como os terpenoides, alcaloides e fenólicos (Grace, 2005). O termo secundário é empregado, pois estes compostos não estão diretamente envolvidos nas funções de crescimento e desenvolvimento da planta. Os compostos fenólicos apresentam função antioxidante e são caracterizados como

metabólitos aromáticos que possuem um ou mais grupos hidroxila, capazes de doar hidrogênio (Grace, 2005). Existem diversas classificações para estes compostos, uma delas os divide em ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas (Manach et al., 2004).

A maioria dos compostos fenólicos de plantas é sintetizada pela via do fenilpropanoide, que produz compostos aromáticos a partir da via do ácido chiquímico em uma série de metabólitos à base de fenol. Os compostos fenólicos atuam nas plantas como antioxidantes na defesa contra o estresse oxidativo causado por fatores externos como radiação ultravioleta excessiva, baixas temperaturas e patógenos (Grace, 2005). Os herbívoros, por sua vez, utilizam estratégias que minimizam os efeitos daqueles compostos, inclusive a adaptação ruminal (Van Soest, 1994).

É característico dos ruminantes a detoxificação microbiana ruminal de compostos secundários, assim como ocorre no cólon de animais monogástricos (Manach et al., 2004). No rúmen acontece a maior parte da digestão de compostos fenólicos constituintes de parede celular (Jung et al., 1983).

As principais reações de ácidos cinâmicos mediadas pela microflora intestinal são: redução da cadeia lateral alifática insaturada, desmetilação do anel aromático, desidroxilação e descarboxilação (Martin, 1982). Estes metabólitos microbianos são absorvidos e conjugados com glicina, ácido glicurônico ou sulfato no fígado (Manach et al., 2004), e depois excretados via urina (Martin, 1982) e também pelo leite (Besle et al., 2010), na forma de vários compostos aromáticos simples. Estes metabólitos podem ser ativos, como no caso das lignanas da linhaça (Gagnon et al., 2009) e isoflavonas do trevo (King et al., 1998).

A própolis é conhecida pela sua concentração de compostos fenólicos. Ela é relatada como uma substância resinosa que as abelhas coletam de diferentes exsudatos de plantas e usam para preencher as lacunas e selar partes da colmeia (Marcucci et al., 2001). Embora a própolis seja um produto de origem animal, uma proporção considerável de seus componentes, principalmente aqueles que apresentam atividade biológica, são derivados de plantas (Salatino et al., 2005). Pelo menos 200 compostos foram identificados em amostras diferentes de própolis, com mais de 100 em cada um, incluindo: ácidos graxos, ácidos fenólicos e ésteres, flavonoides (flavonas, flavononas, flavonóis, dihidroflavonois, chalconas), terpenos, aldeídos aromáticos e álcoois, sesquiterpenos, naftaleno e derivados de estilbeno (Marcucci et al., 2001). Ao analisar amostras de própolis provenientes de diversas regiões, Cunha et al. (2004) relataram

que a própolis brasileira compõem-se majoritariamente de ácidos fenólicos. Os autores encontraram compostos derivados do ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido hidroxicinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, kaempferol e pinobanksina.

A composição da própolis é própria do seu local de origem, ou seja, das plantas que são visitadas pelas abelhas. A própolis verde foi reportada como sendo proveniente das folhas jovens da planta *Baccharis dracunculifolia* (Kumazawa et al., 2003; Park et al., 2004) e a análise da planta de origem é interessante para a padronização do perfil químico e controle de qualidade (Funari & Ferro, 2006). A composição da própolis varia sazonalmente (Bankova et al., 1998), pois ela acompanha o ciclo de desenvolvimento das plantas que são visitadas pelas abelhas ao longo do ano. A composição do extrato de própolis pode variar também com o método de extração (Cunha et al., 2004) e a concentração utilizada de solvente (Cottica et al., 2011).

Os compostos fenólicos da própolis são os responsáveis pelas suas propriedades biológicas e estas são investigadas na aplicação do produto em estudos diversos, como terapêuticos e médicos. Em estudos de produção animal, há relatos da forma de utilização de extrato líquido de própolis, geralmente em solução hidroalcoólica, ou na forma de pó misturado a um excipiente. O extrato de própolis foi investigado, principalmente, em seu potencial de manipular a fermentação ruminal (Stradiotti Junior et al., 2004a), auxiliar na redução da ocorrência de mastite (Pinto et al., 2001), e, recentemente, melhorar a qualidade do leite (Aguiar et al., 2014b).

Já foi demonstrado que o extrato de própolis brasileira apresenta efeito supressor do crescimento *in vitro* de bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus fecalis*, e contra o *Trypanosoma cruzi* (Marcucci et al., 2001). Em se tratando de bactérias ruminais (Aguiar et al., 2013), três extratos de própolis foram capazes de inibir o crescimento de grandes grupos de bactérias, como *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella albensis* e *Streptococcus bovis*, sendo que efeitos mais pronunciados foram observados com uso do extrato de própolis com maior concentração de flavonoides. *Peptostreptococcus* e *Clostridium aminophilum* são bactérias hiper produtoras de amônia e o efeito supressor da própolis foi observado para estes dois grupos (Aguiar et al., 2013). A ação antimicrobiana dos compostos fenólicos inclui a modificação da permeabilidade de membrana da bactéria, do estado energético e motilidade (Mirzoeva et al., 1997).

A densidade da população de protozoários se reduziu com um extrato de

própolis em fermentação *in vitro* (Broudiscou et al., 2000). Em bubalinos, o mesmo efeito do extrato de própolis foi observado na supressão nas populações de *Entodinium* e *Diplodiniinae* (Rísoli et al., 2009).

Estudos de fermentação *in vitro* indicaram que o extrato de própolis pode influenciar a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) para aumento na produção de propionato (Broudiscou et al., 2000), em detrimento da produção de acetato. A supressão das bactérias celulolíticas é considerada a causa deste efeito, mas também a redução das bactérias produtoras de formato e hidrogênio, que diminuem a produção de metano, havendo mais energia que é aproveitada da dieta (Stradiotti Junior et al., 2004a).

De modo geral, o consumo de matéria seca não foi influenciado pelo fornecimento de extrato de própolis nas dietas (Stelzer et al., 2009, Lana et al., 2007). Em dietas contendo alta taxa de proteína e carboidrato fermentável, o extrato de própolis pôde inibir a atividade específica de produção de amônia pela seleção de microrganismos ruminais. Isto indicou que parte da proteína da dieta pode escapar da fermentação ruminal e melhorar a eficiência produtiva do animal (Stradiotti Junior et al., 2004b, Oliveira et al., 2006).

A concentração de própolis e álcool em um extrato pode influenciar sua composição e ação no ambiente ruminal (Aguiar et al., 2014a). Segundo o referido trabalho, o extrato de própolis pode reduzir a digestibilidade ruminal da proteína em razão da redução das populações de bactéria produtoras de nitrogênio amoniacal, corroborado por Aguiar et al. (2013), permitindo, assim, maior aporte de proteína dietética no intestino delgado para absorção. Isto também pode auxiliar na diminuição da excreção de nitrogênio, assim como afirmado por Stradiotti Junior et al. (2004b).

Em um estudo de desempenho de vacas leiteiras, um extrato etanólico de própolis não modificou a produção de leite, nem os seus componentes, gordura, proteína e lactose (Stelzer et al., 2009). Um trabalho mais aprofundado foi realizado com a utilização de três extratos de própolis para vacas em lactação, os quais foram capazes de elevar as concentrações de AGPI e CLA na gordura e também a atividade antioxidante do leite. A magnitude das modificações destes parâmetros dependeu da concentração de compostos fenólicos do extrato de própolis fornecido às vacas, sendo que o mais concentrado favoreceu a atividade antioxidante do leite (Aguiar et al., 2014b). Este parâmetro mostra que o leite poderia ter maior estabilidade oxidativa e suportaria maior tempo passível para consumo. Estes resultados indicam que o uso do extrato de própolis

visando melhorar a qualidade oxidativa do leite se mostra promissor para realização de novos estudos.

## LITERATURA CITADA

(Normas: Animal Feed Science and Technology)

- Aguiar, S. C., Zeoula, L. M., Franco, S. L., Peres, L. P., Arcuri, P.B., Forano, E., 2013. Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria in vitro. *World J Microb. Biot.* 29, 1951-1959.
- Aguiar, S.C., Paula, E.M., Yoshimura, E.H., Santos, W.B.R., Machado, E., Valero, M.V., Santos, G.T., Zeoula, L.M., 2014a. Effects of phenolic compounds in propolis on digestive and ruminal parameters in dairy cows. *R. Bras. Zootec.* 43, 197-206.
- Aguiar, S.C.; Cottica, S.M., Boeing, J.S., Samensari, R.B., Santos, G.T., Visentainer, J.V., Zeoula, L.M., 2014b. Effect of feeding phenolic compounds from propolis extracts to dairy cows on milk production, milk fatty acid composition, and the antioxidant capacity of milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* 193, 148-154.
- Ashes, J.R., Gulati, S.K., Scott, T.W., 1997. Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. *J. Dairy Sci.* 80, 2204–2212.
- Atwal, A.S., Hidiroglou, M., Kramer, J.K.G., 1991. Effects of feeding Protec® and  $\alpha$ -tocopherol on fatty acid composition and oxidative stability of cow's milk. *J. Dairy Sci.* 74, 140-145.
- Baldi, A., 2005. Vitamin E in dairy cows. *Liv. Prod. Sci.* 98, 117– 122.
- Baldi, A., Savoini, G., Pinotti, L., Monfardini, E., Cheli, F., Dell'Orto, V., 2000. Effects of vitamin E and different energy sources on vitamin E status, milk quality and reproduction in transition cows. *J. Vet. Med. A* 47, 599-608.
- Bankova V., Boudourova-Krasteva, G., Popov, S., Sforcin, J.M, Funari, S.R.C., 1998. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apid.* 29, 361-367.
- Bauman, D.E., Griinari, J.M., 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23, 203-227.
- Besle, J.M., Viala, D., Martin, B., Pradel, P., Meunier, B., Berdagué, J.L., Fraisse, D., 2010. Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *J Dairy Sci.* 93, 2846-2856.
- Bourne, N., Laven, R., Wathes, D.C., Martinez, T., McGowan, M., 2007. A meta-analysis of the effects of Vitamin E supplementation on the incidence of retained foetal membranes in dairy cows. *Theriogenology* 67, 494–501.
- Bouwstra, R.J., Goselink, R.M.A., Dobbelaar, P., Nielen, M., Newbold, J.R., Van Werven, T., 2008. The relationship between oxidative damage and vitamin E concentration in blood, milk, and liver tissue from vitamin E supplemented and nonsupplemented periparturient heifers. *J. Dairy Sci.* 91, 977–987.
- Broudiscou, L.P., Papon, Y., Broudiscou, A.F., 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87, 263-277.

- Charmley, E., Nicholson, J.W.G., Zee, J.A., 1993. Effect of supplemental vitamin E and selenium in the diet on vitamin E and selenium levels and control of oxidized flavor in milk from Holstein cows. *Can. J. Anim. Sci.* 73, 453-457.
- 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. Lip. Sci. Technol.* 109, 828–855.
- Cottica, S.M., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Franco, S.L., Zeoula, L.M., Visenteiner, J.V., 2011. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *J Braz. Chem. Soc.* 22, 929-935.
- Cunha, I.B.S., Salomão, K., Shimizu, M., Bankova, V.S., Custódio, A.R., Castro, S.L., Marcucci, M.C., 2004. Antitrypanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis mellifera*. *Chem. Pharm. Bull.* 52, 602-604.
- Focant, M., Mignolet, E., Marique, M., Clabots, F., Breyne, T., Dalemans, D., Larondelle, Y., 1998. The effect of vitamin E supplementation of cow diets containing rapeseed and linseed on the prevention of milk fat oxidation. *J. Dairy Sci.* 81, 1095–1101.
- Frankel, E.M., 1980. Lipid oxidation. *Prog. Lipid Res.* 19, 1-22.
- Funari, C.S., Ferro, V.O., 2006. Análise de própolis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26, 171-178.
- Gagnon, N., Côrtes, C., Silva, D., Kazama, R., Benchaar, C., Santos, G., Zeoula, L., Petit, H.V., 2009. Ruminant metabolism of flaxseed (*Linum usitatissimum*) lignans to the mammalian lignan enterolactone and its concentration in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Brit. J. Nut.* 102, 1015–1023.
- 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.
- Grace, S.C., 2005. Phenolics as antioxidants. Smirnoff, N. (Ed.) *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Wiley-Blackwell, Oxford.
- 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.* 1993, 715-725.
- Jenkins, T.C., McGuire, M.A., 2006. Major advances in nutrition: impact on milk composition. *J. Dairy Sci.* 89, 1302–1310.
- Jung, H.J.G., Fahey, G.C., Merchen, N.R., 1983. Effects of ruminant digestion and metabolism on phenolic monomers of forages. *Brit. J. Nutrit.* 50, 637-651.
- King, R.A., Mano, M.M., Head, R.J., 1998. Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk samples. *J Dairy Res.* 65, 479-489.
- Kiokias, S.N., Dimakou, C.P., Tsaprouni, I.V., Oreopoulou., 2006. Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. *Food Biophys.* 3, 155-123.
- Kumazawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2003. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem. Pharm. Bull.* 5, 740-742.
- Lana, R.P., Camardelli, M.M.L., Rodrigues, M.T., Eifert, E.C., Oliveira, M.V.M., Stradiotti Junior, D., Oliveira, J.S., 2007. Soybean oil and propolis in the diets of dairy goats: intake of nutrients and ruminal metabolism. *R. Bras. Zootec.* 36, 191-197.

- Lindmark-Mansson, H., Akesson, B., 2000. Antioxidative factors in milk. *Brit. J. Nutr.* 84, 103-110.
- Lock, A.L., Bauman, D.E., 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39, 1197–1206.
- Lucas, A., Coulon, J.B., Grolier, P., Martin, B., Rock, E., 2005.. Nutritional quality of dairy products and human health. *Indicators of milk and beef quality - EAAP*. 112, Wageningen, Netherland, pp.163-178.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727-747.
- Marcucci, M.C., Ferreres, F., Garcia-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* 74, 105–112.
- Martin, A.K., 1982. The origin of urinary aromatic compounds excreted by ruminants 2. The metabolism of phenolic cinnamic acids to benzoic acid. *Br. J. Nutr.* 47, 155-164.
- Miller, J.K., Brzezinska-Slebozinska, E., Madsen, F.C., 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy Sci.* 76, 2812-2823.
- Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N., Calder, P.C., 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* 152, 239-246.
- Niki, E., 1987. Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* 44, 227-253.
- Noakes, M., Nestel, P.J., Clifton, P.M., 1996. Modifying the fatty acid profile of dairy products through feedlot technology lowers plasma cholesterol of humans consuming the products. *Am. J. Clin. Nutr.* 63, 42-46.
- NRC, National Research Council, 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. National Academy of Science, Washington, DC.
- Oliveira, J.S., Queiroz, A.C., Lana, R.P., Mantovani, H.C., Generoso, R.A.R., 2006. Effects of monensin and bee propolis on *in vitro* fermentation of amino acids by mixed ruminal bacteria. *R. Bras. Zootec.* 35, 275-281.
- Park, Y.K., Paredes-Guzman, J.F., Aguiar, C.L., Alencar, S.M., Fujiwara, F.Y., 2004. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J. Agric. Food. Chem.* 52, 1100-1103.
- Pinto, M.S., Faria, J.E., Message, D., Cassini, S.T., Pereira, C.S., Gioso, M.M., 2001. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38, 278-283.
- Ríspoli, T.B., Rodrigues, I.L., Martins Neto, R.G., Kazama, R., Prado, O.P.P., Zeoula, L.M., Arcuri, P.B., 2009. Ruminal ciliate protozoa of cattle and buffalo fed on diet supplemented with monensin or extracts from propolis. *Pesq. Agropec. Bras.* 44, 92-97.
- Salatino, A., Teixeira, E. W., Negri, G., Message, D., 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *J. Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2, 33-38.
- Stelzer, F.S., Lana, R.P., Campos, J.M.S., Mancio, A.B., Pereira, J.C., Lima, J.G., 2009. Performance of milking cows fed concentrate at different levels associated or not with propolis. *R. Bras. Zootec.* 38, 1381-1389.
- Stradiotti Junior, D., Queiroz, A.C., Lana, R.P., Pacheco, C.G., Camardelli, M.M.L., Detmann, E., Eifert, E.C., Nunes, P.M.M., Oliveira, M.V.M., 2004a. Effect of the

- propolis on the in vitro fermentation of different feedstuffs by the technique of gas production. *R. Bras. Zootec.* 33, 1093-1099.
- Stradiotti Junior, D., Queiroz, A.C., Lana, R.P., Pacheco, C.G., Eifert, E.C., Nunes, P.M.M., 2004b. Effect of the propolis on amino acids deamination and ruminal fermentation. *R. Bras. Zootec.* 33, 1086-1092.
- Timmons, J.S., Weiss, W.P., Palmquist, D.L., Harper, W.J., 2001. Relationships among dietary roasted soybeans, milk components, and spontaneous oxidized flavor of milk. *J. Dairy Sci.* 84, 2440–2449.
- Van Soest, P. J., 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca.
- Vyncke, W., 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette. Seifen. Anstrichm.* 72, 1084-1087.

## OBJETIVOS GERAIS

Estudar a ação dos compostos fenólicos da própolis sobre as características ruminais, produtos finais de fermentação e produção de gás em fermentação *in vitro*.

Avaliar a influência do uso associado ou não de extrato de própolis e vitamina E como suplemento para vacas sobre a digestão e aproveitamento de nutrientes de dietas contendo óleo de linhaça.

Determinar os efeitos da suplementação de extrato de própolis associado ou não à vitamina E para vacas alimentadas com dietas contendo óleo de linhaça sobre a transferência de compostos antioxidantes ao leite e estabilidade oxidativa.

Estudar o potencial do leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes como alimento funcional para a saúde de ratos em crescimento.

**I – Effect of propolis on *in vitro* fermentation and methane emissions by the rumen microbial population in dairy cows**  
(Animal Feed Science and Technology)

**Abstract**

Propolis is a product rich in phenolic compounds that could be utilized in animal nutrition as an alternative to chemicals, drugs or growth promoters to increase ruminant production performances. Here it was determined the effects of a Brazilian propolis extract on ruminal fermentation and gas production. The fate of propolis phenolic compounds in the rumen medium was also investigated. Fermentation was performed using 24-hour batches over three periods. Propolis extract in hydroalcoholic solution was applied at the following doses: 1.1, 2.2, 6.7, 11.1, 16.7, 22.2, 27.8, 38.9, and 55.6 µg/mg of substrate. Fermentation substrate consisted of 450 mg composed of alfalfa hay, soybean meal and wheat bran in dry matter. After 24 hours, fermentation with propolis extract resulted in the appearance of seven compounds related to propolis components in the medium. The dose of propolis extract linearly decreased the pH of the medium and linearly increased propionate production, which reduced the acetate-to-propionate ratio and influenced the total production of short-chain fatty acids. Propolis also linearly reduced methane production and increased carbon dioxide-to-methane ratio. Ammonia nitrogen and *in vitro* digestibility of organic matter were similar among treatments. The combination of increased propionate production and decreased methane production suggest a better utilization of energy from feed.

*Keywords:* Ammonia nitrogen; Digestibility; Methane; Phenolic acids; Short-chain fatty acids

*Abbreviations:* ADF, acid detergent fiber determined inclusive of residual ash; DM, dry matter; tIVDOM, true *in vitro* digestibility of organic matter; lignin (sa), lignin determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid; aNDF, neutral detergent fiber assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash; OM, organic matter; SCFA, short-chain fatty acids.

## 1. Introduction

Additives are an important part of animal nutrition to improve nutrient utilization and livestock performance. The main purpose of the ongoing search for products that manipulate rumen is to improve digestibility and reduce the energy lost in the digestion process. Chemical additives or antibiotics used to improve ruminal fermentation in the past are no longer acceptable today, and many have been banned, prompting professionals to turn to plant secondary metabolites already present in natural ruminant feed. Propolis is one such natural product that could meet current consumer concerns over the quality and safety of animal origin food.

Man's relationship with plant extracts dates back to antiquity. Plant extracts contain secondary compounds such as terpenoids, alkaloids and phenols (Grace, 2005). Phenolic compounds are metabolites with aromatic hydroxyl groups, a characteristic that determines their antioxidant activity. Phenolics can be subdivided in phenolic acids, flavonoids, stilbenes and lignans (Manach et al., 2004). Numerous ruminal fermentation studies using plant extracts or isolated active compounds have been carried out to discover new natural food additives (Benchaar et al., 2007). Oskoueian et al. (2013) reported that flavone, myricetin and kaempferol, at 4.5% proportion to substrate, reduced microbial fermentation. Naringin and quercetin at the same concentrations were able to maintain fermentation activity with a significant drop in total ruminal protozoa population and methane production. These results, related to the antimicrobial effect of flavonoids, were considered beneficial for the manipulation of ruminal fermentation.

Propolis has attracted interest in animal nutrition due to its many diverse biological effects, including antimicrobial (Pinto et al., 2001), antioxidant (Cottica et al., 2011), and anti-inflammatory and healing properties (Kolankaya et al., 2002). Propolis is a mixture of plant resins, essential oils, waxes and pollen collected by bees in a hive (Monti et al., 1983). Its properties are related to the presence of phenolic compounds (flavonoids and hydroxycinnamic acid derivatives) in plants, where they are abundant and diverse and play vital roles.

Green propolis from Brazil originates mainly from the buds of *Baccharis dracunculifolia* and principally comprises derivatives of *p*-coumaric acid (Teixeira et al., 2008). Green propolis extract has been used to manipulate rumen fermentation (Stradiotti Junior et al., 2004), enhance nutrient utilization by dairy cows (Aguiar et al., 2014a), and improve fat quality and antioxidant activity in milk (Aguiar et al., 2014b).

However, the effect of green propolis phenolics on rumen *in vitro* fermentation has not been clearly established.

In this study, it was applied doses of green propolis extract to *in vitro* ruminal fermentation and to verify its influence on ruminal characteristics, end-products fermentation and gas production.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Propolis processing**

Propolis samples were obtained from Africanized honeybees (*Apis mellifera*) bred in the apiary at the Iguatemi Experimental Farm of Maringá State University (Maringá, PR), Brazil. The apiary is located within a eucalyptus reserve (*Eucalyptus* sp.) surrounded by native forest including Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), being characterized as green type. Propolis was prepared according to Franco and Bueno (1999) and was registered in the National Institute of Intellectual Property–Brazil, under No. 0605768-3. Extract was obtained from a hydroalcoholic solution in a turbo extraction of raw propolis for 15 minutes, vacuum-filtered, stripped of its alcohol (<15%) in a rotary evaporator (Büchi R210, São Paulo, SP, Brazil), and spray-dried (Labmaq MSD 1, Ribeirão Preto, SP, Brazil) at an inlet temperature of 100°C. After drying, samples were stored in closed bottles and kept at 4°C.

### **2.2. Animals, substrates and treatments**

The animals were reared at the Unité Expérimentale sur les Ruminants de Theix (UERT) of Institut National de la Recherche Agronomique, INRA (Theix, France), an installation accredited for experimental animal care and use under No. 6334517. The experiment was conducted in accordance with EU directive 2010/63/EU on animal experiments. Rumen content was collected from three cannulated dry Holstein cows averaging  $867 \pm 58$  kg body weight. Diet was composed of 8.7 kg of native prairie hay and 3.45 kg of concentrate (DM basis). The amount of feed offered was adjusted for *ad libitum* intake. The animals were adapted to the diet two weeks before the beginning of *in vitro* experiments, and had free access to water and mineral lick (Sel'pur, Salins, Paris, France).

*In vitro* fermentation was performed using a batch system. A buffer solution (Goering and Van Soest, 1970) was anaerobically prepared as recommended by Mould et al. (2005) and modified by Niderkorn et al (2011). The 450 mg substrate (Table 1) was comprised of alfalfa hay (200 mg), wheat bran (200 mg) and soybean meal (50 mg) in dry matter, with all components ground to 1 mm. For propolis treatment, the dried extract was dissolved in ethanol (700:300, v/v) and applied in doses: 1.1, 2.2, 6.7, 11.1, 16.7, 22.2, 27.8, 38.9, and 55.6 µg/mg of substrate, in triplicate, in three periods. An ethanol solution (700:300, v/v) was used for control. A batch without substrate and ethanol was used as blank.

**Table 1**

Chemical composition of ingredients and fermentation substrate (g/kg DM)<sup>1</sup>

	Wheat bran	Soybean meal	Alfalfa hay	Substrate
Organic matter	980.8	930.3	908.0	926.5
Nitrogen	17.6	84.2	20.5	48.1
aNDF	149.5	124.9	537.9	309.6
ADF	39.8	70.5	417.7	219.6
Lignin (sa)	7.6	-	102.0	45.8
ME (Mcal/kg DM)	2.6	3.4	1.5	2.5

<sup>1</sup>DM=dry matter, aNDF=neutral detergent fiber, ADF=acid detergent fiber, ME=metabolizable energy, values from Inra (2007).

### 2.3. Experimental procedures

Rumen contents were collected from animals (1 L from each cow) before the morning meal, then pooled and carried to the lab in insulated flasks. The samples were filtered through a polyester monofilament fabric (800 µm mesh size). Filtered rumen liquid and buffer solution were mixed in a 3:5 ratio, with the propolis doses, in 120 mL serum bottles which were sealed with gas-tight rubber stoppers under a N<sub>2</sub> atmosphere and incubated for 24 h at 39°C. Fermentation contents were stirred at regular intervals using a magnetic bar stirrer (300 rpm for 30 s followed by a 2.5 min rest period).

After 5 hours and 24 h incubation, the volume of gas produced was measured using a pressure transducer (Theodorou et al., 1994) and a sample was collected from the headspace with a 10-mL syringe for gas chromatography analysis of fermentation gases. After 24 h, batches were uncapped, pH was measured, and the fermentation media were centrifuged (Eppendorf 5810R, Montesson, France) at 3000 g for 10 minutes at 4°C. For ammonia measurements, 5 mL of supernatant was mixed with

0.5 mL of orthophosphoric acid for storage until analysis. For determination of short-chain fatty acids (SCFA), an aliquot of 0.8 mL was mixed with 0.5 mL of crotonic acid and left at 4°C for two hours, then centrifuged (3000 g, 10 minutes, 4°C), and the supernatant was collected and held at -20°C until analysis. Zero-hour incubation blanks were used to calculate net production of fermentation products at the end of the incubation period.

For phenolic compound analysis, fermentation media supernatants were diluted with water (1:1), freeze-dried (Finn-Aqua® Lyovac GT2, Munich, Germany) and stored at -20°C.

To determine true *in vitro* organic matter digestibility (*tIVOMD*), the fermentation media were discarded after centrifugation at 3,000 g for 3 min at 4°C and the residues were washed with 30 mL of a neutral detergent solution (Senger et al., 2008) in an autoclave at 110°C for 40 minutes to eliminate bacteria from the residues. Tubes were then centrifuged in the same conditions as above, the supernatants were discarded, and the residues were washed 3 times with boiling distilled water, re-centrifuged and dried (60°C, 48 h) to be weighed. Residual ash content of the residues was then assessed. Digestibility was calculated as the ratio between the degraded organic matter of the substrate and the initial organic matter of the substrate weight in the fermenters.

#### 2.4. Chemical analysis

The DM of feed and fermentation residues was determined in a forced-air oven according to AOAC procedure 934.01 (1990). Ashes were determined by combustion at 600°C for 6 hours according to AOAC procedure 924.05 (1990). Nitrogen in feed was determined by the Dumas combustion method of AOAC procedure 990.03 (1995) using a Leco-138 FP428 nitrogen analyzer (Leco Corp., St Joseph, MI). Concentrations of neutral detergent fiber (aNDF) inclusive of residual ash were measured according to Mertens (2002) with the use of amylase but without sodium sulfite in the neutral detergent solution and expressed inclusive of residual ash. Concentrations of acid detergent fiber (ADF) inclusive of residual ash were determined according to AOAC procedure 973.18 (1990). Lignin contents [Lignin(sa)] were determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid (Van Soest and Wine, 1967). Metabolizable energy of the substrate was estimated from energy value of feeds from INRA (2007).

SCFA were analyzed by gas chromatography (Broudicou and Lassalas, 2000). Ammonia was measured by colorimetry following Weatherburn (1967) using a Technicon Autoanalyzer II system as described by Davies and Taylor (1965). Fermentation gases were analyzed by gas chromatography performed on an Agilent microGC 3000 equipped with two column modules. Channel A (Molecular Sieve 5A 10m) was used for H<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> with argon as carrier gas and channel B (PPU 8m) was used for CO<sub>2</sub> with helium as carrier gas. The detector was a micro-thermal conductivity detector (TCD). Temperature of the injector, column A and column B was set at 90°C, 100°C and 75°C, respectively. Molar concentration of individual gases was calibrated using a certified standard gas mixture (relative accuracy of 20 mM/M, Alphagaz No. 073562.00).

Reagents used in chromatographic analyzes were acetonitrile (VWR, HPLC grade, Fontenay-sous-Bois, France), commercial standards of caffeic acid, chicoric acid, *p*-coumaric acid, naringenin, chrysin (Sigma-Aldrich >95%, Saint-Quentin-Fallavier, France) and Artepillin-C (Wako 98%, Montbonnot-Saint-Martin, France).

Phenolic compounds were extracted from 7 mg of propolis extract dissolved in 15 mL ultrapure water using ethyl acetate (25 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, and evaporated (Janke and Kunkel RV 05, Staufen, Germany). The dry residue was resuspended in pure methanol to be analyzed. Phenolic compounds from the fermentation medium were extracted according to Fraisse et al. (2007). Analyses were performed using high-performance liquid chromatography (HPLC) in a Agilent system (1100 Series, Massy, France) equipped with a diode-array detector using a C6C3 RP column (Nucleodur Sphinx, 150 mm × 4.6 mm × 5 μm, Macherey-Nagel, Hoerd, France) held at 35°C. Detection wavelengths were 275 and 320 nm. A mobile phase of 0.05% formic acid in water (solvent A), 0.05% formic acid in 70% acetonitrile (solvent B) and acetonitrile (solvent D) was used at a flow rate of 0.35 mL/min. The following gradient was used: 58% A and 42% B for 5 min, then ramp-up to reach 100% B at 25 min, then 5 min switching to attain 100% D at 30 min, maintained for 10 minutes. The system was equilibrated at initial conditions for 10 min between two runs. Phenolic compounds were identified and quantified using commercial standards. All unknown peaks having the same UV spectra as *p*-coumaric acid and caffeic acid were quantified as *p*-coumaric acid equivalent and caffeic acid equivalent, respectively. Other peaks had similar UV spectra to chrysin, and one peak similar to dihydrokaempferide was quantified as naringenin equivalent. Peak integration was performed using the

Chemstation software (Agilent Technologies). Retention times and peak areas (in arbitrary area units; aau) of all batches at both wavelengths were grouped in an Excel file and realigned according to the retention times. Missing values in the resulting dataset were replaced by 1. Background noise was about 5 aau.

## 2.5. Statistical analysis

Results were tested by analysis of variance using the GLM procedure of SAS 9.0 in a completely randomized design with the general model:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + P_j + e_{ij},$$

where,

$Y_{ij}$  is the dependent variable,  $\mu$  is the overall mean,  $T_i$  is the fixed effect of treatment ( $i=0-55.6 \mu\text{g}/\text{mg}$ ),  $P_j$  is the fixed effect of period ( $j=1-3$ ) and  $+ e_{ij}$  is the random residual error. Treatment sum of squares was partitioned to provide linear and quadratic contrasts. Significance was declared at  $P<0.05$ .

## 3. Results

Artepillin-C, chicoric acid, *p*-coumaric acid and caffeic acid were identified in propolis extract. Several other peaks were quantified in *p*-coumaric acid equivalents, caffeic acid equivalents, chrysin-equivalents or naringenin-equivalents based on their UV spectra (Table 2). Fermentation for 24 hours with the propolis extract resulted in the appearance of seven peaks which increased in intensity in relation to the dose of propolis, at retention times 27.2 min ( $P=0.007$ ), 28.0 min ( $P<0.001$ ), 28.5 min ( $P<0.001$ ), 29.1 min ( $P<0.001$ ), 30.1 min ( $P<0.001$ ), 31.3 min ( $P=0.012$ ) and 33.5 min ( $P=0.040$ ). Examples of peak area variation according to propolis dose are given in Figure 1.

Propolis extract linearly reduced ( $P<0.01$ ) the final pH of the fermentation medium (Table 3).  $\text{N-NH}_3$  concentration was similar among treatments. There was a linear effect of propolis to increase propionate production ( $P<0.001$ ), which decreased ( $P<0.001$ ) acetate-to-propionate ratio and tended to slightly increase ( $P=0.08$ ) total SCFA production. Using propolis extract quadratically decreased the production of isovalerate ( $P=0.03$ ). Other individual SCFA and IVDOM were similar among doses.

Using propolis extract affected the production of fermentation gases (Table 4). Within 5 hours, the treatments linearly reduced methane production ( $P=0.05$ ) and increased  $\text{CO}_2$  production ( $P<0.01$ ), total gas production ( $P=0.05$ ) and  $\text{CO}_2$ -to-methane ratio ( $P<0.001$ ). Within 24 hours of fermentation, treatment linearly reduced methane production ( $P<0.001$ ) and resulted in an increase in  $\text{CO}_2$ -to-methane ratio ( $P<0.001$ ).

**Table 2**

Composition of phenolic compounds of the propolis extract

Phenolic compound	Concentration (mg/g)
Caffeic acid	$1.93 \pm 0.04$
<i>p</i> -coumaric acid	$8.32 \pm 0.08$
Chicoric acid	$19.26 \pm 0.41$
Artepillin C	$31.32 \pm 0.44$
Unknown phenolic compounds:	
Dihydrokaempferide-like (naringenin equivalent)	$5.15 \pm 0.03$
<i>p</i> -coumaric acid-like ( <i>p</i> -coumaric acid equivalent)	$49.37 \pm 1.60$
Caffeic acid-like (caffeic acid equivalent)	$5.77 \pm 0.27$
Chrysin-like (chrysin equivalent)	$44.41 \pm 0.26$
Total phenolic compounds	$165.55 \pm 3.14$

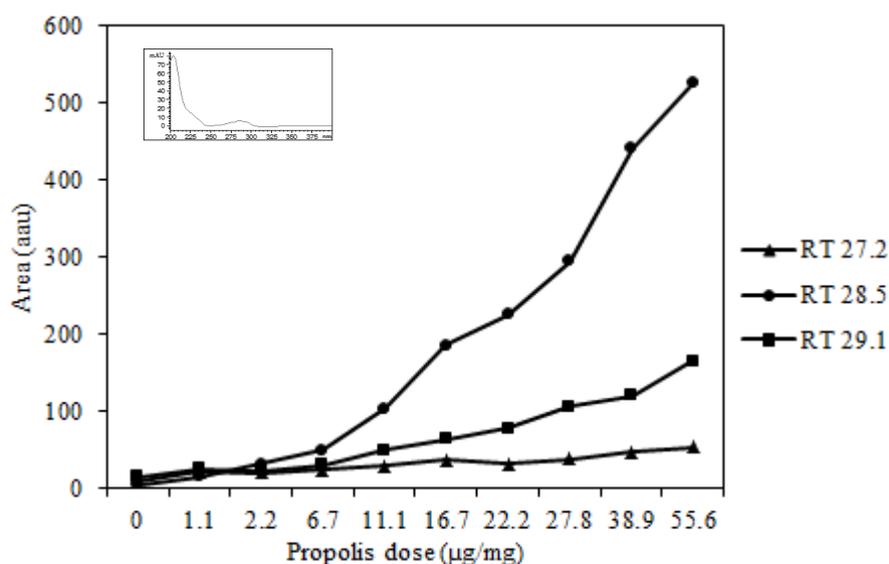


Fig 1. Peak areas (arbitrary area units; aau) of components appearing in the fermentation medium as function of propolis dose initially added. Examples at 275 nm; peaks at RT=retention time (minutes) 27.2 min ( $P=0.007$ ), 28.5 min ( $P<0.001$ ), 29.1 min ( $P<0.001$ ).

**Table 3**Ruminal pH and *in vitro* fermentation products ( $\mu\text{mol}/\text{batch}$ ) using propolis extract at 24h

	Propolis dose ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )										SEM	P-value	
	0	1.1	2.2	6.7	11.1	16.7	22.2	27.8	38.9	55.6		Linear	Quadratic
pH	6.19	6.16	6.16	6.16	6.15	6.15	6.14	6.14	6.14	6.14	0.01	<0.01	0.09
N-NH <sub>3</sub>	539.6	543.5	539.3	546.7	544.8	527.3	546.7	532.7	534.3	538.3	7.68	0.85	0.89
Acetate	2856.4	2878.1	2825.6	2838.3	2825.8	2808.1	2853.4	2846.9	2833.2	2959.2	30.52	0.21	0.13
Propionate	532.7	526.2	513.2	528.8	519.0	528.0	536.4	551.8	551.0	593.7	7.20	<0.001	0.09
Butyrate	477.6	484.5	467.7	482.0	476.8	465.0	478.5	472.6	474.1	482.4	4.72	0.24	0.57
Isobutyrate	30.7	30.2	28.9	30.5	30.2	29.7	31.5	30.5	29.8	31.3	0.40	0.24	0.62
Isovalerate	52.2	52.0	51.2	54.1	51.5	52.1	51.9	51.8	51.0	52.8	0.64	0.17	0.03
Valerate	55.7	56.4	55.4	58.0	57.9	56.9	56.6	56.7	58.4	58.3	0.63	0.30	0.32
Total	4007.9	4030.0	3943.7	3993.2	3962.8	3941.4	4010.7	4012.2	3999.5	4181.1	35.36	0.08	0.13
Acet:prop	5.42	5.48	5.53	5.38	5.47	5.36	5.33	5.18	5.17	5.00	0.10	<0.001	0.20
tIVOMD <sup>1</sup>	0.83	0.81	0.82	0.81	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82	0.81	0.001	0.29	0.26

<sup>1</sup>tIVOMD=True *in vitro* digestibility of organic matter, SEM=standard error of mean.

**Table 4***In vitro* gas production using propolis extract

	Propolis dose ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )										SEM	P-value	
	0	1.1	2.2	6.7	11.1	16.7	22.2	27.8	38.9	55.6		Linear	Quadratic
Gas ( $\mu\text{mol}/\text{batch}$ ), 5 h													
Hydrogen	1.63	1.65	1.51	1.73	1.52	1.65	1.42	1.67	1.37	1.71	0.06	0.33	0.28
Methane	534.8	527.0	541.7	535.8	542.4	542.3	527.5	541.0	518.8	518.5	5.56	0.05	0.29
Carbon dioxide	1894.2	1870.7	1901.0	1891.5	1954.2	1920.5	1913.2	1928.5	1927.5	1989.2	22.18	<0.01	0.68
Total	2430.6	2399.4	2444.3	2429.0	2498.1	2464.4	2442.1	2471.2	2447.7	2509.5	26.36	0.05	0.80
CO <sub>2</sub> -to-CH <sub>4</sub>	3.55	3.56	3.51	3.54	3.61	3.54	3.63	3.57	3.72	3.84	0.03	<0.001	0.04
Gas ( $\mu\text{mol}/\text{batch}$ ), 24 h													
Hydrogen	1.59	1.49	1.36	1.53	1.38	1.47	1.36	1.44	1.39	1.56	0.03	0.20	0.17
Methane	1347.2	1340.8	1354.3	1343.9	1356.1	1337.0	1330.2	1322.8	1308.0	1300.7	11.53	<0.001	0.85
Carbon dioxide	3654.0	3647.5	3663.1	3663.3	3699.0	3666.6	3664.7	3630.2	3672.6	3720.5	25.39	0.13	0.31
Total	5002.8	4989.8	5018.7	5008.7	5056.5	5005.0	4996.3	4954.5	4982.0	5022.7	34.42	0.89	0.72
CO <sub>2</sub> -to-CH <sub>4</sub>	2.71	2.72	2.71	2.73	2.73	2.74	2.76	2.75	2.81	2.86	0.02	<0.001	0.08

SEM=standard error of mean.

#### 4. Discussion

The phenolic compounds present in the studied propolis are mostly derived from cinnamic acid. In contrast to other types around the world, Brazilian propolis is chiefly composed of phenolic acids (Kumazawa et al., 2003). Artepillin C, the major phenolic compound of green propolis (Park et al., 2004), is a 3,5-prenylated *p*-coumaric acid. Prenylated phenolic compounds are synthesized in a limited number of plant families, including Compositae *Baccharis dracunculifolia*.

Alongside artepillin-C, it was also found *p*-coumaric acid, chicoric acid, caffeic acid and six unknown compounds with cinnamic acid-like UV spectra. These cinnamic acid-like compounds probably comprised the caffeic acid phenethyl ester and the prenylated propolis compounds baccharin and drupanin (Park et al., 2002). A few flavonoids with chrysin-like and dihydrokaempferide-like UV spectra were also found.

Propolis components could not be recovered in the rumen medium. At the end of the 24-h incubation, seven new compounds appeared at concentrations related to the propolis extract dose, which suggests that they were metabolites of the major phenolic compounds from propolis. These compounds could not be identified. Their retention times indicated that they had low polarities and their absorption spectra were similar to simple phenols, with no conjugated double bond.

When propolis is consumed, the phenolic compounds are digested and absorbed in the same manner as in other foods (Burdock et al., 1998). The main reactions performed by intestinal microflora on cinnamic acid are: reduction of the unsaturated aliphatic side-chain, demethylation of the aromatic ring, decarboxylation and dehydroxylation (Martin, 1982). Microbial metabolites are absorbed and conjugated with glycine, glucuronic acid or sulfate in the liver (Manach et al., 2004), and are then excreted via urine (Martin, 1982) and also in the milk (Besle et al., 2010) in the form of several simple aromatic compounds. In this experiment, the action of microorganisms may have converted propolis compounds into the prenylated derivatives of the most common degradation products, i.e. *p*-hydroxyphenyl propionic acid and ethylphenol.

Propolis extract reduced the pH of the rumen medium which is a crucial variable for nutrient fermentation balance. Factors that contribute to maintaining a stable pH and rumen function are the buffering capacity of saliva and the removal of SCFA through absorption (Van Soest, 1994). Propolis promoted propionate production with increasing

doses, an effect that caused a slight increase in total production of SCFA. Broudiscou et al. (2000) also found an increase in *in vitro* propionate production caused by propolis.

Mean pH was 6.15 that is below the value of 6.2 considered by Russell and Dombrowski (1980) as limiting for bacterial growth. However it seems that no selection effect on cellulolytic bacteria occurred, since acetate, the main product of these bacteria, showed no change with dose of propolis, even with the decrease in pH of 6.19 (dose 0) to 6.14 (dose 55.6 µg/mg propolis). As a consequence, the decrease in the acetate-to-propionate ratio occurred without change in acetate production.

Together with the increase in propionate production, a propolis-induced decline in the protozoa population has been observed *in vitro* by Broudiscou et al. (2000) and *in vivo* in cattle and buffaloes by Ríspoli et al. (2009). The decrease in ruminal protozoa provides greater availability of starch for starch-fermenting bacteria and propionate production, which could further increase the total production of SCFA (Mendoza et al., 1993). Given how propionate can be converted to glucose in the liver and maintain plasma levels in ruminants (Stradiotti Junior et al., 2004), then the propolis-induced increase in propionate production could be nutritionally favorable to the animal.

Diets that provide low acetate-to-propionate ratio may also induce low ruminal pH, which can have a strong impact on reducing methane production (Lana et al., 1998). A pH lower than 6.9 can also change the balance of carbonate in solution and raise the proportion of CO<sub>2</sub> in the rumen gas (Wolin, 1960). Indeed, propolis showed an observable capacity to reduce methane production in the fermenters, and this effect was more pronounced after 24 than 5 hours of fermentation. CO<sub>2</sub> production increased with increasing doses of extract, especially in the first 5-hr period, and this was reflected in total gas production. CO<sub>2</sub>-to-methane ratio increased with treatments in both periods, although at 24 hours it remained in the range reported by Van Soest (1994) who reported that CO<sub>2</sub> production is two to three-fold higher than methane production.

In the rumen, bacteria can use methanogenesis or propionate production as a means of reducing mainly the hydrogen of the medium, and there is always an inverse relationship between methane and propionate (Lana et al., 1998). This inverse relationship was reproduced here, where the increase in propionate production probably led to lower substrate availability for methane production. However, the production of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> was unaffected by propolis treatment at 24 h. This suggests that propolis may have reduced methane production by inhibiting methane-producing bacteria.

Methane is produced from the reduction of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> by methanogenic bacteria (Moss et al., 2000). These compounds are related as carbon lost from ruminal fermentation while methane production reduces nutritive efficiency by wasting the gross energy of the diet (Johnson and Johnson, 1995). Here, propolis was found to alter the balance of gas production without modifying total gas production. In the study by Stradiotti Junior et al. (2004), the *in vitro* use of hydroalcoholic propolis extract reduced total production of fermentation gases.

Phenolic compounds have been reported as presenting some effects on rumen parameters. Regarding rumen microorganisms, *p*-coumaric acid was shown to be a growth inhibitor for the cellulolytic bacteria *Bacteroides rumenicola* in culture medium (Martin and Akin, 1988). A Brazilian propolis extract was able to inhibit the growth of eight main groups of cellulolytic and proteolytic ruminal bacteria, and this effect was attributed to the phenolic compounds composition such as naringenin, chrysin, caffeic acid, *p*-coumaric and Artepillin-C (Aguiar et al., 2013).

In this study, the effects observed were significant but small due to the relatively low doses of propolis used: max 625 µg propolis/mL fermentation medium or about 9 µg total phenolic compounds/mg substrate. Oskoueian et al. (2013) used 45 µg pure flavonoids/mg substrate and obtained effects on DM degradability, gas production, CH<sub>4</sub> and volatile fatty acid production, and enzyme activities. Aguiar et al. (2013) observed strong antimicrobial effects of propolis on ruminal bacteria strains at 1000 µg/mL. However, the results indicate that even at the doses used, propolis compounds—or the synergy between them (Marcucci, 1996)—actually demonstrated an effective action in the fermentation medium.

Previous studies involving propolis in animal feed have used varying parameters, making it difficult to interpret these results. Besides the dose distributed, which is probably the most important factor, variability in results has been related to variability in the chemical composition of the product (Aguiar et al., 2013) which is affected by the concentration of propolis and solvent used for extraction (Cottica et al., 2011), by production region (Patra et al., 2010) and by harvest season (Bankova et al., 1998). Moreover, interactions with the fermentation substrate almost certainly occur.

In this study, propolis treatment did not alter N-NH<sub>3</sub> production, which diverges from a previous *in vitro* study (Ozturk et al., 2010) reporting that propolis caused a decrease in N-NH<sub>3</sub> concentration related to a decrease in amino acid deamination and to the reduction of the amino acid-fermenting bacterial population. This finding was

corroborated by Aguiar et al. (2013) who reported that phenolic compounds in propolis extract may act by reducing the population of hyper-ammonia-producing bacteria and thereby suppress N-NH<sub>3</sub> concentrations in the rumen. The absence of effect on N-NH<sub>3</sub> production here may be due to the lower concentration of flavonoids in this propolis (49.56 mg/g) compared to other studies such as Aguiar et al. (2013) who observed a strong antimicrobial action of a propolis extract containing 109.17 mg/g of flavonoids. It was found no effect of propolis on OM digestibility, indicating that phenolic compounds did not affect energy availability for ruminal fermentation.

## 5. Conclusion

Propolis increased propionate production and decreased methane production without changing acetate or nitrogen metabolism, suggesting a better utilization of energy from feed. Therefore, the use of propolis in diets could be a beneficial nutritional strategy in dairy cows. Given that literature results are controversial and highly variable due to dosage and composition of used propolis extract, these results now need to be confirmed over longer fermentation periods, and the optimal conditions need to be found to add propolis to animal supplements.

## 6. Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Ciências sem fronteiras (Brasília, DF, Brazil) for supporting N.W. Santos via a fellowship (246624/2012-4).

## 7. References

- Aguiar, S. C., Zeoula, L. M., Franco, S. L., Peres, L. P., Arcuri, P.B., Forano, E., 2013. Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria *in vitro*. *World J. Microb. Biot.* 29, 1951-1959.
- Aguiar, S.C., Paula, E.M., Yoshimura, E.H., Santos, W.B.R., Machado, E., Valero, M.V., Santos, G.T., Zeoula, L.M., 2014a. Effects of phenolic compounds in propolis on digestive and ruminal parameters in dairy cows. *R. Bras. Zootec.* 43, 197-206.
- Aguiar, S.C., Cottica, S.M., Boeing, J.S., Samensari, R.B., Santos, G.T., Visentainer, J.V., Zeoula, L.M., 2014b. Effect of feeding phenolic compounds from propolis extracts to dairy cows on milk production, milk fatty acid composition, and the antioxidant capacity of milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* 193, 148-154.

- AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 1990. Official methods of analysis. 15th ed. AOAC International, Arlington, VA.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists, 1995. Official methods of analysis. 16th ed. AOAC, Washington DC.
- Bankova V., Boudourova-Krasteva, G., Popov, S., Sforcin, J.M., Funari, S.R.C., 1998. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apid.* 29, 361-367.
- Benchaar, C., Petit, H.V., Berthiaume, R., Ouellet, D.R., Chiquette, J., Chouinard, P.Y., 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *J. Dairy Sci.* 90, 886-897.
- Besle, J.M., Viala, D., Martin, B., Pradel, P., Meunier, B., Berdagué, J.L., Fraisse, D., 2010. Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *J. Dairy Sci.* 93, 2846-2856.
- Broudiscou, L.P., Lassalas, B., 2000. Effects of *Lavandula officinalis* and *Equisetum arvense* dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen micro-organisms in batch culture. *Reprod. Nutr. Dev.* 40, 431-440.
- Broudiscou, L.P., Papon, Y., Broudiscou, A.F., 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87, 263-277.
- Burdock, G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 36, 347-363.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2005. Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123, 597-613.
- Cottica, S.M., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Franco, S.L., Zeoula, L.M., Visenteiner, J.V. 2011. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 929-935.
- Davies, A.W., Taylor, K., 1965. Application of the autoanalyser in a river authority laboratory. In: *Proceedings of the Technicon Symposium*, Technicon, Tarrytown, NY, USA, pp. 294-300.
- Franco, S.L., Bueno, J.H.F., 1999. Optimization of extraction process of propolis. *Infarma* 11, 48-51.
- Fraisse, D., Carnat, A., Viala, D., Pradel, P., Besle, J.M., Coulon, J.B., Felgines, C., Lamaison, J.L., 2007. Polyphenolic composition of a permanent pasture: variations related to the period of harvesting. *J. Sci. Food Agric.* 87, 2427-2435.
- Gagnon, N., Côrtes, C., Silva, D., Kazama, R., Benchaar, C., Santos, G., Zeoula, L., Petit, H.V., 2009. Ruminal metabolism of flaxseed (*Linum usitatissimum*) lignans to the mammalian lignan enterolactone and its concentration in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Brit. J. Nut.* 102, 1015-1023.
- Goering, H. K., Van Soest, J. P., 1970. *Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications)*. Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.
- Grace, S.C., 2005. Phenolics as antioxidants. Smirnoff, N. (Ed.) *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Wiley-Blackwell, Oxford.
- INRA, 2007. *Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux. Valeurs des aliments*. Tables INRA 2007. Quae Editions, Versailles, France, 307pp.

- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73, 2483-2492.
- Jung, H.J.G., Fahey, G.C., Merchen, N.R., 1983. Effects of ruminant digestion and metabolism on phenolic monomers of forages. *Brit. J. Nutr.* 50, 637-651.
- King, R.A., Mano, M.M., Head, R.J., 1998. Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk samples. *J. Dairy Res.* 65, 479-489.
- Kolankaya, D., Selmanoglu, G., Sorkun, K., Salih, B., 2002. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. *Food Chem.* 78, 213-217.
- Kumazawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2003. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem. Pharm. Bull.* 5, 740-742.
- Lana, R.P., Russel, J.B., Van Amburgh, M.E., 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim. Sci.* 76, 2190-2196.
- Macheix, J.J., Fleuriot, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques, Lausanne, Suisse.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727-747.
- Marcucci, M.C., 1996. Biological and therapeutic properties of chemical propolis constituents. *Quim. Nova* 19, 529-536.
- Martin, A.K., 1982. The origin of urinary aromatic compounds excreted by ruminants 2. The metabolism of phenolic cinnamic acids to benzoic acid. *Br. J. Nutr.* 47, 155-164.
- Martin, S.A., Akin, D.E., 1988. Effect of phenolic monomers on the growth and  $\beta$ -glucosidase activity of *Bacteroides rumenicola* and on the carboxymethylcellulase,  $\beta$ -glucosidase, and xylanase activities of *Bacteroides succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 3012-3019.
- Mendoza, G.D., Britton, R.A., Stock, R.A., 1993. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 71, 1572-1578.
- Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Int.* 85, 1217-1240.
- Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N., Calder, P.C., 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* 152, 239-246.
- Monti, M., Bertt, E., Carminati, G., Cusini, M., 1983. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. *Cont. Derm.* 9, 163-168.
- Moss, A.R., Jouany, J.P., Newbold, J., 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49, 231-253.
- Mould, F. L., R. Morgan, K. E. Kliem, Krystallidou, E., 2005. A review and simplification of the in vitro incubation medium. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123:155-172.
- Niderkorn, V., Baumont, R., Le Morvan, A., Macheboeuf, D., 2011. Occurrence of associative effects between grasses and legumes in binary mixtures on in vitro rumen fermentation characteristics. *J. Anim. Sc.*, 89, 1138-1145.
- NRC, 2001. National Research Council, Nutrient Requirements of Dairy Cattle, seventh rev. ed. National Academy of Science, Washington, D.C., USA.

- Oskoueian, E., Abdullah, N., Oskoueian, A., 2013. Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. *Biomed Res Int.* 2013, 1-8.
- Ozturk, H., Pekcan, M., Sireli, M., Fidanci, U. R., 2010. Effects of propolis on *in vitro* rumen microbial fermentation. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 57, 217-221.
- Park, Y.K., Paredes-Guzman, J.F., Aguiar, C.L., Alencar, S.M., Fujiwara, F.Y., 2004. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1100-1103.
- Patra, A.K., Kamra, D.N., Agarwal, N., 2010. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *J. Sci. Food Agric.* 90, 511-520.
- Pinto, M.S., Faria, J.E., Message, D., Cassini, S.T.A., Pereira, C.S., Gioso, M.M., 2001. Effect of green propolis extracts on pathogenic bacteria isolated from milk of cows with mastitis. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38, 278-283.
- Ríspoli, T.B., Rodrigues, I.L., Martins Neto, R.G., Kazama, R., Prado, O.P.P., Zeoula, L.M., Arcuri, P.B., 2009. Ruminal ciliate protozoa of cattle and buffalo fed on diet supplemented with monensin or extracts from propolis. *Pesq. Agropec. Bras.* 44, 92-97.
- Russel, J.B., Dombrowski, D.B., 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol. Applied* 39, 604, 1980.
- Senger, C.C.D., Kozloski G.V., Bonnacarrère Sanchez L.M., Mesquita F.R., Alves T.P., and Castagnino, D.S., 2008. Evaluation of autoclave procedures for fiber analysis in forage and concentrate feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 146, 169-174.
- Stradiotti Junior, D., Queiroz, A.C., Lana, R.P., Pacheco, C.G., Camardelli, M.M.L., Detmann, E., Eifert, E.C., Nunes, P.M.M., Oliveira, M.V.M., 2004. Effect of the propolis on the *in vitro* fermentation of different feedstuffs by the technique of gas production. *R. Bras. Zootec.* 33, 1093-1099.
- Teixeira, E.W., Message, D., Negri, G., Salatino, A., Stringheta, P.C., 2008. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 7, 307-314.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185-197.
- Van Soest, P.J., 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca.
- Van Soest, P.J., Wine, R.H., 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 50, 50-55.
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39, 971-974.
- Williams, A.G., Coleman, G.S., 1992. *The Rumen Protozoa*. Springer-Verlag Inc., New York, NY, USA, pp. 441.
- Wolin, M.J., 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.*, 43, 1452-1459.

## **II – Consumo e digestibilidade de dietas com óleo de linhaça contendo extrato de própolis e vitamina E na alimentação de vacas leiteiras**

(Animal Feed Science and Technology)

### **Resumo**

A própolis é uma fonte de compostos fenólicos que, se fornecida a vacas leiteiras, pode ser importante para melhorar a qualidade oxidativa do leite. A vitamina E é um antioxidante natural dos sistemas biológicos e pode apresentar sinergismo com compostos fenólicos na redução da oxidação. Assim, objetivou-se estudar o consumo e digestibilidade de vacas alimentadas com dietas contendo óleo de linhaça, suplementadas com produto à base de própolis associado ou não à vitamina E. Utilizaram-se quatro vacas da raça Holandesa, portadoras de cânulas ruminais, com peso corporal médio de  $584 \pm 52$  kg e  $90 \pm 39$  dias de lactação em delineamento quadrado latino  $4 \times 4$ , com quatro dietas e quatro períodos. As dietas experimentais foram: dieta controle; dieta com óleo de linhaça, 25 g/kg de MS; dieta com óleo de linhaça + produto à base de própolis, 1,2 g/kg de MS; dieta com óleo de linhaça + produto à base de própolis + vitamina E, 375 UI/kg de MS. O fornecimento de extrato de própolis, associado ou não à vitamina E, não influenciou o consumo e as digestibilidades ruminal e total de matéria seca e nutrientes. Parâmetros ruminais como pH e teor de nitrogênio amoniacal não foram influenciados pela suplementação. A produção microbiana ruminal, a eficiência de síntese e os metabólitos nitrogenados sanguíneos não foram alterados pelas dietas. O uso de extrato de própolis associada ou não à vitamina E em dietas para vacas leiteiras não influenciou o consumo, a digestão e o aproveitamento de nutrientes.

*Palavras-chave:* Ácidos fenólicos; Aditivo; Antioxidante; Digestão

*Abreviações:* MS, matéria seca; MO, matéria orgânica; FDN, fibra em detergente neutro; PB, proteína bruta; EE, extrato etéreo; NDT, nutrientes digestíveis totais; NUL, nitrogênio ureico no leite; DP, derivados de purina; DR, digestibilidade ruminal.

## 1. Introdução

A demanda de consumidores por alimentos de origem animal que apresentem qualidade e segurança alimentar tem orientado a pesquisa na produção animal. A produção de leite com perfil de gordura favorável à saúde humana é possível com a suplementação lipídica de vacas em lactação (Chilliard et al., 2007), e resulta em leite com maiores proporções de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI). O óleo de linhaça é rico em ácido linolênico, sua adição em dietas de vacas leiteiras é uma forma de elevar a proporção de AG considerados saudáveis, como o CLA, e resultar em um tipo de leite com maior valor nutritivo e valor terapêutico (Bu et al., 2007).

Os AGPI são instáveis e suscetíveis à oxidação (Granelli et al., 1998) e, portanto, à perda parcial de suas propriedades. Uma solução ao problema pode ser o fornecimento de compostos antioxidantes às vacas pela alimentação, uma vez que podem ser transferidos ao leite. O uso de produtos que contenham compostos de ocorrência natural satisfaz a preocupação dos consumidores acerca da segurança e toxicidade de aditivos alimentares (Gladine et al., 2007).

A própolis é o material resultante da coleta de exsudato e broto de plantas, contendo enzimas e cera de abelhas. Na colmeia, a própolis é usada para proteção contra doenças e invasão de intrusos (Sforcin & Bankova, 2011). Antes de ser utilizada, a própolis bruta necessita passar por processos de extração para tornar disponível seus compostos ativos e, geralmente, isso se dá com o uso de etanol em altas concentrações (Cottica et al., 2011). Quando utilizada como alimento, a própolis pode ser fornecida na forma de extrato líquido (Lana et al., 2005) ou em pó (Aguiar et al., 2013, Aguiar et al., 2014). Segundo Kumazawa et al. (2003), a própolis brasileira, da região sudeste-sul, é oriunda principalmente da planta *Baccharis dracunculifolia* (Alecrim-do-campo). Sua composição confere importantes propriedades biológicas, tais como antioxidante (Cottica et al., 2011) e de inibição do crescimento de diversas cepas de bactérias ruminais (Aguiar et al., 2013).

A vitamina E é usada na nutrição animal em razão, principalmente, de sua função antioxidante lipossolúvel. Sua habilidade em doar hidrogênio aos radicais da cadeia de propagação oxidativa contribui para a finalização da reação de oxidação (Baldi, 2005) e, conseqüentemente, auxilia na redução dos efeitos do estresse oxidativo. A associação na dieta de antioxidantes com propriedade hidrofílica, como os compostos fenólicos de

plantas, e antioxidantes lipolíficos, como a vitamina E, foi estudada em modelo animal (Gobert et al., 2006) visando investigar a ocorrência de complementaridade na proteção contra a lipoperoxidação. Na nutrição animal, a própolis já foi objeto de vários estudos que investigaram a influência de suas propriedades na produção e composição leiteira de vacas (Stelzer et al., 2009) e de cabras (Lana et al., 2005). Em estudo com vacas leiteiras e adição de extrato de própolis às dietas, foi relatado que a própolis exerceu efeitos positivos no metabolismo proteico ruminal (Aguiar et al., 2014). No entanto, a avaliação da associação de extrato de própolis e vitamina E, como aditivo na alimentação de vacas leiteiras, tem sido pouco estudada e seus efeitos nos parâmetros digestivos são desconhecidos.

Portanto, objetivou-se determinar os efeitos da incorporação de produto à base de própolis associado ou não à vitamina E a uma dieta contendo óleo de linhaça para vacas leiteiras sobre o consumo, digestibilidades ruminal e total dos nutrientes e produção microbiana ruminal.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1 Animais e dietas**

O experimento cumpriu as orientações do Comitê para o Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (Maringá, PR), sob número de aprovação 111/2012. O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi e no Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal da Universidade Estadual de Maringá no período de setembro a novembro de 2012.

Quatro vacas da raça Holandesa, portadoras de cânulas ruminais, com média de  $584 \pm 52$  kg de peso corporal (PC) e  $90 \pm 39$  dias de lactação foram distribuídas em quadrado latino  $4 \times 4$ , com quatro dietas e quatro períodos. As vacas foram alojadas em baias *tie stall* e alimentadas individualmente às 08:00 h e 16:00 h.

As dietas foram formuladas para atender às exigências nutricionais de vacas leiteiras com média de 550 kg de PC e produção de 30 kg/dia de leite com 35 g/kg de gordura (NRC, 2001). A dieta controle foi composta de 600 g/kg (base na MS) de volumoso (silagem de milho) e 400 g/kg (base da MS) de concentrado, composto por farelo de soja, milho moído, farelo de trigo, ureia e suplemento mineral (Tabela 1).

**Tabela 1**  
 Ingredientes e composição química das dietas experimentais

Item	Dietas <sup>1</sup>		EP	P
	CON	OL		
Composição de ingredientes (g/kg MS) <sup>2</sup>				
Silagem de milho	600,0	600,0		
Milho moído	160,0	99,0		
Farelo de soja (48 g/kg PB)	111,0	110,0		
Farelo de trigo	90,0	125,0		
Óleo de linhaça bruto		25,0		
Ureia	9,0	9,0		
Suplemento mineral e vitamínico <sup>3</sup>	17,2	17,2		
Calcário	7,5	9,5		
Bicarbonato de sódio	4,0	4,0		
Sulfato de amônia	1,0	1,0		
Sal comum	0,3	0,3		
Análises químicas <sup>4</sup>				
MS (g/kg matéria natural)	568,7	574,1	2,34	0,28
Matéria orgânica (g/kg MS)	935,4	939,2	1,14	0,09
Proteína bruta (g/kg MS)	141,4	143,7	1,22	0,40
Extrato etéreo (g/kg MS)	22,8	47,1	4,61	<0,01
FDN (g/kg MS)	402,0	406,0	5,76	0,76
CNF (g/kg MS)	369,2	341,7	0,77	0,85
EL <sub>L</sub> (Mcal/kg MS) <sup>5</sup>	1,54	1,60	0,02	0,15
Ácidos graxos (g/kg MS)				
16:0	4,00	5,58	0,34	<0,01
16:1n9	0,16	0,18	0,06	0,92
18:0	0,85	2,05	0,23	<0,01
18:1n9	5,40	10,08	0,94	<0,01
18:1n7	0,27	0,34	0,03	0,27
18:2n6	7,54	11,28	0,73	<0,01
18:3n3	1,43	15,35	2,63	<0,01
n6/n3	5,27	0,73	0,96	<0,01
Polifenóis totais (g EAG/kg MS)	3,45	3,92	0,06	0,10

<sup>1</sup>CON, dieta controle, OL, dieta com óleo de linhaça, EP=erro padrão da média. <sup>2</sup>Valores reais obtidos por pesagem dos ingredientes. <sup>3</sup>Contém (por kg): Ca 156 g, P 51 g, S 20 g, Mg 33 g, Na 93 g, K 28 g, Co 30 mg, Cu 400 mg, Cr 10 mg, Fe 2000 mg, I 40 mg, Mn 1350 mg, Se 15 mg, F 510 mg, Zn 1700 mg.

<sup>4</sup>Média das amostras compostas preparadas de cinco amostras diárias coletadas a partir do dia 15 ao 19 de cada período experimental, MS = matéria seca, FDN = fibra em detergente neutro sem nitrogênio e cinza residual, CNF = carboidratos não fibrosos, EL<sub>L</sub> = energia líquida de lactação, EAG = equivalente ácido gálico. <sup>5</sup>Energia líquida de lactação calculada por EL<sub>L</sub> (Mcal/kg) = 0,0245 × nutrientes digestíveis totais – 0,12 (NRC, 2001).

As dietas experimentais foram: dieta controle (CON); dieta com óleo de linhaça, 25 g/kg na MS (OL); dieta com óleo de linhaça + produto à base de própolis, 1,2 g/kg de MS (LLOS); dieta com óleo de linhaça + produto à base de própolis + vitamina E, 375 UI/kg de MS (LLOS-E). O produto à base de própolis e a vitamina E foram fornecidos

duas vezes ao dia juntamente com a dieta (8:00 e 16:00 h), ambos foram acondicionados em papel higroscópico e colocados diretamente no rúmen, pela cânula ruminal.

As amostras de própolis do tipo verde foram obtidas do apiário da Fazenda Experimental de Iguatemi e preparadas no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Estadual de Maringá. O produto à base de própolis (LLOS) foi preparado por meio de uma extração hidroalcoólica da própolis bruta de acordo com Franco & Bueno (1999) e em seguida, o álcool foi evaporado (Büchi R210, São Paulo, SP) e o extrato foi seco em spray dryer (Labmaq MSD 1, Ribeirão Preto, SP). O extrato seco de própolis está registrado no Instituto Nacional da Propriedade Intelectual-Brasil com a denominação LLOS B1 com sete doses, sob o n. 0605768-3. Uma quantidade de milho moído foi adicionada ao extrato como excipiente para facilitar o fornecimento do produto aos animais. A identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes no extrato de própolis foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (Tabela 2). A vitamina E fornecida foi na forma de acetato de  $\alpha$ -tocoferol (Microvit E Promix 500.000 UI/kg, Adisseo, São Paulo, SP).

### **Tabela 2**

Composição de compostos fenólicos do produto à base de própolis e dos alimentos constituintes das dietas<sup>1</sup>

Item	Concentração (mg/g)
Própolis	
Ácido cafeico	0,83 ± 0,01
Ácido chicórico	6,53 ± 0,04
Ácido <i>p</i> -cumárico	2,20 ± 0,05
Artepillin C	2,44 ± 0,01
Flavonoides (equivalente quercetina)	1,25 ± 0,26
Ácidos fenólicos totais (equivalente ácido <i>p</i> -cumárico)	17,64 ± 0,11
Polifenóis totais (equivalente ácido gálico)	
Própolis	20,19 ± 3,78
Silagem de milho	5,27 ± 0,14
Concentrado controle	0,72 ± 0,03
Concentrado com óleo de linhaça	1,26 ± 0,03
Óleo de linhaça <sup>2</sup>	1,14 ± 0,03

<sup>1</sup>Produto a base de própolis=extrato de própolis + excipiente. <sup>2</sup>Siger et al. (2008).

### 2.2 Procedimentos experimentais

Cada período experimental consistiu de 14 dias para adaptação dos animais às dietas e 7 dias para coleta diária de dados. A quantidade de alimento fornecida e as

sobras foram pesadas diariamente e registradas para cada vaca para determinar o consumo, que foi ajustado para 100 g/kg de sobras com base na matéria natural. Diariamente, as vacas foram ordenhadas duas vezes às 06:30 h e 15:00 h, e a produção de leite foi registrada em cada ordenha.

Amostras de alimentos e sobras foram coletadas diariamente do 15º dia ao 19º dia do período experimental e mantidas congeladas. Como indicador de fluxo de MS e nutrientes no conteúdo do omaso e fezes utilizou-se dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>). Foram administrados 10 g no rúmen, pela cânula ruminal, divididos igualmente para alimentação da manhã e tarde, a partir do oitavo dia de cada período experimental. Do 15º dia ao 19º dia de cada período experimental, foram amostradas 500 mL de digesta omasal e 100 g de fezes diretamente do reto, em dias alternados, às 8:00, 12:00, 16:00, 20:00 e 24:00 horas, com total de 5 amostras por animal em cada período, sendo as amostras conservadas congeladas. A coleta de digesta omasal foi realizada por sucção do conteúdo omasal segundo Leão et al. (2005). Amostras de alimentos, sobras, digesta e fezes foram secas a 55°C por 72 horas e moídas a 1 mm, em moinho Wiley (Marconi MA340, Piracicaba, SP) e compostas por período e por animal para posterior análise.

Foram realizadas amostragens de líquido ruminal pela cânula ruminal nos tempos zero (que antecede à primeira alimentação) 2, 4, 6 e 8 horas após a alimentação da manhã. O pH foi mensurado imediatamente após cada coleta com uso de um potenciômetro (Tecnal Tec-5, Piracicaba, SP), em seguida, uma alíquota do líquido ruminal (50 mL) foi adicionada de 1 mL de ácido sulfúrico (500:500, v/v) para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>).

As amostras de leite foram obtidas de dez ordenhas consecutivas entre o 15º dia e o 19º dia de cada período experimental e compostas por vaca e período, proporcionalmente à produção em cada ordenha para obter uma amostra de leite composta/vaca/período. As amostras de leite foram mantidas à temperatura ambiente com conservante, 2-bromo-2-nitropropano-1, 3-diol (Bronopol, San Ramon, CA, EUA), para determinação dos teores de N-ureico.

No 18º dia e 19º dia de cada período experimental foram realizadas coletas *spot* de amostra de urina, aproximadamente 3 horas após a alimentação, por micção espontânea, para determinar a concentração de derivados de purina e estimar a síntese microbiana ruminal, e determinar as concentrações de creatinina a fim de estimar o volume urinário. Alíquotas de 10 mL de urina foram coletadas e conservadas com 40

mL de ácido sulfúrico (0,036N), sendo mantidas a 4°C até serem analisadas. No dia 18 do período experimental, três horas após alimentação da manhã, amostras de sangue foram coletadas pela veia jugular dos animais com tubos contendo anticoagulante (BD vacutainer<sup>®</sup>, K<sub>2</sub>EDTA 7,2 mg, São Paulo, SP), depois foram centrifugadas (2.500g, 20 min) e o plasma foi conservado congelado.

### 2.3 Análises químicas

A matéria seca (MS) das dietas foi determinada em estufa de ventilação forçada, de acordo com o procedimento 934.01 da AOAC (1990). As cinzas foram obtidas por combustão a 600°C por 6 horas de acordo com o método da AOAC 924.05 (1990), para determinação do teor de matéria orgânica (MO). A determinação no N total seguiu o procedimento 990.03 da AOAC (1990) (Tecnal TE-036/1, Piracicaba, SP). As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN), com correção do teor de nitrogênio e cinzas, foram analisadas de acordo com Mertens (2002), com uso de amilase termoestável, sem sulfito de sódio. O extrato etéreo (EE) foi determinado (Tecnal TE-044/1, Piracicaba, SP) de acordo com o método 7.060 da AOAC (1990). Os nutrientes digestíveis totais (NDT) das dietas foram estimados com emprego da equação:  $NDT \text{ (g/kg)} = CNF \text{ digestível} + PB \text{ digestível} + FDNa \text{ digestível} + (EE \text{ digestível} \times 2,25)$ , assim como carboidratos não fibrosos,  $CNF \text{ (g/kg)} = 1000 - (PB \text{ (g/kg)} + FDNa \text{ (g/kg)} + EE \text{ (g/kg)} + cinzas \text{ (g/kg)})$ , ambas as equações descritas por Weiss (1999). A energia líquida de lactação (EL<sub>L</sub>) foi estimada com a equação do NRC (2001):  $EL_L \text{ (Mcal/kg)} = 0,0245 \times NDT - 0,12$ .

A extração e análise de polifenóis no produto à base de própolis e alimentos foi realizada como descrito em Santos et al. (2014). Os lipídios totais dos alimentos foram extraídos de acordo com Bligh & Dyer (1959), com clorofórmio, metanol e água (2:2:1,8). Os ésteres metílicos de ácidos graxos (AG) foram preparados segundo o procedimento de Hartman & Lago (1973), modificado por Maia & Rodrigues-Amaya (1993) e analisados por cromatografia gasosa.

Para determinação dos teores de TiO<sub>2</sub> na digesta e fezes, seguiu-se técnica descrita por Myers et al. (2004), com digestão em ácido sulfúrico concentrado por duas horas, seguido de adição de peróxido de hidrogênio (300:1000, v/v). A absorbância foi medida a 410 nm (Shimadzu UV-1601, São Paulo, SP). As concentrações de TiO<sub>2</sub> nas amostras foram determinadas com uso de uma equação estimada por uma curva padrão

obtida pela análise de TiO<sub>2</sub> padrão. O fluxo omasal e produção fecal foram calculados como a razão entre a quantidade fornecida de dióxido de titânio e concentração de dióxido de titânio em digesta e fezes. Os coeficientes de digestibilidade foram determinados pela razão entre o consumo de nutrientes e teor de nutrientes em digesta e fezes.

A determinação das concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) no líquido ruminal foi realizada por destilação com hidróxido de potássio (2N), de acordo com o método descrito por Preston (1995). Os teores de N-ureico do leite (NUL) foram determinados por um método colorimétrico, com a reação de Berthelot (Chemspec 150, Chaska, MN, EUA).

A análise de alantoína foi realizada com uso dos métodos descritos por Chen & Gomes (1992). Para determinação de creatinina, ácido úrico e ureia foram utilizados métodos colorimétricos (Analisa<sup>®</sup>, Belo Horizonte, MG). Da concentração de creatinina na amostra de urina *spot*, o volume urinário foi estimado (L) pela razão entre a excreção diária de creatinina (mg/kg PC) e a concentração de creatinina (mg/L). Para determinação da excreção diária de creatinina por kg de PC, o valor médio de 23,41 mg/kg de PC foi usado, obtido por Oliveira et al. (2001). A produção de nitrogênio microbiano (N) e a eficiência de síntese foram estimadas de acordo com Chen & Gomes (1992). A determinação da concentração plasmática de ureia foi realizada por método colorimétrico (Analisa<sup>®</sup>, Belo Horizonte, MG).

#### 2.4 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados por variância, com uso do procedimento MIXED do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.0). Os dados foram analisados em quadrado latino 4 × 4 com o modelo geral:  $Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijk}$ , em que:  $Y_{ijk}$  = variáveis observadas;  $\mu$  = média geral,  $A_i$  = efeito do animal  $i$ , de 1 a 4;  $P_j$  = efeito do período  $j$ , de 1 a 4;  $T_k$  = efeito da dieta  $k$ , de 1 a 4;  $e_{ijk}$  = erro aleatório. A significância foi declarada em  $P < 0,05$  e tendências foram aceitas em  $P \leq 0,10$ . Os valores de pH e concentração de nitrogênio amoniacal foram analisados para medidas repetidas no tempo. Contrastes ortogonais foram utilizados para comparar os efeitos de: 1) óleo de linhaça (CON contra OL, LLOS e LLOS-E), 2) extrato de própolis (OL contra LLOS e LLOS -E), e 3) associação de própolis e vitamina E (LLOS contra LLOS -E).

### 3. Resultados

O produto à base de própolis apresentou na composição o ácido cafeico, ácido chicórico, ácido *p*-cumárico e Artepillin-C (Tabela 2). Ácidos fenólicos com espectros desconhecidos foram observados e quantificados como equivalente ácido *p*-cumárico. Os flavonoides não puderam ser identificados, mas foram quantificados como equivalente quercetina. Os compostos fenólicos totais nas amostras de alimentos e extrato de própolis foram quantificados como equivalente ácido gálico.

As dietas não influenciaram o consumo de MS e nutrientes, exceto o EE (Tabela 3). Em relação à dieta controle, o uso de óleo de linhaça causou a redução da digestibilidade ruminal (DR) da MO ( $P=0,05$ ), da FDN ( $P=0,02$ ) e tendência foi observada para decréscimo da DR da MS ( $P=0,07$ ), e aumento da DR do EE ( $P<0,01$ ). O óleo também aumentou a digestibilidade total da PB ( $P=0,06$ ) e EE ( $<0,01$ ), em relação à dieta controle. Em comparação à dieta com óleo, o fornecimento do produto à base de própolis associado ou não com vitamina E não apresentou efeitos sobre o consumo de MS e nutrientes, e sobre as digestibilidades ruminal e total.

O pH ruminal se comportou de forma quadrática ao longo do tempo ( $\text{pH}=0,036\text{h}^2-0,383\text{h}+6,786$ ,  $R^2=0,97$ ), com valor mínimo estimado de 5,8, após 5,3 horas da alimentação da manhã (Figura 1). A concentração de N-NH<sub>3</sub> no rúmen apresentou comportamento cúbico em função do tempo de coleta após a primeira alimentação ( $\text{N-NH}_3=0,365\text{h}^3-5,01\text{h}^2+16,58\text{h}+8,39$ ,  $R^2=0,88$ ). A máxima concentração de N-NH<sub>3</sub> foi 24,5 mg/100 mL após 2,2 horas da alimentação, a concentração mínima foi 4,4 mg/100 mL após 7 horas.

A excreção de derivados de purinas, a produção microbiana, a eficiência de síntese microbiana e excreção de metabólitos nitrogenados não foram modificadas pelas dietas (Tabela 4). Em comparação à dieta contendo produto a base de própolis, observou-se redução na excreção de nitrogênio ureico via urina com a adição do produto à base de própolis associado à vitamina E ( $P=0,10$ ).

**Tabela 3**

Consumo, digestibilidade aparente e parâmetros ruminais de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça (OL) contendo produto à base de própolis (LLOS) associado ou não à vitamina E (LLOS-E) na dieta

Item	Dietas <sup>1</sup>				EP	P		
	CON	OL	LLOS	LLOS-E		1	2	3
Consumo (kg/dia)								
MS <sup>2</sup>	19,64	19,32	19,61	19,35	0,43	0,59	0,71	0,60
MO	18,32	17,51	17,81	17,55	0,41	0,09	0,66	0,57
PB	2,99	3,03	3,00	2,99	0,07	0,59	0,47	0,96
EE	0,46	0,97	0,99	0,97	0,06	<0,01	0,65	0,29
FDN	7,55	7,41	7,62	7,49	0,20	0,86	0,51	0,61
Digestibilidade ruminal (kg/kg)								
MS	0,49	0,44	0,44	0,42	0,02	0,07	0,86	0,56
MO	0,56	0,50	0,50	0,48	0,02	0,05	0,77	0,52
PB	0,22	0,22	0,22	0,21	0,03	0,93	0,90	0,83
FDN	0,59	0,51	0,53	0,48	0,02	0,02	0,87	0,20
Digestibilidade total (kg/kg)								
MS	0,68	0,69	0,67	0,68	0,01	0,80	0,45	0,72
MO	0,71	0,70	0,69	0,69	0,01	0,47	0,54	0,72
PB	0,74	0,78	0,76	0,77	0,01	0,06	0,53	0,42
EE	0,85	0,93	0,93	0,92	0,01	<0,01	0,67	0,46
FDN	0,56	0,56	0,54	0,55	0,01	0,67	0,46	0,79
pH ruminal	6,12	6,09	6,18	6,09	0,05	0,97	0,72	0,51
N-NH <sub>3</sub> (mg/100 mL)	12,28	15,05	13,34	11,36	0,87	0,53	0,13	0,31

<sup>1</sup>CON, dieta controle. Probabilidade de contrastes ortogonais significativos. Os efeitos testados foram 1) CON vs. OL, LLOS e LLOS -E, 2) OL vs. LLOS e LLOS-E, e 3) LLOS vs. LLOS-E. <sup>2</sup>MS=matéria seca, MO=matéria orgânica, PB=proteína bruta, EE=extrato etéreo, FDN=fibra em detergente neutro, N-NH<sub>3</sub>=Nitrogênio amoniacal no rúmen

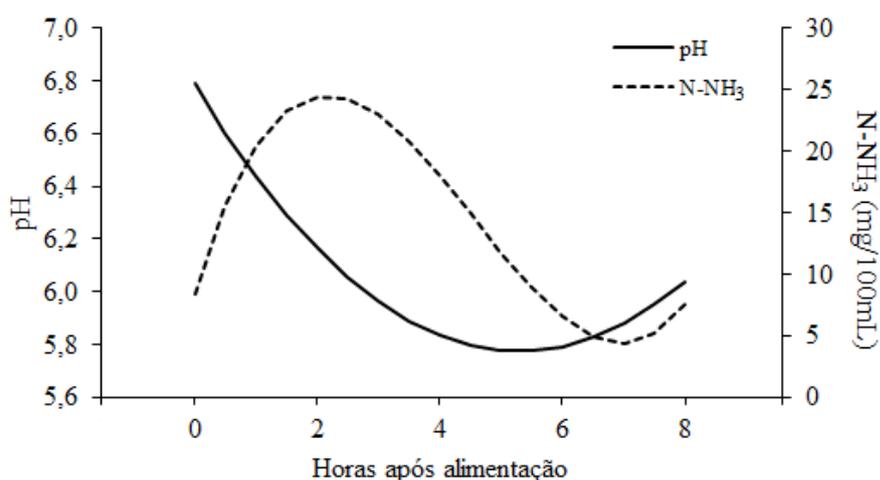


Figura 1. pH e concentração de nitrogênio amoniacal no líquido ruminal de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça contendo produto à base de própolis associado ou não à vitamina E na dieta.

**Tabela 4**

Produção microbiana ruminal e metabólitos nitrogenados de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça (OL) contendo produto à base de própolis (LLOS) associado ou não a vitamina E (LLOS-E) na dieta

Item	Diets <sup>1</sup>				EP	P		
	CON	OL	LLOS	LLOS-E		1	2	3
Produção microbiana								
Volume urinário (L)	19,00	17,77	18,07	19,06	0,75	0,76	0,74	0,72
Purinas excretadas (mmol/dia)								
Alantoína	283,23	285,22	351,61	312,16	47,76	0,83	0,78	0,83
Ácido úrico	40,27	37,17	41,49	37,06	1,87	0,79	0,76	0,58
Purinas leite	28,91	28,91	27,96	28,73	0,71	0,82	0,75	0,71
Purinas totais	352,40	351,31	421,06	377,95	48,31	0,84	0,77	0,82
Purinas absorvidas	361,96	360,66	442,74	392,41	56,91	0,84	0,77	0,82
Nitrogênio microbiano (g/dia)	263,14	262,20	321,87	285,28	41,37	0,84	0,77	0,82
Matéria orgânica digerida no rúmen	10,22	8,61	8,91	8,40	0,35	0,03	0,94	0,51
Eficiência (g N microbiano/kg MODR) <sup>2</sup>	26,25	30,90	34,19	30,58	3,98	0,67	0,91	0,82
Metabólitos nitrogenados (mg/100 mL)								
Nitrogênio ureico sanguíneo	21,24	21,84	19,49	21,96	0,58	0,91	0,42	0,15
Nitrogênio ureico no leite	16,37	17,14	16,22	16,79	0,61	0,65	0,43	0,54
Nitrogênio ureico na urina	980,79	826,86	839,97	860,55	69,79	0,75	0,21	0,10

<sup>1</sup>CON, dieta controle. Probabilidade de contrastes ortogonais significativos. Os efeitos testados foram 1) CON vs, OL, LLOS e LLOS -E, 2) OL vs, LLOS e LLOS -E, e 3) LLOS vs, LLOS -E. <sup>2</sup> MODR=matéria orgânica digestível no rúmen.

#### 4. Discussão

O produto utilizado à base de própolis continha principalmente ácidos fenólicos na composição, derivados do ácido cinâmico. Vários tipos de própolis brasileira são compostas, majoritariamente, por ácidos fenólicos (Cunha et al., 2004). O Artepillin C é um composto encontrado na própolis verde (Park et al., 2004) e é originário de brotos da planta *Baccharis dracunculifolia* (Kumazawa et al., 2003), popularmente conhecida como Alecrim-do-campo. A adição do produto à base de própolis às dietas forneceu às vacas 24,2 mg/kg MS de polifenóis totais e 1,5 mg/kg MS de flavonoides. A suplementação com extrato de própolis às vacas leiteiras realizada por Aguiar et al. (2014) resultou em maior proporção de flavonoides por quilo de matéria seca ingerida (2,81 mg/kg MS), pois a própolis utilizada apresentou concentração mais elevada de flavonoides (28,61 mg/g) que a concentração do produto no presente estudo (1,25 mg/g).

A suplementação lipídica com óleo de linhaça (Tabela 1) esteve dentro dos níveis recomendados de 70 g/kg de MS pelo NRC (2001), de modo que o consumo de MS e nutrientes não foi alterado entre as dietas, com exceção do aumento do consumo de EE. A suplementação lipídica reduziu a digestibilidade ruminal da MO e FDN. A diminuição da DR da fibra pelo fornecimento de óleo aos animais é relatada por Jenkins (1993), que propôs a explicação do revestimento das partículas que dificulta a adesão dos microrganismos, os efeitos antimicrobianos diretos dos ácidos graxos poli-insaturados, a modificação da população ruminal que digere a celulose, e a redução da disponibilidade de cálcio para função microbiana. A redução na DR da FDN acarretou, por consequência, a diminuição na DR da MO e MS.

A suplementação lipídica resultou em aumento da digestibilidade total da PB e EE. Este mesmo efeito sobre a digestibilidade total da PB foi observado por Lana et al. (2005) ao suplementar cabras leiteiras com óleo de soja. O óleo de linhaça é altamente digestível no intestino delgado porque possui grau elevado de insaturação e baixo ponto de fusão (NRC, 2001), características que facilitam a formação de micelas e absorção dos ácidos graxos no intestino delgado. Desta forma a adição de óleo de linhaça às dietas aumentou a digestibilidade do EE.

A adição do produto à base de própolis associado ou não à vitamina E às dietas não apresentou efeitos sobre o consumo de MS e nutrientes, e sobre as digestibilidades

ruminal e total das dietas. O consumo de MS é uma variável nem sempre influenciada pela adição de extrato de própolis na dieta. A adição de três produtos à base de própolis (na forma em pó) na dieta de vacas leiteiras, realizada por Aguiar et al. (2014), não modificou o consumo de MS. Em solução etanólica, o extrato de própolis potencializou os efeitos do óleo de soja em diminuir o consumo e digestibilidade total da MS de dietas fornecidas a cabras leiteiras (Lana et al., 2005).

O efeito do extrato de própolis sobre a digestibilidade depende de sua composição em compostos fenólicos, além da concentração de própolis e álcool utilizada na extração. A utilização de extratos com concentrações reduzidas de própolis parece melhorar a liberação de substâncias ativas que possibilitam melhor digestibilidade da matéria seca (Prado et al., 2010a).

No rúmen, o extrato de própolis pode atuar reduzindo a população de bactérias produtoras de nitrogênio amoniacal (Aguiar et al., 2013), conseqüentemente isto pode acarretar a redução na digestibilidade ruminal da PB. O extrato de própolis promoveu aumento nos fluxos de proteína nos intestinos de búfalos (Prado et al., 2010b). Porém, no presente estudo o extrato de própolis não influenciou a digestibilidade da matéria seca da dieta.

Os parâmetros ruminiais como pH e teor de N-NH<sub>3</sub> mostraram-se semelhantes entre as dietas. O pH médio observado foi 6,1, próximo ao pH 6,2 obtido por Chizzotti et al. (2007) com vacas da raça Holandesa, com consumo e produção similares a este estudo. Os autores afirmaram que animais altamente produtivos (com produção acima de 30 kg de leite por dia) podem apresentar este valor de pH devido à alta taxa de fermentação ruminal. A influência da suplementação de 20 g/kg de gordura animal sobre o pH ruminal de vacas alimentadas com dietas baseadas em silagem de milho foi estudada por Onetti et al. (2002), os quais reportaram que o pH manteve-se entre 6,1 e 6,2. A silagem de milho foi considerada pelos referidos autores como potencializadora dos possíveis efeitos negativos da suplementação lipídica na fermentação ruminal em função de sua acidez característica.

A concentração média de N-NH<sub>3</sub> esteve acima do teor proposto de 5 mg/100 mL por Satter & Slyter (1974) como necessário para que ocorra fermentação no rúmen. Apesar da ausência de efeito do produto à base de própolis sobre as concentrações de N-NH<sub>3</sub> (P=0,13), alguns trabalhos têm relatado que o extrato de própolis pode reduzir a atividade de deaminação ruminal (Oliveira et al., 2004). Este fator pode estar

relacionado à sua ação sobre as bactérias hiper produtoras de amônia, como observado nos estudos *in vitro* relatados por Aguiar et al. (2013), os quais consideraram como um efeito benéfico ao animal em razão da maior proporção de aminoácidos que chega ao intestino e menor perda de ureia via urina.

A excreção de derivados de purinas, a produção microbiana ruminal e a eficiência de síntese não foram alteradas pelas suplementações com produto a base de própolis associado ou não à vitamina E. Do mesmo modo, Aguiar et al. (2014) não observaram efeito do fornecimento de extrato de própolis sobre a eficiência de síntese microbiana de vacas leiteiras alimentadas com dieta baseada em silagem de milho e concentrado. A eficiência média de síntese microbiana obtida foi 30,5 g N/kg de matéria orgânica digestível no rúmen (MODR), a qual se mostrou dentro da variação média relatada pelo NRC (2001) de 12-54 g/kg MODR. A proteína microbiana é formada principalmente pela proteína das bactérias ruminais, que passam ao intestino delgado (NRC, 2001), portanto, a própolis e vitamina E nas dietas não influenciaram a fermentação ruminal e o crescimento dos microrganismos. Ao considerar que o N-NH<sub>3</sub> no rúmen é uma fonte de nitrogênio prontamente disponível para as bactérias e apresentou concentração suficiente para a fermentação, pode-se dizer que houve aproveitamento da energia e nitrogênio do meio ruminal para síntese de proteína microbiana.

O teor de NUL é indicativo das condições do metabolismo proteico do rúmen (DePeters & Cant, 1992) e não foi influenciado pela adição de lipídios na dieta e nem pela suplementação com própolis e vitamina E (Tabela 4). O máximo aproveitamento da proteína dietética pelo animal é desejável para que não ocorra perda de nitrogênio pelo animal e aumente a excreção para o meio ambiente (Jonker et al., 2002), e também para que os animais atinjam plena capacidade de produção. Em geral, as dietas não influenciaram a excreção de metabólitos nitrogenados, porém, houve ligeiro efeito na redução do nitrogênio ureico via urina com a dieta contendo a associação de produto à base de própolis e vitamina E em relação à dieta com adição de própolis. Os valores médios encontrados para nitrogênio ureico no soro do sangue e leite foram, respectivamente, 21,13 mg/dL e 16,63 mg/dL, para as vacas com produção média de 29,31 litros de leite por dia. Estes são valores semelhantes aos verificados por Chizzoti et al. (2007), que ao avaliarem a relação do nível de produção de leite com a excreção de metabólitos nitrogenados, puderam apresentar valores como referência.

A variação dos resultados de estudos com extratos de própolis se relaciona à própria variação de composição do produto, que é determinada por diversos fatores. Uma vez que a própolis constitui-se de substâncias colhidas nas plantas pelas abelhas, sua composição química está condicionada aos fatores relacionados à flora de origem (Park et al., 2004), além de fatores abióticos (clima, estação do ano, localização geográfica), comportamento das abelhas e condições de extração do produto (Cottica et al., 2011).

A ausência de maiores efeitos neste estudo pode estar relacionada à menor dosagem de flavonoides oferecida as vacas, em comparação com Aguiar et al. (2014), os quais observaram efeitos benéficos da própolis no metabolismo proteico no rúmen. Os referidos autores forneceram 2,81 mg de flavonoides/kg MS ingerida e neste estudo foram fornecidos 1,50 mg/kg MS ingerida. Apesar da concentração mais elevada de compostos fenólicos totais na própolis deste estudo comparada àquela utilizada por Aguiar et al. (2014), os flavonoides são reportados como os compostos de maior capacidade antimicrobiana da própolis (Mirzoeva et al, 1997).

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel com funções orgânicas bastante específicas, sobretudo a de antioxidante celular, com ação de proteção do sistema imunológico (McDowell et al., 1996). Estudos de doses da vitamina E superiores à indicação do NRC (2001) para vacas foram conduzidos a fim de melhorar a qualidade antioxidante dos produtos finais (Focant et al., 1998). No entanto, a suplementação de vitamina E na dieta de vacas leiteiras não afetou o consumo e aproveitamento de nutrientes (Pottier et al., 2006).

O NRC (2001) considera que a fermentação ruminal pode ser alterada por uma dieta caso ocorram reduções no consumo, na concentração de gordura do leite e na digestão da fibra. No presente estudo, a gordura do leite foi diminuída pela inclusão de óleo de linhaça às dietas (dados mostrados no capítulo 3 da tese), como também a digestibilidade ruminal de alguns nutrientes, mas as dietas com produto à base de própolis associado ou não com vitamina E não apresentaram efeitos negativos. Segundo Lourenço et al. (2010), o uso de aditivos alimentares para animais em produção tem como objetivo melhorar o aproveitamento dos nutrientes da dieta ou melhorar a qualidade do produto animal. Se a própolis não prejudica a digestão da dieta e é capaz de melhorar a qualidade do leite, ela pode ser considerada um aditivo benéfico na nutrição de vacas leiteiras.

## 5. Conclusões

Em vacas alimentadas com dieta contendo óleo de linhaça, a adição de extrato de própolis associado ou não à vitamina E na dieta não altera o consumo, a digestão, os parâmetros ruminais e a eficiência de síntese microbiana. O produto à base de própolis e vitamina E não modificam a utilização e o aproveitamento de nutrientes da dieta.

## 6. Agradecimentos

O projeto foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília, DF, Brasil, Convênio n. 482858/2011-7, Universal/2011.

## 7. Referências

- Aguiar, S. C., Zeoula, L. M., Franco, S. L., Peres, L. P., Arcuri, P.B., Forano, E., 2013. Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria in vitro. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1951-1959.
- Aguiar, S.C., Paula, E.M., Yoshimura, E.H., Santos, W.B.R., Machado, E., Valero, M.V., Santos, G.T., Zeoula, L.M., 2014. Effects of phenolic compounds in propolis on digestive and ruminal parameters in dairy cows. *R. Bras. Zootec.* 43, 197-206.
- AOAC, 1990. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Baldi, A., 2005. Vitamin E in dairy cows. *Liv. Prod. Sci.* 98, 117-122.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* 37, 911-917.
- Bu, D.P., Wang, J.Q., Dhiman, T.R., Liu, S.J., 2007. Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 998-1007.
- Chen, X., Gomes, M. J., 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. Rowett Research Institute, Bucksburn. (Occasional publication).
- 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.
- Chizzotti, M.L., Valadares Filho, S.C., Valadares, R.F.D., Chizzotti, F.H.M., Marcondes, M.I., Fonseca, M.A., 2007. Intake, digestibility and nitrogen metabolism in Holstein cows with different milk production levels. *Rev. Bras. Zootec.* 36, 138-146.
- Cottica, S.M., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Franco, S.L., Zeoula, L.M., Visenteiner, J.V., 2011. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 929-935.
- Cunha, I.B.S., Salomão, K., Shimizu, M., Bankova, V.S., Custódio, A.R., Castro, S.L., Marcucci, M.C., 2004. Antitrypanosomal activity of Brazilian propolis from *Apis mellifera*. *Chem. Pharm. Bull.* 52, 602-604.
- Depeters, E.J., Cant, J.P., 1992. Nutritional Factors Influencing the Nitrogen Composition of Bovine Milk: A Review. *J. Dairy Sci.* 75, 2043-2070.

- Focant, M., Mignolet, E., Marique, M., Clabots, F., Breyne, T., Dalemans, D., Larondelle, Y., 1998. The effect of vitamin E supplementation of cow diets containing rapeseed and linseed on the prevention of milk fat oxidation. *J. Dairy Sci.* 81, 1095-1101.
- Franco, S.L., Bueno, J.H.F., 1999. Optimization of extraction process of propolis. *Infarma* 11, 48-51.
- Gladine, C., Morand, C., Rock, E., Bauchart, D., Durand, D., 2007. Plant extracts rich in polyphenols (PERP) are efficient antioxidants to prevent lipoperoxidation in plasma lipids from animals fed n-3 PUFA supplemented diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136, 281-296.
- 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.
- Granelli, K., Barrefors, P., Björck, L., Appelqvist, L.A., 1998. Further studies on lipid composition of bovine milk in relation to spontaneous oxidized flavor. *J. Sci. Food Agric.* 77, 161-171.
- Hartman, L., Lago, R.C., 1973. A Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* 22, 475-476.
- Jenkins, T.C., 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76, 3851-3863.
- Jonker, J.S., Kohn, R.A., High, J., 2002. Use of milk urea nitrogen to improve dairy cow diets. *J. Dairy Sci.* 85, 939-946.
- Kumazawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2003. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem. Pharm. Bull.* 5, 740-742.
- Lana, R.P., Camardelli, M.M., Queiroz, A.C., Rodrigues, M.T., Eifert, E.C., Miranda, E.N., Almeida, I.C.C., 2005. Soybean oil and propolis in the diets of dairy goats: intake of nutrients and ruminal metabolism. *Rev. Bras. Zootec.* 34, 650-658.
- Leão, M.I., Valadares Filho, S.C., Rennó, L.N., Cecon, P.R., Azevedo, J.A.G., Gonçalves, L. C., Valadares, R.F.D., 2005. Intake and total and partial digestibility of total carbohydrates, neutral detergent fiber and nonfiber carbohydrates in steers under three ingestion regimes and two methods of digesta collections: abomasal and omasal. *Rev. Bras. Zootec.* 34, 670-678.
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., Wallace, R.J., 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4:1008-1023.
- Maia, E.L., Rodriguez-Amaya, D.B., 1993. Evaluation of a simple and economical method for methylation of fatty acids from lipids of several species of fish. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 53, 27-35.
- McDowell, L.R., Williams, S.N., Hidiroglou, N., Njeru, C.A., Hill, G.M., Ochoa, L., Wilkinson, S.S., 1996. Vitamin E supplementation for the ruminant. *Anim. Feed Sci. Technol.* 60, 273-296.
- Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Int.* 85, 1217-1240.
- Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N., Calder, P.C., 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* 152, 239-246.

- Myers, W.D., Ludden, P.A., Nayigihugu, V., Hess, B.W., 2004. A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J. Anim. Sci.* 82, 179-183.
- NRC, 2001. National Research Council, Nutrient Requirements of Dairy Cattle, seventh rev. ed. National Academy of Science, Washington, D.C., USA.
- Oliveira, A.S., Valadares, R.F.D., Valadares Filho, S.C., Cecon, P.R., Rennó, L.N., Queiroz, A.C., Chizzotti, M.L., 2001. Microbial protein production, purine derivatives and urea excretion estimate in lactating dairy cows fed isoprotein diets with different non protein nitrogen compounds levels. *Rev. Bras. Zootec.* 30, 1621-1629.
- Oliveira, J.S., Lana, R.P., Borges, A.C., Queiroz, A.C., Almeida, I.C.C., 2004. Effect of monensin and propolis extract on ammonia production and *in vitro* degradability of crude protein of different nitrogen sources. *Rev. Bras. Zootec.* 33, 504-510.
- Onetti, S.G., Shaver, R.D., Mcguire, D.L., Grummer, R.R., 2002. Effect of supplemental tallow on performance of dairy cows fed diets with different corn silage:alfalfa silage ratios. *J. Dairy Sci.* 85, 632-614.
- Park, Y.K., Paredes-Guzman, J.F., Aguiar, C.L., Alencar, S.M., Fujiwara, F.Y., 2004. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J. Agric. Food. Chem.* 52, 1100-1103.
- Pottier, J., Focant, M., Debier, C., De Buysser, G., Goffe, C., Mignolet, E., Froidmont, E., Larondelle, Y., 2006. Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. *J. Dairy Sci.* 89, 685-692.
- Prado, O.P.P., Zeoula, L.M., Pontara, L.P.M., Franco, S.L., Novello, C.R., Geron, L.J.V., 2010a. Addition of propolis or monensin sodium on dry matter *in vitro* digestibility. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* 11, 1023-1032.
- Prado, O.P.P., Zeoula, L.M., Moura, L.P.P., Franco, S.L., Prado, I.N., Jacobi, G., 2010b. Effect of propolis and sodium monensin addition on digestibility and ruminal characteristics of buffaloes fed diet based on roughage. *R. Bras. Zootec.*, 39, 2055-2065.
- Preston, T.R., 1995. Biological and chemical analytical methods. In: Preston, T.R. Tropical animal feeding: a manual for research workers. FAO. Rome, Italy.
- Santos, N.W., Santos, G.T., Silva-Kazama, D.C., Grande, P.A., Pintro, P.M., de Marchi, F.E., Jobim, C.C., Petit, H.V., 2014. Production, composition and antioxidants in milk of dairy cows fed diets containing soybean oil and grape residue silage. *Liv. Sci.* 159, 37-45.
- Satter, L.D., Slyter, L.L., 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *Brit. J. Nutr.* 32, 199-205.
- Sforcin, J.M., Bankova, V., 2011. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* 133, 253-260.
- Siger, A., Nogala-Kalucka, M., Lampart-Szczapa, E., 2008. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J. Food Lipids* 15, 137-149.
- Stelzer, F.S., Lana, R.P., Campos, J.M.S., Mancio, A.B., Pereira, J.C., Lima, J.G., 2009. Performance of milking cows fed concentrate at different levels associated or not with propolis. *Rev. Bras. Zootec.* 38, 1381-1389.
- Weiss, W., 1999. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. Proceedings Ithaca: Cornell University. 61, 176-185.

### **III – Extrato de própolis e vitamina E para vacas leiteiras: lipoperoxidação sanguínea, produção de leite, composição de ácidos graxos e qualidade oxidativa do leite**

(Animal Feed Science and Technology)

#### **Resumo**

Os compostos fenólicos da própolis podem ser utilizados na produção de vacas leiteiras com possíveis benefícios à qualidade do leite. O sinergismo destes compostos com a vitamina E pode reduzir a oxidação sanguínea e no leite. Por isso, objetivou-se estudar a lipoperoxidação sanguínea, produção e composição de leite, composição de ácidos graxos e qualidade antioxidante do leite de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça contendo própolis ou própolis associada com vitamina E na dieta. Utilizaram-se quatro vacas da raça Holandesa, portadoras de cânulas ruminais, com média de  $584 \pm 52$  kg de peso corporal e  $90 \pm 39$  dias de lactação em quadrado latino  $4 \times 4$ , com quatro dietas e quatro períodos. As dietas experimentais foram: dieta controle; dieta com óleo de linhaça, 25 g/kg de MS; dieta com óleo de linhaça + produto à base de própolis, 1,2 g/kg de MS; dieta com óleo de linhaça + produto à base de própolis + vitamina E, 375 UI/kg de MS. A suplementação com o produto à base de própolis diminuiu as concentrações sanguíneas de colesterol total. O produto à base de própolis associado ou não à vitamina E diminuiu a lipoperoxidação sanguínea. O fornecimento do produto associado ou não a vitamina E não apresentou efeitos sobre a produção de leite e composição química. A adição do produto à base de própolis nas dietas aumentou as concentrações dos ácidos graxos 18:1*trans*9 e 18:2*cis*9,*trans*11-CLA, assim como a concentração total de CLA no leite. A concentração de polifenóis totais no leite foi elevada com o uso produto a base de própolis em associação ou não a vitamina E. O produto a base de própolis elevou a atividade antioxidante do leite pelo aumento do poder redutor. O fornecimento de óleo de linhaça às vacas diminuiu a estabilidade oxidativa da gordura do leite, mas não houve efeito protetor das fontes de antioxidantes. Nas condições estudadas, o produto a base de própolis mostrou-se eficaz na melhora de alguns parâmetros de qualidade do leite e a associação com a vitamina E influenciou positivamente a lipoperoxidação sanguínea.

*Palavras-chave:* Ácidos fenólicos; Linhaça; Antioxidante; Ácido graxo; Composição de leite; CLA

*Abreviações:* AGPI, ácidos graxos poli-insaturados; AGMI, ácidos graxos monoinsaturados; EAG, equivalente ácido gálico; MS, matéria seca; MO, matéria orgânica; EE, extrato etéreo; DC, hidroperóxidos dieno conjugados; HDL, lipoproteína de alta densidade; CLA, ácido linoleico conjugado.

## **1. Introdução**

A própolis é um material resinoso produzido pelas abelhas a partir de resinas de plantas, contendo enzimas e cera de abelhas. É usada para proteger a colmeia de doenças e invasão de intrusos (Sforcin & Bankova, 2011). Por se tratar de substância oriunda de plantas, a própolis é rica em compostos fenólicos vegetais que conferem importantes propriedades biológicas, tais como antioxidantes (Cottica et al., 2011) e antibacteriana (Marcucci et al., 2001), e sua composição está relacionada às características fitogeográficas do local de origem (Kumazawa et al., 2003).

Para ser utilizada na alimentação animal, a própolis bruta necessita passar por processos de extração e purificação para que os compostos de interesse estejam disponíveis no extrato a ser estudado. Em razão de ser um produto natural, a própolis pode ser utilizada como aditivo na produção animal e satisfazer as preocupações atuais dos consumidores sobre segurança e toxicidade dos produtos animais. A própolis brasileira do tipo verde é originária, sobretudo, da planta *Baccharis dracunculifolia* (Kumazawa et al., 2003) e sua composição foi relacionada com a inibição do crescimento de diversas cepas de bactérias ruminais (Aguiar et al., 2013) e na população ruminal de protozoários ciliados em bubalinos (Ríspoli et al., 2009).

A vitamina E é usada na nutrição animal, principalmente, em razão de sua função antioxidante lipossolúvel. Sua habilidade em doar hidrogênio aos radicais da cadeia de propagação oxidativa contribui com a finalização das reações de oxidação (Baldi, 2005) e, conseqüentemente, auxilia na redução dos efeitos do estresse oxidativo. A associação de antioxidantes com propriedade hidrofílica, como os compostos fenólicos de plantas, e antioxidantes lipofílicos, como a vitamina E, foi estudada em modelo animal (Gobert

et al., 2009) visando investigar a ocorrência de complementaridade na proteção contra a lipoperoxidação sanguínea.

A suplementação lipídica de vacas leiteiras pode ser utilizada para modificar a composição e proporção de ácidos graxos da gordura do leite (Chilliard et al., 2007), de forma a aumentar as concentrações de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), mono-insaturados (AGMI) e a síntese do ácido linoleico conjugado (CLA), considerados benéficos à saúde humana. O óleo de linhaça é rico em ácido linolênico, sua adição em dietas de vacas leiteiras é uma forma de elevar a proporção de AG considerados saudáveis, como o CLA, e resultar em um tipo de leite com maior valor nutritivo e valor terapêutico (Bu et al., 2007). Porém, esse perfil de gordura é instável e suscetível à ocorrência do sabor rançoso no leite (Granelli et al., 1998). A suplementação lipídica para vacas leiteiras pode aumentar o risco de lipoperoxidação dos lipídios sanguíneos, de modo similar ao leite, e expor os animais aos efeitos deletérios do estresse oxidativo (Gobert et al., 2009), com possível ocorrência de desordens metabólicas (Miller et al., 1993).

A presença de antioxidantes no leite como  $\alpha$ -tocoferol pode prevenir a oxidação do leite enriquecido com AGPI se o  $\alpha$ -tocoferol for fornecido em alta dosagem na dieta de vacas leiteiras (Focant et al., 1998). Compostos fenólicos como isoflavonas, lignanas, ácido ferúlico e fenólicos totais podem ser transferidos para o leite, como foi mostrado para vacas leiteiras alimentadas com trevo (King et al., 1998), farinha de linhaça (Petit & Gagnon, 2009), ácido ferúlico (Soberon et al., 2012), e resíduo de uva (Santos et al., 2014), respectivamente. O uso de antioxidantes na dieta de vacas leiteiras pode contribuir para proteção contra o estresse oxidativo e manutenção da saúde destes animais. A adição de extrato de própolis e vitamina E na alimentação de vacas leiteiras tem sido pouco estudada e sua capacidade de proteção contra o estresse oxidativo é desconhecida.

Portanto, os objetivos foram determinar os efeitos da incorporação de um produto à base de própolis associado ou não à vitamina E a uma dieta contendo óleo de linhaça para vacas em lactação sobre a peroxidação dos lipídios sanguíneos, produção e composição química do leite, composição de ácidos graxos e qualidade oxidativa do leite.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Animais e dietas

O experimento cumpriu as orientações do Comitê para o Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (Maringá, PR), sob número de aprovação 111/2012. O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi e no Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal da Universidade Estadual de Maringá no período de setembro a novembro de 2012.

Quatro vacas da raça Holandesa, portadoras de cânulas ruminais, com média de  $584 \pm 52$  kg de peso corporal (PC) e  $90 \pm 39$  dias de lactação foram distribuídas em quadrado latino  $4 \times 4$ , com quatro dietas e quatro períodos. As vacas foram alojadas em baias *tie stall* e alimentadas individualmente às 08:00 h e 16:00 h.

As dietas foram formuladas para atender às exigências nutricionais de vacas leiteiras com média de 550 kg de PC e produção de 30 kg/dia de leite com 35 g/kg de gordura (NRC, 2001). A dieta controle foi composta por 600 g/kg (base na MS) de volumoso (silagem de milho) e 400 g/kg (base da MS) de concentrado, composto por farelo de soja, milho moído, farelo de trigo, ureia e suplemento mineral (Tabela 1).

As dietas experimentais foram: dieta controle (CON); dieta com óleo de linhaça, 25 g/kg na MS (OL); dieta com óleo de linhaça + aditivo à base de própolis, 1,2 g/kg de MS (LLOS); dieta com óleo de linhaça + aditivo à base de própolis + vitamina E, 375 UI/kg de MS (LLOS-E). O produto à base de própolis e a vitamina E foram fornecidos duas vezes ao dia juntamente com a dieta (8:00 e 16:00 h), ambos foram acondicionados em papel higroscópico e colocados diretamente no rúmen, pela cânula ruminal.

As amostras de própolis do tipo verde foram obtidas do apiário da Fazenda Experimental de Iguatemi e preparadas no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Estadual de Maringá. O produto à base de própolis (LLOS) foi preparado por meio de uma extração hidroalcoólica da própolis bruta de acordo com Franco e Bueno (1999) e em seguida, o álcool foi evaporado (Büchi R210, São Paulo, SP) e o extrato foi seco em spray dryer (Labmaq MSD 1, Ribeirão Preto, SP). O extrato seco de própolis está registrado no Instituto Nacional da Propriedade Intelectual-Brasil como LLOS B1, com sete doses, sob o n. 0605768-3. Uma quantidade de milho moído foi adicionada ao extrato como excipiente para facilitar o fornecimento do produto aos animais. A identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes no extrato de

própolis foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (Tabela 2). A vitamina E fornecida foi na forma de acetato de  $\alpha$ -tocoferol (Microvit E Promix 500.000 UI/kg, Adisseo, São Paulo, SP).

**Tabela 1**  
Ingredientes e composição química das dietas experimentais

	Dietas <sup>1</sup>		EP	P
	CON	OL		
Composição de ingredientes (g/kg MS) <sup>2</sup>				
Silagem de milho	600	600		
Milho moído	160	99		
Farelo de soja (48 g/kg PB)	111	110		
Farelo de trigo	90	125		
Óleo de linhaça bruto		25		
Ureia	9,0	9,0		
Suplemento mineral e vitamínico <sup>3</sup>	17,2	17,2		
Calcário	7,5	9,5		
Bicarbonato de sódio	4,0	4,0		
Sulfato de amônia	1,0	1,0		
Sal comum	0,3	0,3		
Análises químicas <sup>4</sup>				
MS (g/kg matéria natural)	568,7	574,1	2,34	0,28
Matéria orgânica (g/kg MS)	935,4	939,2	1,14	0,09
Proteína bruta (g/kg MS)	141,4	143,7	1,22	0,40
Extrato etéreo (g/kg MS)	22,8	47,1	4,61	<0,01
FDN (g/kg MS)	402,0	406,0	5,76	0,76
CNF (g/kg MS)	369,2	341,7	0,77	0,85
EL <sub>L</sub> (Mcal/kg MS) <sup>5</sup>	1,54	1,60	0,02	0,15
Ácidos graxos (g/kg MS)				
16:0	4,00	5,58	0,34	<0,01
16:1n9	0,16	0,18	0,06	0,92
18:0	0,85	2,05	0,23	<0,01
18:1n9	5,40	10,08	0,94	<0,01
18:1n7	0,27	0,34	0,03	0,27
18:2n6	7,54	11,28	0,73	<0,01
18:3n3	1,43	15,35	2,63	<0,01
n6/n3	5,27	0,73	0,96	<0,01
Polifenóis totais (g EAG/kg MS)	3,45	3,92	0,06	0,10

<sup>1</sup>CON, dieta controle, OL, dieta com óleo de linhaça, EP=erro padrão da média. <sup>2</sup>Valores reais obtidos por pesagem dos ingredientes. <sup>3</sup>Contém (por kg): Ca 156 g, P 51 g, S 20 g, Mg 33 g, Na 93 g, K 28 g, Co 30 mg, Cu 400 mg, Cr 10 mg, Fe 2000 mg, I 40 mg, Mn 1350 mg, Se 15 mg, F 510 mg, Zn 1700 mg.

<sup>4</sup>Média das amostras compostas preparadas de cinco amostras diárias coletadas a partir do dia 15 ao 19 de cada período experimental, MS = matéria seca, FDN = fibra em detergente neutro sem nitrogênio e cinza residual, CNF = carboidratos não fibrosos, EL<sub>L</sub> = energia líquida de lactação, EAG = equivalente ácido gálico. <sup>5</sup>Energia líquida de lactação calculada por EL<sub>L</sub> (Mcal/kg) = 0,0245 × nutrientes digestíveis totais – 0,12 (NRC, 2001).

**Tabela 2**

Composição de compostos fenólicos do produto à base de própolis e dos alimentos constituintes das dietas<sup>1</sup>

Item	Concentração (mg/g)
Própolis	
Ácido cafeico	0,83 ± 0,01
Ácido chicórico	6,53 ± 0,04
Ácido <i>p</i> -cumárico	2,20 ± 0,05
Artepillin C	2,44 ± 0,01
Flavonoides (equivalente quercetina)	1,25 ± 0,26
Ácidos fenólicos totais (equivalente ácido <i>p</i> -cumárico)	17,64 ± 0,11
Polifenóis totais (equivalente ácido gálico)	
Própolis	20,19 ± 3,78
Silagem de milho	5,27 ± 0,14
Concentrado controle	0,72 ± 0,03
Concentrado com óleo de linhaça	1,26 ± 0,03
Óleo de linhaça <sup>2</sup>	1,14 ± 0,03

<sup>1</sup>Produto a base de própolis=extrato de própolis + excipiente. <sup>2</sup>Siger et al. (2008).

## 2.2 Procedimentos experimentais

Cada período experimental consistiu de 14 dias de adaptação às dietas e 7 dias de coleta diária de dados. A ingestão alimentar foi ajustada para 100 g/kg de sobras em matéria natural. As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia às 06:30 h e 15:00 h, e a produção de leite foi registrada em cada ordenha.

Amostras de rações foram coletadas diariamente a partir do 15º ao 19º dia, congeladas, e compostas por período. Estas amostras foram secas a 55°C por 72 horas e moídas a 1 mm em moinho Wiley (Marconi MA340, Piracicaba, SP, Brasil) para posterior análise.

Amostras de leite foram obtidas de dez ordenhas consecutivas entre o 15º e 19º dia de cada período experimental e compostas por vaca e período, proporcionalmente à produção em cada ordenha para obter uma amostra de leite composta/vaca/período. As amostras de leite foram mantidas à temperatura ambiente (23°C) com conservante, 2-bromo-2-nitropropano-1, 3-diol (Bronopol, San Ramon, CA, EUA), para determinação dos teores de proteína, gordura, lactose, N-ureico e contagem de células somáticas (CCS). As amostras sem conservante foram mantidas congeladas para determinação da concentração de ácidos graxos e dos parâmetros antioxidantes. No 18º dia do período experimental, três horas após alimentação, amostras de sangue foram coletadas pela veia jugular dos animais com tubos contendo anticoagulante (BD vacutainer<sup>®</sup>, K<sub>2</sub>EDTA

7,2 mg, São Paulo, SP), depois foram centrifugadas (2.500g, 20 min) e o plasma foi conservado congelado.

### 2.3 Análises químicas

A matéria seca (MS) das dietas foi determinada em estufa de ventilação forçada de acordo com o procedimento 934.01 da AOAC (1990). As cinzas foram obtidas por combustão a 600°C por 6 horas de acordo com o método da AOAC número 924.05 (1990), para determinação dos teores de matéria orgânica (MO). A determinação no N total seguiu o procedimento 990.03 da AOAC (1990) (Tecnal TE-036/1, Piracicaba, SP, Brasil). As concentrações de fibra em detergente neutro (FDN), com correção do teor de nitrogênio e cinzas, foram medidas de acordo com Mertens (2002) com uso de amilase termoestável, sem sulfito de sódio. O extrato etéreo (EE) foi determinado (Tecnal TE-044/1, Piracicaba, SP, Brasil) de acordo com o método de 7.060 da AOAC (1990).

As concentrações de proteína, gordura e lactose no leite foram determinadas por espectroscopia de infravermelho (Bentley modelo 2000, Chaska, MN, EUA), pelo procedimento 972.16 da AOAC (1990). Os teores de N-ureico do leite (NUL) foram determinados por um método colorimétrico, com a reação de Berthelot (Chemspec 150, Chaska, MN, EUA). A CCS foi obtida utilizando um contador eletrônico (Somacount 500 ®, Chaska, MN, EUA), como descrito por Voltolini et al. (2001).

Os lipídios totais nas amostras de rações foram extraídos de acordo com Bligh & Dyer (1959), com clorofórmio, metanol e água (2:2:1,8) e os lipídios totais de amostras de leite foram extraídos de acordo com Folch et al. (1957), com clorofórmio, metanol e água (2:1:1). Os ésteres metílicos de ácidos graxos (AG) foram preparados segundo o procedimento de Hartman & Lago (1973), modificado por Maia & Rodrigues-Amaya (1993).

Os ácidos graxos foram analisados por um cromatógrafo a gás (Thermo, Trace GC Ultra 3300, Waltham, MA, EUA), equipado com um amostrador automático TriPlus, com um detector de ionização de chama e uma coluna capilar de sílica fundida (Select FAME CP-7420, 100 m, 0,25 mm d.i. e 0,39 mM, 100% cyanopropyl) (Martin et al., 2008). O fluxo de gases (White Martins, Osasco, SP, Brasil) foi de 1,2 mL/min para o gás de transporte (H<sub>2</sub>), 30 mL/min para o gás auxiliar (N<sub>2</sub>), 35 mL/min e 350 mL/min para o H<sub>2</sub> e o gás sintético, respectivamente. O volume de injeção foi 2 µL,

utilizando uma razão de divisão da amostra (split) de 1:80. As temperaturas do injetor e do detector eram de 200°C e 240°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada a 65°C durante 4 minutos, seguida por uma primeira rampa de 16°C/min até 185°C, mantida por 12 minutos. Uma segunda rampa foi programada de 20°C/min a 235°C, mantida a esta temperatura durante 9 minutos. O tempo total de análise foi de 35 minutos. As áreas dos picos foram determinadas pelo software ChromQuest, versão 5.0. A identificação de AG foi baseada na comparação dos tempos de retenção com os de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma- Aldrich, Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

A quantificação absoluta dos ácidos graxos foi realizada por normalização interna, e usado como padrão o éster metílico de tricosanóico (Sigma-Aldrich Brasil, SP, SP, Brasil). Os cálculos foram efetuados de acordo com o método de Joseph e Ackman (1992). Fatores de correção teóricos (Visentainer, 2012) foram utilizados para determinar as concentrações. A quantidade de ácidos graxos foi calculada em mg/g de lípidos totais no leite, e em g/kg MS em rações.

A extração e análise de polifenóis no produto à base de própolis e alimentos foi realizada como descrito em Santos et al. (2014). Para extração dos polifenóis totais do leite, usou-se 1 mL da amostra e o volume foi completado a 10 mL com metanol puro. Os extratos foram, em seguida, centrifugados (1.058 g, 10 min, 23°C) e filtrados por um filtro de membrana de politetrafluoretileno (PTFE), 0,22 µm (Spritzen, Xangai, China) em tubo protegido da luz. A concentração de polifenóis totais foi determinada pelo procedimento Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965). Em resumo, 125 µL de amostra foram misturados com 125 µL da solução de Folin-Ciocalteu (500:500, v/v) e 2,25 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3,79 M). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante 30 minutos e a leitura foi realizada com um espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Scientific 300 PC, Waltham, MA, EUA) a 760 nm. As concentrações de compostos fenólicos foram expressas como equivalentes de ácido gálico (EAG; mg/L de leite).

A capacidade antioxidante total das amostras de leite foi determinada pelo método ORAC (Capacidade de absorção do radical oxigênio) de acordo com Zulueta et al. (2009) com algumas modificações. O procedimento foi realizado a 37°C e utilizou-se tampão fosfato de potássio (pH 7,0). As amostras de leite foram previamente descongeladas e homogeneizadas em um banho ultrassom e diluídas em balão volumétrico com 50 mL de tampão fosfato (1:100, v/v). O procedimento consistiu em

misturar 25  $\mu\text{L}$  de amostra diluída com 150 mL de solução de fluoresceína (4,0 nmol/L), após 5 minutos de ambientação das soluções a 37°C e sob proteção da luz, 25  $\mu\text{L}$  de solução AAPH (2,2'-azobis-2-amidinopropano) di-hidroclorato; 160 nmol/L) foram adicionados. As leituras foram feitas em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos em um espectrofluorímetro (Perkin Elmer, Victor X4, Waltham, MA, EUA). Pelas leituras das intensidades de fluorescência (excitação = 485 nm, emissão = 515 nm), foi calculada a área sob a curva de absorbância em função do tempo. Os resultados foram expressos em equivalente Trolox® (ET; mmol/L) e calculados pela equação linear obtida a partir da curva de calibração com o padrão de Trolox.

O poder redutor do leite foi determinado como descrito por Zhu et al. (2002) com modificações. As proteínas do leite foram precipitadas por adição de um mililitro de uma solução de ácido tricloroacético (200:800, v/v) a um mililitro de leite. A mistura foi agitada por vortex por 10 minutos e centrifugada a 1.058 g durante 10 min, a 23°C. A absorbância foi medida a 700 nm em um espectrofotômetro UV-Vis. O poder redutor foi expresso em equivalente ácido gálico (EAG; mg/L).

A produção de hidroperóxidos dieno conjugados (DC) foi utilizada para medir a oxidação lipídica do leite, como descrito por Kiokias et al. (2006). À amostra de leite (50  $\mu\text{L}$ ), foram adicionados 2,5 mL de 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  $\mu\text{m}$ , e a absorbância foi medida com um espectrofotômetro UV-Vis. A quantidade de DC em amostras de leite foi calculada pela monitorização da absorbância a 232 nm, considerando a absorvidade molar do ácido linoleico ( $\epsilon = 27,000$ ), expressa como mmol/kg de gordura.

A oxidação lipídica também foi mensurada com uso do ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) como descrito por Vyncke (1970) com modificações. A 500  $\mu\text{L}$  de leite foram misturados 2 mL de uma solução composta de TBA (10:990, w/v), ácido tricloroacético (150:850, w/v) e ácido clorídrico (0,05:999,95, v/v), e a mistura foi fervida a 100°C durante 15 minutos. Depois, um banho frio de 5 minutos e uma centrifugação (1.058 g, 10 min, 23°C) foram realizados. O sobrenadante foi lido a 538 nm em espectrofotômetro UV-Vis. Tetrametoxipropano foi utilizado como padrão e os valores de TBARS foram expressos como mmol de malonaldeído por kg de gordura (MDA; mmol/kg de gordura).

A lipoperoxidação no sangue foi avaliada pela cinética de produção *in vitro* de hidroperóxidos dieno conjugados (DC) induzida pela adição de íons cobre, de acordo com Gobert et al. (2009). Adicionou-se três mL de solução de sulfato de cobre (25 µM) em tampão fosfato (pH 7) à 25 µL de plasma e a absorbância foi monitorada a 245 nm, a cada minuto por 150 minutos a 37°C, em espectrofotômetro (Thermo Scientific 300 PC, Waltham, MA, EUA). A cinética de produção de DC resultou numa curva, da qual três parâmetros foram analisados de acordo com Pinchuk & Lichtenberg (2002): 1) taxa de oxidação (TOX), representa a velocidade de propagação da lipoperoxidação, calculada a partir da inclinação da curva dos pontos formados da densidade ótica (DO) e o tempo, DO/minuto, 2) tempo para atingir a máxima taxa de oxidação (TMTOX), calculada com uso da equação gerada pela curva, 3) acúmulo máximo de DC (DO máxima), analisada diretamente no perfil da cinética.

#### 2.4 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados com uso do procedimento MIXED do SAS (Statistical Analysis System, versão 9.0). A CCS no leite não apresenta distribuição normal, então os valores foram convertidos em logaritmo (log) em base 10. Os dados foram analisados em um quadrado latino 4 × 4 com o modelo geral:  $Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijk}$ , em que:  $Y_{ijk}$  = variáveis observadas;  $\mu$  = média geral,  $A_i$  = efeito do animal  $i$ , de 1 a 4;  $P_j$  = efeito do período  $j$ , de 1 a 4;  $T_k$  = efeito da dieta  $k$ , de 1 a 4;  $e_{ijk}$  = erro aleatório. A significância foi declarada em  $P < 0,05$  e tendências foram aceitas em  $P \leq 0,10$ . Contrastes ortogonais foram utilizados para comparar os efeitos de: 1) óleo de linhaça (CON contra OL, LLOS e LLOS -E), 2) extrato de própolis (OL contra LLOS e LLOS -E), e 3) associação de própolis e vitamina E (LLOS contra LLOS -E).

### 3. Resultados

A análise da composição de compostos fenólicos do produto à base de própolis mostrou a presença do ácido cafeico, ácido chicórico, ácido p-cumárico e Artepillin-C (Tabela 2). Outros ácidos fenólicos com espectros desconhecidos foram quantificados como equivalente ácido p-cumárico. Os flavonoides não puderam ser identificados, mas foram quantificados em equivalente quercetina. Os compostos fenólicos totais nas amostras de alimentos e produto a base de própolis foram quantificados em equivalente ácido gálico.

As dietas não modificaram a glicemia e as concentrações sanguíneas de triacilgliceróis das vacas (Tabela 3). A adição de óleo de linhaça às dietas resultou em aumento do HDL ( $P=0,04$ ) e colesterol total ( $P=0,05$ ) quando comparada à dieta controle, porém, quando se suplementou com produto à base de própolis, verificaram-se reduções do HDL ( $P=0,08$ ) e das concentrações sanguíneas do colesterol total ( $P<0,01$ ). O fornecimento de produto à base de própolis associado à vitamina E também diminuiu o HDL ( $P=0,05$ ) e colesterol total ( $P=0,04$ ). As dietas influenciaram a lipoperoxidação no sangue das vacas. A suplementação lipídica elevou a TOX, o TMTOX e a DO máxima, porém, quando se adicionou o produto à base de própolis, houve redução na TOX ( $P=0,04$ ) e na DO máxima ( $P<0,01$ ). A associação de antioxidantes influenciou para redução da TOX ( $P=0,09$ ) e aumento do TMTOX ( $P=0,06$ ).

As dietas fornecidas às vacas não modificaram a produção de leite e composição de proteína e lactose (Tabela 4). Decréscimos nas concentrações de gordura ( $P<0,01$ ) e sólidos totais ( $P=0,05$ ) foram observados pela adição de óleo de linhaça nas dietas. A razão gordura/proteína, os teores de CCS e N-ureico e a eficiência de produção foram semelhantes entre dietas.

As dietas influenciaram a composição de ácidos graxos da gordura do leite (Tabela 5). A suplementação lipídica na dieta reduziu as concentrações de AG C6-C17 e elevou as concentrações de C18, incluindo o CLA. Por consequência, as proporções de AGMI e AGPI foram aumentadas com o óleo de linhaça na dieta, com redução dos AGS. A adição de produto à base de própolis às dietas aumentou as concentrações dos ácidos graxos 18:1n9trans ( $P=0,05$ ) e 18:2cis9,trans11 ( $P=0,04$ ), elevando o CLA total ( $P=0,01$ ). A associação de produto à base de própolis e vitamina E nas dietas resultou em tendência para aumento das concentrações de 18:2 cis9,trans11 CLA ( $P=0,06$ ) e CLA total ( $P=0,03$ ).

A qualidade oxidativa do leite foi alterada pelas dietas experimentais (Tabela 6). A concentração de polifenóis totais no leite foi aumentada pela adição às dietas de óleo de linhaça, produto à base de própolis e produto à base de própolis em associação com a vitamina E ( $P<0,01$ ). As dietas não influenciaram a atividade antioxidante no leite medido pela técnica ORAC, no entanto o poder redutor foi aumentado pelo fornecimento às vacas de óleo de linhaça e produto à base de própolis ( $P<0,05$ ). O óleo de linhaça na dieta provocou aumento da concentração de hidroperóxidos dieno conjugados no leite ( $P<0,01$ ), porém não houve efeito da suplementação com produto à

base de própolis associado ou não à vitamina E. A concentração de Tbars no leite foi semelhante entre dietas.

**Tabela 3**

Parâmetros sanguíneos e lipoperoxidação em vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça (OL) contendo produto à base de própolis (LLOS) associado ou não à vitamina E (LLOS-E) na dieta

	Dietas <sup>1</sup>				EP	P		
	CON	OL	LLOS	LLOS-E		1	2	3
Parâmetros (mg/100 mL)								
Glicose	52,88	53,54	53,54	55,26	1,22	0,63	0,75	0,58
Triacilgliceróis	10,04	8,69	10,03	8,38	0,49	0,45	0,71	0,33
Colesterol total	152,91	178,55	154,23	125,22	6,30	0,05	<0,01	0,04
HDL	103,81	145,25	128,98	115,72	5,25	0,04	0,08	0,05
Hidroperóxidos dieno conjugados <sup>2</sup>								
TOX (DO/min)	0,50	0,67	0,61	0,52	0,02	0,03	0,04	0,09
TMTOX (minuto)	132,48	143,83	133,11	144,04	2,22	0,09	0,26	0,06
DO máxima	245,94	276,33	261,59	254,68	3,75	<0,01	<0,01	0,14

<sup>1</sup>CON, dieta controle. Probabilidade de contrastes ortogonais significativos. Os efeitos testados foram 1) CON vs, OL, LLOS e LLOS -E, 2) OL vs, LLOS e LLOS -E, e 3) LLOS vs, LLOS -E. <sup>2</sup>TOX=taxa de oxidação, TMTOX=tempo para máxima taxa de oxidação, DO=densidade ótica.

**Tabela 4**

Produção e composição do leite em vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça (OL) contendo produto à base de própolis (LLOS) associado ou não à vitamina E (LLOS-E) na dieta

Item	Dietas <sup>1</sup>				EP	P		
	CON	OL	LLOS	LLOS-E		1	2	3
Produção, kg/dia								
Leite	28,91	28,91	27,96	28,73	0,71	0,82	0,75	0,71
Leite corrigido <sup>2</sup>	26,34	25,23	24,82	25,12	0,60	0,40	0,87	0,87
Gordura	0,85	0,78	0,78	0,78	0,02	0,17	1,00	0,93
Proteína	0,83	0,84	0,82	0,85	0,02	0,88	0,88	0,57
Lactose	1,36	1,35	1,31	1,34	0,03	0,74	0,81	0,75
Concentração, g/kg								
Gordura	29,68	27,09	28,11	27,21	0,40	<0,01	0,38	0,23
Proteína	28,84	29,33	29,57	29,49	0,30	0,34	0,74	0,92
Lactose	47,13	46,55	46,94	46,83	0,20	0,26	0,27	0,78
Sólidos totais	115,17	112,28	114,00	112,84	0,50	0,05	0,27	0,33
Razão G/P	1,03	0,92	0,95	0,92	0,10	0,44	0,80	0,89
CCS (log 10)	1,70	1,92	1,83	1,94	0,11	0,16	0,81	0,49
N-ureico (mg/dl)	16,37	17,14	16,22	16,79	0,61	0,65	0,43	0,54

<sup>1</sup>Dietas: CON, controle. Probabilidade de contrastes ortogonais significativos. Os efeitos testados foram 1) CON vs, OL, LLOS e LLOS -E, 2) OL vs, LLOS e LLOS -E, e 3) LLOS vs, LLOS -E. <sup>2</sup>Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura = (0,432 + 0,1625 x % gordura) x produção de leite (kg/dia) (Sklan et al., 1992); Razão G/P=gordura/proteína; CCS = contagem de células somáticas, base log 10.

**Tabela 5**

Composição de ácidos graxos da gordura do leite (mg/g de lipídios totais) de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça (OL) contendo produto à base de própolis (LLOS) associado ou não à vitamina E (LLOS-E) na dieta

Item	Dietas <sup>1</sup>				EP	P		
	CON	OL	LLOS	LLOS-E		1	2	3
4:0	6,97	7,36	7,34	6,93	0,17	0,29	0,86	0,80
6:0	10,11	8,14	8,02	8,13	0,39	<0,01	0,93	0,50
8:0	9,52	7,19	7,10	6,85	0,46	<0,01	0,87	0,96
10:0	28,05	19,45	18,29	17,68	1,60	<0,01	0,64	0,97
12:0	34,09	23,75	22,98	23,38	1,82	<0,01	0,88	0,79
13:0	1,11	0,76	0,69	0,88	0,09	0,07	0,86	0,13
13:1n5	1,05	0,83	0,81	0,90	0,05	0,13	0,88	0,61
14:0	113,09	90,92	90,99	91,17	3,88	<0,01	0,93	0,89
14:1n9	10,02	7,33	7,32	7,07	0,56	<0,01	0,78	0,60
14:1n7	2,86	2,59	2,64	2,83	0,11	0,28	0,65	0,78
14:1n5	5,86	5,86	5,71	5,69	0,15	0,78	0,72	0,88
15:0	11,56	8,79	8,69	9,57	0,58	0,05	0,72	0,45
15:1n5	2,44	2,25	2,38	2,25	0,17	0,26	0,52	0,49
16:0	293,60	212,61	211,91	203,49	9,60	<0,01	0,65	0,55
16:1n9	13,58	9,43	9,33	8,64	0,63	<0,01	0,60	0,50
16:1n7	5,85	5,46	5,66	5,56	0,15	0,32	0,41	0,92
16:1n5	5,22	4,92	5,21	4,79	0,09	0,20	0,75	0,11
17:0	5,63	4,72	5,01	5,00	0,17	0,06	0,35	0,88
17:1n7	2,23	1,78	1,89	1,81	0,07	<0,01	0,43	0,54
18:0	82,13	112,24	120,27	124,21	5,24	<0,01	0,34	0,89
18:1n9 <sup>t</sup>	12,19	22,50	25,20	25,60	1,74	<0,01	0,05	0,84
18:1n9	174,06	223,53	234,02	230,50	7,51	<0,01	0,29	0,96
18:2n6	21,17	24,17	25,50	25,27	0,79	0,03	0,95	0,11
18:3n3	2,62	10,67	11,25	10,68	0,95	<0,01	0,50	0,46
18:2c9, <sup>t</sup> 11	3,82	4,34	4,52	4,78	0,16	<0,01	0,04	0,06
18:2c12, <sup>t</sup> 10	1,07	1,06	1,10	1,17	0,04	0,68	0,56	0,89
20:3n6	0,50	0,36	0,33	0,33	0,02	0,01	0,61	0,86
20:4n6	1,07	0,81	0,81	0,78	0,04	<0,01	0,69	0,61
AGMI <sup>2</sup>	235,36	286,47	300,17	295,64	7,80	<0,01	0,22	0,99
AGPI	30,25	41,41	43,51	43,01	1,61	<0,01	0,59	0,17
AGS <sup>2</sup>	596,91	496,75	502,10	498,19	13,85	<0,01	0,81	0,99
CLA total	4,89	5,40	5,62	5,95	0,17	<0,01	0,01	0,03
n-6	22,74	25,34	26,64	26,38	0,78	0,05	0,98	0,11
n-3	2,62	10,67	11,25	10,68	0,95	<0,01	0,50	0,46
n-6/n-3	8,72	2,38	2,37	2,47	0,72	<0,01	0,77	0,69

<sup>1</sup>CON, dieta controle. Probabilidade de contrastes ortogonais significativos. Os efeitos testados foram 1) CON vs, OL, LLOS e LLOS -E, 2) OL vs, LLOS e LLOS -E, e 3) LLOS vs, LLOS -E. <sup>2</sup>AGMI=ácidos graxos monoinsaturados, AGPI=ácidos graxos poli-insaturados, AGS=ácidos graxos saturados, CLA = ácido linoleico conjugado.

**Tabela 6**

Qualidade oxidativa do leite de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça (OL) contendo produto à base de própolis (LLOS) associado ou não à vitamina E (LLOS-E) na dieta

Item	Dietas <sup>1</sup>				EP	P		
	CON	OL	LLOS	LLOS-E		1	2	3
Polifenóis totais (mg/L EAG) <sup>2</sup>	9,57	10,64	13,35	19,76	1,14	<0,01	<0,01	<0,01
Orac (mmol/L ET)	10,98	10,98	10,46	12,35	0,60	0,87	0,81	0,38
Poder redutor (mg/L EAG)	24,99	33,49	38,05	38,10	1,55	<0,01	0,02	0,98
Dieno conjugados (mmol/kg gordura)	41,72	59,09	57,00	54,61	1,91	<0,01	0,13	0,31
Tbars (mmol/kg gordura MDA)	2,54	6,61	6,50	6,36	0,80	0,11	0,94	0,96

<sup>1</sup>CON, dieta controle. Probabilidade de contrastes ortogonais significativos. Os efeitos testados foram 1) CON vs, OL, LLOS e LLOS -E, 2) OL vs, LLOS e LLOS -E, e 3) LLOS vs, LLOS -E.<sup>2</sup> EAG, equivalente ácido gálico; ET, equivalente Trolox®; MDA, malonaldeído.

#### 4. Discussão

O produto utilizado à base de própolis apresentou principalmente ácidos fenólicos em sua composição, que são derivados do ácido cinâmico. O Artepillin C é um composto encontrado na própolis verde (Park et al., 2004) em razão da coleta das abelhas em plantas *Baccharis dracunculifolia* (Kumazawa et al., 2003). A suplementação com produto à base de própolis nas dietas forneceu às vacas 24,2 mg/kg MS de polifenóis totais e 1,5 mg/kg MS de flavonoides. O produto à base de própolis utilizado por Aguiar et al. (2014) apresentou concentração de flavonoides (28,61 mg/g) mais elevada que a própolis deste estudo (1,25 mg/g). Assim, as vacas daquele estudo receberam 2,81 mg/kg MS de flavonoides.

O fornecimento de dieta com óleo de linhaça para vacas em lactação aumentou as concentrações sanguíneas de HDL e colesterol total e o produto à base de própolis foi responsável pela diminuição do HDL e colesterol total. A associação da vitamina E com produto à base de própolis acentuou a redução nestes parâmetros. Este resultado difere do relatado por Gobert et al. (2009), no qual a associação de um produto rico em compostos fenólicos e vitamina E não modificou as concentrações de triacilgliceróis e frações de colesterol de vacas alimentadas com linhaça extrusada. Segundo Macheix et al. (2005), os antioxidantes fenólicos não são reportados por influenciar as concentrações sanguíneas de lipídios, mas sim por seu efeito protetor sobre a LDL contra a oxidação e seu acúmulo nas artérias.

A suscetibilidade dos lipídios sanguíneos à oxidação é um indicativo do estresse oxidativo nos animais, que é a situação de desequilíbrio entre a produção de radicais livres e nível de antioxidantes. O estresse oxidativo pode causar danos a lipídios e macromoléculas importantes, modificar vias metabólicas, podendo causar alterações fisiológicas que podem desencadear a ocorrência de doenças, como retenção de placenta, mastite e edema de úbere (Miller et al., 1993). A suplementação lipídica para vacas almeja melhorar a qualidade da gordura do leite, entretanto, causa o aumento das concentrações sanguíneas de AGPI que são, por natureza, suscetíveis à lipoperoxidação (Gladine et al., 2007), e expõe os animais aos riscos citados do estresse oxidativo. O produto à base de própolis, contribuiu com o aumento da resistência à oxidação inicial dos lipídios, na diminuição da propagação pela captação de hidroperóxidos dieno conjugados, e diminuiu o acúmulo final destes compostos. A associação do produto à

base de própolis e vitamina E aumentou esta proteção em benefício ao animal. O mesmo efeito foi observado por Gobert et al. (2009), que sugerem haver uma ação sinérgica dos dois tipos de antioxidantes, sendo hidrofílicos os compostos fenólicos, e lipofílica a vitamina E. Esta seria incorporada às camadas lipídicas, e os compostos fenólicos estariam presentes na interface água-lipídio, próximo à vitamina E, e poderiam favorecer a regeneração do radical  $\alpha$ -tocoferil.

A adição de óleo de linhaça nas dietas das vacas foi responsável pelas baixas concentrações de gordura e sólidos totais observadas no leite. No entanto, o teor de EE na dieta se manteve abaixo das recomendações limite de 60 a 70 g/kg de MS do NRC (2001) – teor necessário para não modificar a fermentação ruminal. O tipo de volumoso utilizado pode controlar a extensão dos efeitos da suplementação lipídica na fermentação ruminal (Onetti et al., 2002). Segundo os referidos autores, vacas alimentadas com silagem de milho podem proporcionar pH ruminal abaixo de 6,7 em razão da acidez característica da silagem. pH ruminal abaixo de 6,7 pode interferir nas vias de biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados C18 e causar um acúmulo de isômeros 18:1*trans* no rúmen (Onetti et al., 2002) que, após serem absorvidos, podem interferir na síntese da gordura do leite na glândula mamária. O pH ruminal médio das vacas foi 6,12; 6,10; 6,18 e 6,10 com as dietas CON, OL, PROP e PROP-E, respectivamente. Ademais, a suplementação com gordura sob a forma de óleo livre exerce um efeito maior na biohidrogenação no rúmen (Chilliard et al., 2007) em relação à forma em semente, pois não há proteção do tegumento contra o ataque microbiano.

A razão entre gordura e proteína observada no leite de vacas alimentadas com óleo de linhaça é típica de depressão da gordura do leite (DGL), pois foi similar à razão 1,05, considerada por Stoop et al. (2009) para caracterizar casos de DGL. A ocorrência, considerada pelo referido autor, inclui diminuição da concentração de gordura, mas sem alterações em outros componentes do leite. Embora o isômero 18:2 *cis*12,*trans*10 CLA, produto intermediário da biohidrogenação ruminal do ácido linoleico, esteja relacionado como uma das causas para a ocorrência da DGL (Baumgard et al., 2000), as dietas experimentais não modificaram a sua concentração no leite. Talvez outros isômeros relacionados à DGL pudessem ter sido sintetizados, como o 18:1*trans*10 e outros (Chilliard et al., 2007), mas a presença destes não foi identificada no leite do presente estudo.

As concentrações mais elevadas de 18:2 *cis*9,*trans*11 CLA na gordura do leite de vacas que receberam o produto à base de própolis na dieta indicaram uma possível ação do produto sobre as bactérias responsáveis pela biohidrogenação ruminal. A própolis é um produto rico em compostos fenólicos, como ácidos fenólicos (ácido *p*-cumárico, Artepillin C) e flavonoides (naringenina, crisina), e demonstraram serem inibidores do crescimento de várias cepas de bactérias ruminais (Aguiar et al., 2013). A conversão de ácidos graxos insaturados C18 para a forma saturada é efetuada em várias etapas após a lipólise dos triacilgliceróis. A formação de CLA é realizada pela bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens* (Lourenço et al., 2010), cujo crescimento foi inibido *in vitro* pela própolis (Aguiar et al., 2013). Isto pode ter levado a um acúmulo de 18:1*trans* no rúmen e um posterior fluxo deste isômero para a circulação sanguínea, com captação pela glândula mamária para síntese da gordura do leite. Ademais, a maior parte do CLA no leite advém de síntese endógena, tendo o ácido vacênico como substrato (Lock & Bauman, 2004).

A associação de produto à base de própolis e vitamina E nas dietas das vacas causou aumento de CLA na gordura do leite. A adição de vitamina E nas dietas foi relatada como um meio eficaz para minimizar a formação de AG C18:1*trans*10 no rúmen e atenuar seus efeitos de depressão da gordura do leite (Pottier et al., 2006). A suplementação de 9600 UI/ dia às vacas leiteiras pôde prevenir a redução do teor de gordura do leite (Focant et al., 1998), mas esse fato não foi observado neste estudo. Segundo Pottier et al. (2006), o mecanismo de ação da vitamina E pode ser a doação de elétrons aos isômeros C18:1*trans* formados, agilizando a biohidrogenação.

O fornecimento de óleo de linhaça às vacas foi concebido para melhorar o perfil da gordura do leite para o consumo humano. Este objetivo foi atingido, pois esta suplementação elevou em 22% a concentração de AGMI, 37% os AGPI e 10% de CLA total, quando comparado ao leite obtido com a dieta controle. O uso da própolis e vitamina E nas dietas das vacas leiteiras apresentou um efeito aditivo e aumentou a qualidade da gordura do leite devido à elevação das concentrações de CLA.

Os AGPI são instáveis e suscetíveis à oxidação (Zhao et al., 2013) e para protegê-los forneceu-se o produto à base de própolis como fonte de compostos fenólicos, e produto à base de própolis associado à vitamina E para verificar uma possível ação sinérgica, como verificado por Gobert et al. (2009) sobre o estresse oxidativo de vacas. Os compostos fenólicos de plantas têm capacidade de captar radicais livres, doar átomos

de hidrogênio/elétrons, ou ligar-se a cátions metálicos (Balasundram et al., 2006), reduzindo a oxidação. Quando incluídos na dieta, os compostos fenólicos podem apresentar uma ação complementar ao sistema antioxidante endógeno, envolvido na proteção do organismo contra os efeitos do estresse oxidativo (Rock, 2004).

Os compostos fenólicos são de ocorrência natural no leite de ruminantes, provenientes da dieta e catabolismo de proteínas por bactérias ruminais (O'Connell e Fox, 2001). Este estudo mostra que é possível aumentar a concentração de compostos fenólicos no leite através do seu fornecimento na dieta de vacas. De acordo com Besle et al. (2004), os ruminantes ingerem 20 a 100 vezes mais compostos fenólicos biodisponíveis que o homem e a fração secretada no leite pode refletir a dieta do animal ou até mesmo beneficiar funções metabólicas no corpo de quem o consome.

O parâmetro da atividade antioxidante pode confirmar que os compostos fenólicos foram transferidos ao leite. Embora as dietas não tenham modificado a atividade antioxidante no leite medido pelo método Orac, o poder redutor foi aumentado pela alimentação das vacas com óleo de linhaça e produto à base de própolis. Efeito diferente foi observado por Aguiar et al. (2014) que ao fornecer produtos à base de própolis na dieta de vacas, observaram elevação da atividade antioxidante no leite, medida pelo mesmo método. Os compostos fenólicos têm diferentes mecanismos de ação (Cheynier, 2005), eles podem reagir na fase lipídica e aquosa como captadores de radicais e íons metálicos (Lindmark-Mansson e Åkesson, 2000) e, por isso, é importante analisar a atividade antioxidante por mais de um método.

O leite apresenta uma matriz lipídica complexa e a oxidação ocorre em reação em cadeia envolvendo radicais livres, podendo levar à diminuição da qualidade (Lindmark-Mansson e Åkesson, 2000). Neste estudo, a suplementação de gordura com óleo de linhaça diminuiu a estabilidade oxidativa da gordura do leite, pois as concentrações de DC foram superiores à dieta controle. Efeito semelhante foi relatado por Zhao et al. (2013), que observaram aumento da peroxidação lipídica à medida que foi aumentada a concentração de AGPI no leite. A adição de produto à base de própolis em associação ou não com vitamina E não melhorou a estabilidade oxidativa.

Ainda que os aditivos nas dietas tenham aumentado a concentração de compostos fenólicos e a atividade antioxidante no leite, a estabilidade oxidativa não apresentou semelhante melhora. Ashes et al. (1997) afirmaram que a oxidação do leite pode ser evitada pela inclusão de 1000 UI/dia de vitamina E na dieta dos animais. Neste estudo,

o fornecimento da vitamina E para as vacas foi superior ao referido trabalho (7125 UI/dia), mas não suficiente para proteger a gordura do leite contra a oxidação. Um efeito semelhante foi observado por Slots et al. (2007) que relataram que o  $\alpha$ -tocoferol pode tornar-se pró-oxidante na presença de altas concentrações de ácidos graxos insaturados. Entretanto, uma melhora na resistência da gordura do leite à oxidação foi observada por Focant et al. (1998) com dose para as vacas de 9.616 UI/dia. Este fato ocorre, provavelmente, devido à complexa relação entre pró e antioxidantes no leite (Lindmark-Mansson e Akesson, 2000) e para que a estabilidade oxidativa ocorra é necessário um equilíbrio entre AGPI e antioxidantes (Granelli et al., 1998). A magnitude de transferência de compostos fenólicos presentes na dieta de vacas em lactação para o leite não é bem estabelecida, mas como mostrado por Soberon et al. (2012), vacas foram capazes de transferir 0,02% de ácido ferúlico da dieta ao leite. Foi observado por Matumoto-Pintro et al. (2011) que é possível a transferência de antioxidantes da linhaça para o leite de vacas alimentadas com esse alimento, entretanto as concentrações obtidas não foram suficientes para diminuir a oxidação da gordura do leite.

## **5. Conclusões**

O uso associado de extrato de própolis e vitamina E em dietas contendo óleo de linhaça para vacas apresenta benefícios na lipoperoxidação sanguínea, composição de ácidos graxos e transferência de antioxidantes ao leite, sem interferir na produção. Para vacas em início de lactação alimentadas com óleo de linhaça, o fornecimento de extrato de própolis e vitamina E nas dietas é eficaz na redução do estresse oxidativo sanguíneo, confirmando seu potencial antioxidante para vacas.

## **6. Agradecimentos**

O projeto foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, DF, Brasil, Convênio n.º. 482858/2011-7, Universal/2011.

## 7. Referências

- Aguiar, S. C., Zeoula, L. M., Franco, S. L., Peres, L. P., Arcuri, P.B., Forano, E., 2013. Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria in vitro. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1951-1959.
- Aguiar, S.C.; Cottica, S.M., Boeing, J.S., Samensari, R.B., Santos, G.T., Visentainer, J.V., Zeoula, L.M., 2014. Effect of feeding phenolic compounds from propolis extracts to dairy cows on milk production, milk fatty acid composition, and the antioxidant capacity of milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* 193, 148-154.
- AOAC, 1990. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Ashes, J.R., Gulati, S.K., Scott, T.W., 1997. Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. *J. Dairy Sci.* 80, 2204–2212.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99, 191–203.
- Baldi, A., 2005. Vitamin E in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 98, 117– 122.
- Baumgard, L.H., Corl, B.A., Dwyer, D.A., Saebo, A., Bauman, D.E., 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Phys.* 278, 179–184.
- Besle, J.M., Lamaison, J.L., Pradel, P., Fraisse, D., Viala, D., Martin, B., 2004. Flavonoids, from forages to milk. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, 11, 67-70, Paris, France.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* 37, 911-917.
- Bu, D.P., Wang, J.Q., Dhiman, T.R., Liu, S.J., 2007. Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 998–1007.
- Cheyrier, V., 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American J. Clin. Nutr.* 81, 223–229.
- 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.
- Cottica, S.M., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Franco, S.L., Zeoula, L.M., Visenteiner, J.V., 2011. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 929-935.
- Focant, M., Mignolet, E., Marique, M., Clabots, F., Breyne, T., Dalemans, D., Larondelle, Y., 1998. The effect of vitamin E supplementation of cow diets containing rapeseed and linseed on the prevention of milk fat oxidation. *J. Dairy Sci.* 81, 1095–1101.
- Folch, J., Less, M., Sloane, S.G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Franco, S.L., Bueno, J.H.F., 1999. Optimization of extraction process of propolis. *Infarma* 11, 48-51.
- Gladine, C., Morand, C., Rock, E., Bauchart, D., Durand, D., 2007. Plant extracts rich in polyphenols (PERP) are efficient antioxidants to prevent lipoperoxidation in plasma lipids from animals fed n-3 PUFA supplemented diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136, 281–296.
- 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.
- Granelli, K., Barrefors, P., Björck, L., Appelqvist, L.A., 1998. Further studies on lipid composition of bovine milk in relation to spontaneous oxidized flavor. *J. Sci. Food Agric.* 77, 161-171.
- Hartman, L., Lago, R.C., 1973. A Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* 22, 475-476.
- Joseph, J. D., Ackman, R. G., 1992. Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. *J AOAC Int.* 75, 488-506.
- King, R.A., Mano, M.M., Head, R.J., 1998. Assessment of isoflavonoid concentrations in Australian bovine milk samples. *J. Dairy Res.* 65, 479-489.
- Kiokias, S.N., Dimakou, C.P., Tsaprouni, I.V., Oreopoulou., 2006. Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. *Food Biophys.* 3, 115-123.
- Kumazawa, T., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2003. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem. Pharm. Bull.* 5, 740-742.
- Lindmark-Mansson, H., Akesson, B., 2000. Antioxidative factors in milk. *Brit. J. Nutr.* 84, 103-110.
- Lock, A.L., Bauman, D.E., 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39, 1197–1206.
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., Wallace, R.J., 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4:1008-1023.
- Macheix, J.J., Fleuriot, A., Jay-Allemand, C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques, Lausanne.
- Maia, E.L., Rodriguez-Amaya, D.B., 1993. Evaluation of a simple and economical method for methylation of fatty acids from lipids of several species of fish. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 53, 27-35.
- Marcucci, M.C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V.S., De Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J. Ethnopharmacol.* 74, 105–112.
- Martin, C.A., Oliveira, C.C., Visenteiner, J.V., Matsushita, M., De Souza, N.E., 2008. Optimization of the selectivity of a cyanopropyl stationary phase for gas chromatographic analysis of *trans* fatty acids. *J. Chromatogr. A* 1194, 111-117.
- Matumoto-Pintro, P.T., Petit, H.V., Giroux, H.J., Côrtes, C., Gagnon, N., 2011. Effect of flaxseed lignans added to milk or fed to cows on oxidative degradation of dairy beverages enriched with polyunsaturated fatty acids. *J. Dairy Res.* 78, 111–117.
- Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Int.* 85, 1217–1240.
- Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska, E., Madsen, F.C., 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy Sci.* 76, 2812-2823.
- NRC, 2001. National Research Council, Nutrient Requirements of Dairy Cattle, seventh rev. ed. National Academy of Science, Washington, D.C., USA.

- O'Connel, J.E., Fox, P.F., 2001. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *Int. Dairy J.* 11, 103–120.
- Onetti, S.G., Shaver, R.D., Mcguire, D.L., Grummer, R.R., 2001. Effect of supplemental tallow on performance of dairy cows fed diets with different corn silage:alfalfa silage ratios. *J. Dairy Sci.* 85, 632-614.
- Park, Y.K., Paredes-Guzman, J.F., Aguiar, C.L., Alencar, S.M., Fujiwara, F.Y., 2004. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J. Agric. Food. Chem.* 52, 1100-1103.
- Petit, H.V., Gagnon, N., 2009. Milk concentrations of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol, milk production, and whole tract digestibility of dairy cows fed diets containing different concentrations of flaxseed meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 152, 103-111.
- Pottier, J., Focant, M., Debier, C., De Buysser, G., Goffe, C., Mignolet, E., Froidmont, E., Larondelle, Y., 2006. Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. *J. Dairy Sci.* 89, 685-692.
- Pinchuk, I., Lichtenberg, D., 2002. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Prog. Lipid Res.* 41, 279–314.
- Ríspoli, T.B., Rodrigues, I.L., Martins Neto, R.G., Kazama, R., Prado, O.P.P., Zeoula, L.M., Arcuri, P.B., 2009. Ruminal ciliate protozoa of cattle and buffalo fed on diet supplemented with monensin or extracts from propolis. *Pesq. Agropec. Bras.* 44, 92-97.
- Rock, E., 2004. Nutritional quality of milk products and human health. 11° Rencontres autour des recherches sur les ruminants, Paris, France.
- Santos, N.W., Santos, G.T., Silva-Kazama, D.C., Grande, P.A., Pintro, P.M., de Marchi, F.E., Jobim, C.C., Petit, H.V., 2014. Production, composition and antioxidants in milk of dairy cows fed diets containing soybean oil and grape residue silage. *Liv. Sci.* 159, 37–45.
- Sforcin, J.M., Bankova, V., 2011. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* 133, 253–260.
- Siger, A., Nogala-Kalucka, M., Lampart-Szczapa, E., 2008. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *J. Food Lipids* 15, 137–149.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16, 144–158.
- Sklan, D., Ashkennazi, R., Braun, A., Devorin, A., Tabori, K., 1992. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows. *J. Dairy Sci.* 75, 2463-2472.
- Slots, T., Skibsted, L.H., Nielsen, J.H., 2007. The difference in transfer of all-rac- $\alpha$ -tocopherol stereo-isomers to milk from cows and the effect on its oxidative stability. *Int. Dairy J.* 17, 737–745.
- Soberon, M.A., Cherney, J.H., Liu, R.H., Ross, D.A., Cherney, D.J., 2012. Free ferulic acid uptake in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 95, 1-8.
- Stoop, W.M., Bovenhuis, H., Heck, J.M.L., Van Arendonk, J.A., 2009. Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 92, 1469–1478.

- Visentainer, J.V., 2012. Analytical aspects of the flame ionization detector response of fatty acid esters in biodiesels and foods. *Quím. Nova* 35, 274-279.
- Voltolini, T.V., Santos, G.T., Zambom, M.A., Ribas, N.P., Müller, E.E., Damasceno, J.C., Ítavo, L.C.V., Veiga, D.R., 2001. Influence of lactation stages on the counting of somatic cells of Holstein milk cows and identification of sources of mastitis pathogens in cattle. *Acta Sci., Anim. Sci.* 23, 961–966.
- Vyncke, W., 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette. Seifen. Anstrichm.* 72, 1084-1087.
- 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.
- Zulueta, A., Maurizi, A., Frígola, A., Esteve, M.J., Coli, R., Burini, G., 2009. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *Int. Dairy J.* 19, 380-385.

## **Suplementação com leite de vaca rico em ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes a ratos normais em crescimento**

(British Journal of Nutrition)

### **Resumo**

O consumo de leite enriquecido naturalmente, pela alimentação das vacas, com ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e antioxidantes pode contribuir para o aporte total destes nutrientes a uma dieta balanceada. Objetivou-se com este trabalho determinar os efeitos da suplementação de leite rico em AGPI e antioxidantes a ratos normais em crescimento sobre o consumo alimentar, ganho de peso, parâmetros sanguíneos, tolerância à glicose e composição corporal. Quarenta ratos machos *Wistar* com 21 dias de idade foram utilizados em delineamento inteiramente casualizado, com período experimental de 85 dias. A suplementação foi realizada por gavagem em dose 0,005 ml/g de peso corporal, com ajuste semanal do volume fornecido. Os grupos experimentais foram: controle com água; leite comum integral; leite rico em AGPI; e leite rico em AGPI e antioxidantes. O leite enriquecido com AGPI e antioxidantes proporcionou aos ratos maior ingestão de ácidos graxos com dezoito carbonos e do ácido linoleico conjugado, além de compostos fenólicos, em comparação ao leite comum. A suplementação com leite enriquecido não influenciou o consumo alimentar, a absorção intestinal, o comprimento naso-anal, o ganho de peso, a concentração de triglicerídeos e capacidade antioxidante no sangue dos ratos. Em relação ao grupo que recebeu o leite enriquecido com AGPI, o leite enriquecido com AGPI e antioxidantes mostrou tendência para aumento do colesterol total e LDL, aumento da glicemia no teste de tolerância à glicose, e elevou o peso dos tecidos adiposos periepídidimal, retroperitoneal e subcutânea. Nas condições estudadas, fornecer leite rico em AGPI e antioxidantes aos ratos aumentou, de forma moderada, a lipídemia sanguínea e de forma acentuada o acúmulo de tecido adiposo visceral.

**Palavras-chave:** tecido adiposo visceral, colesterol, tolerância à glicose, compostos fenólicos, ômega-3

**Abreviações:** AGPI, ácidos graxos poli-insaturados; AGS, ácidos graxos saturados AG; CLA, ácido linoleico conjugado; AST, aspartato aminotransferase; ALAT, alanina aminotransferase; CAT, capacidade antioxidante total; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade.

## Introdução

O leite de vaca é um alimento muito comum na dieta humana e importante, principalmente, para crianças e idosos. O leite e produtos lácteos são fontes de nutrientes na dieta que fornecem energia, proteína de alta qualidade, vitaminas e minerais essenciais<sup>(1)</sup>. O consumo do leite de vaca foi criticado por nutricionistas em razão de a gordura ser composta, majoritariamente, por ácidos graxos saturados (AGS). O consumo de AGS já foi relacionado com a ocorrência de doenças cardíacas<sup>(2)</sup> e, portanto, sob este ponto de vista, o leite seria um fator crítico na alimentação. No entanto, aqueles efeitos adversos que poderiam ocorrer com o consumo de leite não foram confirmados<sup>(3)</sup>, porém são, infelizmente, muito divulgados.

Na nutrição animal, estratégias vêm sendo propostas para melhorar o perfil da gordura do leite. A suplementação lipídica em dietas de vacas, sobretudo com alimentos ricos em AGPI, pode aumentar a proporção destes ácidos graxos (AG) e do ácido linoleico conjugado (CLA) no leite, com potenciais benefícios para a saúde humana<sup>(1,4)</sup>. O óleo de linhaça é rico em ácido linolênico, sua adição em dietas de vacas leiteiras é uma forma de elevar a proporção de AG considerados saudáveis, como o CLA, e resultar em um tipo de leite com maior valor nutritivo e valor terapêutico<sup>(5)</sup>. Estudos demonstraram que alimentos ricos com AGPI da série ômega-3 possuem efeitos hipolipidêmicos, antitrombóticos e anti-inflamatórios<sup>(6)</sup>, e o CLA pode melhorar a sensibilidade à insulina e reduzir a adiposidade<sup>(7)</sup>.

Infelizmente, a maior concentração de AGPI na gordura do leite modifica sua estabilidade, podendo se oxidar e desenvolver sabor e odor rançosos<sup>(8)</sup>, diminuindo o tempo passível para o consumo, em comparação ao leite com perfil comum de gordura. Por esta razão, esforços foram realizados para enriquecer o leite com compostos antioxidantes também de forma natural, através da alimentação das vacas<sup>(9,10)</sup>. A atividade antioxidante do leite pode ser elevada ao adicionar na dieta das vacas um produto à base de própolis, substância rica em compostos fenólicos vegetais<sup>(11)</sup>. A suplementação de vitamina E na dieta de vacas leiteiras pode aumentar a secreção desta vitamina no leite<sup>(12)</sup>, e isto é interessante em razão de sua função antioxidante lipossolúvel.

O enriquecimento do leite é interessante porque se trata de um alimento bastante comum no dia-a-dia dos consumidores e poderia contribuir facilmente a um maior aporte de compostos benéficos na dieta, sem alterar o padrão alimentar. Os efeitos do

consumo humano de leite enriquecido com AGPI pela suplementação das vacas já foram reportados<sup>(13)</sup>, mas as consequências do consumo de leite enriquecido com aqueles AG e antioxidantes são desconhecidas. Objetivou-se com este trabalho determinar os efeitos da suplementação de leite rico em AGPI e antioxidantes sobre o crescimento e parâmetros metabólicos de ratos normais.

## **Materiais e métodos**

### *Animais e dietas*

O experimento cumpriu as orientações do Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (UEM, Maringá, Paraná, Brasil), sob número de aprovação 115/2012. O experimento foi conduzido no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da UEM, no período de fevereiro a abril de 2013. Os animais foram provenientes do Biotério Central da mesma universidade.

Foram utilizados quarenta ratos (*Rattus norvegicus*) machos, linhagem *Wistar*, com 21 dias de idade. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas coletivas (46 x 24 x 20 cm), com cinco animais por gaiola, cada animal pesava 78,5 g. As condições do biotério foram: temperatura de 24°C, fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, água e ração *ad libitum*. A dieta foi à base de ração Nuvilab CR1 (Nuvital®, Colombo, PR) composta por 875 g/kg de matéria seca, 220 g/kg de proteína bruta, 40 g/kg de extrato etéreo, 80 g/kg de fibra, 100 g/kg de matéria mineral e 3976 kcal/kg de energia bruta.

O leite fornecido para a suplementação dos ratos foi obtido de vacas leiteiras utilizadas anteriormente em pesquisa realizada na Fazenda Experimental de Iguatemi da UEM. As vacas receberam uma dieta basal e foram suplementadas com óleo de linhaça – rico em AGPI – com ou sem antioxidantes – produto à base de própolis verde (LLOS B1, sete doses) e vitamina E – a fim de produzirem um leite naturalmente enriquecido com AGPI e antioxidantes. Após a ordenha das vacas, as amostras de leite foram distribuídas em tubos de polietileno (12 mL) e congeladas. Imediatamente antes de fornecer aos ratos, o leite era descongelado (4°C) e homogeneizado com agitador tipo vortex durante 5 minutos.

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais: controle com água (controle), leite cru comum (L-COM), leite cru enriquecido com AGPI (L-AGPI), leite cru

enriquecido com AGPI e antioxidantes (L-AGPI/A). A composição dos leites é apresentada na Tabela 1. A suplementação com leite foi realizada diariamente por gavagem, na dose 0,005 mL/g de peso corporal, a dose foi ajustada semanalmente acompanhando o ganho de peso dos animais. A dose de leite utilizada na suplementação alimentar dos animais foi calculada com base na recomendação do Ministério da Saúde<sup>(14)</sup> de 150 litros por ano de leite e derivados em razão ao peso de um homem médio brasileiro<sup>(15)</sup>.

**Tabela 1.** Composição do leite comum (L-COM), leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI), e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A) fornecidos aos grupos experimentais

Item	Grupos experimentais		
	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A
Composição química (mg/mL)			
Gordura	29,80 ± 0,1	26,86 ± 0,8	27,78 ± 0,4
Proteína	28,99 ± 0,2	30,74 ± 0,9	29,26 ± 0,6
Lactose	46,31 ± 0,1	45,81 ± 0,6	47,50 ± 0,2
Sólidos totais	114,40 ± 0,4	112,59 ± 0,7	113,95 ± 0,8
Composição de ácidos graxos (mg/mL)			
12:0	0,82 ± 0,04	0,64 ± 0,14	0,67 ± 0,02
14:0	2,70 ± 0,08	2,53 ± 0,31	2,49 ± 0,01
16:0	7,02 ± 0,63	5,96 ± 0,01	5,34 ± 0,12
18:0	1,73 ± 0,48	3,34 ± 0,19	3,28 ± 0,02
18:1n-9trans	0,18 ± 0,10	0,58 ± 0,09	0,70 ± 0,02
18:1n-9	4,01 ± 0,77	6,52 ± 0,55	5,89 ± 0,21
18:2n-6	0,47 ± 0,16	0,66 ± 0,05	0,70 ± 0,01
18:3n-3	0,06 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,29 ± 0,01
18:2 cis9, trans11	0,09 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01
18:2 trans10, cis12	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
CLA total <sup>1</sup>	0,11 ± 0,03	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01
AGS	13,98 ± 4,34	14,00 ± 0,43	13,42 ± 0,65
AGMI	5,43 ± 1,17	8,23 ± 0,52	7,61 ± 0,17
AGPI	0,67 ± 0,22	1,14 ± 0,09	1,17 ± 0,02
n-6/n-3	8,61	2,28	2,55
Qualidade antioxidante e estabilidade oxidativa			
Compostos fenólicos (EAG mg/L) <sup>2</sup>	11,33 ± 0,61	10,16 ± 0,69	18,15 ± 1,30
Orac (ET mmol/L)	10,57 ± 0,29	11,18 ± 0,70	14,70 ± 0,06
Poder redutor (EAG mg/L)	25,85 ± 0,32	35,78 ± 0,57	38,32 ± 0,59
Dienos conjugados (mmol/kg gordura)	41,51 ± 0,09	59,55 ± 0,28	54,53 ± 0,53
Tbars (mmol/kg gordura)	2,68 ± 0,34	5,28 ± 0,76	3,43 ± 0,89

<sup>1</sup>CLA=ácido linoleico conjugado, AGS=ácidos graxos saturados, AGMI=ácidos graxos monoinsaturados, AGPI=ácidos graxos poli-insaturados. <sup>2</sup>EAG=equivalente ácido gálico, ET=equivalente Trolox®.

### *Procedimentos experimentais*

O período experimental foi de 85 dias, o delineamento foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e dez repetições. O experimento iniciou-se imediatamente após o desmame dos ratos, sem período de adaptação à dieta. As quantidades de alimentos fornecidas e sobras foram pesadas diariamente e registradas para determinar a ingestão de alimento, assim como o volume de água ingerido. O peso corporal foi mensurado semanalmente. Para estimar a absorção intestinal, os ratos foram alocados em gaiolas metabólicas individuais por 24 horas, as fezes eliminadas foram pesadas e coletadas para determinação da matéria seca.

Para o teste de tolerância à glicose intravenosa, os animais foram submetidos a uma pequena cirurgia para o implante de um cateter de silicone na veia jugular. No dia seguinte, em jejum, amostras de sangue (0,1 mL) foram colhidas antes da infusão da glicose (1g/kg) e nos tempos 5, 15, 30 e 60 minutos após a infusão. As amostras de sangue foram centrifugadas (2.500g, 20 min) e o plasma armazenado congelado para determinação de glicose. A tolerância à glicose foi avaliada pela análise da área sob a curva dos valores glicêmicos obtidos.

Ao final do período experimental, os animais, em jejum noturno por 12 horas, foram anestesiados com tionembutal sódico (tiopental, 40 mg/kg de peso corporal), o comprimento naso-anal foi mensurado e o sangue foi coletado pela veia cava inferior. Para obtenção do soro, o sangue foi centrifugado (2.500g, 20 min) e armazenado congelado para posteriores análises. Os animais foram submetidos à laparotomia mediana e, em seguida, foram retirados e pesados o fígado, testículos, vesículas seminais, rins, músculos sóleo e gastrocnêmio e os tecidos adiposos periepídídimo, retroperitoneal, mesentérica, subcutânea e marrom. O índice de Lee foi obtido pela razão entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento naso-anal do rato.

### *Análises químicas*

Os procedimentos de análises de leite estão descritos detalhadamente no capítulo três da tese. O teor de matéria seca das amostras de alimentos e fezes foi determinado de acordo com o método 934.01 da AOAC<sup>(16)</sup>. A absorção intestinal foi obtida pela diferença entre as quantidades de matéria seca ingerida e a excretada nas fezes.

A determinação das concentrações sanguíneas de glicose, colesterol total, HDL, triglicerídeos, aspartato aminotransferase (AST), e alanina aminotransferase (ALT) foi realizada com uso de métodos colorimétricos (Gold Analisa<sup>®</sup>, Belo Horizonte, MG) e espectrofotômetro (Bioplus2000<sup>®</sup>, São Paulo, SP). A concentração de LDL foi calculada pela equação Friedewald,  $LDL \text{ (mg/dL)} = \text{colesterol total} - HDL - (\text{triglicerídeo}/2,2)$ .

A oxidação de proteínas sanguíneas foi avaliada pela determinação de tióis reduzidos<sup>(17)</sup>. O radical ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) foi utilizado para análise da capacidade antioxidante total (CAT)<sup>(18)</sup> do sangue.

Os adipócitos foram isolados de acordo com Rodbell<sup>(19)</sup> com modificações, e o diâmetro determinado. O tecido adiposo retroperitoneal foi fragmentado e colocado em 4mL de tampão digestivo (DMEM/HEPES 25 mM (SciencePro, São Caetano do Sul, SP), soro albumina bovina fração V (BSA) a 4%, colagenase II 1,25 mg/mL, pH 7,4 a 37°C) por 20 minutos (37°C), sob agitação constante (150 rpm em banho-maria de agitação orbital). Em seguida, o tecido digerido foi filtrado, colocado em tubo cônico e lavado três vezes com 25 mL de tampão EHB (EARLE/HEPES, São Caetano do Sul, SP) 20 mM contendo BSA a 1%, piruvato de sódio 1mM, sem glicose, pH 7,4 a 37°C (tampão EARLE/HEPES/BSA – EHB). O diâmetro dos adipócitos (100 células por animal) foi mensurado através de um sistema de análise de imagem (Image-Pro Plus 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, USA). A partir do diâmetro do adipócito e do peso do tecido retroperitoneal, foi determinada a celularidade da massa adiposa. Considerando que o adipócito é esférico, primeiramente o volume e a área de superfície celular foram calculados e, a partir destes, a celularidade foi inferida pela razão entre a massa total de tecido retroperitoneal e a massa média do adipócito do tecido.

#### *Análises estatísticas*

Os resultados foram analisados com uso do procedimento GLM do SAS 9.0, com análise de variância e significância em  $P < 0,05$ , com tendências aceitas em  $P < 0,10$ . As médias de ingestão de nutrientes provenientes do leite comum e enriquecido foram comparadas pelo teste Tuckey. Para os outros resultados, contrastes ortogonais foram utilizados para comparar os efeitos da suplementação de: 1) leite comum (controle contra L-COM, L-AGPI e L-AGPI/A), 2) leite enriquecido com AGPI (L-COM contra

L-AGPI e L-AGPI/A), e 3) leite enriquecido com AGPI e antioxidantes (L-AGPI contra L-AGPI/A).

## Resultados

Os animais que receberam a suplementação com o leite L-AGPI apresentaram menor ingestão de gordura ( $P=0,03$ ), quando comparados com aqueles que receberam o leite comum (Tabela 2). A suplementação com os leites enriquecidos alteraram a ingestão de AG, diminuindo a ingestão de 12:0 ( $P<0,0001$ ) e 16:0 ( $P<0,0001$ ), com aumento de todos os AG com 18 carbonos e CLA ( $P<0,0001$ ), conseqüentemente, aumentando a ingestão de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e AGPI ( $P<0,0001$ ). O leite L-AGPI/A proporcionou maior ingestão de compostos fenólicos ( $P<0,0001$ ).

**Tabela 2.** Ingestão média de nutrientes do leite em ratos normais suplementados com leite comum (L-COM), leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI), e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)

Item (mg/dia)	Grupos experimentais			P
	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A	
Gordura	36,06 ± 2,40a	32,56 ± 2,33b	34,03 ± 1,24ab	0,03
Proteína	35,08 ± 2,33	37,25 ± 2,67	35,86 ± 1,30	0,27
Lactose	56,05 ± 3,73	55,52 ± 3,98	58,20 ± 2,11	0,39
12:0	1,00 ± 0,07a	0,78 ± 0,06b	0,82 ± 0,03b	<0,0001
14:0	3,26 ± 0,22	3,07 ± 0,22	3,06 ± 0,11	0,15
16:0	8,50 ± 0,57a	7,22 ± 0,52b	6,54 ± 0,24b	<0,0001
18:0	2,09 ± 0,14b	4,05 ± 0,29a	4,02 ± 0,15a	<0,0001
18:1n-9trans	0,22 ± 0,01c	0,70 ± 0,05b	0,86 ± 0,03a	<0,0001
18:1n-9	4,85 ± 0,32c	7,90 ± 0,57a	7,21 ± 0,26b	<0,0001
18:2n-6	0,57 ± 0,04b	0,80 ± 0,06a	0,86 ± 0,03a	<0,0001
18:3n-3	0,07 ± 0,01b	0,36 ± 0,03a	0,35 ± 0,01a	<0,0001
18:2n(cis9, trans11)	0,11 ± 0,01b	0,15 ± 0,01a	0,15 ± 0,01a	<0,0001
CLA total <sup>1</sup>	0,13 ± 0,01b	0,18 ± 0,01a	0,19 ± 0,01a	<0,0001
AGS	16,91 ± 1,13	16,96 ± 1,21	16,44 ± 0,60	0,65
AGMI	6,57 ± 0,44b	9,97 ± 0,71a	9,32 ± 0,34a	<0,0001
AGPI	0,82 ± 0,05b	1,38 ± 0,10a	1,43 ± 0,05a	<0,0001
Compostos fenólicos	0,014 ± 0,001b	0,012 ± 0,001b	0,022 ± 0,001a	<0,0001

<sup>1</sup>CLA=ácido linoleico conjugado, AGS=ácidos graxos saturados, AGMI= ácidos graxos monoinsaturados, AGPI= ácidos graxos poli-insaturados. Compostos fenólicos= equivalente ácido gálico. Valores com letras diferentes diferem pelo teste Tukey.

A suplementação com leite, tanto comum como enriquecido, não modificou o consumo alimentar, a absorção intestinal, o comprimento naso-anal e o índice de Lee (Tabela 3). Entretanto a suplementação causou redução da ingestão de água ( $P=0,002$ ) dos ratos. A suplementação com leite não modificou o peso corporal final dos ratos, mas causou maior ganho de peso ( $P=0,09$ ) na fase de crescimento do animal (idade de 25-32 dias) e redução significativa ( $P=0,03$ ) na fase adulta de 88-102 dias.

Diversos parâmetros plasmáticos foram avaliados e os resultados são mostrados na Tabela 4. A suplementação com leite, tanto comum quanto enriquecido, causou redução no colesterol total ( $P=0,004$ ) e na concentração plasmática de LDL ( $P=0,001$ ). Animais que receberam a suplementação com L-AGPI, quando comparados com aqueles que receberam leite comum, apresentaram as concentrações de triglicerídeos ( $P=0,005$ ) e de VLDL ( $P=0,005$ ) significativamente menores e de HDL ( $P=0,01$ ) e de LDL ( $P=0,005$ ) significativamente maiores. A suplementação com L-AGPI/A, quando comparada com o leite L-AGPI, mostrou tendência a aumentar o colesterol total ( $P=0,08$ ) e o LDL ( $P=0,06$ ). A Tabela 4 também contém os valores de glicemia de jejum, AST, ALT, tióis reduzidos de proteína e capacidade antioxidante total (CAT), que não foram modificados pela suplementação.

A Tabela 5 apresenta os valores glicêmicos obtidos durante o teste de tolerância à glicose. A suplementação, tanto de leite comum quanto de enriquecidos, não causou efeito neste teste, conforme valores da área sob a curva. Os dados registrados e cada um dos tempos não diferiram entre os grupos, com exceção daqueles obtidos no tempo de 15 minutos ( $P=0,05$ ), 60 minutos ( $P=0,09$ ) e área sob a curva ( $P=0,08$ ), em que animais do grupo L-AGPI/A apresentaram glicemia mais elevada quando comparada com o grupo L-AGPI.

A suplementação não modificou o peso dos órgãos (Tabela 6). Em comparação ao leite L-AGPI, o leite L-AGPI/A aumentou o peso dos tecidos adiposos periepididimal ( $P=0,003$ ), retroperitoneal ( $P=0,017$ ) e subcutânea ( $P=0,031$ ), em razão ao peso corporal total. Conseqüentemente, a suplementação com este leite elevou as proporções de tecidos adiposos viscerais ( $P<0,05$ ). O leite L-AGPI reduziu o diâmetro dos adipócitos ( $P=0,03$ ) comparado ao leite comum; o leite L-AGPI/A influenciou para aumento ( $P=0,08$ ) deste parâmetro, em comparação ao grupo anteriormente citado.

**Tabela 3.** Consumo, absorção intestinal, peso e comprimento corporal e ganho médio diário em ratos normais suplementados com leite comum (L-COM), leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI), e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)

Parâmetros	Grupos experimentais				Contrastes ortogonais <sup>1</sup>		
	Controle	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A	1	2	3
Consumo de água (mL/dia)	64,80 ± 7,19	49,40 ± 3,78	52,00 ± 7,58	51,00 ± 9,62	0,002	0,61	0,83
Consumo de ração (g/dia)	36,10 ± 2,95	33,10 ± 2,33	34,60 ± 2,27	38,00 ± 11,65	0,79	0,36	0,40
Produção fecal (g/dia)	6,58 ± 0,64	6,40 ± 0,96	7,02 ± 1,08	6,90 ± 0,49	0,66	0,23	0,82
Absorção intestinal (g/dia)	29,52 ± 3,01	26,70 ± 1,98	27,58 ± 3,23	31,10 ± 1,56	0,75	0,45	0,39
Peso corporal inicial (g)	78,40 ± 9,91	77,30 ± 8,65	78,95 ± 8,72	79,35 ± 10,93	0,97	0,62	0,93
Peso corporal final (g)	376,65 ± 18,60	364,85 ± 28,58	358,10 ± 34,20	357,45 ± 35,96	0,14	0,55	0,96
Comprimento naso-anal (cm)	23,70 ± 1,01	23,28 ± 0,83	23,00 ± 0,89	23,07 ± 0,75	0,12	0,47	0,86
Índice de Lee <sup>2</sup>	304,98 ± 9,13	306,87 ± 5,36	308,68 ± 9,28	307,37 ± 6,16	0,348	0,699	0,705
Ganho médio diário (g/d)							
25-32 dias	3,73 ± 1,53	4,40 ± 0,83	4,23 ± 0,56	4,54 ± 0,72	0,09	0,98	0,48
32-39 dias	5,18 ± 1,46	5,24 ± 1,34	5,01 ± 1,14	4,71 ± 1,47	0,70	0,47	0,63
39-46 dias	5,56 ± 0,64	6,11 ± 0,63	5,73 ± 0,97	5,79 ± 0,64	0,25	0,22	0,86
46-53 dias	6,04 ± 0,93	5,70 ± 0,53	5,62 ± 0,76	5,56 ± 0,87	0,16	0,73	0,87
53-60 dias	5,23 ± 0,88	4,96 ± 0,59	4,96 ± 0,57	4,63 ± 0,32	0,10	0,48	0,25
60-67 dias	4,34 ± 1,56	4,16 ± 1,00	4,02 ± 0,62	4,01 ± 1,03	0,49	0,75	0,99
67-74 dias	4,09 ± 1,12	3,71 ± 0,55	3,82 ± 0,99	3,76 ± 1,44	0,41	0,84	0,89
74-81 dias	3,34 ± 1,50	2,64 ± 1,27	2,41 ± 0,97	2,80 ± 1,87	0,17	0,95	0,55
81-88 dias	2,04 ± 0,61	1,73 ± 0,46	1,83 ± 0,77	1,76 ± 0,69	0,27	0,79	0,82
88-102 dias	1,24 ± 0,65	0,90 ± 0,39	0,83 ± 0,36	0,75 ± 0,56	0,03	0,57	0,75
25-102 dias	3,82 ± 0,24	3,69 ± 0,39	3,68 ± 0,36	3,57 ± 0,40	0,11	0,41	0,93

Dados apresentados como média ± desvio padrão. <sup>1</sup>Probabilidade de contrastes ortogonais, os efeitos testados foram 1) Controle contra L-COM, L-AGPI e L-AGPI/A, 2) L-COM contra L-AGPI e L-AGPI/A, e 3) L-AGPI contra L-AGPI/A. <sup>2</sup>Razão entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento naso-anal.

**Tabela 4.** Perfil bioquímico sanguíneo de ratos normais suplementados com leite comum (L-COM), leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI), e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)

Parâmetros	Grupos experimentais				Contrastes ortogonais <sup>1</sup>		
	Controle	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A	1	2	3
Glicose (mg/dL)	84,30 ± 6,07	88,10 ± 10,21	87,50 ± 9,98	88,70 ± 5,91	0,22	1,00	0,75
Triglicerídeos (mg/dL)	83,51 ± 19,34	109,18 ± 21,97	77,06 ± 15,73	82,71 ± 23,54	0,47	0,005	0,59
Colesterol total (mg/dL)	93,69 ± 11,52	74,83 ± 12,54	78,06 ± 10,46	87,81 ± 14,16	0,004	0,10	0,08
VLDL (mg/dL)	16,70 ± 3,87	21,84 ± 4,39	15,41 ± 3,15	16,54 ± 4,71	0,47	0,005	0,59
HDL (mg/dL)	36,74 ± 3,93	31,91 ± 7,19	37,39 ± 5,82	41,61 ± 7,95	0,93	0,01	0,20
LDL (mg/dL)	40,25 ± 5,04	21,08 ± 2,25	25,26 ± 3,78	29,66 ± 3,13	0,001	0,005	0,06
AST (mg/dL) <sup>2</sup>	96,61 ± 13,37	97,72 ± 16,62	91,23 ± 5,92	93,07 ± 20,51	0,74	0,47	0,83
ALT (mg/dL)	30,78 ± 5,46	27,49 ± 7,08	31,20 ± 6,57	28,25 ± 6,40	0,55	0,46	0,40
Tióis (nmol/mL)	177,94 ± 22,93	180,33 ± 18,03	189,45 ± 28,34	197,64 ± 19,13	0,35	0,30	0,57
Tióis (nmol/mg proteína)	3,02 ± 0,59	3,08 ± 0,42	3,17 ± 0,38	3,01 ± 0,15	0,72	0,96	0,56
CAT (μmoles/50 μL)	10,24 ± 1,58	8,99 ± 1,06	9,81 ± 2,11	11,09 ± 2,28	0,76	0,17	0,29
CAT (μmoles/mg proteína)	3,37 ± 0,85	2,97 ± 0,71	3,15 ± 0,89	3,88 ± 0,84	0,94	0,25	0,18

Dados apresentados como média ± desvio padrão. <sup>1</sup>Probabilidade de contrastes ortogonais, os efeitos testados foram 1) Controle contra L-COM, L-AGPI e L-AGPI/A, 2) L-COM contra L-AGPI e L-AGPI/A, e 3) L-AGPI contra L-AGPI/A. <sup>2</sup>AST=aspartato transaminase, ALAT=alanina aminotransferase, CAT=capacidade antioxidante total.

**Tabela 5.** Concentrações sanguíneas de glicose em teste de tolerância a glicose intravenosa em ratos normais suplementados com leite comum (L-COM), leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI), e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)

Parâmetros (mg/dL)	Grupos experimentais				Contrastes ortogonais <sup>1</sup>		
	Controle	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A	1	2	3
0 minuto	96,80 ± 10,38	91,43 ± 6,82	91,75 ± 10,39	94,79 ± 7,35	0,30	0,66	0,53
5 minutos	303,71 ± 24,17	297,17 ± 28,69	308,26 ± 25,84	314,06 ± 31,82	0,82	0,29	0,70
15 minutos	137,54 ± 24,33	130,27 ± 19,58	127,11 ± 23,63	150,14 ± 14,66	0,85	0,40	0,05
30 minutos	78,23 ± 6,75	73,31 ± 11,22	69,65 ± 11,78	76,50 ± 12,10	0,29	0,96	0,24
60 minutos	92,02 ± 8,70	90,11 ± 6,97	86,63 ± 10,81	95,83 ± 12,16	0,79	0,81	0,09
Média	141,66 ± 10,60	136,46 ± 11,12	136,67 ± 14,16	146,26 ± 9,81	0,71	0,36	0,13
Área sob a curva	7376,33 ± 579,07	7173,00 ± 618,79	7047,83 ± 864,40	7657,33 ± 657,62	0,62	0,46	0,08

Dados apresentados como média ± desvio padrão. <sup>1</sup>Probabilidade de contrastes ortogonais, os efeitos testados foram 1) Controle contra L-COM, L-AGPI e L-AGPI/A, 2) L-COM contra L-AGPI e L-AGPI/A, e 3) L-AGPI contra L-AGPI/A.

**Tabela 6.** Peso de órgãos e tecido adiposo em razão ao peso corporal de ratos normais suplementados com leite comum (L-COM), leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI), e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)

Parâmetros	Grupos experimentais				Contrastes ortogonais <sup>1</sup>		
	Controle	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A	1	2	3
Fígado (g/100g)	3,68 ± 0,23	3,47 ± 0,27	3,55 ± 0,27	3,61 ± 0,41	0,23	0,36	0,65
Testículos (g/100g)	0,75 ± 0,19	0,81 ± 0,07	0,81 ± 0,08	0,75 ± 0,07	0,35	0,57	0,30
Vesícula seminal (g/100g)	0,42 ± 0,07	0,41 ± 0,07	0,40 ± 0,08	0,40 ± 0,07	0,62	0,93	0,95
Rins (g/100g)	0,68 ± 0,06	0,66 ± 0,03	0,67 ± 0,06	0,65 ± 0,06	0,41	0,94	0,44
Músculo gastrocnêmio (g/100g)	0,58 ± 0,12	0,53 ± 0,15	0,58 ± 0,11	0,51 ± 0,11	0,35	0,65	0,21
Músculo sóleo (g/100g)	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,65	0,13	0,64
Tecidos adiposos (g/100g)							
Periepididimal	1,12 ± 0,20	1,17 ± 0,21	1,09 ± 0,14	1,42 ± 0,36	0,23	0,34	0,003
Retroperitoneal	1,33 ± 0,29	1,38 ± 0,28	1,25 ± 0,33	1,60 ± 0,35	0,51	0,69	0,017
Subcutâneo	1,10 ± 0,28	1,08 ± 0,17	0,99 ± 0,26	1,24 ± 0,29	0,99	0,76	0,031
Marrom	0,066 ± 0,016	0,067 ± 0,011	0,068 ± 0,017	0,070 ± 0,016	0,68	0,74	0,80
Mesentérico	0,53 ± 0,12	0,53 ± 0,12	0,52 ± 0,15	0,59 ± 0,11	0,81	0,70	0,41
Tecido adiposo visceral - RM (g/100g) <sup>2</sup>	1,92 ± 0,38	1,85 ± 0,19	1,62 ± 0,33	2,24 ± 0,38	0,92	0,69	0,013
Tecido adiposo visceral - RMP (g/100g)	3,07 ± 0,55	3,09 ± 0,27	2,93 ± 0,68	3,69 ± 0,54	0,56	0,46	0,039
Diâmetro de adipócitos (µm)	40,68 ± 1,66	43,36 ± 5,51	37,50 ± 1,61	41,20 ± 2,16	0,99	0,03	0,08

Dados apresentados como média ± desvio padrão. <sup>1</sup>Probabilidade de contrastes ortogonais, os efeitos testados foram 1) Controle contra L-COM, L-AGPI e L-AGPI/A, 2) L-COM contra L-AGPI e L-AGPI/A, e 3) L-AGPI contra L-AGPI/A. <sup>2</sup>Tecido adiposo visceral RM= tecidos retroperitoneal + mesentérico, tecido adiposo visceral RMP= tecidos retroperitoneal + mesentérico + periepididimal.

## Discussão

Os efeitos do consumo de leite na saúde humana sempre foram temas de muita discussão e, por isso, pesquisas têm sido realizadas desde os anos 1970<sup>(20)</sup>. Estudos populacionais foram feitos visando investigar a relação da ingestão de leite e produtos lácteos com a ocorrência de doenças<sup>(21)</sup>. A experimentação com ratos pôde especificar as modificações sanguíneas ocasionadas pela ingestão de leite<sup>(22)</sup>.

O leite enriquecido com AGPI de forma natural, isto é, obtido de vacas alimentadas com dietas contendo maior conteúdo de AGPI, mostrou ser uma maneira eficaz de contribuir para maior ingestão destes AG em humanos e apresentou boa aceitabilidade<sup>(23)</sup>, além dos efeitos de redução do colesterol total e de LDL<sup>(13)</sup>. O enriquecimento do leite obtido também de forma natural com antioxidantes tornou-se necessário para proteger a gordura poli-insaturada contra a oxidação, mas é uma técnica que pode ser onerosa e ainda nem sempre trazer resultados consistentes e conclusivos<sup>(10,24)</sup>. Por isso, houve necessidade de verificar a funcionalidade do leite enriquecido com AGPI e antioxidantes e a realização de experimentos com ratos foi considerada adequada.

O leite enriquecido com AGPI através da alimentação de vacas com óleos vegetais pode apresentar baixo teor de gordura porque alguns isômeros formados na biohidrogenação parcial ruminal do ácido linoleico, após absorvidos, podem influenciar negativamente a síntese de gordura na glândula mamária<sup>(25)</sup>. Os leites enriquecidos forneceram maiores quantidades de AGMI, AGPI e CLA aos ratos; o leite L-AGPI/A proporcionou maior ingestão de compostos fenólicos, em comparação ao leite comum. O consumo de ração não se modificou entre os grupos experimentais, mas o volume de água ingerido foi menor quando houve a suplementação de leite provavelmente em razão de um efeito de substituição, pois o leite apresenta baixa concentração de sólidos, (114,4 mg/mL) constituído, principalmente, por água (Tabela 3).

Apesar dos pesos semelhantes ao final do experimento, a ingestão de leite pareceu melhorar o ganho de peso diário dos ratos na fase inicial de vida, após o desmame. O efeito contrário foi observado na fase adulta, em que a suplementação de leite reduziu o ganho de peso. Esta redução não parece estar associada a uma diminuição na absorção dos nutrientes da dieta, pois a absorção intestinal foi semelhante entre os grupos experimentais. Portanto, o leite não interferiu no aproveitamento de nutrientes dos ratos mesmo com o avanço da idade, e, de acordo com Leichter<sup>(26)</sup>, os

ratos mantêm a atividade da enzima lactase se alimentados com ração contendo lactose ao longo da vida. Ainda, estas alterações de ganhos de pesos observadas, na fase inicial da vida e na fase adulta, pela ingestão de leite parecem ser saudáveis.

O efeito hipocolesterolêmico do leite em ratos foi observado anteriormente<sup>(22)</sup> e foi ligado, em parte, à inibição da síntese de colesterol e AG. A gordura do leite comum de vaca é composta, principalmente, por AGS que possuem propriedades de aumento do LDL e da razão LDL/HDL, considerados fatores de risco para doenças coronarianas<sup>(27)</sup>. É provável que o ácido orótico presente no soro do leite seja o fator responsável pela redução do colesterol<sup>(22)</sup>. Também é possível que o efeito adverso da gordura saturada dos produtos lácteos na saúde cardiovascular seja compensado pela presença de nutrientes benéficos, como o CLA, o cálcio e a vitamina D<sup>(28)</sup>. É pouco provável que um nutriente isolado do leite seja o responsável pelo efeito redutor do colesterol<sup>(20)</sup> como observado neste estudo. Ademais, o papel do colesterol oriundo de produtos lácteos foi considerado pouco impactante na colesterolemia que depende, principalmente, da síntese endógena de colesterol<sup>(29)</sup>.

As menores concentrações dos triglicerídeos e VLDL no plasma causadas pelo leite enriquecido com AGPI podem estar associadas à menor ingestão de gordura, pois o leite enriquecido com AGPI apresentou teor reduzido de gordura em comparação ao leite comum. A redução dos triglicerídeos é importante, pois eles também são fatores de risco para doenças coronarianas<sup>(27)</sup>. Embora tenha havido redução dos triglicerídeos e VLDL, elevações das concentrações de LDL e HDL no plasma foram observadas, possivelmente devido à maior ingestão de AG ômega-3 presente no leite. Efeito semelhante foi observado anteriormente com suplementação de óleo de peixe para humanos<sup>(30,31)</sup>, contudo o ácido linolênico foi considerado uma alternativa aos AG de cadeia longa do óleo de peixe, pois elevou as concentrações séricas dos ácidos eicosapentaenoico e docosaenoico em humanos<sup>(32)</sup>, compostos com propriedades cardioprotetoras.

A redução do diâmetro de adipócitos, causada pelo leite rico em AGPI neste estudo, foi também observada anteriormente pela suplementação de um produto misto de CLA (isômeros *cis*-9,*trans*-11 e *trans*-10,*cis*-12) a ratos, em dose 75 mg/dia<sup>(33)</sup>. As vacas podem secretar vários isômeros de CLA no leite<sup>(34)</sup>, mas em concentrações muito inferiores ao referido trabalho, mesmo sob dietas especiais. No presente trabalho, a quantidade máxima de CLA fornecida pelo leite enriquecido com AGPI (com e sem

antioxidantes) foi ao final do experimento 0,27 mg/dia, mas talvez suficiente para diminuir o enchimento lipídico das células gordurosas.

A transferência natural dos antioxidantes da dieta ao leite das vacas era preconizada visando, sobretudo, uma ação protetiva daqueles aos ácidos graxos insaturados e poli-insaturados contra a oxidação. Assim, esses AG poderiam exercer suas funções fisiológicas após o seu consumo. Foi sugerido acerca dos antioxidantes que uma vez presentes no leite, eles poderiam ter efeito positivo para quem o consome<sup>(35)</sup>. O leite não foi considerado uma fonte importante de compostos antioxidantes se comparado com alimentos à base de plantas, mas a presença daqueles compostos poderia contribuir para aumentar o potencial antioxidante endógeno que ajuda a preservar a integridade de outros nutrientes contra a oxidação<sup>(29)</sup>.

Após serem ingeridos pela vaca, os compostos fenólicos são transformados primeiro em uma série de reações no rúmen<sup>(9)</sup>, depois eles são metabolizados no fígado<sup>(36)</sup> e secretados no leite em vários compostos aromáticos simples. Apesar de não elevar a capacidade antioxidante no sangue, o leite enriquecido com AGPI e antioxidantes elevou, embora não de forma acentuada, o colesterol total e LDL dos ratos, em comparação com o leite enriquecido somente com AGPI. O leite L-AGPI/A também aumentou significativamente o depósito de tecidos adiposos viscerais (periepídidimal, retroperitoneal e subcutânea), além do diâmetro de adipócitos.

O tecido adiposo é amorfo e amplamente distribuído por todo o corpo<sup>(37)</sup>, mas o acúmulo de gordura visceral é um fator de risco para a síndrome metabólica. O aumento do diâmetro dos adipócitos e tecidos adiposos resultantes da ingestão de leite L-AGPI/A não eram esperados porque ele forneceu, em média, 40 g/kg de gordura (ração mais leite), valor próximo ao teor 50 g/kg preconizado para ratos em crescimento<sup>(38)</sup>. O teor de gordura da ração foi adequado para as exigências nutricionais destes animais, portanto os compostos fenólicos são a provável causa do aumento dos tecidos adiposos viscerais, o que contradiz os relatos da literatura. Estudos apontam que os compostos fenólicos podem atuar na modulação do metabolismo lipídico<sup>(39)</sup>. Ratos normais alimentados com dieta com pouca gordura (4,6 g/kg) e suplementados com água contendo extrato de catequina em doses (0,1% e 0,5%) apresentaram teores reduzidos de lipídios hepáticos e mesentéricos, indicando menor acúmulo de gordura intra-abdominal<sup>(37)</sup>; a eliminação fecal de colesterol induzida pelas catequinas foi considerado a causa de tal efeito. Por outro lado, os compostos fenólicos do leite podem ter

protegidos os AG da oxidação, e estes terem causado o maior acúmulo de tecido adiposo.

Em indivíduos adultos normais, a suplementação com 75 mg/dia de resveratrol não modificou a função metabólica, os lipídios do plasma, nem a sensibilidade à insulina<sup>(40)</sup>. No referido estudo, foi sugerido, que talvez o resveratrol traga mais benefícios a indivíduos com desordens metabólicas do que a indivíduos normais. O Artepillin C é um ácido fenólico derivado do ácido cinâmico e é presente na própolis verde<sup>(41)</sup>, que foi fornecida às vacas para produzir o leite enriquecido com antioxidantes além da vitamina E, para este experimento. O tratamento com Artepillin C de pré-adipócitos de ratos em cultura mostrou que o composto fenólico melhorou a adipogênese pelo aumento da diferenciação das células de maneira dose-dependente (1-30  $\mu$ M) e bloqueou os efeitos do fator de necrose tumoral<sup>(42)</sup>, uma citocina envolvida em inflamações sistêmicas. Talvez metabólitos do Artepillin C presentes no leite tenham exercido efeito semelhante nos ratos, causando aumento de gorduras, mas que não geram respostas inflamatórias.

O consumo de leite semidesnatado enriquecido industrialmente com AGPI ômega-3 e vitaminas, incluindo A e E, pode reduzir fatores de risco para doenças cardiovasculares, como as concentrações sanguíneas de homocisteína, colesterol total, LDL e resistência à oxidação da LDL<sup>(43)</sup>. Entretanto no presente estudo, a forma de obtenção do leite rico em AGPI de forma natural, obtido por meio da alimentação das vacas, torna difícil a comparação dos resultados com a literatura porque relatos semelhantes são ainda desconhecidos.

A síndrome metabólica é um conjunto de distúrbios metabólicos, como a dislipidemia, hipertensão, obesidade e intolerância à glicose, sendo este último o fenômeno central<sup>(44)</sup>. A síndrome é caracterizada na ocorrência de, ao menos, três dos referidos distúrbios. As tentativas de estudo da relação do consumo de leite com a ocorrência de doenças mostraram resultados variados. Em alguns casos o consumo de leite mostrou-se inversamente relacionado à ocorrência de infartos<sup>(21)</sup>, em outros uma correlação positiva foi observada entre o consumo de leite e manteiga e mortes por doenças do coração<sup>(45)</sup>. Neste estudo, somente as gorduras viscerais foram aumentadas de forma acentuada com o consumo do leite enriquecido com AGPI e antioxidantes, portanto este efeito não é suficiente para fundamentar conclusões e recomendações.

Os níveis sanguíneos de colesterol são determinados pela composição total da dieta e não por um único alimento<sup>(22)</sup>, por isso o leite comum de vaca continua sendo

útil na alimentação humana, e Lucas et al.<sup>(29)</sup> indicaram que o consumo de produtos lácteos deve ser feito junto a uma dieta balanceada e não fazer opção por sua total exclusão da dieta.

Na revisão de literatura realizada, não foram encontrados trabalhos semelhantes a este. Assim, esta é a primeira demonstração que ao fornecer uma dieta de qualidade superior para vacas leiteiras é possível obter um leite rico em AGPI e antioxidantes, e este leite, ao ser fornecido adicionalmente a uma dieta basal para ratos em crescimento, permitiu aumentar o consumo daqueles compostos. Entretanto, os resultados indicaram que a nossa hipótese sobre o maior consumo de ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes obtidos de forma natural sobre os seus efeitos benéficos no metabolismo lipídico, não foi totalmente confirmada. A lipídemia foi influenciada de forma moderada, e acúmulo de gordura visceral foi observado. Desta forma, novos estudos devem ser realizados para confirmação dos resultados e recomendações ou não sobre o uso de leite de vaca enriquecido naturalmente.

### **Suporte financeiro**

O projeto foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Brasília, DF, Brasil, Convenio nº.482858/2011-7, Universal/2011.

### **Referências**

1. Bauman DE, Mather IH, Wall RJ, *et al.* (2006). Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J Dairy Sci* **89**, 1235–1243.
2. Hu FB, Willett WC (2002). Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *J Am Med Assoc* **288**, 2569–2578.
3. Crichton GE, Bryan J, Buckley J, *et al.* (2011). Dairy consumption and metabolic syndrome: a systematic review of findings and methodological issues. *Obes Rev* **12**, 190–2011.
4. Chilliard Y, Glasser F, Ferlay A, *et al.* (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur J Lip Sci Technol* **109**, 828–855.
5. Bu DP, Wang JQ, Dhiman TR, *et al.* (2007). Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *J Dairy Sci* **90**, 998–1007.
6. Simopoulos AP (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr* **70**, 560–569.
7. Rainer L, Heiss CJ (2004). Conjugated linoleic acid: health implications and effects on body composition. *J Am Diet Assoc* **104**, 963–968.

8. Zhao X, Wang J, Yang Y, *et al.* (2013). Effects of different fat mixtures on milk fatty acid composition and oxidative stability of milk fat. *Anim Feed Sci Technol* **185**, 35- 42.
9. Gagnon N, Côrtes C, Silva D, *et al.* (2009). Ruminal metabolism of flaxseed (*Linum usitatissimum*) lignans to the mammalian lignanenterolactone and its concentration in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Brit J Nut* **102**, 1015–1023.
10. Santos NW, Santos GT, Silva-Kazama DC, *et al.* (2014). Production, composition and antioxidants in milk of dairy cows fed diets containing soybean oil and grape residue silage. *Liv Sci* **159**, 37–45.
11. Aguiar SC, Cottica SM, Boeing JS, *et al.* (2014). Effect of feeding phenolic compounds from propolis extracts to dairy cows on milk production, milk fatty acid composition, and the antioxidant capacity of milk. *Anim Feed Sci Technol* **193**, 148-154.
12. Bell JA, Grinari JM, Kennelly JJ (2006). Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. *J Dairy Sci* **89**, 733–748.
13. Noakes M, Nestel PJ, Clifton PM (1996). Modifying the fatty acid profile of dairy products through feedlot technology lowers plasma cholesterol of humans consuming the products. *Am J Clin Nutr* **63**, 42-46.
14. Ministry of Health of Brazil (2008). Food guide for the Brazilian population. Brasília, 210p.
15. Brazilian Institute of Geography and Statistics (2011). “Anthropometry and nutritional status of children, teenagers and adults in Brazil, 2008-2009”. Tables. Brazil: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoedevida/pof/2008\\_2009\\_encaa/tabelas\\_pdf/tab1\\_1.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaoedevida/pof/2008_2009_encaa/tabelas_pdf/tab1_1.pdf), cited 5 August.
16. AOAC (1990). Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC, Washington, DC, USA.
17. Faure P, Lafond JL (1995). Measurement of plasma sulphydryland carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: Analysis of free radicals in biological systems. Boston: Birkhauser Verlag, Basel, 238-247.
18. Erel O (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* **37**, 277-285.
19. Rodbell M (1964). Metabolism of isolated fat cells. *J Biochem* **239**, 375-380.
20. Howard AN, Marks J (1977). Hypocholesterolaemic effect of milk. *Lancet* **30**, 255-256.
21. Artaud-Wild SM, Connor SL, Sexton G, *et al.* (1993). Differences in coronary mortality can be explained by differences in cholesterol and saturated fat intakes in 40 countries but not in France and Finland. *Circulation* **88**, 2771–2779.
22. Kritchevsky D, Tepper SA, Morrisey RB, *et al.* (1979). Influence of whole or skim milk on cholesterol metabolism in rats. *J Clin Nutr* **32**, 597-600.
23. Ramaswamy N, Baer RJ, Schingoethe DJ, *et al.* (2001). Short communication: consumer evaluation of milk high in conjugated linoleic acid. *J Dairy Sci* **84**, 1607–1609.
24. Matumoto-Pintro PT, Petit HV, Giroux HJ, *et al.* (2011). Effect of flaxseed lignans added to milk or fed to cows on oxidative degradation of dairy beverages enriched with polyunsaturated fatty acids. *J Dairy Res* **78**, 111–117.
25. Dhiman TR, Satter LD, Pariza MW, *et al.* (2000). Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J Dairy Sci* **83**, 1016–1027.

26. Leichter J (1973). Effect of dietary lactose on intestinal lactase activity in young rats. *J Nutr* **103**, 393-396.
27. Pfeuffer M, Schrezenmeir J (2000). Bioactive substances in milk with properties decreasing risk of cardiovascular diseases. *Brit J Nutr* **84**, 155-159.
28. Aslibekyan S, Campos A, Baylin A (2012). Biomarkers of dairy intake and the risk of heart disease. *Nutr Metab Cardiovasc* **22**, 1039-1045.
29. Lucas A, Coulon JB, Grolier P, *et al.* (2005). Nutritional quality of dairy products and human health. *Indicators of milk and beef quality - EAAP.112*, Wageningen, Netherland, pp.163-178.
30. Harris SW (1977). n-3 Fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr* **6**, 1645-1654.
31. Connor WE (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* **71**, 171-175.
32. Harper CR, Edwards MJ, DeFilipis AP, *et al.* (2006). Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans. *J Nutr* **136**, 83-87.
33. Azain MJ, Hausman DB, Sisk MB, *et al.* (2000). Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J Nutr* **130**, 1548-1554.
34. Lee YJ, Jenkins TC (2011). Biohydrogenation of linolenic acid to stearic acid by the rumen microbial population yields multiple intermediate conjugated diene isomers. *J Nutr* **141**, 1445-1450.
35. Besle JM, Lamaison JL, Pradel P, *et al.* (2004). Flavonoids, from forages to milk. *Rencontres autour des recherches sur les ruminants*, **11**, 67-70, Paris, France.
36. Manach C, Scalbert A, Morand C, *et al.* (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727-747.
37. Ito Y, Ichikawa T, Morohoshi Y, *et al.* (2008). Effect of tea catechins on body fat accumulation in rats fed a normal diet. *Biomed Res* **29**, 27-32.
38. NRC (1995). National Research Council, Nutrient Requirements of Laboratory Animals. Vol. 4, National Academy of Science, Washington, D.C., USA.
39. Meydani M, Hasan ST (2010). Dietary polyphenols and obesity. *Nutrients* **2**, 737-751.
40. Yoshino J, Conte C, Fontana L, *et al.* (2012). Resveratrol supplementation does not improve metabolic function in nonobese women with normal glucose tolerance. *Cell Metab* **16**, 658-664.
41. Kumazawa T, Yoneda M, Shibata I, *et al.* (2003). Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem Pharm Bull* **5**, 740-742.
42. Choi SS, Cha BY, Iida K, *et al.* (2011). Artepillin C, as a PPAR $\gamma$  ligand, enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells. *Biochem Pharmacol* **81**, 925-933.
43. Baró L, Fonollá J, Peña JL, *et al.* (2003). n-3 Fatty acids plus oleic acid and vitamin supplemented milk consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans. *Clin Nutr* **22**, 175-182.
44. Pfeuffer M, Schrezenmeir J (2006). Milk and the metabolic syndrome. *Obes Rev* **8**, 109-118.
45. Moss M, Freed D (2003). The cow and the coronary: epidemiology, biochemistry and immunology. *Int J Cardiol* **87**, 203-216.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fermentação ruminal pode ser beneficiada com a presença de extrato de própolis no meio. Os compostos fenólicos da própolis verde influenciam positivamente a produção de propionato e metano, sugerindo uma melhora na utilização da energia dos alimentos.

A associação extrato de própolis com vitamina E para vacas não modifica a digestão e o aproveitamento de nutrientes da dieta. Estes produtos têm potencial para auxiliar o combate ao estresse oxidativo, elevar as concentrações de CLA no leite e a atividade antioxidante, sem modificar a produção de leite. Entretanto, a necessidade de melhora da estabilidade oxidativa da gordura é um fator importante para a qualidade do leite.

A obtenção de leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes é possível por meio de uma alimentação diferenciada fornecida às vacas. A suplementação deste leite a ratos não modifica o consumo alimentar e o crescimento. Devido à sua influência sobre o acúmulo de tecido adiposo visceral, os efeitos do consumo de leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes permanecem a ser elucidados.