

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ÓLEO DE LINHAÇA COM ADIÇÃO DE PRÓPOLIS
E VITAMINA E NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS
LEITEIRAS E A QUALIDADE DO LEITE NA
REDUÇÃO DE DISTÚRBIOS METABÓLICOS EM
RATOS DIABÉTICOS E OBESOS

Autor: Emerson Henri Yoshimura
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucia Maria Zeoula

MARINGÁ
Estado do Paraná
fevereiro – 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

ÓLEO DE LINHAÇA COM ADIÇÃO DE PRÓPOLIS
E VITAMINA E NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS
LEITEIRAS E A QUALIDADE DO LEITE NA
REDUÇÃO DE DISTÚRBIOS METABÓLICOS EM
RATOS DIABÉTICOS E OBESOS

Autor: Emerson Henri Yoshimura
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucia Maria Zeoula

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

MARINGÁ
Estado do Paraná
fevereiro - 2016

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

Yoshimura, Emerson Henri
Y65o Título / Emerson Henri Yoshimura -- Maringá, 2016.
100 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Lucia Maria Zeoula.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Área de Concentração: Produção Animal, 2016.

1. Alimentos funcionais. 2. Bacterias ruminais. 3. Diabetes. 4. Omega-3. 5. Protozoários. I. Zeoula, Lúcia Maria, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Área de Concentração: Produção Animal. III.. Título.

CDD 21.ed. 636.21

AHS-002862



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ÓLEO DE LINHAÇA COM ADIÇÃO DE PRÓPOLIS
E VITAMINA E NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS
LEITEIRAS E A QUALIDADE DO LEITE NA
REDUÇÃO DE DISTÚRBIOS METABÓLICOS
EM RATOS DIABÉTICOS E OBESOS**

Autor: Emerson Henri Yoshimura
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Lúcia Maria Zeoula

TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 18 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Geraldo Tadeu
dos Santos

Profª Drª Claudete Regina
Alcalde

Profª Drª Cecília Edna
Mareze da Costa

Profª Drª Odimári Pricila
Pires do Prado

Profª Drª Lúcia Maria Zeoula
(Orientadora)

Aos meus pais,
Carlos Hiroshi Yoshimura e Márcia Satomi Takada Yoshimura,
Por todo amor e confiança depositada,
E por todo apoio incondicional!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e ao Departamento de Ciências Fisiológicas, por terem possibilitado o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto de pesquisa e pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Dr.^a Lucia Maria Zeoula, pela amizade, pelos ensinamentos, pela orientação em todo o trabalho, por toda paciência e confiança depositada.

À professora Dr.^a Cecília Edna Mareze da Costa, pelos ensinamentos, pela amizade, por toda contribuição e ajuda no trabalho.

Ao professor Dr. Raul Franzolin Neto, pela contribuição na análise de protozoários.

Aos professores Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, Dr.^a Paula Matumoto Pinto, Dr.^a Eliane Gasparino e Dr.^a Selma L. Franco, pela parceria e colaboração neste trabalho.

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

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas, Dr. Sidney Barnabé Peres, Dr. Nilton de Almeida Brito, Dr.^a Márcia do Nascimento Brito e Dr.^a Edmara Aparecida Baroni, por toda colaboração no experimento.

Ao funcionário do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Densilon dos Santos Vicentin, pela disponibilidade.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi, Vicente Faleiros, Célio Aparecido Passolongo e Ezupério Salim da Silva, pela contribuição no trabalho a campo.

Aos funcionários do Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal, Creuza Azevedo e Hermógenes Augusto, pelo auxílio durante o período de análises laboratoriais.

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

Aos amigos, que foram fundamentais na execução dos experimentos, Nadine Woruby Santos, Erica Machado, Bruna Calvo Agostinho, Lucélia Pereira de Moura, Ana Paula Del Vesco, Paula Gimenez Milani, Fernando Alves e Sílvia Cristina de Aguiar.

Aos colegas de grupo, Jocasta Carraro, Bruno Abreu, Fernanda Códea, Bruna Almeida, Cecília Aparecida Spada, Aline Bravo, João Gustavo Franceschi, Cássia Almeida Fiorentini e Maynara Andrade, pelos bons momentos de trabalho e troca de experiências.

Aos grandes amigos, Eduardo Marostegan de Paula, Rafael Barreiros Samensari, Fábio José Maia, André Luiz Garcia Dias e Fernando Jacovaci por todo apoio e momentos de convívio.

Aos amigos do Centro Mesorregional de Excelência e Tecnologia do leite - Noroeste, Ranulfo Junior, Paula Olivo, Jessyka Mazziero e Bruna Hygino.

E, a tantos outros que contribuíram na realização deste trabalho.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

BIOGRAFIA

EMERSON HENRI YOSHIMURA, filho de Carlos Hiroshi Yoshimura e Márcia Satomi Takada Yoshimura, nasceu na cidade de São Paulo/SP, no dia 8 de outubro de 1986.

Em julho de 2009, concluiu a graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Norte do Paraná, no *Campus* Luiz Meneghel, na cidade de Bandeirantes-PR.

Em março de 2010, ingressou no mestrado e, em março de 2012, recebeu o título de Mestre em Produção Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2012, ingressou no doutorado em Nutrição Animal do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá.

No mês de maio de 2015, submeteu-se à banca examinadora para o Exame Geral de Qualificação, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

No mês de fevereiro de 2016, submeteu-se à banca para defesa da Tese.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	16
REFERÊNCIAS	25
OBJETIVOS GERAIS	34
CAPÍTULO I – Efeito de dietas fornecidas a vacas leiteiras com óleo de linhaça e extrato de própolis associado ou não a vitamina E sobre a microbiota, biohidrogenação e dinâmica ruminal	
Resumo	35
Introdução	36
Material e métodos	37
Resultados	44
Discussão	50
Conclusões	55
Referências	55
CAPÍTULO II – Funcionalidade do leite de vacas alimentadas com óleo de linhaça e antioxidantes como suplemento dietético para ratos diabéticos	
Resumo	61
Introdução	62
Material e métodos	63
Resultados	67
Discussão	74

Conclusões.....	78
Referências	79
CAPÍTULO III – Funcionalidade do leite de vacas alimentadas com óleo de linhaça e antioxidantes como suplemento dietético para ratos obesos	
Resumo.....	83
Introdução.....	84
Material e métodos.....	85
Resultados.....	88
Discussão.....	95
Conclusões.....	96
Referências	97
CONSIDERAÇÕES FINAIS	100

LISTA DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I	
Tabela 1. Ingredientes e composição da dieta controle (CON) e dieta com óleo de linhaça (OL).....	38
Tabela 2. Composição de compostos fenólicos do produto à base de própolis e dos alimentos da dieta.....	39
Tabela 3. Contagem de protozoários ciliados do rúmen em vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça e adição de própolis associada ou não à vitamina E	45
Tabela 4. Populações de bactérias ruminais ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), <i>Butirivibrio fibrisolvens</i> , <i>Anaerovibrio lipolytica</i> e <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> em vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça e adição de própolis associada ou não à vitamina E	46
Tabela 5. Produção de ácidos graxos da gordura do leite (g/dia) de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça e adição de própolis associada ou não à vitamina E	47
Tabela 6. Consumo, fluxo omasal e digerido no rúmen ($\text{kg}\cdot\text{dia}^{-1}$) da matéria seca e nutrientes obtidos de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça e adição de própolis associada ou não a vitamina E	48
Tabela 7. Produção de ácidos graxos de cadeia curta (mmol/L) no fluido ruminal de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça e adição de própolis associada ou não à vitamina E.....	49
Tabela 8. Cinética de sólidos no rúmen em vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça e adição de própolis ou própolis associada com vitamina E	50

CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição dos três tipos de leites utilizados na suplementação alimentar de ratos diabéticos; L-COM: leite comum; L-AGPI: leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (AGPI); L-AGPI/A: leite enriquecido com AGPI e antioxidantes ...	64
Tabela 2. Ingestão (mg/dia) de gordura, proteína, lactose e ácidos graxos da suplementação por leite dos ratos diabéticos 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).....	68
Tabela 3. Peso corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee, peso de órgãos, tecidos musculares e tecidos adiposos de ratos diabéticos 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) ...	71
Tabela 4. Parâmetros plasmáticos de ratos diabéticos 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).....	72
Tabela 5. Valores de glicemia (mg/dL) no teste de tolerância à glicose oral de ratos diabéticos controle e 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)	73

CAPÍTULO III

Tabela 1. Composição dos três tipos de leites utilizados na suplementação alimentar de ratos obesos; L-COM: leite comum; L-AGPI: leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (AGPI); L-AGPI/A: leite enriquecido com AGPI e antioxidantes ...	86
Tabela 2. Ingestão (mg/dia) de gordura, proteína, lactose e ácidos graxos da suplementação por leite dos ratos obesos 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)	90
Tabela 3. Peso corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee, peso de órgãos, tecidos musculares e tecidos adiposos de ratos obesos 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) ...	91
Tabela 4. Parâmetros plasmáticos de ratos obesos 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).....	92

Tabela 5. Valores de glicemia (mg/dL) na curva glicêmica em ratos obesos 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)..... 93

Tabela 6. Valores de glicemia (mg/dL) no Teste de tolerância a insulina em ratos obesos 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)..... 94

LISTA DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO I	
Figura 1. Concentração de amônia e pH no fluído ruminal de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça e adição de própolis associada ou não à vitamina E	49
CAPÍTULO II	
Figura 1. Média glicêmica obtida em teste de tolerância à glicose oral de ratos diabéticos do grupo controle (água) e grupo suplementado com leite [média dos grupos: 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)]. Dados expressam a média \pm EPM. Detalhe: área sob a curva.....	74

RESUMO

Estudos foram conduzidos para avaliar os efeitos de dietas com óleo de linhaça com adição de própolis, associada ou não à vitamina E, sobre a microbiologia e parâmetros ruminais, e a funcionalidade do leite na prevenção de doenças metabólicas, como a diabetes e a obesidade. No primeiro experimento, foram avaliados os parâmetros de consumo, digestibilidade ruminal, parâmetros de fermentação ruminal, população de protozoários e bactérias ruminais. Foram utilizadas quatro vacas da raça Holandesa, com peso médio de 584 ± 52 kg, canuladas no rúmen e distribuídas em quadrado Latino 4×4 . As dietas foram: 1) dieta controle (CON), 2) dieta com óleo de linhaça, 25 g/kg de MS (OL), 3) dieta com óleo de linhaça + aditivo à base de própolis, 1,2 g/kg de MS (PROP), 4) dieta com óleo de linhaça + aditivo à base de própolis + vitamina E, 375 UI/kg de MS (PROP-E). O fornecimento de óleo de linhaça às dietas reduziu a contagem do gênero *Entodinium* ($P=0,097$) e a contagem total de protozoários ($P=0,092$). O óleo de linhaça favoreceu maior concentração da bactéria *Butirivibrio fibrisolvens* ($P=0,008$) e reduziu as populações de *Anaerovibrio lipolytica* ($P<0,001$) e *Methanobrevibacter ruminantium* ($P=0,013$). De modo geral, o extrato de própolis e a vitamina E não alteraram os parâmetros ruminais, digestivos e microbiológicos. No segundo e terceiro experimento, avaliou-se a funcionalidade do leite obtido com maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes, na suplementação alimentar de ratos diabéticos e obesos. No segundo experimento, foram utilizados trinta e dois ratos diabéticos distribuídos em quatro grupos experimentais: controle (CON), leite integral (L-COM), leite enriquecido com AGPI (L-AGPI), leite enriquecido com AGPI e antioxidantes (L-AGPI/A). A suplementação de leite obtido no primeiro experimento, na dose de 0,005 mL/g de peso corporal, foi realizada durante 77 dias, sendo 42 dias pré e 35 dias pós indução do diabetes. O leite reduziu a glicemia durante

o teste de tolerância à glicose oral nos tempos 0, 30, 60, 120 minutos, a média glicêmica (P=0,04) e a área sob a curva (P=0,05). O leite ainda reduziu a concentração plasmática de frutossamina (P=0,01) e aumentou a quantidade de tecido adiposo marrom (P=0,007). O grupo L-AGPI apresentou tendência para menor glicemia de jejum (P=0,086), redução do colesterol LDL (P=0,008) e maior capacidade antioxidante total (P=0,001) no sangue. No terceiro experimento, foram utilizados trinta e dois ratos obesos distribuídos em quatro grupos experimentais, semelhante ao experimento anterior. A suplementação láctea com a mesma dosagem foi realizada por 85 dias. A suplementação com leite reduziu o diâmetro de adipócitos (P=0,068), reduziu a resistência à insulina (P=0,002) e aumentou a taxa de desaparecimento da glicose (P=0,002). O grupo L-AGPI/A apresentou maior deposição de massa muscular (P=0,030), menor acúmulo de gordura mesentérica (P=0,037) e menor concentração plasmática de LDL (P=0,076). O leite integral e o leite enriquecido naturalmente com AGPI e antioxidantes comprovaram a sua funcionalidade, uma vez que melhoraram os parâmetros fisiológicos importantes no controle dos distúrbios metabólicos ocasionados pelo diabetes e a obesidade.

Palavras-chave: alimentos funcionais, bactérias ruminais, diabetes, ômega-3, protozoários.

ABSTRACT

Studies were conducted to evaluate the effects of diets with flaxseed oil with propolis associated or not with vitamin E on microbiology and ruminal parameters, and the functionality of milk in the prevention of metabolic diseases like diabetes and obesity. The first experiment evaluated parameters of intake, ruminal digestibility, ruminal fermentation, protozoa population fermentation and ruminal bacteria. Four Holstein cows were used, with average weight of 584 ± 52 kg, cannulated in the rumen and distributed in 4×4 Latin square. The treatments were: 1) control diet (CON), 2) diet with flaxseed oil, 25 g/kg DM (OL), 3) diet with flaxseed oil + propolis extract, 1.2 g/kg DM (PROP), 4) diet with flaxseed oil + propolis extract + vitamin E, 375 IU/kg DM (PROP-E). The supply of flaxseed oil to the diet reduced the count score of Entodinium ($P=0.097$) and the total count of total protozoa ($P=0.092$). Flaxseed oil improved a increased concentration of *Butirivibrio fibrisolvens* ($P=0.008$) and reduced the population of *Anaerovibrio lipolytica* ($P<0.001$) and *Methanobrevibacter ruminantium* ($P=0.013$). In general, propolis extract and vitamin E have not been proved as antimicrobial and antioxidant additives, respectively, on ruminal microflora, because did not change the studied parameters. The second and third experiment evaluated the functionality of the milk obtained, with increased concentrations of polyunsaturated fatty acids and antioxidants in diabetic and obese rats. In the second experiment thirty-two rats were divided into four experimental groups: control (CON), whole milk (L-COM), PUFA-enriched milk (L-APGI), milk enriched with PUFA and antioxidants (L-AGPI/A). The milk supplementation obtained in the first experiment with dose of 0.005 ml/g body weight was carried out for 77 days, 42 days before and 35 days after induction of diabetes. Milk reduced blood glucose in the oral glucose tolerance test at 0, 5, 15, 60 minutes, and the average glycemia ($P=0.04$) and area under the curve

($P=0.05$). The milk also reduced plasma concentration of fructosamine ($P=0.01$) and increased the amount of brown adipose tissue ($P=0.007$). The L-AGPI group reduced fasting plasma glucose ($P=0.086$), significantly reduced LDL cholesterol ($P=0.008$) and increased total antioxidant capacity ($P=0.001$) in the blood. In the third experiment thirty-two obese mice were distributed in four experimental groups similar to the previous experiment. Milk supplementation with the same dose was carried out for 85 days. Milk supplementation reduced the diameter of adipocytes ($P=0.068$) and reduced the insulin resistance ($P=0.002$) and increased the glucose disappearance rate ($P=0.002$). The L-PUFA/A group resulted in an increased deposition of muscle mass ($P=0.030$), lower mesenteric fat ($P = 0.037$), and lower plasmatic levels of LDL ($P = 0.076$). The whole milk and milk naturally enriched with PUFA proved its functionality, since improved important parameters in the control of metabolic disorders caused by diabetes and obesity.

Keywords: diabetes, functional food, omega-3, protozoa, ruminal bacteria

I - INTRODUÇÃO

Atualmente, os desafios da nutrição animal visam aumentar a produtividade nos diferentes sistemas de produção, em busca de manutenção e melhora na qualidade dos produtos (carne e leite) e com vista à sustentabilidade. Em ruminantes, o avanço na produção animal inclui estudos da função digestiva e a pesquisa em microbiologia ruminal tem exercido grande impacto na compreensão da nutrição. O conhecimento detalhado da microbiota ruminal e dos parâmetros que a afetam são fundamentais para o desenvolvimento da produtividade da pecuária nos diferentes sistemas de produção de ruminantes.

Nesse âmbito, aditivos alimentares, como os ionóforos, são comumente administrados aos animais para manipular a microbiota ruminal com intuito de melhorar a eficiência alimentar e potencializar o desempenho. No entanto, nos últimos anos, a preocupação pública sobre o uso sistêmico de antibióticos na alimentação animal tem aumentado devido ao surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos que podem representar um risco para a saúde humana. Assim, esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de alternativas aos antibióticos, principalmente na exploração de produtos naturais.

Desta forma, vários estudos foram realizados com produtos naturais, como a própolis, pois, dentre suas diversas propriedades, a antimicrobiana e antioxidante têm motivado os estudos em nutrição animal.

Aditivos na alimentação de ruminantes: óleo de linhaça, própolis e vitamina E

As forragens utilizadas na alimentação de ruminantes comumente são ricas em ácidos graxos poli-insaturados que são benéficos para saúde humana, mas a composição dos produtos de origem animal, como a carne e o leite, apresenta apenas uma pequena proporção destes ácidos graxos (Huws *et al.*, 2013). Isto ocorre devido ao processo de biohidrogenação no rúmen que parcialmente transforma os ácidos graxos poli-insaturados em ácidos graxos saturados por meio da microbiota ruminal, produzindo também dienos e trienos conjugados intermediários (Jenkins *et al.*, 2008), os quais também têm sido relacionados com propriedades benéficas à saúde (Tsuzuki *et al.*, 2004).

O óleo de linhaça apresenta em sua constituição alto grau de ácidos graxos poli-insaturados (cerca de 90%), composto por 55,2% de ácido linolênico (n-3), 17% de ácido linoleico (n-6), 18,5% de ácido oleico, 3,4% de ácido esteárico e 7,2% de ácido palmítico (Vereshchagin & Novitskaya, 1965). A suplementação com óleo de linhaça na dieta de vacas leiteiras tem sido utilizada com objetivo de aumentar a proporção de ácidos graxos poli-insaturados no leite, especialmente os ácidos graxos da série n-3 (Glasser *et al.*, 2008). Desta forma, ampliando as propriedades do leite, que além de nutrir, promove benefícios a saúde humana.

No entanto, devido à toxicidade dos ácidos graxos poli-insaturados aos microrganismos ruminais, o óleo de linhaça pode alterar a população de bactérias ruminais (Yang *et al.*, 2009; Gudla *et al.*, 2012; Huws *et al.*, 2015) e protozoários ciliados do rúmen (Ueda *et al.*, 2003; Benchaar *et al.*, 2012) e, conseqüentemente, prejudicar a fermentação ruminal e este efeito pode variar de acordo com a quantidade suplementada, em nível de 5,7% na dieta de vacas leiteiras há relato de redução no consumo e na digestibilidade da matéria seca (Martin *et al.*, 2008).

A própolis é um material resinoso coletado pelas abelhas de brotos e secreções de árvores de diversas espécies. Após coletado, este material é enriquecido de secreções salivares e enzimáticas e é utilizado como proteção para colmeia contra insetos invasores (Castaldo & Capasso, 2002). A composição química da própolis é bastante diversa com mais de 300 compostos (Lotfy, 2006). Dentre eles, encontra-se: açúcares, alcoóis, aldeídos, ácidos e ésteres alifáticos, ácidos graxos (AG), aminoácidos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, esteroides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas,

flavonoides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenoides e também vitaminas e minerais (Lima, 2006).

Na natureza, os compostos secundários localizados em resinas vegetais, óleos essenciais, ceras e pólen nas plantas são colhidos pelas abelhas (Bankova *et al.*, 2000) que utilizam essas substâncias para produção da própolis. Suas propriedades estão relacionadas à alta concentração de compostos fenólicos (flavonoides e derivados do ácido hidroxicinâmico) provenientes do material vegetal, que são importantes na planta e produzidos com função de defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (Manach *et al.*, 2004a).

Os flavonoides são grupos de compostos de polifenólicos aromáticos conjugados, que divergem em estrutura e características químicas (Lustosa *et al.*, 2008). De forma geral, são potentes antioxidantes, quelantes de metais e combatem os radicais livres (Harborne & Williams, 2000). Os fatores como a composição botânica da região onde foi coletada e até mesmo a variabilidade genética das rainhas, influenciam na composição química da própolis (Bankova, 2005).

A própolis apresenta várias propriedades biológicas como: antiviral, antifúngica, imunomodulatória, anti-inflamatória e hepatoprotetora, entre outras (Bankova, 2009). No entanto, as propriedades que mais despertam interesse na área de nutrição de ruminantes são a antimicrobiana (de Aguiar *et al.*, 2013), com intuito de utilizá-la como aditivo alimentar na manipulação da fermentação ruminal e antioxidante (Cottica *et al.*, 2011; Aguiar *et al.*, 2014) para obtenção de leite com melhor qualidade.

Em estudos zootécnicos, o uso da própolis como aditivo na dieta de ruminantes tem-se mostrado eficiente no estímulo ao crescimento microbiano ruminal, aumento na produção de ácidos graxos de cadeia curta (Stradiotti Junior *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2010b), e redução na produção ruminal de amônia (Oliveira *et al.*, 2006) resultando em menor perda de nitrogênio pelos ruminantes (Barbosa *et al.*, 2001). Em estudo com um produto à base de própolis, denominado LLOS, foi constatado seu efeito em reduzir população ruminal de protozoários ciliados do rúmen de bubalinos, efeito semelhante ao observado pelo ionóforo monensina (Ríspoli *et al.*, 2009).

A capacidade de seleção de microrganismos ruminais por extrato de própolis foi observada por Prado *et al.* (2010a), em que as cepas bacterianas tolerantes ao produto foram superiores na fermentação de celobiose e celulose e foi concluído que os produtos à base de própolis têm mecanismos de ação diferentes daqueles de ionóforos, uma vez que a tolerância aos produtos ocorreu em maior percentagem de cepas Gram-positivas.

A influência do extrato de própolis sobre bactérias ruminais foi determinada *in vitro* (de Aguiar et al., 2013). Os extratos de própolis inibiram o crescimento de seis cepas, com maior inibição para a concentração contendo 1000 µg de extratos de própolis, sendo as cepas de *Fibrobacter succinogenes*, *Clostridium bifementans* e *Peptostreptococcus* sp. foram as mais sensíveis. Os autores observaram que a própolis possui ação antimicrobiana tanto contra bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, assim como contra várias espécies. Concluiu-se também que a condição de extração influenciou a quantidade de compostos fenólicos na própolis e, conseqüentemente, a atividade antimicrobiana.

O advento das técnicas de biologia molecular (PCR) permite aos microbiologistas de rúmen expandir os limites de conhecimentos acerca da ecologia microbiana. As proporções de microrganismos ruminais representadas por culturas isoladas é baixa, portanto é necessário ir além, uma vez que, os ecossistemas microbianos são notavelmente complexos e diversos (Firkins, 2010). Com esta ferramenta é possível compreender a influência dos aditivos alimentares na população microbiana, biohidrogenação de ácidos graxos insaturados e inferir sobre oportunidades de manipulação da fermentação ruminal.

Na produção de leite, a própolis foi utilizada em estudo por Lana et al. (2005), em conjunto ou não ao óleo de soja. Essa associação resultou em aumento dos teores de gordura, proteína e sólidos totais no leite de cabra. Com bovinos de leite, o extrato etanólico de própolis aumentou a produção de leite e teores de proteína (Freitas *et al.*, 2009). Na qualidade da gordura do leite, Aguiar et al. (2014) demonstraram a melhora na composição em ácidos graxos da gordura do leite resultante da adição de produtos à base de própolis na dieta de vacas leiteiras. Neste mesmo estudo foram observados aumentos na concentração de ácidos graxos conjugados, ácidos graxos monoinsaturados e aqueles da série n-3.

A suplementação de ruminantes com alimentos ou produtos ricos em compostos fenólicos tem mostrado efeitos positivos na qualidade dos produtos lácteos, por contribuir para melhora da estabilidade oxidativa da gordura do leite, como relatado em estudos com outros antioxidantes como α -tocoferol e carotenoides (Havemose *et al.*, 2004; Havemose *et al.*, 2006; Paschoal *et al.*, 2007). O uso de produto a base de própolis como aditivo alimentar para vacas leiteiras mostrou ser eficiente no aumento da atividade antioxidante no leite (Cottica *et al.*, 2011). A incorporação de antioxidantes ao

leite de maneira natural, por meio da alimentação das vacas leiteiras (Petit *et al.*, 2009), é uma opção que evita a adição dessas substâncias na indústria.

A vitamina E é um termo genérico de duas famílias de compostos lipossolúveis, os tocoferóis e tocotrienóis. A forma mais abundante e biologicamente ativa na natureza é o α -tocoferol (Brigelius-Flohe & Traber, 1999). Está bem estabelecido que a vitamina E é um importante antioxidante em membranas celulares e protege os lipídeos de membrana contra a peroxidação (Burton *et al.*, 1982; Isozaki *et al.*, 2006), por meio da redução dos radicais peróxido e superóxido (Mirbagheri *et al.*, 2008). Ela está correlacionada positivamente com o funcionamento do sistema imune (Weiss *et al.*, 2009), e redução na incidência de mastite e contagem de células somáticas (Weiss *et al.*, 1997). A suplementação com vitamina E para vacas leiteiras elevou as concentrações desta vitamina no leite e melhorou parâmetros que avaliam a qualidade do leite (Atwal *et al.*, 1991; Charmley *et al.*, 1993; Focant *et al.*, 1998).

A gordura do leite pode ser rica em ácidos graxos poli-insaturados (como aqueles da série n-3, n-6 e ácido linoleico conjugado) através do fornecimento de óleo vegetal e grãos de oleaginosas nas dietas de vacas (Benchaar *et al.*, 2012). Esse perfil de gordura é suscetível à oxidação (Timmons *et al.*, 2001), podendo ocorrer perda da qualidade. A presença de compostos antioxidantes no leite é uma forma eficaz de prevenir a oxidação dos ácidos graxos (Ashes *et al.*, 1997), permanecendo maior tempo passível para consumo. No leite o efeito da adição de vitamina E em dietas com óleo de linhaça para vacas leiteiras preveniu parcialmente a depressão da gordura e aumentou a concentração de CLA. Adicionalmente, houve melhora no perfil de ácidos graxos no leite por meio da redução dos ácidos graxos saturados C16:0 e C18:0 (Bell *et al.*, 2006).

A ação de antioxidantes de naturezas distintas, lipofílica e hidrofílica, pode atuar de forma sinérgica (Manach *et al.*, 2004b). A suplementação de vitamina E com um extrato natural de plantas amenizou o estresse oxidativo causado pela suplementação lipídica (Gobert *et al.*, 2009).

A literatura mostra que com aplicação de técnicas específicas de alimentação animal é possível produzir um tipo de leite rico em antioxidantes e em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (da Silva-Kazama *et al.*, 2011; Benchaar *et al.*, 2012), o que pode representar não só um grande avanço na qualidade nutricional deste alimento, como também a ampliação de suas propriedades.

Doenças metabólicas: diabete mellitus e obesidade

O diabete mellitus (DM) é uma das doenças crônicas mais comuns em quase todos os países, e continua a aumentar em número e importância. Alterações nos hábitos alimentares da população têm contribuído para o aumento desta doença. O DM acomete 7,6% da população adulta entre 30 e 69 anos e 0,3% de gestantes, alterações na tolerância a glicose são observadas em 12% dos indivíduos adultos e também em 7% das grávidas. Segundo estimativas globais, o número de indivíduos com diabetes poderá passar de 430 milhões em 2030 (Shaw *et al.*, 2010).

O DM está em um grupo de desordens metabólicas que tem como manifestação comum a hiperglicemia, desenvolvimento de resistência a insulina, disfunções das células β e comprometimento na secreção de insulina (Santaguida *et al.*, 2005). É uma síndrome de fatores tanto hereditários como ambientais (Harlev *et al.*, 2013). Na diabetes mellitus tipo 2 (DM2) são comumente acompanhadas por desordens metabólicas múltiplas incluindo o metabolismo comprometido de lipídeos, carboidratos e proteínas, estresse oxidativo, inflamação subclínica, disfunção endotelial vascular e hipertensão (Mirmiran *et al.*, 2014). Estas alterações em longo prazo podem ocasionar múltiplas complicações no organismo, incluindo micro e macro complicações vasculares, como retinopatia (Kollias & Ulbig, 2010; Payne *et al.*, 2014), nefropatia (Pálsson & Patel, 2014), enfermidades vasculares (Horton *et al.*, 2015), como também articulares e ósseas (Sponer *et al.*, 2013), e conseqüentemente, reduzindo a qualidade de vida e aumentando a taxa de mortalidade (Constantino *et al.*, 2013).

O DM leva a depleção do sistema de defesa antioxidante e aumenta a quantidade de espécies reativas de oxigênio (Tangvarasittichai, 2015). Os radicais livres contribuem significativamente para a progressão do DM e suas complicações (Tilton *et al.*, 1997; Rösen *et al.*, 2001; Kopprasch *et al.*, 2015). Rösen *et al.* (2001) mencionam diversas evidências de que o estresse oxidativo desempenha um importante papel fisiopatológico no aparecimento do DM e no desenvolvimento de complicações associadas e asseguram que a inclusão de antioxidantes como coadjuvantes podem ser muito benéficas. Adicionalmente, a inclusão de AGPI a dieta tem demonstrado melhoria significativa na sensibilidade dos tecidos à insulina (Muley *et al.*, 2014).

A obesidade é caracterizada por um acúmulo excessivo de gordura que pode desencadear diversos problemas de saúde como doenças cardiovasculares (Glück *et al.*, 2015), hipertensão, dislipidemia (Mishra *et al.*, 2016), uma série e tipos de câncer (Calle

& Kaaks, 2004) e o diabetes tipo 2 (Hurt *et al.*, 2010). O tecido adiposo interfere diretamente nesta síndrome metabólica, diversos tipos de cânceres, doenças cardiovasculares, dislipidemias e inflamação. Além disso, o tecido adiposo está envolvido na regulação da massa óssea, da homeostase metabólica, das funções tireoidianas e reprodutivas, na manutenção da sensibilidade à insulina e no controle da ingestão alimentar (Rosen & Spiegelman, 2006; Lefterova & Lazar, 2009). Isto demonstra a imensa capacidade do tecido adiposo de interagir com outros tecidos corporais, inclusive com sistema nervoso central, desempenhando funções parácrinas e endócrinas. Esta interação resulta da presença de receptores no tecido adiposo para um elevado número de hormônios provenientes de diversos órgãos endócrinos e, também, devido à ação de hormônios e citocinas, incluindo as pró-inflamatórias, secretadas pelos próprios adipócitos, chamadas “adipocinas”. Tais substâncias regulam processos fisiológicos que incluem o metabolismo de glicose e a sensibilidade à insulina, o apetite, as respostas inflamatórias, a angiogênese, a pressão sanguínea e a função reprodutiva. Na obesidade, a expressão de adipocinas e o metabolismo de glicose e de lipídios via tecido adiposo estão alterados e isto contribui para estados de hiperglicemia, hiperlipidemia, resistência à insulina e inflamação crônica, ou seja, a disfunção do TA é um fator crucial no desenvolvimento da patogênese do DM2 e de outras doenças metabólicas (Lefterova & Lazar, 2009).

No DM ocorrem mudanças significativas na concentração, composição e metabolismo de lipídios. As alterações são de natureza oxidativa, com aumento da peroxidação lipídica associado com a hiperlipidemia (Malviya *et al.*, 2010). A dislipidemia é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares em pacientes com DM (Qidwai & Ashfaq, 2014) e estes apresentam de 2 a 3 vezes mais risco de sofrer um infarto do miocárdio e um acidente vascular cerebral (Turner *et al.*, 1998).

O controle da hiperglicemia em pacientes diabéticos é essencial na prevenção de doenças crônicas associadas (Smith-Palmer *et al.*, 2014). A dieta é o principal foco das estratégias de saúde pública na manutenção da saúde ao longo da vida, prevenindo precocemente doenças crônicas e aumentando a qualidade de vida dos indivíduos (Gupta & Prakash, 2014).

Qualidade do leite na prevenção de diabete mellitus e obesidade

Por séculos, senão milênios, o leite e seus derivados têm sido ícones de saúde e nutrição (MacDonald, 2008). Em revisão, Pfeuffer & Schrezenmeir (2006) concluem que os produtos lácteos contêm uma série de constituintes, como minerais, proteínas, peptídeos, triacilgliceróis de cadeia média, lactose e ácidos orgânicos que podem, diretamente ou indiretamente, ter efeitos benéficos na sensibilidade à insulina, no peso corporal, na pressão sanguínea e na lipídemia. Segundo Renhe (2013) o leite é um alimento muito rico e complexo que possui propriedades que vão além do papel básico de nutrição, mas é necessário desvincularem sua imagem do consumo de gordura saturada e desmistificarem o papel do leite somente como alimento para crianças. Esta mesma autora ainda menciona que o desenvolvimento de novos produtos lácteos com maior atividade funcional e nutricional pode representar grande melhora nas atuais condições nutricionais da população mundial.

Em estudos recentes, a ingestão de produtos lácteos e derivados tem sido associada com a redução no risco do DM e melhora na saúde metabólica (Crichton *et al.*, 2011; Rice *et al.*, 2011; Ricci-Cabello *et al.*, 2012; Hirahatake *et al.*, 2014). O Guia Dietético para Americanos desde 2010 já recomenda a ingestão de leite e produtos lácteos sem gordura ou baixo teor de gordura (1%) para indivíduos com idade acima de 9 anos, com objetivo de prevenir doenças crônicas e promover a saúde (McGuire, 2011). Os efeitos benéficos do leite têm sido relacionado com os seus componentes, como o cálcio (Sun & Zemel, 2006), proteínas do soro (Jakubowicz & Froy, 2013) e composição de ácidos graxos poli-insaturados (Mozaffarian *et al.*, 2013).

A ingestão de leite rico em cálcio por indivíduos obesos é capaz de promover uma redução nas concentrações plasmáticas de proteína reativa C (CRP) (Zemel & Sun, 2008), uma proteína de fase aguda produzida por macrófagos e pelos adipócitos e cujos níveis se elevam consideravelmente durante a inflamação. Ao mesmo tempo, este feito anti-inflamatório é acompanhado por um aumento dos níveis circulantes de adiponectina, um adipocina que se correlaciona positivamente com a melhora da sensibilidade à insulina (Zemel & Sun, 2008). Outros elementos presentes no leite como a lactoferrina desencadeiam efeitos anti-inflamatórios, como observado em diferentes modelos experimentais (Conneely & Ward, 2000; Legrand *et al.*, 2005), além de promover redução no ganho de peso corporal e no diâmetro dos adipócitos (Pilvi *et al.*, 2009).

Em estudos com humanos, o consumo de leite apresentou correlação negativa com a síndrome metabólica em homens de meia idade, realizado no Reino Unido (Elwood *et al.*, 2007). Em outro trabalho realizado com humanos, 5232 participantes, foi avaliada a associação entre ingestão de produtos lácteos e a incidência de DM2 (Struijk *et al.*, 2013). Os autores constataram que a ingestão de queijo e produtos lácteos fermentados não apresentou um efeito forte suficiente para evitar o risco de diabetes, mas reduziram significativamente os níveis glicêmicos.

Os produtos lácteos representam a principal fonte de ácido linoleico conjugado potencialmente promotora da saúde na dieta humana (McCrorie *et al.*, 2011). Entre os isômeros do ácido linoleico conjugado, o 18:2*cis*-9,*trans*-11 (CLA) é o mais abundante nos alimentos derivados de ruminantes, e pode ser formado no rúmen a partir do ácido linoleico da dieta via biohidrogenação microbiana. Este processo pode acumular uma série de intermediários, que é em grande parte reduzida a isômeros 18:1 e finalmente a 18:0 (ácido esteárico). Identificar quais espécies de bactérias tem um papel na biohidrogenação pode ajudar o desenvolvimento de produtos lácteos saudáveis (Belenguer *et al.*, 2010).

A formação de ácido vacênico no rúmen é desejável, pois este AG pode ser dessaturado a CLA na glândula mamária. Óleos vegetais que contem ácido linoleico, como óleo de linhaça (OL) fornece substrato para síntese de ácido vacênico no rúmen, sendo descrita como uma boa estratégia nutricional para melhorar o perfil de AG em vacas leiteiras (Toral *et al.*, 2010). No entanto, AG insaturados podem ser tóxicos a certos microrganismos, embora algumas bactérias ruminais sejam capazes de detoxificá-los por meio da biohidrogenação (Belenguer *et al.*, 2010).

Os benefícios da ingestão AGPI e o ácido graxo ômega-3 (AG-n3) foram correlacionados com a redução no risco de diabetes e melhora na saúde humana (Serhan *et al.*, 2008; Guadarrama-López *et al.*, 2014; Muley *et al.*, 2014). O leite quando enriquecido industrialmente com AG-n3 e vitaminas melhorou a lipídemia plasmática e reduziu o risco de doenças cardiovasculares (Baro *et al.*, 2003). Além do efeito isolado do AG-n3, há evidências para interações competitivas entre AGPI, especificamente entre ácido graxo ômega-6 (AG-n6) e AG-n3. O equilíbrio alimentar entre eles estão relacionados com a formação e ação dos eicosanóides, tromboxanos, prostaciclina, prostaglandinas e leucotrienos (Lands, 1986). Uma maior razão n6:n3 (10:1) na dieta favorece a formação de eicosanóides pró-inflamatórios (Harnack *et al.*, 2009) e também

está relacionada com aumento de doenças cardiovasculares (Moreira *et al.*, 2001). Recomenda-se uma razão de no máximo 4:1 na dieta (HMSO, 1994).

A ingestão de antioxidantes é benéfica para o controle do DM por sua atividade hipoglicêmica, como observado em plantas medicinais que contêm os flavonoides como principais compostos fenólicos (Malviya *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2012). Segundo Górecka *et al.* (2014), em testes *in vitro* e *in vivo*, a epicatequina (flavonoide) estimula a síntese de insulina e o nível de AMPc nas células β das ilhotas de Lagerhans, aumentando a secreção de insulina. E outra catequina, epigallocatequina-3-galato (EGCG), tem efeito hipoglicêmico constatado pela inibição na produção de glicose no fígado.

Portanto, o leite bovino enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes poderia caracterizá-lo como um alimento funcional com propriedades na prevenção e no tratamento de doenças, especialmente as crônicas degenerativas como o DM e a obesidade. A descrição de pesquisas que explorem a importância deste tipo de leite na prevenção de doenças metabólicas não é conhecida, no entanto, os resultados anteriormente descritos sugerem uma grande potencialidade para o tratamento ou prevenção da obesidade e do diabete mellitus.

Referências

- Aguiar SC, Cottica SM, Boeing JS, Samensari RB, Santos GT, Visentainer JV & Zeoula LM (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. *Animal Feed Science and Technology* **193**, 148-154.
- Ashes J, Gulati S & Scott T (1997) Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. *Journal of dairy science* **80**, 2204-2212.
- Atwal KS, Swanson BN, Unger SE, Floyd DM, Moreland S, Hedberg A & O'Reilly BC (1991) Dihydropyrimidine calcium channel blockers. 3. 3-Carbamoyl-4-aryl-1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid esters as orally effective antihypertensive agents. *J Med Chem* **34**, 806-811.
- Bankova V (2005) Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* **100**, 114-117.
- Bankova V (2009) Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *J. ApiProd. ApiMed. Sci.* **1**, 23-38.
- Bankova VS, de Castro SL & Marcucci MC (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* **31**, 3-15.

- Barbosa NGS, Lana RdP, Mâncio AB, Borges AC, Queiroz Cd & Oliveira JS (2001) Fermentação da proteína de seis alimentos por microrganismos ruminais, incubados puros ou com monensina ou rumensin®. *Revista Brasileira de Zootecnia* **30**, 1316-1324.
- Baro L, Fonolla J, Pena JL, Martinez-Ferez A, Lucena A, Jimenez J, Boza JJ & Lopez-Huertas E (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.
- Belenguer A, Toral PG, Frutos P & Hervas G (2010) Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *J Dairy Sci* **93**, 3275-3286.
- Bell J, Griinari J & Kennelly J (2006) Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. *Journal of Dairy Science* **89**, 733-748.
- Benchaar C, Romero-Pérez G, Chouinard P, Hassanat F, Eugene M, Petit H & Côrtes C (2012) Supplementation of increasing amounts of linseed oil to dairy cows fed total mixed rations: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, protozoal populations, and milk fatty acid composition. *Journal of dairy science* **95**, 4578-4590.
- Brigelius-Flohe R & Traber MG (1999) Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal* **13**, 1145-1155.
- Burton G, Joyce A & Ingold K (1982) First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *The Lancet* **320**, 327.
- Calle EE & Kaaks R (2004) Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* **4**, 579-591.
- Castaldo S & Capasso F (2002) Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* **73**, S1-S6.
- Charmley E, Nicholson J & Zee J (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. *Canadian Journal of Animal Science* **73**, 453-457.
- Conneely OM & Ward PP (2000) Lactoferrin variants and uses thereof: Google Patents.
- Constantino MI, Molyneaux L, Limacher-Gisler F, Al-Saeed A, Luo C, Wu T, Twigg SM, Yue DK & Wong J (2013) Long-Term Complications and Mortality in Young-Onset Diabetes Type 2 diabetes is more hazardous and lethal than type 1 diabetes. *Diabetes Care* **36**, 3863-3869.
- Cottica SM, Sawaya ACHE, Eberlin MN, Franco SL, Zeoula LM & Visentainer JV (2011) Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by Different Methods of Extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **22**, 929-935.

- Crichton G, Bryan J, Buckley J & Murphy K (2011) Dairy consumption and metabolic syndrome: a systematic review of findings and methodological issues. *Obesity reviews* **12**, e190-e201.
- da Silva-Kazama DC, Côrtes C, Kazama R, Benchaar C, Santos GTD, Zeoula LM & Petit HV (2011) Ruminal fermentation characteristics and fatty acid profile of ruminal fluid and milk of dairy cows fed flaxseed hulls supplemented with monensin. *Journal of dairy research* **78**, 56-62.
- de Aguiar S, Zeoula L, Franco S, Peres L, Arcuri P & Forano E (2013) Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria in vitro. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **29**, 1951-1959.
- Elwood PC, Pickering JE & Fehily AM (2007) Milk and dairy consumption, diabetes and the metabolic syndrome: the Caerphilly prospective study. *Journal of epidemiology and community health* **61**, 695-698.
- Firkins JL (2010) Reconsidering rumen microbial consortia to enhance feed efficiency and reduce environmental impact of ruminant livestock production systems. *Revista Brasileira de Zootecnia* **39**, 445-457.
- 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. *Journal of dairy science* **81**, 1095-1101.
- Freitas JA, Antonangelo RP, Ribeiro JL, Joslin M, Nogueira SRP & Souza JC (2009) Extrato etanólico de própolis na alimentação de vacas leiteiras. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. **10**, 333-343.
- Glasser F, Ferlay A & Chilliard Y (2008) Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science* **91**, 4687-4703.
- Glück T, Rupp H & Alter P (2015) Mechanisms increasing n-3 highly unsaturated fatty acids in the heart. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.
- 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. *Journal of dairy science* **92**, 6095-6104.
- Górecka AK, Stojko AR, Górecki M, Stojko J, Sosada M & Zięba GS (2014) Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* **19**, 78-101.
- Guadarrama-López AL, Valdés-Ramos R & Martínez-Carrillo BE (2014) Type 2 Diabetes, PUFAs, and Vitamin D: Their Relation to Inflammation. *Journal of Immunology Research* **2014**, 860703.
- Gudla P, Ishlak A & AbuGhazaleh A (2012) The effect of forage level and oil supplement on *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Anaerovibrio lipolytica* in continuous culture fermenters. *Asian-Australasian journal of animal sciences* **25**, 234.

- Gupta C & Prakash D (2014) Phytonutrients as therapeutic agents. In *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, pp. 151.
- Harborne JB & Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* **55**, 481-504.
- Harlev E, Nevo E, Mirsky N & Ofir R (2013) Antidiabetic attributes of desert and steppic plants: a review. *Planta medica* **79**, 425-436.
- Harnack K, Andersen G & Somoza V (2009) Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n6/n3 fatty acids. *Nutrition and Metabolism* **6**, 1-11.
- Havemose M, Weisbjerg MR, Bredie WL & Nielsen JH (2004) Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. *International Dairy Journal* **14**, 563-570.
- Havemose MS, Weisbjerg MR, Bredie W, Poulsen HD & Nielsen JH (2006) Oxidative stability of milk influenced by fatty acids, antioxidants, and copper derived from feed. *Journal of dairy science* **89**, 1970-1980.
- Hirahatake KM, Slavin JL, Maki KC & Adams SH (2014) Associations between dairy foods, diabetes, and metabolic health: potential mechanisms and future directions. *Metabolism: Clinical and Experimental* **63**, 618-627.
- HMSO U (1994) Nutritional aspects of cardiovascular disease (report on health and social subjects No. 46): London: HMSO.
- Horton WB, Taylor JS, Ragland TJ & Subauste AR (2015) Diabetic muscle infarction: a systematic review. *BMJ Open Diabetes Research & Care* **3**, e000082.
- Hurt RT, Kulisek C, Buchanan LA & McClave SA (2010) The obesity epidemic: challenges, health initiatives, and implications for gastroenterologists. *Gastroenterology & hepatology* **6**, 780.
- Huws S, Scott M, Tweed J & Lee M (2013) Fatty acid oxidation products ('green odour') released from perennial ryegrass following biotic and abiotic stress, potentially have antimicrobial properties against the rumen microbiota resulting in decreased biohydrogenation. *Journal of applied microbiology* **115**, 1081-1090.
- Huws SA, Kim EJ, Cameron SJ, Girdwood SE, Davies L, Tweed J, Vallin H & Scollan ND (2015) Characterization of the rumen lipidome and microbiome of steers fed a diet supplemented with flax and echium oil. *Microbial biotechnology* **8**, 331-341.
- Isozaki Y, Yoshida N, Kuroda M, Takagi T, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Naito Y, Okanoue T & Yoshikawa T (2006) Effect of a novel water-soluble vitamin E derivative as a cure for TNBS-induced colitis in rats. *International journal of molecular medicine* **17**, 497-502.
- Jakubowicz D & Froy O (2013) Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat obesity and Type 2 diabetes. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **24**, 1-5.

- Jenkins T, Wallace R, Moate P & Mosley E (2008) Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal science* **86**, 397-412.
- Kollias AN & Ulbig MW (2010) Diabetic Retinopathy: Early Diagnosis and Effective Treatment. *Deutsches Arzteblatt International* **107**, 75-84.
- Kopprasch S, Srirangan D, Bergmann S, Graessler J, Schwarz PE & Bornstein SR (2015) Association of systemic oxidative stress and insulin resistance/sensitivity indices—the PREDIAS study. *Clinical endocrinology*.
- Lana RdP, Camardelli MML, Queiroz ACd, Rodrigues MT, Eifert EdC, Miranda EN & Almeida ICC (2005) Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras. *Revista Brasileira de Zootecnia*.
- Lands WE (1986) Renewed questions about polyunsaturated fatty acids. *Nutrition Reviews* **44**, 189-195.
- Lefterova MI & Lazar MA (2009) New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab* **20**, 107-114.
- Legrand D, Ellass E, Carpentier M & Mazurier J (2005) Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2549-2559.
- Lima M (2006) A produção de própolis no Brasil. *São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica*.
- Lotfy M (2006) Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev* **7**, 22-31.
- Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP & Rolim Neto PJ (2008) Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosian*. **18**, 447-454.
- MacDonald HB (2008) Dairy nutrition: What we knew then to what we know now. *International Dairy Journal* **18**, 774-777.
- Malviya N, Jain S & Malviya S (2010) Antidiabetic potential of medicinal plants. *Acta Poloniae Pharmaceutica* **67**, 113-118.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C & Jimenez L (2004a) Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* **79**, 727-747.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C & Jiménez L (2004b) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**, 727-747.
- Martin C, Rouel J, Jouany JP, Doreau M & Chilliard Y (2008) Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *J Anim Sci* **86**, 2642-2650.

- McCrorie TA, Keaveney EM, Wallace JM, Binns N & Livingstone MBE (2011) Human health effects of conjugated linoleic acid from milk and supplements. *Nutrition research reviews* **24**, 206-227.
- McGuire S (2011) U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services, Dietary Guidelines for Americans, 2010. 7th Edition, Washington, DC: U.S. Government Printing Office, January 2011. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* **2**, 293-294.
- Mirbagheri SA, Nezami BG, Assa S & Hajimahmoodi M (2008) Rectal administration of d-alpha tocopherol for active ulcerative colitis: a preliminary report. *World journal of gastroenterology: WJG* **14**, 5990.
- Mirmiran P, Bahadoran Z & Azizi F (2014) Functional foods-based diet as a novel dietary approach for management of type 2 diabetes and its complications: A review. *World journal of diabetes* **5**, 267.
- Mishra AK, Dubey V & Ghosh AR (2016) Obesity: An overview of possible role (s) of gut hormones, lipid sensing and gut microbiota. *Metabolism: Clinical and Experimental* **65**, 48-65.
- Moreira AB, Visentainer JV, de Souza NE & Matsushita M (2001) Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian Brycon freshwater fishes. *Journal of Food Composition and Analysis* **14**, 565-574.
- Mozaffarian D, de Oliveira Otto MC, Lemaitre RN, Fretts AM, Hotamisligil G, Tsai MY, Siscovick DS & Nettleton JA (2013) trans-Palmitoleic acid, other dairy fat biomarkers, and incident diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *The American Journal of Clinical Nutrition* **97**, 854-861.
- Muley A, Muley P & Shah M (2014) ALA, fatty fish or marine n-3 fatty acids for preventing DM?: a systematic review and meta-analysis. *Current diabetes reviews* **10**, 158-165.
- Oliveira JS, Queiroz AC, Lana RP, Mantovani HC & Generoso RAR (2006) Efeito da monensina e da própolis sobre a atividade de fermentação de aminoácidos in vitro pelos microrganismos ruminais. *Revista Brasileira de Zootecnia* **35**, 275-281.
- Pálsson R & Patel UD (2014) Cardiovascular Complications of Diabetic Kidney Disease. *Advances in chronic kidney disease* **21**, 273-280.
- Paschoal JJ, Zanetti MA, Del Claro GR, de Melo MP, Pugine SP & Cunha JA (2007) Perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas alimentadas com soja extrusada e selênio orgânico. *Pesq. Agrop. Bras* **42**, 1793-1799.
- Patel DK, Prasad SK, Kumar R & Hemalatha S (2012) An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2**, 320-330.

- Payne AJ, Kaja S, Naumchuk Y, Kunjukunju N & Koulen P (2014) Antioxidant Drug Therapy Approaches for Neuroprotection in Chronic Diseases of the Retina. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 1865-1886.
- Petit HV, Côrtes C, da Silva D, Kazama R, Gagnon N, Benchaar C, dos Santos GT & Zeoula LM (2009) The interaction of monensin and flaxseed hulls on ruminal and milk concentration of the mammalian lignan enterolactone in late-lactating dairy cows. *Journal of dairy research* **76**, 475-482.
- Pfeuffer M & Schrezenmeir J (2006) Impact of trans fatty acids of ruminant origin compared with those from partially hydrogenated vegetable oils on CHD risk. *International Dairy Journal* **16**, 1383-1388.
- Pilvi TK, Harala S, Korpela R & Mervaala EM (2009) Effects of high-calcium diets with different whey proteins on weight loss and weight regain in high-fat-fed C57BL/6J mice. *Br J Nutr* **102**, 337-341.
- Prado OPP, Zeoula LM, Moura LPP, Franco SL, Paiva SB & Arcuri PB (2010a) Isolation and expeditious morphological, biochemical and kinetic characterization of propolis-tolerant ruminal bacteria. *Revista Brasileira de Zootecnia* **39**, 2048-2054.
- Prado OPPd, Zeoula LM, Moura LPPd, Franco SL, Prado INd & Gomes HCC (2010b) Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos. *Revista Brasileira de Zootecnia*.
- Qidwai W & Ashfaq T (2014) Effect of Dietary Supplementation of Black Seed (N. Sativa L.) on Lipid Profile of Patients Suffering from Diabetes. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Cu* **13**, 3-8.
- Renhe IRT (2013) O papel do leite na nutrição. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* **63**, 8.
- Ricci-Cabello I, Herrera MO & Artacho R (2012) Possible role of milk-derived bioactive peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome. *Nutrition Reviews* **70**, 241-255.
- Rice BH, Cifelli CJ, Pikosky MA & Miller GD (2011) Dairy components and risk factors for cardiometabolic syndrome: recent evidence and opportunities for future research. *Advances in Nutrition: An International Review Journal* **2**, 396-407.
- Ríspoli TB, Rodrigues IL, Martins Neto RG, Kazama R, Prado OPP, Zeoula LM & Arcuri PB (2009) Protozoários ciliados do rúmen de bovinos e bubalinos alimentados com dietas suplementadas com monensina ou própolis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. **44**, 92-97.
- Rosen ED & Spiegelman BM (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* **444**, 847-853.
- Rösen P, Nawroth P, King G, Möller W, Tritschler HJ & Packer L (2001) The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American

- Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/metabolism research and reviews* **17**, 189-212.
- Santaguida P, Balion C, Hunt D, Morrison K, Gerstein H, Raina P, Booker L & Yazdi H (2005) Diagnosis, prognosis, and treatment of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose: Agency for Healthcare Research and Quality.
- Serhan CN, Chiang N & Van Dyke TE (2008) Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* **8**, 349-361.
- Shaw JE, Sicree RA & Zimmet PZ (2010) Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* **87**, 4-14.
- Smith-Palmer J, Brändle M, Trevisan R, Orsini Federici M, Liabat S & Valentine W (2014) Assessment of the association between glycemic variability and diabetes-related complications in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* **105**, 273-284.
- Sponer P, Kucera T, Brtkova J & Srot J (2013) The management of Charcot midfoot deformities in diabetic patients. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **56**, 3-8.
- Stradiotti Junior D, Queiroz AC, Lana RP, Pacheco CG, Camardelli MML, Detmann E, Eifert EC, Nunes PMM & Oliveira MVM (2004) Ação do extrato de própolis sobre a fermentação in vitro de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. *Revista Brasileira de Zootecnia* **33**, 1093-1099.
- Struijk EA, Heraclides A, Witte DR, Soedamah-Muthu SS, Geleijnse JM, Toft U & Lau CJ (2013) Dairy product intake in relation to glucose regulation indices and risk of type 2 diabetes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **23**, 822-828.
- Sun X & Zemel MB (2006) Dietary calcium regulates ROS production in aP2-agouti transgenic mice on high-fat/high-sucrose diets. *Int J Obes* **30**, 1341-1346.
- Tangvarasittichai S (2015) Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* **6**, 456-480.
- Tilton RG, Kawamura T, Chang KC, Ido Y, Bjorck RJ, Stephan CC, Brock TA & Williamson JR (1997) Vascular dysfunction induced by elevated glucose levels in rats is mediated by vascular endothelial growth factor. *The Journal of clinical investigation* **99**, 2192.
- Timmons J, Weiss W, Palmquist D & Harper W (2001) Relationships among dietary roasted soybeans, milk components, and spontaneous oxidized flavor of milk. *Journal of dairy science* **84**, 2440-2449.
- Toral PG, Frutos P, Hervas G, Gomez-Cortes P, Juarez M & de la Fuente MA (2010) Changes in milk fatty acid profile and animal performance in response to fish oil supplementation, alone or in combination with sunflower oil, in dairy ewes. *J Dairy Sci* **93**, 1604-1615.

- Tsuzuki T, Tokuyama Y, Igarashi M & Miyazawa T (2004) Tumor growth suppression by α -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation. *Carcinogenesis* **25**, 1417-1425.
- Turner RC, Millns H, Neil HAW, Stratton IM, Manley SE, Matthews DR & Holman RR (1998) *Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent diabetes mellitus: United Kingdom prospective diabetes study (UKPDS: 23)*.
- Ueda K, Ferlay A, Chabrot J, Loor J, Chilliard Y & Doreau M (2003) Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage: concentrate ratios. *Journal of Dairy Science* **86**, 3999-4007.
- Vereshchagin A & Novitskaya GV (1965) The triglyceride composition of linseed oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* **42**, 970-974.
- Weiss W, Hogan J, Todhunter D & Smith K (1997) Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. *Journal of dairy science* **80**, 1728-1737.
- Weiss W, Hogan J & Wyatt D (2009) Relative bioavailability of all-rac and RRR vitamin E based on neutrophil function and total α -tocopherol and isomer concentrations in periparturient dairy cows and their calves. *Journal of dairy science* **92**, 720-731.
- Yang S, Bu D, Wang J, Hu Z, Li D, Wei H, Zhou L & Loor J (2009) Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal* **3**, 1562-1569.
- Zemel MB & Sun X (2008) Dietary calcium and dairy products modulate oxidative and inflammatory stress in mice and humans. *J Nutr* **138**, 1047-1052.

OBJETIVOS GERAIS

- 1) Determinar o efeito do fornecimento de dietas com óleo de linhaça com adição de produtos à base de própolis, associado ou não à vitamina E, para vacas leiteiras sobre a população de protozoários e bactérias ruminais, biohidrogenação, consumo, digestibilidade ruminal e parâmetros de fermentação ruminal;
- 2) Avaliar a ingestão de leite rico em ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes sobre diversos eventos biológicos, importantes na prevenção de doenças metabólicas, em ratos diabéticos e obesos.

1 **Efeito de dietas fornecidas a vacas leiteiras com óleo de linhaça e extrato de**
2 **própolis associado ou não à vitamina E sobre a microbiota, biohidrogenação e**
3 **dinâmica ruminal**

4 (Normas: International Dairy Journal)

5
6 **Resumo**

7 Foram avaliados os efeitos de dietas com óleo de linhaça e a suplementação de
8 própolis associada ou não à vitamina E sobre o consumo, digestibilidade ruminal,
9 parâmetros de fermentação ruminal, população de protozoários e bactérias ruminais.
10 Foram utilizadas quatro vacas da raça Holandesa, com peso médio de 584 ± 52 kg,
11 multíparas, com aproximadamente 90 ± 39 dias de lactação, canuladas no rúmen e
12 distribuídas em quadrado Latino 4×4 . As dietas foram compostas de 60:40
13 volumoso:concentrado (% na MS) para as seguintes dietas: 1) controle (CON), 2) óleo
14 de linhaça, 25 g/kg na MS (OL), 3) óleo de linhaça + aditivo à base de própolis, 1,2
15 g/kg de MS (PROP), 4) óleo de linhaça + aditivo à base de própolis + vitamina E, 375
16 UI/kg de MS (PROP-E). A adição de óleo de linhaça às dietas reduziu a contagem do
17 gênero *Entodinium* ($P=0,097$) e a contagem total de protozoários ($P=0,092$) e aumentou
18 a concentração da bactéria *Butirivibrio fibrisolvens* ($P=0,008$). Todavia, as populações
19 de *Anaerovibrio lipolytica* ($P<0,001$) e *Methanobrevibacter ruminantium* ($P=0,013$)
20 foram reduzidas pela presença de óleo. Os ácidos graxos poli-insaturados provenientes
21 do óleo de linhaça foram biohidrogenados no rúmen, porém a maior parte foi
22 incorporado à gordura do leite. A adição de óleo de linhaça reduziu a quantidade de
23 matéria orgânica e carboidratos totais digeridos no rúmen e aumentou os fluxos omasal
24 de FDN ($P=0,013$) e FDA ($P=0,041$), reduzindo ($P=0,070$) a quantidade digerida de
25 FDN no rúmen. A adição de própolis associada ou não à vitamina E nas dietas resultou
26 em tendência ($P=0,090$) no aumento da concentração da *Butirivibrio fibrisolvens*, porém
27 não alteraram o fluxo omasal dos nutrientes, a concentrações de ácidos graxos de cadeia
28 curta, a cinética de sólidos no rúmen, o pH e amônia ruminal. Conclui-se que entre os
29 aditivos adicionados as dietas o maior efeito nos parâmetros avaliados foi pela a adição
30 de óleo de linhaça e tanto a própolis e a sua associação com a vitamina E nas dietas não
31 interferem sobre a ação do óleo no rúmen.

32
33 **Palavras-chave:** bactérias ruminais, flavonoides, ômega-3, protozoários ciliados

34

35 **1. Introdução**

36 Para atender aos anseios do consumidor preocupado com os nutrientes que ingere e
37 sua saúde, estudos zootécnicos têm sido realizados para enriquecer a gordura do leite,
38 melhorando ainda mais sua qualidade, ascendendo-o à classe de alimento nutracêutico.
39 O óleo de linhaça é rico em 18:3n-3 e este representa 50 a 60% do conteúdo total de
40 ácidos graxos (AG). Seu uso na suplementação de vacas leiteiras tem sido relatado por
41 elevar o conteúdo de ácido linoleico conjugado e ômega-3 no leite (Chilliard, Martin,
42 Rouel, & Doreau, 2009). No entanto, o processo de biohidrogenação no rúmen faz com
43 que a maioria dos ácidos graxos insaturados da dieta dos ruminantes converta-se em
44 saturados antes de deixar o rúmen e este processo limita o conteúdo de ácidos graxos
45 poli-insaturados (AGPI) no leite e produtos lácteos (Benchaar et al., 2012).

46 O equilíbrio da microbiota ruminal é dependente da dieta, em que os substratos
47 fermentados e a eficiência da síntese microbiana ruminal podem ser influenciados
48 fortemente por alterações na dieta (Lock, Preseault, Rico, DeLand, & Allen, 2013). A
49 adição do óleo de linhaça a dietas com objetivo de melhorar a qualidade do leite pode
50 prejudicar a fermentação ruminal e este efeito pode variar de acordo com a quantidade
51 suplementada, como observado em nível de 5,7% na dieta de vacas leiteiras, com efeito
52 na redução do consumo e a digestibilidade da matéria seca (C. Martin, Rouel, Jouany,
53 Doreau, & Chilliard, 2008).

54 Produtos naturais como a própolis têm sido estudados como alternativa aos aditivos
55 antibióticos, com intuito de provocar mudanças na microbiota que beneficiem o
56 processo de fermentação ruminal, como a diminuição da biohidrogenação. Suas
57 propriedades biológicas estão relacionadas aos flavonoides, considerados a principal
58 classe de compostos fenólicos ativos (Castro et al., 2007) e, também, aos derivados de
59 ácido cinâmico e Artepillin C (Estrada, Mendes da Silva, & Ceva Antunes, 2008).
60 Redução no crescimento da *Butyrivibrio fibrisolvens*, uma das bactérias responsáveis
61 pela biohidrogenação no rúmen, foi observado em estudos *in vitro* (Aguiar et al., 2013).
62 O uso do extrato de própolis em dieta com óleo de soja melhorou a qualidade do leite
63 pelo aumento no conteúdo de AGPI e de antioxidantes (Aguiar et al., 2014).

64 Da mesma forma, a suplementação de vitamina E em dietas ricas em AGPI, para
65 vacas leiteiras, está associada à sua ação antioxidante, que auxilia na redução dos efeitos
66 do estresse oxidativo, por meio da sua capacidade em doar hidrogênio aos radicais de
67 cadeia de propagação oxidativa (Baldi et al., 2005) e nas alterações nas vias da
68 biohidrogenação ruminal (Pottier et al., 2006). Estes últimos autores constataram que a

69 suplementação de vitamina E as dietas propiciaram aumento na produção de gordura do
70 leite com diminuição da concentração de trans-10 C18:1 e aumento de trans-11 C18:1.
71 Ainda a redução da incidência de mastite e melhora na estabilidade oxidativa do leite
72 estão associadas aos efeitos da vitamina E (Politis, Theodorou, Lampidonis, Kominakis,
73 & Baldi, 2012).

74 A suplementação concomitante de óleo de linhaça, própolis e vitamina E na dieta de
75 vacas leiteiras, além de melhorar a composição da gordura do leite, pode exercer um
76 efeito aditivo ou mesmo sinérgico sobre a população microbiana no rúmen e provocar
77 maior eficiência nos processos digestivos e nos parâmetros de fermentação ruminal.
78 Desta forma, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação de própolis associado ou
79 não à vitamina E em dietas com óleo de linhaça fornecidas a vacas leiteiras, sobre a
80 população de protozoários e bactérias ruminais, biohidrogenação, consumo,
81 digestibilidade ruminal e parâmetros de fermentação ruminal.

82

83 **2. Material e Métodos**

84 *2.1. Animais, dietas e procedimentos experimentais*

85 O experimento cumpriu as orientações do Comitê de ética para o Uso de Animais
86 em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (Maringá, PR), na Fazenda
87 Experimental de Iguatemi, sob número de aprovação 111/2012. Quatro vacas da raça
88 Holandesa, lactantes, portadoras de cânulas ruminais, com peso corporal (PC) médio de
89 584 ± 52 kg e com 90 ± 39 dias de lactação foram distribuídas em um quadrado Latino
90 4×4 . Cada período experimental teve duração de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação e 7
91 dias de coleta de dados. As vacas foram alojadas em baias *tie stall*, com livre acesso à
92 água e ordenhadas diariamente, duas vezes ao dia (06h:30 e 15h:00).

93 As dietas foram formuladas para atender às exigências nutricionais de vacas leiteiras
94 com média de 550 kg de PC e produção de leite 30 kg/dia, com 35 g/kg de gordura
95 (NRC, 2001). A dieta basal (Tabela 1) foi composta de 60% de volumoso (silagem de
96 milho) e de 40% de concentrado (composto por farelo de soja, fubá de milho, farelo de
97 trigo, uréia e suplemento mineral). Os tratamentos foram: controle (CON); óleo de
98 linhaça, 25 g/kg MS (OL); óleo de linhaça + aditivo à base de própolis, 10 mg de
99 flavonoides/kg de MS (PROP); óleo de linhaça + aditivo à base de própolis + vitamina
100 E, 375 UI/kg de MS (PROP-E).

101

102 Tabela 1 - Ingredientes e composição da dieta controle (CON) e dieta com óleo de
103 linhaça (OL)

Item	COM		OL	
Composição da ração (g.kg ⁻¹ MS)				
Silagem de milho	600,0		600,0	
Milho moído	160,0		99,0	
Farelo de soja (48% 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 ^a	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 ^b	CON	OL	EPM	P
MS (g.kg ⁻¹ matéria natural)	568,7	574,1	2,338	0,288
Matéria orgânica (g.kg ⁻¹ MS)	935,4	939,2	1,139	0,898
Proteína bruta (g.kg ⁻¹ MS)	141,4	143,7	1,224	0,400
Extrato etéreo (g.kg ⁻¹ MS)	22,8	47,1	4,612	<0,001
FDN(g.kg ⁻¹ MS)	402,0	406,0	5,756	0,759
FDA(g.kg ⁻¹ MS)	209,5	210,0	1,902	0,902
NDT (g.kg ⁻¹ MS)	667,6	702,4	8,112	0,134
Ácidos graxos (g.kg ⁻¹ MS)				
16:0	4,00	5,59	0,345	0,005
16:1	0,16	0,43	0,173	0,487
18:0	0,85	2,05	0,231	<0,001
18:1n-9	5,40	10,08	0,943	0,001
18:1n-7	0,27	0,34	0,279	0,275
18:2n-6	7,54	11,28	0,727	<0,001
18:3n-3	1,43	15,35	2,635	<0,001
Soma	19,66	45,11	4,866	<0,001
n6/n3	5,27	0,73	0,222	<0,001
AGS	4,85	7,63	0,564	0,001
AGMI	5,84	10,84	1,066	0,003
AGPI	8,97	26,64	3,350	<0,001

104 ^aContém (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,
105 Fe 2000 mg, I 40 mg, Mn 1350 mg, Se 15 mg, F 510 mg, Zn 1700 mg.

106 ^bMédia das amostras compostas preparadas de cinco amostras diárias coletadas a partir do dia 15 ao 19 de
107 cada período experimental, MS = matéria seca, PB = proteína bruta, FDN = fibra em detergente neutro
108 sem cinza residual, FDA = fibra em detergente ácido sem cinza residual, NDT calculado (Weiss, 1999) =
109 nutrientes digestíveis totais.

110

111 Amostras de própolis bruta foram obtidas do apiário da Fazenda Experimental de
112 Iguatemi e o produto à base de própolis foi preparado de acordo com Franco & Bueno

113 (1999) O produto contém extrato de própolis seco e está registrado no Instituto Nacional
 114 da Propriedade Industrial-Brasil como LLOS, sob o n. 0605768-3. O produto à base de
 115 própolis foi preparado por uma extração hidroalcoólica da própolis bruta, em seguida, o
 116 álcool foi evaporado (Büchi R210, São Paulo, SP, Brasil) e o extrato foi seco (Labmaq
 117 MSD 1, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Uma quantidade de milho moído foi adicionada ao
 118 produto de própolis para facilitar o fornecimento aos animais. O PBP utilizado foi o
 119 LLOS B1 (concentração B de própolis e teor alcoólico 1) e a quantificação de
 120 compostos fenólicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (Tabela
 121 2). A vitamina E fornecida foi o all-*rac*-alpha-tocopherylacetate (Microvit E Promix
 122 500.000 UI/kg, Adisseo, São Paulo, SP, Brasil).

123

124 Tabela 2 – Composição de compostos fenólicos do produto à base de própolis e dos
 125 alimentos da dieta

Item	Concentração (mg/g)
Própolis	
Ácido cafeico	0,83 ± 0,01
Ácido chicórico	6,53 ± 0,04
Ácido p-cumárico	2,20 ± 0,05
Artepillin C	2,44 ± 0,01
Flavonoides (equivalente quercetina)	1,25 ± 0,26
Ácidos fenólicos totais (equivalente ácido p-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*	1,14 ± 0,03

126 *(Siger, NOGALA-KALUCKA, & LAMPART-SZCZAPA, 2008).

127

128 O óleo de linhaça foi misturado ao concentrado previamente ao fornecimento
 129 diariamente, sendo a alimentação realizada individualmente (07:00 e 16:00 horas) e
 130 consumo ajustado para manutenção das sobras em 10% do valor fornecido. A própolis e
 131 a vitamina E foram pesados em papel higroscópico e colocados diretamente no rúmen
 132 no mesmo horário da alimentação.

133 Para estimar o fluxo omasal utilizou-se o indicador externo dióxido de titânio (TiO₂)
 134 fornecido em dose diária de 20 gramas, divididos igualmente na alimentação da manhã
 135 e tarde, a partir do oitavo dia de cada período experimental. Do décimo quinto ao
 136 décimo nono dia de cada período experimental foram coletadas amostras de alimentos,
 137 sobras e conteúdo omasal que foram armazenadas a -20°C. A coleta de digesta omasal

138 foi realizada por sucção do conteúdo omasal segundo Huhtanen et al. (1997), na qual
139 cerca de 500 mL foram amostrados em dias consecutivos com uma coleta por dia nos
140 horários 08:00, 11:00, 14:00, 17:00 e 20:00 horas, totalizando 5 amostras por animal em
141 cada período. As amostras de alimentos, sobras e digesta omasal foram secas a 55°C por
142 72 horas e moídas a 1 mm em moinho Wiley (Marconi MA340, Piracicaba, SP) e
143 compostas por período e por período/animal para posterior análise, respectivamente.

144 Amostragens de líquido ruminal foram realizadas no vigésimo dia nos tempos 0, 2,
145 4, 6 e 8 horas após a alimentação da manhã. O pH foi mensurado imediatamente após
146 coleta com uso de um potenciômetro (Tecnal Tec-5, Piracicaba, SP, Brasil), em seguida
147 uma alíquota do líquido ruminal (50 mL) foi adicionada de 1 mL de ácido sulfúrico
148 (500:500, v/v) para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), e
149 uma outra alíquota (50 mL), sem adição de ácido, para determinação dos ácidos graxos
150 de cadeia curta (AGCC). Todas as amostras foram armazenadas a -20°C.

151 A dinâmica da fase sólida no trato gastrointestinal foi estimada com indicador
152 externo cromo mordente na fibra (Cr-FDN), fixado a parece celular da silagem de
153 milho, de acordo com a técnica descrita por (Uden, Colucci, & Van Soest, 1980). Para
154 determinar a curva de excreção de cromo, foi introduzida uma única amostra marcada
155 de silagem (100 g) diretamente no rúmen, via cânula ruminal, antes da primeira
156 alimentação no décimo quinto dia de cada período experimental. Após este
157 procedimento, foi iniciada a coleta de aproximadamente 100 g de fezes, durante um
158 período de cinco dias, nos seguintes horários: 0, 6, 12, 16, 24, 30, 36, 48, 72, 96, e 120
159 horas, totalizando 11 amostras por animal em cada período.

160

161 2.1.1. *Contagem de protozoários*

162 O conteúdo ruminal para a contagem de protozoários foi coletado no décimo oitavo
163 e décimo nono dia de cada período, antes do fornecimento da dieta. As amostras foram
164 coletadas da porção dorsal anterior, ventral anterior, ventral médio, dorsal posterior e
165 ventral posterior de forma a obter uma amostra representativa do rúmen. Após a
166 amostragem o conteúdo foi filtrado com quatro camadas gazes e espremido
167 manualmente. Aproximadamente 10 mL do conteúdo ruminal foi armazenado com
168 adição de igual volume de solução de formol (18,5%). As amostras foram armazenadas
169 em temperatura ambiente na ausência de luz até o momento da contagem. A contagem
170 diferencial da população de protozoários ciliados no rúmen foi realizada por

171 microscopia em câmara de contagem Neubauer (Blaubrand[®], 0,1 mm de profundidade)
172 segundo a técnica descrita por Dehority (1993).

173

174 2.1.2. Identificação e quantificação das bactérias ruminais

175 A coleta do conteúdo ruminal para a identificação e quantificação das bactérias
176 ocorreu no vigésimo primeiro dia, nos tempos 0, 3 e 6 horas após a alimentação da
177 manhã. Foram coletados líquido e conteúdo ruminal de forma a obter uma amostra
178 representativa do rúmen, semelhante à utilizada para contagem de protozoários. Este
179 material foi misturado em um liquidificador industrial por 30 segundos em alta
180 velocidade, e logo após foi filtrado em quatro camadas de gaze intercalada em algodão.

181 O DNA genômico das cepas bacterianas ruminais, foi extraído pelo método de
182 Ezaki et al., (1982), no qual 10 mL do líquido ruminal foi peletizada por centrifugação
183 (5000 x g, 5 min) e ressuspensa em 3 mL de 5 mM EDTA (pH 8,0). As células foram
184 tratadas com acromopeptidase (concentração final de 1mg/mL) e lisada pela adição de
185 300 µL de SDS 20%. Logo após foi feita incubação a 55°C por 30 min, 3 mL de fenol
186 tamponado (Tris-EDTA) (pH 8,0) foi adicionado. O material foi centrifugado a 10000 ×
187 g por 10 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um tubo
188 limpo, e o DNA extraído com fenol e precipitado com isopropanol. O ácido nucleico foi
189 dissolvido em tampão TE e tratados com RNase livre de DNase. O DNA precipitado
190 com isopropanol foi lavado com etanol 70%, seco ao ar e dissolvido em tampão TE
191 estéril, estocado a 4°C. Os primers para a identificação das cepas bacterianas,
192 *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Anaerovibrio lipolytica*, *Methanobrevibacter ruminantium*
193 foram os apresentados por Tajima et al. (2001). Um volume final de 25 µL contendo
194 200 µL de cada DNTP, 12,5 ng de DNA, 1,5 U Taq DNA polimerase e 300 nM de cada
195 primer foi amplificado considerando: um ciclo de desnaturação a 95°C por 3 min, 35
196 ciclos a 95°C por 3 segundos (s), várias temperaturas de anelamento por 30 s e uma
197 extensão final de 72°C por um min. Os produtos de PCR foram avaliados em géis de
198 agarose corados em solução de brometo de etídeo (0,5µg/mL) e visualizados em
199 transiluminador ultravioleta, sendo as imagens capturas por um sistema da EDAS
200 (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

201 Para quantificação das bactérias ruminais por PCR em tempo real, foi utilizado o
202 corante fluorescente SYBR GREEN SYBR[®] GREEN PCR Máster Mix (Applied
203 Biosystems, USA). As análises de PCR em tempo real foram realizadas no aparelho
204 StepOnePlus v.2.2 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Todas as reações foram

205 submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de
206 referência passiva ROX Reference Dye (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), para correção
207 de flutuações na leitura decorrentes das variações de volume e evaporação ao longo da
208 reação.

209

210 2.2. Análises químicas

211 A matéria seca (MS) foi determinada em estufa de ventilação forçada de acordo com
212 o procedimento de 934.01 (AOAC, 1990). A matéria orgânica (MO) foi determinada
213 por diferença das cinzas, que foram determinadas por combustão a 600°C por 6 horas de
214 acordo com o método da AOAC 924.05 (1990). A determinação da proteína bruta (PB)
215 seguiu o procedimento 990.03 da AOAC (1990) (Tecnal TE-036/1, Piracicaba, SP). As
216 concentrações de fibra em detergente neutro (FDN), com correção do teor de nitrogênio
217 e cinzas, foram medidas de acordo com Mertens (2002) com uso de α amilase
218 termoestável, sem sulfito de sódio. As concentrações de fibra em detergente ácido
219 (FDA), sem correção do teor de cinzas, foram determinadas de acordo com o
220 procedimento 973.18 AOAC (1990). O extrato etéreo (EE) foi determinado (Tecnal TE-
221 044/1, Piracicaba, SP) de acordo com o método de 7.060 AOAC (1990). Os nutrientes
222 digestíveis totais (NDT) das dietas foram calculados com uso da equação: $\text{NDT (g/kg)} =$
223 $\text{CNF digestível} + \text{PB digestível} + \text{FDNa digestível} + (\text{EE digestível} \times 2,25)$, assim como
224 carboidratos não fibrosos, $\text{CNF (g/kg)} = 100 - (\text{PB (g/kg)} + \text{FDNa (g/kg)} + \text{EE (g/kg)} +$
225 $\text{cinzas (g/kg)})$, ambas as equações descritas por (Weiss, 1999).

226 Os lipídios totais em amostras de rações foram extraídos de acordo com (Bligh &
227 Dyer (1959), com clorofórmio, metanol e água (2:2:1,8). Os ésteres metílicos de ácidos
228 graxos (AG) foram preparados segundo o procedimento de Hartman & Lago (1973),
229 modificado por E. L. Maia & Rodriguez-Amaya (1993). Os ácidos graxos foram
230 analisados por um cromatógrafo a gás (Thermo, Trace GC Ultra 3300, Waltham, MA,
231 EUA), equipado com um amostrador automático TriPlus, com um detector de ionização
232 de chama e uma coluna capilar de sílica fundida (Select FAME CP-7420, 100 m, 0,25
233 mm d.i. e 0,39 mM, 100% cyanopropyl) (C. A. Martin, de Oliveira, Visentainer,
234 Matsushita, & de Souza, 2008). O fluxo de gases (White Martins, Osasco, SP, Brasil)
235 foram de 1,2 mL/min para o gás de transporte (H_2), 30 mL/min para o gás auxiliar (N_2),
236 35 mL/min e 350 mL/min para o H_2 e o gás sintético, respectivamente. Os volumes de
237 injeção foram 2 μL , utilizando uma razão de divisão da amostra (split) de 1:80. As
238 temperaturas do injetor e do detector eram de 200°C e 240°C, respectivamente. A

239 temperatura da coluna foi programada a 65°C durante 4 minutos, seguida por uma
240 primeira rampa de 16°C/min até 185°C, mantida por 12 minutos. Uma segunda rampa
241 foi programada de 20°C/min a 235°C, mantida a esta temperatura durante 9 minutos. O
242 tempo total de análise foi de 35 minutos. As áreas dos picos foram determinadas pelo
243 software ChromQuest, versão 5.0. A identificação de AG foi baseada na comparação
244 dos tempos de retenção com os de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos
245 (Sigma- Aldrich, Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

246 A quantificação absoluta dos ácidos graxos foi realizada por normalização interna, e
247 uso como padrão o éster metílico de tricosanoico (23:0) (Sigma-Aldrich Brasil, SP, SP,
248 Brasil). Os cálculos foram efetuados de acordo com o método de (Joseph & Ackman,
249 1992). Fatores de correção teóricos (Visentainer, 2012) foram utilizados para determinar
250 as concentrações.

251 A determinação dos teores de TiO₂ na digesta omasal seguiu-se técnica descrita por
252 (Myers, Ludden, Nayigihugu, & Hess, 2004), com digestão em ácido sulfúrico
253 concentrado por duas horas, seguido de adição de peróxido de hidrogênio (300:1000,
254 v/v). A absorbância foi medida a 410 nm (Shimadzu UV-1601, São Paulo, SP), as
255 concentrações de TiO₂ nas amostras foram determinadas com uso de uma equação
256 estimada por uma curva padrão obtida pela análise de TiO₂ padrão. O fluxo de omasal
257 foi calculado como a razão entre a quantidade fornecida de dióxido de titânio e
258 concentração de dióxido de titânio no conteúdo omasal. A quantidade digerida de
259 matéria seca e dos nutrientes foi calculada pela diferença entre o ingerido e o fluxo
260 omasal.

261 A determinação das concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) em líquido
262 ruminal foi realizada por destilação com hidróxido de potássio (2N) de acordo com o
263 método descrito por (Preston, 1995). Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foram
264 determinados segundo a técnica descrita por (Palmquist & Conrad, 1971), utilizando
265 cromatógrafo gasoso (SHIMADZU, modelo GC-2014) com injetor automático modelo
266 AOC - 20i (volume injetado, 1 µL), com uma coluna HP INNOWax - 19091N (30m de
267 comprimento; 0,32 mm ID; 0,50 µm de filme), acoplado a um integrador e um
268 microcomputador. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste na vazão de 3,18
269 mL/min. As temperaturas de operação foram: injetor 220°C, detector de ionização de
270 chama 250°C, temperatura inicial da coluna: 80°C, por 3 minutos; seguida de uma
271 rampa de aquecimento com aumento de 20°C por minuto até atingir 240°C.

272 A concentração de cromo nas fezes foi determinada por espectrometria de absorção
273 atômica, conforme técnica descrita por Williams, David, & Iismaa (1962). O ajuste
274 matemático da curva de concentração de cromo nas fezes foi feito pelo modelo
275 bicompartimental de (Grofum & Phillips, 1973) e os cálculos dos parâmetros da
276 dinâmica da fase sólida foram realizados de acordo as equações propostas por Colucci,
277 MacLeod, Grofum, McMillan, & Barney (1990): $TRR = 1/k_1$, $TRPR = 1/k_2$, $TMRT =$
278 $TRR + TRPR + TT$, em que: TRR (h) equivale ao tempo de retenção no rúmen-retículo;
279 TRPR (h), tempo de retenção pós rúmen; K1 (%/h), a taxa de passagem de partículas no
280 rúmen-retículo; K2 (%/h), taxa de passagem de partículas pós-rúmen; TMRT (h), tempo
281 médio de retenção total e TT (h) corresponde ao tempo de trânsito.

282

283 2.3. Análises estatísticas

284 O delineamento experimental utilizado foi um quadrado Latino 4×4 . As variáveis
285 foram submetidas à análise de variância usando o procedimento GLM do SAS
286 (Statistical Analysis System, versão 9.0) segundo modelo geral: $Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k +$
287 e_{ijk} , em que: Y_{ijk} = variáveis observadas; μ = média geral, A_i = efeito do animal I, de 1 a
288 4; P_j = efeito do período j, de 1 a 4; T_k = efeito do tratamento k, de 1 a 4; e_{ijk} = erro
289 aleatório. Todos os efeitos foram considerados fixos, exceto o efeito de animal que foi
290 considerado aleatório. Contrastes ortogonais foram utilizados para comparar os efeitos
291 de: 1) Efeito do óleo de linhaça (CON vs OL, PROP e PROP-E), 2) efeito antioxidante
292 (OL vs PROP e PROP-E), e 3) efeito da associação dos antioxidante, própolis e
293 vitamina E (PROP vs PROP-E). A significância foi considerada em $P < 0,05$ e
294 tendências foram aceitas em $P \leq 0,10$.

295 Foi realizada a interação entre tratamento e horário de coleta para os parâmetros pH
296 e $N-NH_3$, por meio do PROC MIXED do SAS para medidas repetidas no tempo, com a
297 subdivisão das parcelas experimentais em função do tempo de amostragem.

298

299 3. Resultados

300 Pelo teste de contraste ortogonais, os efeitos do óleo de linhaça, da adição de
301 própolis e o efeito associativo da própolis com vitamina E sobre a microbiota e
302 dinâmica ruminal, verificou-se que a adição de óleo de linhaça teve maior influência
303 quando adicionada em dietas de vacas leiteiras.

304 Foi identificada a presença de protozoários ciliados dos gêneros *Entodinium* e
305 *Isotricha* no rúmen das vacas leiteiras (Tabela 3). Enquanto, os gêneros *Epidinium*,

306 *Dasytricha*, *Charonina* e da subfamília Diplodiniinae não foram observados. O gênero
 307 *Entodinium* foi o mais representativo na totalidade, com média de 95,69% e esta
 308 distribuição proporcional não foi alterada pelas dietas ($P>0,10$). Porém com o
 309 fornecimento de óleo de linhaça houve uma tendência em reduzir a contagem do gênero
 310 *Entodinium* ($P=0,097$) e conseqüentemente a contagem total ($P=0,092$). A adição da
 311 própolis associada ou não a vitamina E não apresentou efeito na contagem de
 312 protozoários ciliados no rúmen.

313

314 Tabela 3 – Contagem de protozoários ciliados do rúmen em vacas leiteiras
 315 suplementadas com óleo de linhaça e adição de própolis associada ou não à vitamina E

Parâmetros	Dietas ¹				EPM	Contrastes ortogonais ²		
	CON	OL	PROP	PROP-E		1	2	3
	Nx10 ⁵ ciliates/mL							
<i>Entodinium</i>	4,89	3,73	4,10	3,03	0,403	0,097	0,813	0,226
<i>Isotricha</i>	0,02	0,01	0,01	0,01	0,004	0,143	0,879	0,792
Total	4,92	3,74	4,11	3,03	0,405	0,092	0,814	0,222
	% Total							
<i>Entodinium</i>	99,58	99,83	99,76	99,6	0,111	0,633	0,635	0,678
<i>Isotricha</i>	0,41	0,16	0,24	0,39	0,111	0,633	0,635	0,678

316 ¹CON, controle; OL, dieta com óleo de linhaça; PROP, dieta com óleo de linhaça e própolis; PROP-E,
 317 dieta com óleo de linhaça, própolis e vitamina E. ²Probabilidade de contrastes ortogonais significativos.
 318 Os efeitos testados usando contrastes ortogonais foram 1) C vs. OL, PROP e PROP-E, 2) OL vs. PROP e
 319 PROP-E, e 3) PROP vs. PROP-E.

320

321 As bactérias *Butirivibrio fibrisolvens*, *Anaerovibrio lipolytica* e *Methanobrevibacter*
 322 *ruminantium* foram identificadas e quantificadas (Tabela 4). O óleo de linhaça
 323 favoreceu maior concentração da bactéria *Butirivibrio fibrisolvens* ($P=0,008$) e reduziu
 324 as populações de *Anaerovibrio lipolytica* ($P<0,001$) e *Methanobrevibacter ruminantium*
 325 ($P<0,05$). A própolis apresentou tendência em aumentar ($P=0,090$) a concentração da
 326 cepa *Butirivibrio fibrisolvens* no líquido ruminal. A associação da Vitamina E com a
 327 própolis não influenciou ($P>0,100$) a concentração das cepas bacterianas estudadas.

328 Verificou-se que a síntese *de novo* ($P=0,081$) no leite foi diminuída e a quantidade
 329 de AGPI ($P=0,012$) foi aumentada com a presença de óleo de linhaça na dieta em
 330 relação à dieta controle (Tabela 5).

331 Apesar dos tratamentos não influenciarem ($P>0,10$) o consumo e quantidade de MS
 332 digerida no rúmen, a presença de óleo de linhaça nas dietas em comparação à dieta
 333 controle - sem adição de óleo, aumentou ($P<0,05$) os fluxos de MS, MO, EE, FDN,
 334 FDA e CT no omaso, contudo sem alterar o fluxo omasal da PB e CNF (Tabela 6).

335 Tabela 4 – Populações de bactérias ruminais ($\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), *Butirivibrio fibrisolvens*,
 336 *Anaerovibrio lipolytica* e *Methanobrevibacter ruminantium* em vacas leiteiras
 337 suplementadas com óleo de linhaça e adição de própolis associada ou não à vitamina E

Parâmetros	Dietas ¹				EPM	Contrastes ortogonais ²		
	CON	OL	PROP	PROP-E		1	2	3
<i>A. lipolytica</i>	1,120	0,212	0,077	0,063	0,132	<0,001	0,417	0,941
<i>B. fibrisolvens</i>	1,039	1,915	2,603	2,799	0,276	0,008	0,090	0,679
<i>M. ruminantium</i>	0,244	0,088	0,097	0,038	0,026	0,013	0,718	0,366

338 ¹CON, controle; OL, dieta com óleo de linhaça; PROP, dieta com óleo de linhaça e própolis; PROP-E,
 339 dieta com óleo de linhaça, própolis e vitamina E. ²Probabilidade de contrastes ortogonais significativos.
 340 Os efeitos testados usando contrastes ortogonais foram 1) C vs. OL, PROP e PROP-E, 2) OL vs. PROP e
 341 PROP-E, e 3) PROP vs. PROP-E.
 342

343 O aumento do fluxo de MO para o omaso com a adição de óleo de linhaça reduziu
 344 ($P=0,014$) a quantidade de matéria orgânica digerida no rúmen (em média de $1,3 \text{ kg}\cdot\text{dia}^{-1}$)
 345 ¹) em comparação a dieta controle. Em relação à fração fibrosa das dietas, o óleo de
 346 linhaça aumentou o fluxo omasal de FDN ($P=0,013$) e FDA ($P=0,041$) e apresentou
 347 tendência em reduzir ($P=0,070$) a quantidade de FDN digerida no rúmen,
 348 comportamento semelhante à MO, foi observado para os CT, a presença de óleo
 349 diminuiu o consumo ($P=0,046$), aumentou o fluxo omasal ($P=0,013$) e reduziu
 350 ($P=0,018$) a quantidade de CT digerida no rúmen. A adição de óleo de linhaça
 351 aumentou o consumo de EE ($P<0,001$), e o fluxo omasal ($P=0,008$), porém aumentou a
 352 quantidade de EE digerida no rúmen ($P<0,001$).

353 Os parâmetros ruminais, pH, N-NH₃ e AGCC, não apresentaram efeito da interação
 354 entre tratamento e horário de coleta (Tabela 7), mas apresentaram efeito do tempo de
 355 coleta (Figura 1). O pH ruminal apresentou comportamento quadrático ($\text{pH} = 0,036\text{h}^2 -$
 356 $0,383\text{h} + 6,786$, $R^2 = 0,974$) em função do tempo de coleta e o valor mínimo estimado
 357 foi de 5,77 no tempo de 5,32 horas após a alimentação. Os valores observados para a
 358 concentração de N-NH₃ mostrou comportamento cúbico ($\text{N-NH}_3 = 0,214\text{h}^3 - 2,940\text{h}^2 +$
 359 $9,735\text{h} + 4,929$, $R^2 = 0,931$), e os valores estimados para máxima e mínima
 360 concentração de N-NH₃ foram de 14,40 e 2,42 (mmol/L) e ocorreram nos horários 2,17
 361 e 6,99 horas, respectivamente.

362 A concentração dos principais ácidos graxos de cadeia curta produzidos no rúmen e
 363 a produção dos ácidos graxos de cadeia ramificada, isobutírico, isovalerato e o valerato,
 364 oriundos da deaminação dos aminoácidos como valina e leucina, foram semelhantes
 365 entre os tratamentos (Tabela 7). A razão acetato:propionato, apresentou valor médio de
 366 2,86:1. Os parâmetros de dinâmica da fase sólida não foram influenciados ($P>0,05$)
 367 pelos tratamentos (Tabela 8).

368 Tabela 5 – Produção de ácidos graxos da gordura do leite (g/dia) de vacas leiteiras
 369 suplementadas com óleo de linhaça e adição de própolis associada ou não à vitamina E

Item	Dietas ¹				EPM	P ²		
	CON	OL	PROP	PROP-E		1	2	3
4:0	5,02	5,80	4,93	5,11	0,275	0,725	0,339	0,844
6:0	7,31	6,44	5,46	5,93	0,425	0,175	0,459	0,679
8:0	7,06	5,62	4,86	4,99	0,465	0,074	0,485	0,906
10:0	20,84	15,14	12,52	12,83	1,481	0,028	0,400	0,924
12:0	25,34	18,37	15,90	17,06	1,689	0,030	0,565	0,757
13:0	0,87	0,58	0,48	0,66	0,090	0,110	0,949	0,397
13:1n5	0,76	0,63	0,58	0,65	0,044	0,253	0,878	0,612
14:0	83,14	70,58	62,82	66,96	4,377	0,097	0,542	0,698
14:1n9	7,37	5,81	5,16	5,31	0,576	0,033	0,479	0,866
14:1n7	2,06	2,06	1,83	2,09	0,132	0,793	0,748	0,458
14:1n5	4,32	4,57	4,02	4,22	0,233	0,931	0,468	0,767
15:0	8,75	6,80	5,98	7,11	0,651	0,132	0,853	0,476
15:1n5	1,67	1,74	1,76	1,66	0,133	0,809	0,906	0,745
16:0	210,14	165,00	149,19	150,01	9,103	0,023	0,457	0,972
16:1n9	9,44	7,33	6,42	6,41	0,433	0,007	0,252	0,988
16:1n7	4,26	4,29	3,98	4,09	0,217	0,782	0,636	0,857
16:1n5	3,81	3,85	3,68	3,53	0,176	0,813	0,662	0,809
17:0	4,17	3,68	3,52	3,72	0,240	0,366	0,916	0,785
17:1n7	1,63	1,39	1,31	1,35	0,091	0,201	0,759	0,896
18:0	59,36	87,88	83,13	91,06	4,758	0,051	0,951	0,596
18:1n9 ^t	9,26	17,37	17,35	18,82	1,243	0,001	0,692	0,484
18:1n9	124,71	174,64	158,31	170,52	8,386	0,074	0,647	0,636
18:2n6	15,44	18,68	17,07	18,57	0,760	0,145	0,630	0,472
18:3n3	1,90	8,28	7,97	7,86	0,728	<0,001	0,600	0,890
18:2c9,t11	2,72	3,34	3,23	3,52	0,143	0,097	0,909	0,491
18:2c12,t10	0,76	0,83	0,77	0,86	0,033	0,597	0,880	0,509
20:3n6	0,36	0,28	0,24	0,24	0,023	0,075	0,572	0,968
20:4n6	0,78	0,63	0,58	0,58	0,042	0,124	0,668	0,984
CLA	3,49	4,16	4,00	4,38	0,159	0,133	0,963	0,467
n6/n3	6,28	1,85	1,56	1,83	0,547	<0,001	0,782	0,688
AGS	432,77	386,53	349,36	366,09	18,505	0,211	0,582	0,780
AGMI	169,30	223,69	204,39	218,66	9,884	0,111	0,659	0,655
AGPI	21,97	32,02	29,85	31,63	1,467	0,012	0,658	0,598
De novo ³	174,51	144,14	126,28	134,60	9,866	0,081	0,519	0,731
Preformed ⁴	221,11	316,99	293,47	317,09	15,062	0,048	0,767	0,608

370 ¹CON, controle; OL, dieta com óleo de linhaça; PROP, dieta com óleo de linhaça e própolis; PROP-E,
 371 dieta com óleo de linhaça, própolis e vitamina E. ²Probabilidade de contrastes ortogonais significativos,
 372 Os efeitos testados usando contrastes ortogonais foram 1) C vs, OL, PROP e PROP-E, 2) OL vs, PROP e
 373 PROP-E, e 3) PROP vs, PROP-E. ³De novo, AG originado pela síntese de novo na glândula mamária,
 374 calculado pela soma de todos AG com <16 carbonos (Lock et al., 2013). ⁴Preformed, AG originado da
 375 extração do plasma, calculado pela soma de todos AG >16 carbonos (Lock et al., 2013).

376

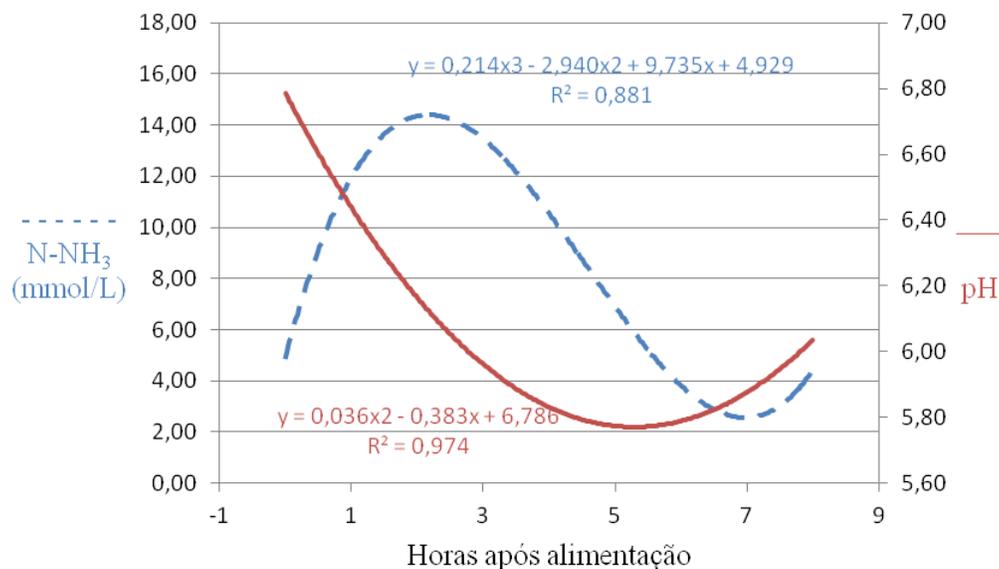
377 Tabela 6 – Consumo, fluxo omasal e digerido no rúmen (kg.dia⁻¹) da matéria seca e
 378 nutrientes obtidos de vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça e adição de
 379 própolis associada ou não à vitamina E

Parâmetros	Dietas ¹				EPM	Contrastes ortogonais ²		
	CON	OL	PROP	PROP-E		1	2	3
	Matéria seca							
Consumo	19,64	19,32	19,61	19,35	0,435	0,589	0,710	0,597
Fluxo omasal	10,01	10,96	11,01	11,12	0,629	0,014	0,732	0,769
Digerido	9,63	8,36	8,60	8,22	0,398	0,105	0,944	0,653
	Matéria orgânica							
Consumo	18,32	17,51	17,81	17,55	0,410	0,094	0,661	0,570
Fluxo omasal	8,10	8,90	8,91	9,14	0,513	0,016	0,671	0,477
Digerido	10,22	8,61	8,91	8,40	0,354	0,035	0,944	0,507
	Proteína Bruta							
Consumo	2,99	3,03	3,00	2,99	0,075	0,593	0,472	0,959
Fluxo omasal	2,33	2,40	2,35	2,37	0,145	0,652	0,684	0,839
Digerido	0,65	0,63	0,65	0,62	0,100	0,860	0,975	0,843
	Extrato Etéreo							
Consumo	0,46	0,97	0,93	0,97	0,061	<0,001	0,649	0,290
Fluxo omasal	0,40	0,58	0,53	0,61	0,053	0,008	0,882	0,259
Digerido	0,06	0,39	0,40	0,36	0,051	<0,001	0,774	0,352
	Fibra em detergente neutro							
Consumo	7,55	7,41	7,62	7,49	0,196	0,864	0,510	0,608
Fluxo omasal	3,09	3,63	3,59	3,84	0,216	0,013	0,656	0,279
Digerido	4,46	3,78	4,03	3,65	0,199	0,070	0,857	0,317
	Fibra em detergente ácido							
Consumo	3,88	3,78	3,89	3,83	0,092	0,714	0,523	0,667
Fluxo omasal	1,85	2,22	2,12	2,29	0,126	0,041	0,901	0,332
Digerido	2,03	1,56	1,78	1,54	0,110	0,105	0,673	0,392
	Carboidratos totais							
Consumo	13,79	13,01	13,19	13,12	0,562	0,046	0,624	0,841
Fluxo omasal	5,37	5,92	6,01	6,17	0,333	0,013	0,437	0,539
Digerido	8,42	7,09	7,18	6,96	0,620	0,018	0,970	0,692
	Carboidratos não fibrosos							
Consumo	6,86	6,67	6,77	6,66	0,187	0,658	0,898	0,788
Fluxo omasal	2,28	2,30	2,42	2,32	0,143	0,639	0,608	0,568
Digerido	4,58	4,37	4,35	4,33	0,207	0,601	0,947	0,977

380 ¹CON, controle; OL, dieta com óleo de linhaça; PROP, dieta com óleo de linhaça e própolis; PROP-E,
 381 dieta com óleo de linhaça, própolis e vitamina E. ²Probabilidade de contrastes ortogonais significativos,
 382 Os efeitos testados usando contrastes ortogonais foram 1) C vs, OL, PROP e PROP-E, 2) OL vs, PROP e
 383 PROP-E, e 3) PROP vs, PROP-E.

384

385



386

387 Figura 1 – Concentração de nitrogênio amoniacal e pH no fluido ruminal de vacas
 388 leiteiras suplementadas com óleo de linhaça e adição de própolis associada ou não à
 389 vitamina E

390

391 Tabela 7 – Produção de ácidos graxos de cadeia curta (mmol/L) no fluido ruminal de
 392 vacas leiteiras suplementadas com óleo de linhaça e adição de própolis associada ou não
 393 à vitamina E

Parâmetros	Dieta ¹				EPM	Contrastes ortogonais ²		
	CON	OL	PROP	PROP-E		1	2	3
Acetato	84,25	83,34	83,75	82,11	1,488	0,709	0,902	0,675
Propionato	29,98	30,14	29,37	30,27	0,833	0,982	0,893	0,743
Isobutirato	0,49	0,59	0,54	0,48	0,036	0,565	0,329	0,540
Butirato	13,49	13,11	12,86	12,67	0,266	0,450	0,679	0,839
Isovalerato	1,78	1,98	1,91	1,98	0,100	0,378	0,890	0,762
Valerato	1,89	1,91	1,91	1,99	0,083	0,823	0,860	0,746
Total AGCC	131,89	131,07	130,33	129,49	2,372	0,777	0,845	0,902
A:P ¹	2,88	2,84	2,89	2,83	0,061	0,875	0,886	0,766

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

¹CON, controle; OL, dieta com óleo de linhaça; PROP, dieta com óleo de linhaça e própolis; PROP-E, dieta com óleo de linhaça, própolis e vitamina E. ²Probabilidade de contrastes ortogonais significativos. Os efeitos testados usando contrastes ortogonais foram 1) C vs. OL, PROP e PROP-E, 2) OL vs. PROP e PROP-E, e 3) PROP vs. PROP-E. ¹Razão acetato:propionato

404 Tabela 8 – Cinética de sólidos no rúmen em vacas leiteiras suplementadas com óleo de
405 linhaça e adição de própolis ou própolis associada com vitamina E

Parâmetros ¹	Dieta ²				EPM	Contrastes ortogonais ³		
	CON	OL	PROP	PROP-E		1	2	3
k1, h ⁻¹	0,025	0,026	0,026	0,027	<0,001	0,504	0,701	0,620
k2, h ⁻¹	0,117	0,116	0,116	0,119	0,002	0,979	0,836	0,794
TRRR, horas	39,6	38,9	38,3	36,7	0,916	0,495	0,594	0,580
TPR, horas	8,6	8,7	8,7	8,5	0,183	0,938	0,729	0,757
TMR, horas	48,2	47,6	47,0	45,1	0,941	0,457	0,507	0,498
TT, horas	34,4	38,0	37,0	36,1	1,819	0,626	0,799	0,889
TRT, horas	82,6	85,6	84,0	81,2	2,076	0,828	0,545	0,630

406 ¹k1 = taxa de passagem no rúmen-retículo; k2 = taxa de passagem no pós-rúmen; TRRR = tempo de
407 retenção rumen-retículo; TPR = tempo de retenção no pós-rúmen; TMR = tempo de retenção médio; TT =
408 tempo de trânsito; TRT = tempo de retenção total. ²CON, controle; OL, dieta com óleo de linhaça; PROP,
409 dieta com óleo de linhaça e própolis; PROP-E, dieta com óleo de linhaça, própolis e vitamina E.
410 ³Probabilidade de contrastes ortogonais significativos. Os efeitos testados usando contrastes ortogonais
411 foram 1) C vs. OL, PROP e PROP-E, 2) OL vs. PROP e PROP-E, e 3) PROP vs. PROP-E.

412

413 4. Discussão

414 O extrato de própolis utilizado conferiu ao produto LLOS B1 a presença dos ácidos
415 cafeicos, chicórico, *p*-cumárico e Artepillin C (Tabela 2). Ácidos fenólicos com
416 espectro UV desconhecidos foram quantificados como equivalente ácido *p*-cumárico.
417 Flavonoides não foram identificados, mas foram quantificados em equivalente
418 quercetina.

419 A maior proporção na população de protozoários *Entodinium* está de acordo com
420 observado na literatura para a espécie bovina. Ao estudar bovinos da raça Zebu,
421 Franzolin et al. (2010) relataram que em média 84,5% da população de protozoários
422 eram *Entodinium*, e este valor poderia ser superior, até 93,5% quando os animais eram
423 tratados com concentrado a base de milho grão e com ureia, fontes de alimentos
424 semelhante ao usado neste trabalho.

425 Em geral o uso de óleo ou gordura na dieta de ruminantes está associado à redução
426 da população de protozoários ruminais (Firkins, Yu, & Morrison, 2007), porém, este
427 efeito é variável em função do tipo e da quantidade total de óleo utilizado na dieta
428 (Doreau & Ferlay, 1995). Neste trabalho com a adição de 2,5% de óleo de linhaça
429 (4,7% EE na dieta) verificaram-se tendências tanto nas diminuições da população de
430 protozoários como na digestibilidade ruminal da fibra. A população dos protozoários
431 *Entodinium* reduziu (P=0.097) em 24%. Em estudo com níveis de suplementação com
432 óleo de linhaça (2 a 4% da dieta), Ueda et al. (2003) e Benchaar et al. (2012), não
433 observaram efeito na contagem e na distribuição geral dos protozoários de vacas

434 leiteiras alimentadas com dietas a base de forragem. No entanto, Ueda et al. (2003)
435 observaram em dieta com alto teor de concentrado (65%) e adição de óleo de linhaça
436 redução na população de *Entodinium* e *Dasytricha* com diminuição na digestibilidade
437 ruminal da FDN e FDA. A maioria dos ciliados entodiniomorfos possuem alta atividade
438 celulolítica na degradação da fibra no rúmen, e a eliminação ou diminuição destes reduz
439 a digestibilidade da MO e da celulose, devido a menor atividade carboximetil-celulase
440 no rúmen (Santra & Karim, 2002). Os efeitos do óleo de linhaça sobre população de
441 protozoários poderiam ser ainda mais prejudiciais em dietas com maior proporção de
442 concentrado que por si já contribuiriam com a sua redução.

443 Não houve efeito da adição de própolis as dietas com óleo de linhaça sobre a
444 contagem de protozoários. Este resultados divergem dos encontrados por Yaghoubi et
445 al. (2010) que ao adicionarem doses crescentes de flavonoides oriundos de extrato de
446 própolis (0, 17, 35, 70 e 140 µg/mL do fluido de cultura) em dietas que diferiam na
447 proporção volumoso:concentrado foi observado que independente desta proporção
448 houve redução linear no número de protozoários. Da mesma forma, Ríspoli et al. (2009)
449 e Paula et al. (2016) observaram redução na população de *Entodinium* ao fornecerem
450 produtos à base de própolis, semelhantes aos usados neste trabalho, em dietas ricas em
451 forragem para búfalos.

452 Apesar das evidências suportadas pelo benefício da incorporação de ácidos graxos
453 poli-insaturados (AGPI) em produtos de ruminantes, como no leite e carne, por meio da
454 inclusão de óleo de linhaça na dieta, pouco se sabe sobre seus efeitos na biodiversidade
455 microbiológica ruminal. A atividade metabólica microbiológica é responsável pelo
456 processo de biohidrogenação e as vias de biohidrogenação requerem a hidrólise inicial
457 dos lipídios vegetais ingeridos pelas lípases vegetais e microbianas, ocorrendo a
458 liberação de ácidos graxos constituintes (Lee, Waller, Melton, Saxton, & Pordesimo,
459 2004). A *Anaerovibrio lipolytica* é uma bactéria lipolítica ruminal, a lipase produzida
460 por esta bactéria é extracelular e tem a capacidade de hidrolisar diacilgliceróis mais
461 prontamente que os triacilgliceróis (Henderson & Hobson, 1968). Uma vez liberado, o
462 ácido graxo deve estar na forma não esterificado antes da biohidrogenação bacteriana
463 seguir. No presente trabalho o efeito do óleo de linhaça rico em 18:3n-3 reduziu a
464 população de *A. lipolytica*. No entanto, nos resultados observados na literatura a
465 suplementação com óleo de peixe e óleo de soja não apresentaram efeito nesta espécie
466 de bactéria (Gudla, Ishlak, & AbuGhazaleh, 2012; M. R. Maia, Chaudhary, Figueres, &
467 Wallace, 2007; Potu, AbuGhazaleh, Hastings, Jones, & Ibrahim, 2011).

468 *A. lipolytica* é uma bactéria Gram-negativa e, por isso mais resistente as
469 perturbações no desequilíbrio metabólico da parede celular quando um constituinte da
470 dieta causa uma alteração no ambiente ruminal. Contudo é uma bactéria sensível ao pH
471 ruminal, e o pH ótimo de atividade da lipase é de 7,4 (Hobson & Stewart, 1997). No
472 presente trabalho o pH ruminal ficou abaixo de 6,0 após 3 horas da alimentação da
473 manhã (Figura 1) para todas as dietas. Apesar de teor de pH poder ter influenciado na
474 atividade *A. lipolytica*, a presença do óleo de linhaça reduziu sua população ($P < 0,001$).
475 É possível constatar que houve biohidrogenação pelo aumento na concentração de
476 C18:0 no leite das vacas que ingeriram óleo de linhaça (1,5 vezes mais) em relação a
477 dieta sem óleo. Como também se observa aumento de C18:3 em quantidades
478 consideráveis no leite do tratamento com óleo de linhaça (4,2 vezes mais) em relação a
479 dieta sem óleo além da maior quantidade de total de ácidos graxos pré-formado e
480 redução na síntese *de novo* (Tabela 5). Estes dados demonstram que apesar da
481 biohidrogenação ter ocorrido, não foi suficiente para neutralizar todo óleo ativo no
482 rúmen, e uma das causas pode ter sido a diminuição na hidrólise de triacilgliceróis que
483 antecede a biohidrogenação pela redução na população da *A. lipolytica* em dietas com
484 óleo.

485 *A. Butirivibrio fibrisolvens* é uma bactéria Gram-positiva, reconhecida como a
486 principal bactéria responsável pela biohidrogenação ruminal e possui papel chave na
487 digestão da fibra. A adição de óleo de linhaça e a adição de própolis propiciaram
488 aumento na concentração desta bactéria. Yang et al. (2009) relataram em novilhas
489 leiteiras alimentadas com óleo de linhaça a 4% da MS da dieta (60:40 de
490 volumoso:concentrado), redução na população de *Butirivibrio fibrisolvens* quando
491 comparado com a dieta controle. Gudla et al. (2012) registraram em estudos com
492 fermentadores *in vitro*, interação de forragem e óleo sobre a concentração de DNA da
493 *Butirivibrio fibrisolvens*, e constataram aumento desta bactéria na presença de óleo com
494 baixa concentração de forragem (30% de feno de alfafa). Também, Huws et al. (2014)
495 observaram aumento no gênero *B. fibrisolvens* em novilhas alimentadas com óleo de
496 linhaça e correlacionaram com o aumento dos intermediários da biohidrogenação para
497 mesma dieta. Da mesma forma, no presente trabalho, com a adição de óleo de linhaça
498 foi observado no leite aumento dos intermediários da biohidrogenação, como C18:1 e
499 C18:2. Todavia, Huws et al. (2014) concluíram, que o papel do gênero *Butirivibrio* na
500 biohidrogenação não está claro, quando comparado com estudos anteriores, nos quais
501 nem sempre a quantidade de DNA de *B. fibrisolvens* está correlacionada com o aumento

502 de C18:0. E desta forma, o papel deste gênero no rúmen permanece incerto, embora os
503 dados demonstrem um papel potencial na biohidrogenação de AGPI do óleo de linhaça.

504 O aumento na concentração da *B. fibrisolvens* com adição de própolis (P=0,09) no
505 rúmen das vacas está em acordo com estudo *in vitro*. Em trabalho anterior Aguiar et al.
506 (2013) avaliaram diferentes produtos à base de própolis que diferiam na concentração e
507 teor alcoólico usado na extração dos compostos fenólicos da própolis e verificaram que
508 o LLOS B1 (alta e baixa concentração de flavonóides e de ácidos fenólicos,
509 respectivamente), semelhante ao usado neste trabalho, na maior concentração (0, 250,
510 500 e 1.000 $\mu\text{g ml}^{-1}$) interferiu no crescimento da *B. fibrisolvens* D1. Ainda os autores
511 observaram que entre as cepas avaliadas sobre a resistência ou sensibilidade ao produto
512 à base de própolis não houve distinção entre as Gram positiva e negativa. A ação dos
513 compostos fenólicos da própolis sobre as bactérias ruminais ainda necessita de mais
514 estudos e a composição dos diferentes tipos de flavonóides, ácidos fenólicos e a
515 presença do Artepillin C nos extratos de própolis, parecem ser os principais
516 responsáveis pelas ações antimicrobiana.

517 A *Methanobrevibacter ruminantium* é a archaeae predominante no rúmen, e a sua
518 inibição com o uso do óleo de linhaça, pode ser explicado em parte pela competição por
519 H metabólico pela biohidrogenação (Czerkawski, Blaxter, & Wainman, 1966). Outro
520 fator, que pode explicar em parte é a redução na população de protozoários causada pelo
521 óleo, devido ao comportamento simbiótico com os microrganismos metanogênicos.
522 Segundo, Nagaraja et al. (1997), a redução na produção de metano com o uso de óleo
523 ocorre também em animais defaunados, indicando que associado a estes fatores há uma
524 inibição direta do efeito citotóxico do óleo sobre os metanogênicos.

525 Não houve efeito da adição de própolis e própolis associada à Vitamina E em dietas
526 com óleo sobre a *M. ruminantium*. No entanto, em estudo *in vitro* registra-se que a
527 própolis pode reduzir a produção de metano pela inibição dos metanogênicos (Santos,
528 2014). Da mesma maneira como discutido anteriormente a ação do óleo sobre a
529 microbiota pode ter mascarado a atuação da própolis.

530 De modo geral, o metabolismo ruminal foi influenciado somente pela adição de óleo
531 de linhaça (2,5% na MS) nas dietas de vacas leiteiras, porém sem interferir no consumo
532 de MS. Este resultado está de acordo com relatos em vacas leiteiras alimentadas com
533 óleo de linhaça em nível de suplementação de 2,6% (Doreau, Laverroux, Normand,
534 Chesneau, & Glasser, 2009) até 4% (Benchaar et al., 2012) da MS da dieta. Os efeitos
535 da suplementação lipídica com óleo de linhaça variam de acordo com a quantidade de

536 óleo suplementada, como observado por Martin et al. (2008) que ao fornecer 5,7% de
537 de óleo de linhaça observaram reduções no consumo de MS e na digestibilidade da MS,
538 MO e FDN.

539 Nos parâmetros digestivos não se registrou alterações quando da adição de própolis
540 e vitamina E a dietas contendo óleo de linhaça. Entretanto, alguns trabalhos realizados
541 com produtos a base de própolis produzidos de forma análoga ao utilizado neste
542 trabalho tem mostrado efeito sobre o metabolismo ruminal da proteína (Prado et al.,
543 (2010). Em outros estudos, em *in vivo* e *in vitro*, foram relatados o efeito inibidor da
544 própolis sobre a produção de amônia e a atividade específica de produção amônia
545 (Oliveira, Queiroz, Lana, Mantovani, & Generoso, 2006; Stradiotti Junior, et al., 2004).

546 Embora a quantidade de EE da dieta com óleo de linhaça (47,1 g/kg de MS) esteja
547 dentro dos limites máximos recomendados pelo (NRC, 2001) de 60 a 70 g/kg de MS da
548 dieta, as alterações nas quantidades digeridas de MO, FDN e CT indicam que houve
549 alteração na fermentação ruminal. Esta alteração pode estar relacionada ao uso de
550 silagem de milho como volumoso que potencializa os efeitos adversos da
551 suplementação com óleo (Smith, Harris, Van Horn, & Wilcox, 1993). Também pode ser
552 atribuída aos efeitos físicos da gordura que revestem as partículas dificultando a
553 digestão e adesão dos microrganismos (Jenkins, 1993) e a sensibilidade das espécies
554 microbianas devido aos efeitos citotóxicos dos ácidos graxos poli-insaturados (Maia et
555 al., 2010).

556 Os triglicerídeos no rúmen são hidrolisados pelas lípases microbianas a ácidos
557 graxos e glicerol e os ácidos graxos são absorvidos posteriormente no intestino. Desta
558 forma, quando se adicionou óleo de linhaça às dietas não era esperado aumento da
559 quantidade digerida de EE no rúmen. Entretanto há relato que os principais
560 microrganismos a influenciar o metabolismo dos ácidos graxos no rúmen são os
561 protozoários ciliados os quais efetivamente acumulam ácidos graxos poli-insaturados
562 (Devillard, McIntosh, Newbold, & Wallace, 2006). Desta maneira, os ácidos graxos
563 poli-insaturados (AGPI) podem ficar retidos no rúmen, em razão da retenção de
564 protozoários neste compartimento, uma vez que possuem a habilidade de engolfar
565 cloroplastos ricos em 18:3n-3 (Huws et al., 2012). E ainda segundo os autores citados a
566 retenção pode ocorrer mediante ao metabolismo lipídico intra-protozoário e subsequente
567 absorção de AGPI dentro de suas membranas celulares. Adicionalmente, é possível que
568 o óleo de linhaça não se misture de forma homogênea no líquido ruminal e, portanto

569 dificultou a recuperação da quantidade total de EE que deveria fluir para fora do rúmen
570 quando da amostragem omasal.

571 Os carboidratos da dieta são os principais substratos de fermentação no rúmen, eles
572 são degradados a seus constituintes de hexoses e pentoses antes de ser fermentado a
573 AGCC via piruvato. Apesar do efeito do óleo de linhaça em reduzir a quantidade de
574 MO, FDN e CT digeridos no rúmen, não houve diferença na produção de AGCC e nem
575 na razão acetato:propionato. Em trabalho conduzido concomitantemente, Santos (2014)
576 observou que a adição de óleo de linhaça reduziu ($P<0,01$) a concentração de gordura
577 do leite, e como não foi observada alteração na produção de acetato, é possível que a
578 biohidrogenação incompleta no rúmen dos AGCL em especial do ômega 3, principal
579 AG da linhaça, provocasse o aumento de trans-18:1 no leite, como observado na Tabela
580 5.

581

582 **5. Conclusão**

583 A adição de óleo de linhaça na dieta de vacas leiteiras reduziu a população de
584 protozoários e alterou a população de bactérias ruminais interferindo na dinâmica
585 ruminal com a redução da digestibilidade ruminal da fibra e da matéria orgânica. Os
586 ácidos graxos poli-insaturados provenientes do óleo de linhaça foram parcialmente
587 biohidrogenados no rúmen e parte deles foi incorporada à gordura do leite. A adição de
588 própolis associado ou não a vitamina E não apresentaram efeito sobre a ação do óleo no
589 rúmen.

590

591 **6. Apoio Financeiro**

592 O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
593 Tecnológico (CNPQ), Brasília, DF, Brasil, nº do processo: 485566/2012-5,
594 Universal/2012.

595

596 **7. Referências**

597 Aguiar, S. C., Zeoula, L. M., Franco, S. L., Peres, L. P., Arcuri, P. B., & Forano, E.
598 (2013). Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria
599 in vitro. *World J Microbiol Biotechnol*, 29, 1951-1959.
600 Aguiar, S. C., Cottica, S. M., Boeing, J. S., Samensari, R. B., Santos, G. T., Visentainer,
601 J. V., & Zeoula, L. M. (2014). Effect of feeding phenolic compounds from propolis
602 extracts to dairy cows on milk production, milk fatty acid composition, and the
603 antioxidant capacity of milk. *Animal Feed Science and Technology*, 193, 148-154.

- 604 AOAC. (1990). *Association of Official Analytical Chemists, Official methods of*
605 *analysis, 15th ed.* Arlington, VA, USA: AOAC.
- 606 Baldi, A., Lombardi, D., Russo, P., Palescandolo, E., De Luca, A., Santini, D., Baldi, F.,
607 Rossiello, L., Dell'Anna, M. L., Mastrofrancesco, A., Maresca, V., Flori, E., Natali,
608 P. G., Picardo, M., & Paggi, M. G. (2005). Ferritin contributes to melanoma
609 progression by modulating cell growth and sensitivity to oxidative stress. *Clin*
610 *Cancer Res, 11*, 3175-3183.
- 611 Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization.
612 *J Ethnopharmacol, 100*, 114-117.
- 613 Benchaar, C., Romero-Perez, G. A., Chouinard, P. Y., Hassanat, F., Eugene, M., Petit,
614 H. V., & Cortes, C. (2012). Supplementation of increasing amounts of linseed oil to
615 dairy cows fed total mixed rations: effects on digestion, ruminal fermentation
616 characteristics, protozoal populations, and milk fatty acid composition. *J Dairy Sci,*
617 *95*, 4578-4590.
- 618 Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and
619 purification. *Can J Biochem Physiol, 37*, 911-917.
- 620 Castro, M. L., Cury, J. A., Rosalen, P. L., Alencar, S. M., Ikegaki, M., Duarte, S., &
621 Koo, H. (2007). Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade
622 na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Quim. Nova, 30*, 1512-1516.
- 623 Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J., & Doreau, M. (2009). Milk fatty acids in dairy cows
624 fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with
625 methane output. *J Dairy Sci, 92*, 5199-5211.
- 626 Colucci, P. E., MacLeod, G. K., Grovum, W. L., McMillan, I., & Barney, D. J. (1990).
627 Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate
628 ratios at high and low intakes. *J Dairy Sci, 73*, 2143-2156.
- 629 Czerkawski, J. W., Blaxter, K. L., & Wainman, F. W. (1966). The effect of linseed oil
630 and of linseed oil fatty acids incorporated in the diet on the metabolism of sheep. *Br*
631 *J Nutr, 20*, 485-494.
- 632 de Aguiar, S., Zeoula, L., Franco, S., Peres, L., Arcuri, P., & Forano, E. (2013).
633 Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria in vitro.
634 *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29*, 1951-1959.
- 635 Dehority, B. A. (1993). Laboratory manual for classification and morphology of rumen
636 ciliate protozoan. In: Boca Raton: CRC Press.
- 637 Devillard, E., McIntosh, F. M., Newbold, C. J., & Wallace, R. J. (2006). Rumen ciliate
638 protozoa contain high concentrations of conjugated linoleic acids and vaccenic acid,
639 yet do not hydrogenate linoleic acid or desaturate stearic acid. *Br J Nutr, 96*, 697-
640 704.
- 641 Doreau, M., & Ferlay, A. (1995). Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the
642 rumen: a review. *Livestock Production Science, 43*, 97-110.
- 643 Doreau, M., Laverroux, S., Normand, J., Chesneau, G., & Glasser, F. (2009). Effect of
644 linseed fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on fatty acid rumen metabolism and
645 intestinal digestibility in cows. *Lipids, 44*, 53-62.
- 646 Estrada, G. O. D., Mendes da Silva, J. F., & Ceva Antunes, O. A. (2008). Artepillin C:
647 A review. *Lett. Drug Des. Discovery, 5*, 88-92.

- 648 Firkins, J. L., Yu, Z., & Morrison, M. (2007). Ruminant nitrogen metabolism:
649 perspectives for integration of microbiology and nutrition for dairy. *J Dairy Sci*, 90
650 *Suppl 1*, E1-16.
- 651 Franco, S. L., & Bueno, J. H. F. (1999). Otimização de processo extrativo de própolis.
652 *Infarma*, 11, 48-51.
- 653 Franzolin, R., Rosales, F. P., & Soares, W. V. B. (2010). Effects of dietary energy and
654 nitrogen supplements on rumen fermentation and protozoa population in buffalo and
655 zebu cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 549-555.
- 656 Grovum, W. L., & Phillips, G. D. (1973). Rate of passage of digesta in sheep. 5.
657 Theoretical considerations based on a physical model and computer simulation. *Br J*
658 *Nutr*, 30, 377-390.
- 659 Gudla, P., Ishlak, A., & AbuGhazaleh, A. A. (2012). The Effect of Forage Level and Oil
660 Supplement on *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Anaerovibrio lipolytica* in Continuous
661 Culture Fermenters. *Asian-Australas J Anim Sci*, 25, 234-239.
- 662 Hartman, L., & Lago, R. C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from
663 lipids. *Lab Pract*, 22, 475-476 passim.
- 664 Henderson, C., & Hobson, P. N. (1968). The lipase of a rumen bacterium. *J Gen*
665 *Microbiol*, 53, Suppl:8.
- 666 Hobson, P. N., & Stewart, C. S. (1997). The rumen microbial ecosystem. In (Vol. 2 ed.,
667 pp. 632). London: Chapman & Hall.
- 668 Huhtanen, P., Brotz, P. G., & Satter, L. D. (1997). Omasal sampling technique for
669 assessing fermentative digestion in the forestomach of dairy cows. *J Anim Sci*, 75,
670 1380-1392.
- 671 Huws, S. A., Lee, M. R., Kingston-Smith, A. H., Kim, E. J., Scott, M. B., Tweed, J. K.,
672 & Scollan, N. D. (2012). Ruminant protozoal contribution to the duodenal flow of
673 fatty acids following feeding of steers on forages differing in chloroplast content. *Br*
674 *J Nutr*, 108, 2207-2214.
- 675 Huws, S. A., Kim, E. J., Cameron, S. J., Girdwood, S. E., Davies, L., Tweed, J., Vallin,
676 H., & Scollan, N. D. (2014). Characterization of the rumen lipidome and
677 microbiome of steers fed a diet supplemented with flax and echium oil. *Microb*
678 *Biotechnol*.
- 679 Jenkins, T. C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *J Dairy Sci*, 76, 3851-3863.
- 680 Joseph, J. D., & Ackman, R. G. (1992). Capillary Column Gas- Chromatographic
681 Method for Analysis of Encapsulated Fish Oils and Fish Oil Ethyl-Esters—
682 Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 75, 488-506.
- 683 Lee, J. H., Waller, J. C., Melton, S. L., Saxton, A. M., & Pordesimo, L. O. (2004).
684 Feeding encapsulated ground full-fat soybeans to increase polyunsaturated fat
685 concentrations and effects on flavor volatiles in fresh lamb. *J Anim Sci*, 82, 2734-
686 2741.
- 687 Lock, A. L., Preseault, C. L., Rico, J. E., DeLand, K. E., & Allen, M. S. (2013). Feeding
688 a C16:0-enriched fat supplement increased the yield of milk fat and improved
689 conversion of feed to milk. *J Dairy Sci*, 96, 6650-6659.

- 690 Maia, E. L., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1993). Avaliação de um método simples e
691 econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de
692 peixes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, *52*, 27-35.
- 693 Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Figueres, L., & Wallace, R. J. (2007). Metabolism of
694 polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie*
695 *Van Leeuwenhoek*, *91*, 303-314.
- 696 Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Bestwick, C. S., Richardson, A. J., McKain, N., Larson,
697 T. R., Graham, I. A., & Wallace, R. J. (2010). Toxicity of unsaturated fatty acids to
698 the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiol*,
699 *10*, 52.
- 700 Martin, C., Rouel, J., Jouany, J. P., Doreau, M., & Chilliard, Y. (2008). Methane output
701 and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded
702 linseed, or linseed oil. *J Anim Sci*, *86*, 2642-2650.
- 703 Martin, C. A., de Oliveira, C. C., Visentainer, J. V., Matsushita, M., & de Souza, N. E.
704 (2008). Optimization of the selectivity of a cyanopropyl stationary phase for the gas
705 chromatographic analysis of trans fatty acids. *J Chromatogr A*, *1194*, 111-117.
- 706 Mertens, D. R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent
707 fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J AOAC*
708 *Int*, *85*, 1217-1240.
- 709 Myers, W. D., Ludden, P. A., Nayigihugu, V., & Hess, B. W. (2004). Technical note: a
710 procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium
711 dioxide. *J Anim Sci*, *82*, 179-183.
- 712 Nagaraja, T. G., Newbold, C. J., Van Nevel, C. J., & Demeyer, D. I. (1997).
713 Manipulation of ruminal fermentation. In P. N. Hobson & C. S. Stewart (Eds.), *The*
714 *Rumen Microbial Ecosystem*. London, UK: Blackie Academic & Professional.
- 715 NRC. (2001). *National Research Council, Nutrient requirements of dairy cattle, seventh*
716 *rev. ed.* (seventh rev. edition ed.). Washington, DC: National Academy of Science.
- 717 Oliveira, J. S., Queiroz, A. C., Lana, R. P., Mantovani, H. C., & Generoso, R. A. R.
718 (2006). Efeito da monensina e da própolis sobre a atividade de fermentação de
719 aminoácidos in vitro pelos microrganismos ruminais. *Rev Bras Zootec* *35*, 275-281.
- 720 Palmquist, D. L., & Conrad, H. R. (1971). Origin of plasma fatty acids in lactating cows
721 fed high grain or high fat diets. *J Dairy Sci*, *54*, 1025-1033.
- 722 Paula, E. M., Samensari, R. B., Machado, E., Pereira, L. M., Maia, F. J., Yoshimura, E.
723 H., Franzolin, R., Faciola, A. P., & Zeoula, L. M. (2016). Effects of phenolic
724 compounds on ruminal protozoa population, ruminal fermentation, and digestion in
725 water buffaloes. *Livestock Science, Prelo*.
- 726 Politis, I., Theodorou, G., Lampidonis, A. D., Kominakis, A., & Baldi, A. (2012). Short
727 communication: Oxidative status and incidence of mastitis relative to blood alpha-
728 tocopherol concentrations in the postpartum period in dairy cows. *J Dairy Sci*, *95*,
729 7331-7335.
- 730 Pottier, J., Focant, M., Debier, C., De Buysser, G., Goffe, C., Mignolet, E., Froidmont,
731 E., & Larondelle, Y. (2006). Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation
732 pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. *Journal of Dairy*
733 *Science*, *89*, 685-692.

- 734 Potu, R. B., AbuGhazaleh, A. A., Hastings, D., Jones, K., & Ibrahim, S. A. (2011). The
735 effect of lipid supplements on ruminal bacteria in continuous culture fermenters
736 varies with the fatty acid composition. *J Microbiol*, *49*, 216-223.
- 737 Prado, O. P. P., Zeoula, L. M., Moura, L. P. P., Franco, S. L., Prado, I. N., & Gomes, H.
738 C. C. (2010). Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem
739 com adição de própolis e monensina sódica para bovinos. *Rev Bras Zootec*, *39*,
740 1336-1345.
- 741 Preston, T. R. (1995). *Tropical animal feeding: a manual for research workers*. Rome:
742 FAO.
- 743 Ríspoli, T. B., Rodrigues, I. L., Martins Neto, R. G., Kazama, R., Prado, O. P. P.,
744 Zeoula, L. M., & Arcuri, P. B. (2009). Protozoários ciliados do rúmen de bovinos e
745 bubalinos alimentados com dietas suplementadas com monensina ou própolis.
746 *Pesqui. Agropecu. Bras.*, *44*, 92-97.
- 747 Santos, N. W. (2014). *Própolis e vitamina E na dieta de vacas leiteiras suplementadas*
748 *com óleo de linhaça sobre a qualidade e funcionalidade do leite*. Universidade
749 Estadual de Maringá, Maringá.
- 750 Santra, A., & Karim, S. A. (2002). Influence of ciliate protozoa on biochemical changes
751 and hydrolytic enzyme profile in the rumen ecosystem. *J Appl Microbiol*, *92*, 801-
752 811.
- 753 Siger, A., NOGALA-KALUCKA, M., & LAMPART-SZCZAPA, E. (2008). The
754 content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils.
755 *Journal of Food Lipids*, *15*, 137-149.
- 756 Smith, W., Harris, B., Van Horn, H., & Wilcox, C. (1993). Effects of forage type on
757 production of dairy cows supplemented with whole cottonseed, tallow, and yeast.
758 *Journal of dairy science*, *76*, 205-215.
- 759 Stradiotti Junior, D., Queiroz, A. C., Lana, R. P., Pacheco, C. G., Camardelli, M. M. L.,
760 Detmann, E., Eifert, E. C., Nunes, P. M. M., & Oliveira, M. V. M. (2004). Ação do
761 extrato de própolis sobre a fermentação in vitro de diferentes alimentos pela técnica
762 de produção de gases. *Rev Bras Zootec* *33*, 1093-1099.
- 763 Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., & Benno, Y.
764 (2001). Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with
765 real-time PCR. *Appl Environ Microbiol*, *67*, 2766-2774.
- 766 Uden, P., Colucci, P. E., & Van Soest, P. J. (1980). Investigation of chromium, cerium
767 and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *J Sci Food Agric*, *31*, 625-
768 632.
- 769 Ueda, K., Ferlay, A., Chabrot, J., Loor, J. J., Chilliard, Y., & Doreau, M. (2003). Effect
770 of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with
771 different forage:concentrate ratios. *J Dairy Sci*, *86*, 3999-4007.
- 772 Visentainer, J. V. (2012). Analytical aspects of the flame ionization detector response of
773 fatty acid esters in biodiesels and foods. *Quim. Nova*, *35*, 274-279.
- 774 Weiss, W. P. (1999). Energy prediction equations for ruminant feeds. In *CORNELL*
775 *NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS* (Vol. 61, pp. 176-
776 185). Ithaca.

- 777 Williams, C. H., David, D. J., & Iismaa, O. (1962). The determination of chromic oxide
778 in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *The Journal of*
779 *Agricultural Science*, 59, 381-385.
- 780 Yaghoubi, S. M. J., Ghorbani, H. R., Rahmani, A., & Nikkhah, A. (2010). Flavonoids
781 Manipulation of Rumen Fermentation: An Alternative for Monensin? *Agricultural*
782 *Segment*.
- 783 Yang, S. L., Bu, D. P., Wang, J. Q., Hu, Z. Y., Li, D., Wei, H. Y., Zhou, L. Y., & Looor,
784 J. J. (2009). Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal
785 microorganisms in dairy cows. *Animal*, 3, 1562-1569.

1 **Funcionalidade do leite de vacas alimentadas com óleo de linhaça e antioxidantes**
2 **como suplemento dietético para ratos diabéticos**

3 (Normas: British Journal of Nutrition)

4
5 **Resumo**

6 A incidência crescente de diabetes mellitus (DM) está se tornando uma ameaça grave
7 para a saúde humana em diversas partes do mundo. Estudos com produtos e derivados
8 lácteos têm demonstrado um efeito benéfico potencial na suscetibilidade contra a
9 diabetes. Desta forma, objetivou-se avaliar a suplementação de leite integral e leite
10 enriquecido naturalmente, com ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e antioxidantes,
11 pela alimentação da vaca em ratos diabéticos. Foram utilizados quarenta ratos machos,
12 linhagem *Wistar* com 28 dias de idade, distribuídos em quatro tratamentos
13 experimentais de animais diabéticos (indução por estreptozotocina), e um grupo de ratos
14 normais (não induzidos). Os tratamentos experimentais foram: água (controle-CON),
15 leite integral (L-COM), leite enriquecido com AGPI (L-AGPI), leite enriquecido com
16 AGPI e antioxidantes (L-AGPI/A). A suplementação na dose de 0,005 mL/g de peso
17 corporal foi realizada durante 77 dias, sendo 42 dias pré e 35 dias pós indução do
18 diabetes. A suplementação com leite integral não alterou ($P>0,05$) os parâmetros
19 plasmáticos, deposição de gordura, peso corporal e de órgãos. O leite reduziu a glicemia
20 no teste de tolerância à glicose oral nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos, a média
21 glicêmica ($P=0,04$) e a área sob a curva ($P=0,05$). O leite ainda reduziu o teor de
22 frutossamina ($P=0,01$). O grupo AGPI (L-AGPI e L-AGPI/A) apresentou tendência para
23 menor glicemia de jejum ($P=0,086$), redução significativa do colesterol LDL ($P=0,008$)
24 e maior capacidade antioxidante total ($P=0,001$) no sangue. A ingestão de leite integral
25 e enriquecido com AGPI e antioxidantes auxiliam na prevenção dos efeitos metabólicos
26 da diabetes.

27
28 **Palavras-chave:** alimentos funcionais, diabetes mellitus, glicemia, ômega-3, própolis

29
30
31
32
33
34

35 **1. Introdução**

36 O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica e crônica, de etiologia
37 multifatorial, causada por defeitos na secreção e/ou ação da insulina, que apresenta
38 como manifestação comum a hiperglicemia (Harlev *et al.*, 2013). Desordens
39 metabólicas múltiplas incluindo o metabolismo comprometido de lipídeos e
40 lipoproteínas, estresse oxidativo, inflamação subclínica, disfunção endotelial vascular
41 são comuns no DM (Mirmiran *et al.*, 2014). Estas alterações em longo prazo podem
42 resultar na ocorrência de doenças (complicações do DM) como retinopatias (Payne *et*
43 *al.*, 2014), nefropatias (Pálsson & Patel, 2014), enfermidades vasculares (Horton *et al.*,
44 2015), como também articulares e ósseas (Sponer *et al.*, 2013), caracterizando o DM
45 como uma síndrome de alta morbidade e mortalidade.

46 O número de pessoas com diabetes está aumentando e estimativas globais apontam
47 que deverá passar de 430 milhões de indivíduos em 2030 (Shaw *et al.*, 2010). O
48 tratamento do DM é complexo e consiste em dietas especiais, prática de exercícios
49 físicos e controle da hiperglicemia (Sponer *et al.*, 2013). O elevado número de
50 portadores e o difícil tratamento tem estimulado a busca por alimentos funcionais que
51 auxiliem na prevenção ou no tratamento dessa doença. O conceito de alimento funcional
52 tem se expandido rapidamente, que além das funções nutricionais básicas tem
53 benefícios potenciais para promover a saúde e reduzir o risco de doenças crônicas
54 (Ballali & Lanciai, 2012).

55 A ingestão de produtos lácteos e derivados tem sido associada com a redução no
56 risco do DM e melhora na saúde metabólica (Hirahatake *et al.*, 2014). Em estudo com
57 humanos, a ingestão de queijo e produtos lácteos fermentados reduziu os níveis
58 glicêmicos de pacientes diabéticos (Struijk *et al.*, 2013). Os efeitos benéficos do leite
59 têm sido relacionados com os seus componentes, como o cálcio (Sun & Zemel, 2006) e
60 proteínas do soro (Jakubowicz & Froy, 2013).

61 As pesquisas recentes enfatizam as propriedades de compostos bioativos dos
62 alimentos funcionais, como exemplo, a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados
63 (AGPI), especialmente o ácido graxo ômega-3 (AG-n3) foram correlacionados com a
64 redução no risco de diabetes e melhora na saúde humana (Serhan *et al.*, 2008;
65 Guadarrama-López *et al.*, 2014; Muley *et al.*, 2014). O enriquecimento do leite
66 industrialmente com AG-n3 e vitamina E melhorou a lipidemia plasmática e reduziu o
67 risco de doenças cardiovasculares (Baro *et al.*, 2003).

68 Neste trabalho, ratos diabéticos receberam suplementação alimentar com leite
69 integral e enriquecido naturalmente pela alimentação disponibilizada para as vacas. A
70 hipótese a ser testada foi de que o leite de vaca integral e leite de vaca enriquecido
71 naturalmente com AGPI e antioxidantes atuasse como um alimento funcional com
72 propriedades benéficas na prevenção e no tratamento do diabetes mellitus.

73

74 **2. Material e Métodos**

75 *2.1. Animais, tratamentos e procedimentos experimentais*

76 O experimento foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (DFS) e os
77 animais obtidos do Biotério Central, ambos pertencentes à Universidade Estadual de
78 Maringá. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso
79 de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (UEM, Maringá,
80 Paraná, Brasil) – Parecer nº115/2012.

81 Foram utilizados quarenta ratos (*Rattus norvegicus*) machos, linhagem *Wistar*, com
82 28 dias de idade. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas coletivas
83 (46×24×20 cm), com cinco animais por gaiola, e mantidos no biotério setorial do DFS
84 nas seguintes condições: temperatura de 24°C, fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas
85 escuro, água e ração *ad libitum*. Os animais permaneceram em gaiola metabólica
86 durante 24 horas para mensurar consumo de água e produção de urina.

87 A suplementação com leite foi iniciada logo após o desmame dos animais (idade de
88 28 dias) e realizada diariamente por sonda esofágica, às 09h00. Foi estabelecida, a partir
89 da recomendação do Guia Dietético para Americanos (McGuire, 2011), a dose de
90 0,005 mL/g de peso corporal. A dose foi ajustada semanalmente de acordo com o peso
91 dos animais. Foram estabelecidos quatro tratamentos experimentais (n=8 para cada
92 tratamento): 1) água (controle-CON), 2) leite integral (L-COM), 3) leite enriquecido
93 com AGPI (L-AGPI) e 4) leite enriquecido com AGPI e antioxidantes (L-AGPI/A).

94 Os três tipos leite (Tabela 1) utilizado para a suplementação dos ratos foram obtidos
95 de vacas leiteiras utilizadas no experimento prévio (capítulo I da tese) como segue: L-
96 COM proveniente de vacas que receberam uma dieta controle; L-AGPI provenientes de
97 vacas alimentadas com dieta controle + óleo de linhaça, 25 g/kg na MS; L-AGPI/A
98 proveniente de vacas alimentadas com dieta basal + óleo de linhaça + aditivo à base de
99 própolis, 10 mg de flavonoides/kg de MS + vitamina E, 375 UI/kg de MS.

100 As amostras de leite foram acondicionadas em tubos de polietileno (12 mL) e
 101 congeladas em freezer (-20° C). Imediatamente antes de fornecer aos ratos, o leite foi
 102 descongelado e homogeneizado em agitador tipo vortex durante 5 minutos.

103

104 Tabela 1. Composição dos três tipos de leites utilizados na suplementação alimentar de
 105 ratos diabéticos; L-COM: leite integral; L-AGPI: leite enriquecido com ácidos graxos
 106 poli-insaturados (AGPI); L-AGPI/A: leite enriquecido com AGPI e antioxidantes

	Tratamentos		
	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A
Composição química (mg/mL)			
Gordura	29,80	26,86	27,78
Proteína	28,99	28,99	29,26
Lactose	46,31	45,81	47,50
Sólidos totais	114,40	112,59	113,95
Composição de ácidos graxos (mg/mL)			
12:0	0,82	0,64	0,67
14:0	2,70	2,53	2,49
16:0	7,02	5,96	5,34
18:0	1,73	3,34	3,28
18:1n9t	0,18	0,58	0,70
18:1n-9	4,01	6,52	5,89
18:2n-6	0,47	0,66	0,70
18:3n-3	0,06	0,30	0,29
18:2n(9c11t)	0,09	0,12	0,12
18:2(t10c12)	0,02	0,03	0,03
Total CLA	0,11	0,15	0,15
AGS ¹	13,98	14,00	13,42
AGMI	5,43	8,23	7,61
AGPI	0,67	1,14	1,17
n-6/n-3	8,61	2,28	2,55
Qualidade antioxidante e estabilidade oxidativa			
Compostos fenólicos (EAG mg/L)	11,33	10,16	18,15
Orac (ET mmol/L)	10,57	11,18	14,70
Poder redutor (EAG mg/L)	25,85	35,78	38,32
Dieno conjugados (mmol/kg gordura)	41,51	59,55	54,53
TBARS (mmol/kg gordura)	2,68	5,28	3,43

107 ¹CLA=ácido linoleico conjugado, AGS=ácidos graxos saturados, AGMI=ácidos graxos monoinsaturados,
 108 AGPI=ácidos graxos poli-insaturados, EAG=equivalente ácido gálico, ET=equivalente Trolox®.

109

110 Os ratos foram alimentados com ração Nuvilab CR1 (Nuvital®, Colombo, PR)
 111 composta por 879,7 g/kg de matéria seca, 261,6 g/kg de proteína bruta, 22,9 g/kg de

112 extrato etéreo, 41,8 g/kg de fibra, 972,2 g/kg de matéria orgânica e 3.959,1 kcal/kg de
113 energia bruta.

114

115 *2.1.1. Período experimental e indução do diabetes*

116 O período experimental total foi de 77 dias. A indução do diabetes realizada após 42
117 dias de suplementação láctea, quando os animais atingiram 70 dias de idade, e
118 prosseguiram por mais 35 dias até os animais completarem 105 dias de idade quando,
119 então, foram eutanasiados.

120 Para indução do diabetes experimental, os animais, em jejum noturno de 12 horas,
121 receberam uma única injeção intravenosa (veia peniana) de estreptozotocina
122 (Streptozotocin®, Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos), na dose de 40 mg/kg,
123 dissolvido em tampão citrato (0,05 M; pH 4,5). Os animais permaneceram em jejum
124 alimentar por mais quatro horas após a aplicação da droga diabetogênica. Um grupo de
125 animais normais (n=8) foi mantido nas mesmas condições que os animais diabéticos,
126 possibilitando a comparação da glicemia de jejum, do ganho de peso corporal, do
127 volume de urina excretada e da quantidade de alimento e de água ingeridos. A presença
128 de hiperglicemia, a perda de peso corporal, poliúria, polifagia e polidipsia nos animais
129 diabéticos caracterizaram o quadro fisiopatológico deste modelo experimental.

130

131 *2.1.2. Parâmetros avaliados durante o período experimental*

132 Ganho de peso corporal: os animais foram pesados semanalmente, possibilitando
133 calcular o ganho de peso corporal durante o período experimental.

134 Teste de tolerância à glicose (GTT): Na última semana do período experimental, os
135 animais diabéticos, em jejum noturno de 12 horas, foram submetidos ao GTT oral (1
136 g/kg). Amostras de sangue foram colhidas por punção caudal nos tempos 0, 30, 60, 90
137 120 minutos e a glicemia foi determinada em um glicosímetro MediSense® Optium™
138 (Abbott Diabetes Care Inc., Alameda, CA, Estados Unidos), calibrado e certificado pelo
139 INMETRO.

140

141 *2.1.3. Eutanásia dos animais e parâmetros avaliados*

142 Ao final do período experimental, os animais, em jejum noturno por 12 horas, foram
143 anestesiados com thionembusal sódico (Thionembusal®, Abbott, São Paulo, SP, Brasil),
144 com dose de 40 mg/kg de peso corporal. Após o registro do comprimento naso-anal, os
145 animais foram submetidos à laparotomia mediana e amostras de sangue foram colhidas

146 através da veia cava inferior. Tais amostras foram centrifugadas (2.500 g, 20 min) e
147 armazenadas em freezer (-20°C) para posteriores análises bioquímicas. Depois de
148 eutanasiados os animais, foram retirados e pesados o fígado, testículos, vesículas
149 seminais, rins, músculos sóleo e gastrocnêmico e os depósitos de gordura
150 periepididimal, retroperitoneal, mesentérica, subcutânea e marrom. Um fragmento do
151 fígado foi congelado em nitrogênio líquido e mantido em freezer -80°C. A
152 determinação da quantidade de gordura hepática foi feita por métodos gravimétricos. O
153 índice de Lee foi obtido pela razão entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento
154 naso-anal do rato, de acordo com Novelli et al. (2007).

155

156 2.2. Análises bioquímicas

157 As concentrações de proteína, gordura e lactose no leite foram determinadas por
158 espectroscopia de infravermelho (Bentley modelo 2000, Chaska, MN, EUA), pelo
159 procedimento 972.16 da AOAC (1990). Os lipídios totais nas amostras de rações foram
160 extraídos de acordo com Bligh & Dyer (1959), com clorofórmio, metanol e água
161 (2:2:1,8) e os lipídios totais de amostras de leite foram extraídos de acordo com Folch et
162 al. (1957), com clorofórmio, metanol e água (2:1:1). Os ésteres metílicos de ácidos
163 graxos (AG) foram preparados segundo o procedimento de Hartman & Lago (1973),
164 modificado por Maia & Rodrigues-Amaya (1993).

165 Os ácidos graxos foram analisados por cromatografia gasosa (Martin *et al.*, 2008).
166 Os cálculos foram efetuados de acordo com o método de Joseph e Ackman (1992).
167 Fatores de correção teóricos (Visentainer, 2012) foram utilizados para determinar as
168 concentrações. A quantidade de ácidos graxos foi calculada em mg/mL de leite.

169 A qualidade antioxidante e estabilidade oxidativa do leite foram determinadas pelos
170 métodos: ORAC (Capacidade de absorção do radical oxigênio) de acordo com Zulueta
171 et al. (2009); o poder redutor de acordo com Zhu et al. (2002); a produção de
172 hidroperóxidos dieno conjugados (DC) foi utilizada para medir a oxidação lipídica do
173 leite, como descrito por Kiokias et al. (2006); a oxidação lipídica também foi mensurada
174 com uso do ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) como descrito por Vyncke (1970).

175 A determinação das concentrações sanguíneas de glicose, colesterol total, HDL,
176 triglicerídeos, aspartatoaminotransferase (AST), e alanina aminotransferase (ALT) foi
177 realizada com uso de métodos colorimétricos (Gold Analisa[®], Belo Horizonte, MG) e
178 espectrofotômetro (Bioplus2000[®], São Paulo, SP, Brasil). A concentração de LDL foi

179 calculada pela equação Friedewald et al. (1972), LDL (mg/dL) = colesterol total – HDL
180 –(triglicerídeo/2,2).

181 A oxidação de proteínas sanguíneas foi avaliada pela determinação de tióis
182 reduzidos (Faure & Lafond, 1995). O radical ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-
183 6-ácido sulfônico]) foi utilizado para análise da capacidade antioxidante total (TAC) do
184 sangue (Erel, 2004).

185

186 2.3. *Análises estatísticas*

187 O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. As variáveis
188 foram submetidas à análise de variância segundo modelo geral: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$, em
189 que: Y_{ij} = variáveis observadas; μ = média geral; T_i = efeito do tratamento k, de 1 a 4; e_{ij}
190 = erro aleatório. Contrastes ortogonais foram utilizados para comparar os efeitos de: 1)
191 Efeito do leite (CON vs L-COM, L-AGPI e L-AGPI/A), 2) efeito leite enriquecido com
192 AGPI (L-COM vs L-AGPI e L-AGPI/A), e 3) efeito do leite enriquecido com
193 antioxidante (L-AGPI vs L-AGPI/A). A significância foi considerada em $P < 0,05$ e
194 tendências foram aceitas em $P \leq 0,10$.

195 Os dados da ingestão de leite foram submetidos à análise de variância e as médias
196 comparadas pelo teste Tukey.

197

198

199 **3. Resultados**

200 A presença de hiperglicemia de jejum (324,6 vs 85,1 mg/dL), o menor peso corporal
201 (263,5 vs 364,8 g) e a presença de polidipsia (91,0 vs 49,5 mL) e de poliúria (64,6 vs 9,4
202 mL) nos animais diabéticos, quando comparados com ratos normais, respectivamente,
203 confirmaram o estabelecimento do quadro fisiopatológico característico do modelo
204 experimental de diabetes induzido por estreptozotocina.

205 A suplementação com leite logo após o desmame teve muito boa aceitabilidade
206 pelos ratos diabéticos, nenhum evento de diarreia foi constatado durante o período
207 experimental.

208 A alimentação de vacas leiteiras com o fornecimento de dietas com maior conteúdo
209 de AGPI (fonte: óleo de linhaça) foi eficiente na obtenção de leite enriquecido
210 naturalmente, com maior proporção de AGPI. Da mesma forma, o uso de antioxidantes
211 (própolis e vitamina E) na mesma dieta para vacas de leite, proporcionou melhor
212 qualidade antioxidante e estabilidade oxidativa do leite (Tabela 1).

213 Os três tipos de leites utilizados na suplementação alimentar de ratos diabéticos
 214 proporcionaram a ingestão de quantidades semelhantes de proteína e de lactose, mas
 215 diferiram com relação à quantidade de gordura e ao perfil de ácidos graxos (Tabela 2).
 216 A suplementação com o leite integral proporcionou maior ingestão de gordura
 217 ($P<0,001$) e de AG de cadeia média (12:0, 14:0, 16:0), e menor ingestão de AG de
 218 cadeia longa (C18:0, 18:1, 18:2, 18:3 e CLA) ($P<0,001$). A suplementação com o leite
 219 AGPI resultou em maior ingestão de AG de cadeia longa (18:0, 18:1, 18:2, 18:3 e CLA)
 220 ($P<0,001$). O leite rico em AGPI e antioxidantes forneceu altas concentrações de
 221 AGMI, AGPI e também mais compostos fenólicos ($P<0,001$).

222

223 **Tabela 2.** Ingestão (mg/dia) de gordura, proteína, lactose e ácidos graxos da
 224 suplementação por leite dos ratos diabéticos suplementados com leite integral (L-
 225 COM), leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI) e leite
 226 enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)

Item	Tratamentos ¹			EPM	P
	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A		
Gordura	36,17 ^a	29,54b	29,65b	0,854	<0,001
Proteína	35,19	33,80	31,24	0,740	0,083
Lactose	56,21	50,38	50,71	1,163	0,066
12:0	1,00a	0,71b	0,71b	0,029	<0,001
14:0	3,27 ^a	2,78b	2,66b	0,075	<0,001
16:0	8,53 ^a	6,55b	5,70b	0,258	<0,001
18:0	2,09b	3,67a	3,51a	0,148	<0,001
18:1n9t	0,22c	0,64b	0,75a	0,043	<0,001
18:1n-9	4,86c	7,17a	6,28b	0,219	<0,001
18:2n-6	0,57b	0,72a	0,75a	0,020	<0,001
18:3n-3	0,07b	0,33a	0,30a	0,022	<0,001
18:2n(9c11t)	0,11b	0,13a	0,13a	0,003	<0,001
Total CLA	0,13b	0,17a	0,16a	0,004	<0,001
AGS ²	16,96 ^a	15,39ab	14,33b	0,371	0,009
AGMI	6,59b	9,05a	8,12a	0,252	<0,001
AGPI	0,82b	1,25a	1,24a	0,044	<0,001
Compostos fenólicos	0,014b	0,011c	0,019a	0,001	<0,001

227 ¹L-COM, grupo suplementado com leite integral; L-AGPI, grupo suplementado com leite enriquecido
 228 com AGPI; L-AGPI/A, grupo suplementado com leite enriquecido com AGPI e antioxidantes, ²AGS =
 229 ácidos graxos saturados, AGMI = ácidos graxos monoinsaturados, AGPI = ácidos graxos poli-
 230 insaturados. Compostos fenólicos = equivalente ácido gálico. Valores com letras diferentes nas linhas
 231 diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

232

233 A suplementação láctea em ratos diabéticos não alterou ($P>0,05$) o peso corporal, o
 234 comprimento naso-anal, o índice de Lee, o peso do fígado, do músculo sóleo, dos

235 depósitos de gordura periepididimal e subcutânea e a quantidade de gordura hepática de
236 ratos diabéticos, quando comparados com o grupo controle (Tabela 3). Um efeito
237 significativo da suplementação foi o aumento na quantidade de tecido adiposo marrom
238 interescapular ($P=0,007$). Observa-se ainda que os valores médios dos depósitos de
239 tecido adiposo retroperitoneal foram cerca de duas vezes maior nos animais que
240 receberam a suplementação láctea. Apesar de tais diferenças não terem se mostrado
241 estatisticamente significativas, em função dos elevados desvios, é importante que sejam
242 assinaladas. Um destaque nos resultados apresentados na Tabela 3 são os efeitos das
243 propriedades antioxidantes do leite (tratamentos L-AGPI/A) no aumento do peso do
244 músculo gastrocnêmio ($P=0,01$) e na redução da gordura mesentérica ($P=0,03$).

245 Ratos que receberam leite como suplemento alimentar apresentaram quadro
246 hiperglicêmico (glicemia de jejum) mais ameno após indução do diabetes com
247 estreptozotocina ($P=0,01$). Ao final do período de tratamento, a glicemia de jejum não
248 diferiu significativamente entre os tratamentos, mas ratos diabéticos que receberam os
249 leites AGPI e AGPI/A apresentaram tendência na redução deste parâmetro ($P=0,09$)
250 (Tabela 4).

251 A suplementação não modificou as concentrações sanguíneas de triglicerídeos,
252 colesterol total e frações de colesterol, aspartato aminotransferase, alanina
253 aminotransferase e tióis. Ratos diabéticos que receberam a suplementação com leite rico
254 em AGPI e antioxidantes apresentaram redução na concentração sanguínea de LDL
255 ($P=0,01$). Os valores de frutossamina ($P=0,02$) foram significativamente menores nos
256 grupos suplementados com leite e maior TAC ($P=0,001$) foi observada os nos grupos L-
257 AGPI (Tabela 4).

258 A suplementação alimentar de ratos diabéticos com leite melhorou a tolerância à
259 glicose (Figura 1), conforme mostra a redução significativa na glicemia registrada nos
260 tempos 30 ($P=0,03$), 60 ($P=0,03$) e 120 minutos ($P=0,05$) após a ingestão de glicose e,
261 também no valor médio glicêmico durante o teste ($P=0,04$) e no valor da área sob a
262 curva ($P=0,047$). O enriquecimento do leite com AGPI ou com AGPI e antioxidantes
263 não causou efeito no GTT (Tabela 5).

264 Portanto, a suplementação alimentar para ratos diabéticos com leite de vaca
265 aumentou os depósitos de gordura marrom, reduziu a glicemia pós-indução, reduziu a
266 concentração de frutossamina no plasma e melhorou a tolerância à glicose. O
267 enriquecimento deste leite com AGPI, por meio de dieta especial oferecida às vacas,
268 acrescentou outros benefícios à suplementação, tendo reduzido a glicemia final de

269 jejum, concentração de LDL e melhora na capacidade antioxidante no plasma. O
270 enriquecimento do leite com AGPI e antioxidantes promoveu aumento da massa
271 muscular e maior redução nos níveis plasmáticos de LDL.

272 Tabela 3. Peso corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee, peso de órgãos, tecidos musculares e tecidos adiposos de ratos diabéticos
 273 suplementados com leite integral (L-COM), leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI) e leite enriquecido com ácidos
 274 graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)

Parâmetros	Tratamentos ¹				EPM	Contrastes ortogonais ¹		
	COM	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A		1	2	3
Peso corporal inicial (g)	84,50 ± 15,09	82,43 ± 11,56	84,10 ± 17,50	83,61 ± 12,07	2,378	0,837	0,829	0,950
Peso corporal final (g)	256,75 ± 31,53	259,14 ± 32,75	273,10 ± 36,28	265,22 ± 37,56	5,954	0,502	0,540	0,684
Comprimento naso-anal (cm)	21,40 ± 1,02	21,57 ± 0,67	21,40 ± 0,65	21,11 ± 0,93	0,157	0,983	0,355	0,563
Índice de Lee	304,98 ± 9,13	305,88 ± 6,08	309,47 ± 11,23	307,32 ± 6,53	1,465	0,490	0,405	0,646
Fígado (g/100g)	4,43 ± 0,27	4,33 ± 0,36	4,38 ± 0,29	4,19 ± 0,36	0,059	0,291	0,860	0,289
Músculo gastrocnêmio (g/100g)	0,45 ± 0,10	0,40 ± 0,06	0,42 ± 0,05	0,52 ± 0,06	0,015	0,778	0,018	0,012
Músculo sóleo (g/100g)	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,001	0,04 ± 0,01	0,001	0,358	0,546	0,744
Gordura no fígado (g/100g)	2,90 ± 0,23	2,97 ± 0,12	2,93 ± 0,23	2,92 ± 0,24	0,043	0,702	0,659	0,948
Periepididimal (g/100g)	0,44 ± 0,15	0,58 ± 0,24	0,44 ± 0,18	0,41 ± 0,25	0,038	0,524	0,086	0,831
Retroperitoneal (g/100g)	0,12 ± 0,12	0,28 ± 0,32	0,22 ± 0,21	0,20 ± 0,35	0,047	0,243	0,504	0,918
Subcutânea (g/100g)	0,30 ± 0,17	0,37 ± 0,23	0,24 ± 0,09	0,34 ± 0,19	0,033	0,749	0,394	0,372
Gordura marrom (g/100g)	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,002	0,007	0,429	0,538
Mesentérica (g/100g)	0,29 ± 0,12	0,31 ± 0,08	0,35 ± 0,03	0,21 ± 0,04	0,021	0,981	0,569	0,027

275 Dados apresentados em média ± desvio padrão. ¹Probabilidade de contrastes ortogonais significativos, Os efeitos testados usando contrastes ortogonais foram 1) CON vs, L-
 276 COM, L-AGPI e L-AGPI/A, 2) L-COM vs, L-AGPI e L-AGPI/A, e 3) L-AGPI vs, L-AGPI/A.

277

278

279

280

281

282

283

284

285 Tabela 4. Parâmetros plasmáticos de ratos diabéticos suplementados com leite integral (L-COM), leite enriquecido com ácidos graxos poli-
 286 insaturados (L-AGPI) e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)

Parâmetros ¹	Tratamentos ¹				EPM	Contrastes ortogonais ¹		
	CON	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A		1	2	3
Glicemia pós-indução(mg/dL)	328,33±44,73	297,57±48,78	272,60±47,23	257,00±37,31	9,585	0,017	0,125	0,530
Glicemia final (mg/dL)	341,14 ± 53,07	353,20 ± 61,19	303,60 ± 53,84	300,57 ± 46,46	11,152	0,368	0,086	0,923
Triglicerídeos (mg/dL)	73,76 ± 13,42	75,91 ± 11,03	65,76 ± 14,04	67,39 ± 15,73	2,779	0,502	0,225	0,851
Colesterol (mg/dL)	65,59 ± 8,14	71,41 ± 12,12	65,84 ± 12,72	66,98 ± 7,39	1,793	0,528	0,301	0,844
VLDL (mg/dL)	14,75 ± 2,68	15,18 ± 2,21	13,15 ± 2,81	13,48 ± 3,15	0,555	0,502	0,225	0,851
HDL (mg/dL)	38,05 ± 2,90	41,61 ± 5,48	39,57 ± 6,00	44,20 ± 8,67	1,284	0,195	0,933	0,215
LDL (mg/dL)	12,79 ± 2,79	14,62 ± 1,87	13,12 ± 0,84	9,30 ± 2,87	0,614	0,693	0,008	0,011
AST(mg/dL)	102,11 ± 20,05	115,58 ± 22,73	100,56 ± 19,33	100,36 ± 19,01	3,957	0,699	0,175	0,986
ALT (mg/dL)	45,99 ± 7,39	45,51 ± 6,13	48,48 ± 7,47	46,59 ± 8,36	1,476	0,800	0,622	0,690
Frutosamina (mg/dL)	1,41 ± 0,15	1,29 ± 0,25	1,19 ± 0,26	1,14 ± 0,22	0,045	0,011	0,644	0,003
Tióis (nmol/mL)	279,46 ± 36,52	303,17 ± 29,47	309,36 ± 36,17	303,95 ± 32,74	7,050	0,145	0,840	0,793
Tióis (nmol/mg proteína)	4,06 ± 0,71	4,18 ± 0,55	4,16 ± 0,51	4,21 ± 0,36	0,098	0,636	0,994	0,858
TAC (µmoles/50 uL)	13,26 ± 3,76	11,39 ± 1,95	20,40 ± 4,08	20,06 ± 3,13	1,115	0,030	0,001	0,868
TAC (µmoles/mg proteína)	4,11 ± 0,93	3,40 ± 0,71	5,66 ± 0,79	5,92 ± 0,64	0,282	0,038	0,001	0,581

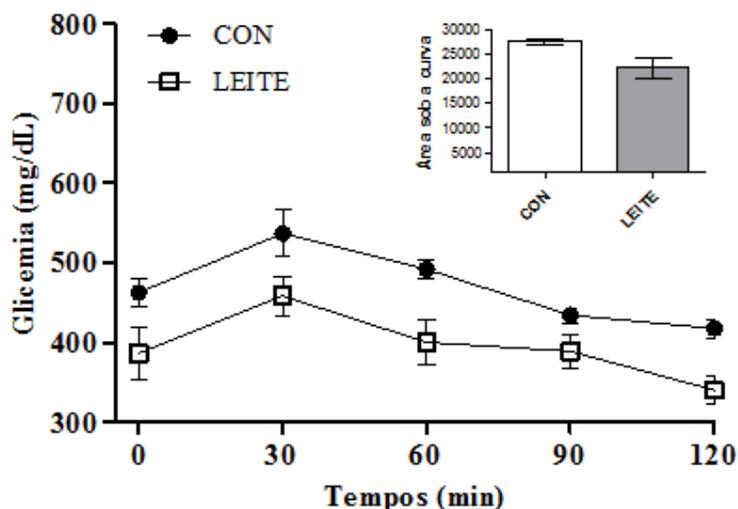
287 Dados apresentados em média ± desvio padrão. ¹Probabilidade de contrastes ortogonais significativos, Os efeitos testados usando contrastes ortogonais foram 1) CON vs, L-
 288 COM, L-AGPI e L-AGPI/A, 2) L-COM vs, L-AGPI e L-AGPI/A, e 3) L-AGPI vs, L-AGPI/A. ¹VLDL = lipoproteína de densidade muito baixa, HDL = lipoproteína de alta
 289 densidade, LDL = lipoproteína de baixa densidade, AST = aspartato transaminase, ALT=alanina aminotransferase, TAC = capacidade antioxidante total.

290
 291
 292
 293
 294
 295
 296

297 Tabela 5. Valores de glicemia (mg/dL) no teste de tolerância à glicose oral de ratos diabéticos controle e suplementados com leite integral (L-
 298 COM), leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI) e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-
 299 AGPI/A)

Parâmetros	Tratamentos ¹				EPM	Contrastes ortogonais ¹		
	COM	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A		1	2	3
0 minuto	462,75 ± 49,40	391,43 ± 149,95	379,00 ± 129,09	361,50 ± 95,80	20,644	0,072	0,680	0,769
30minutos	536,75 ± 83,59	456,57 ± 94,92	426,00 ± 129,76	458,75 ± 74,77	18,422	0,032	0,750	0,529
60minutos	492,00 ± 31,22	405,14 ± 134,31	373,67 ± 132,84	399,50 ± 103,61	20,392	0,032	0,708	0,654
90minutos	434,25 ± 27,89	382,29 ± 88,27	372,33 ± 125,88	392,50 ± 93,86	16,062	0,168	0,997	0,674
120minutos	407,50 ± 33,82	312,57 ± 91,12	330,67 ± 159,78	364,25 ± 82,60	18,593	0,053	0,444	0,525
Média	468,65 ± 37,28	389,60 ± 103,07	376,33 ± 122,14	395,30 ± 82,50	17,000	0,036	0,927	0,694
Área sob a curva	27365,6 ± 1710,7	22757,1 ± 5778,8	22150,8 ± 7510,7	23633,1 ± 4982,1	992,010	0,047	0,955	0,602

300 Dados apresentados em média ± desvio padrão. ¹Probabilidade de contrastes ortogonais significativos, Os efeitos testados usando contrastes ortogonais foram 1) CON vs, L-
 301 COM, L-AGPI e L-AGPI/A, 2) L-COM vs, L-AGPI e L-AGPI/A, e 3) L-AGPI vs, L-AGPI/A.



302

303 **Figura 1** – Média glicêmica obtida durante teste de tolerância à glicose oral de ratos diabéticos
 304 do grupo controle (água) e grupo suplementado com leite [média dos tratamentos: leite integral
 305 (L-COM); leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI); e leite enriquecido
 306 com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)]. As barras expressam EPM.
 307 Detalhe: área sob a curva.

308

309 4. Discussão

310 As recomendações para produtos lácteos são baseadas tradicionalmente no
 311 fornecimento de nutrientes, como também pela contribuição na saúde dos ossos. No
 312 entanto, outras funcionalidades como redução no risco de diabetes podem estar
 313 associadas. Em revisão sistemática com meta-análise de quatro estudos que datam desde
 314 2004, foi constatado que o risco relativo para diabetes tipo 2 era de 10% menor em
 315 pessoas com maior consumo de leite quando comparado a baixo consumo (Elwood *et*
 316 *al.*, 2008). Os produtos lácteos quando classificados em função da quantidade de
 317 gordura, baixa ou alta concentração, nem sempre apresentam uma dose resposta linear
 318 na prevenção da diabetes (Aune *et al.*, 2013; Rice *et al.*, 2013), demonstrando também
 319 que outros fatores como a composição da gordura podem ser determinantes nos efeitos
 320 positivos.

321 O leite contém os nutrientes necessários ao crescimento e desenvolvimento do
 322 neonato (Jensen, 1995). Esses nutrientes são secretados em proporções que têm relação
 323 com o estado da vaca, bem como sua alimentação. O teor de gordura no leite é o
 324 parâmetro mais responsivo às estratégias alimentares. A suplementação lipídica de
 325 vacas com AG de cadeia longa pode resultar na produção de leite com menor teor de

326 gordura do que o habitual (Kouba & Mourot, 2011), por isso, o grupo experimental que
327 recebeu leite rico em AGPI apresentou menor ingestão de gordura.

328 O leite integral proporcionou aos ratos maior ingestão de ácidos graxos de cadeia
329 média e saturados (C12-16) porque normalmente este leite apresenta maiores
330 concentrações destes AG (Tabela 2). Isto se deve ao fato de que, na vaca, a fermentação
331 ruminal converte os ácidos graxos insaturados da dieta em saturados, para depois serem
332 utilizados na glândula mamária para a síntese da gordura do leite. Todavia, a
333 suplementação das vacas com óleo de linhaça evitou, em parte, a biohidrogenação dos
334 AG e elevou as concentrações de AGPI e CLA no leite (Benchaar *et al.*, 2012), isso fez
335 com que os ratos alimentados com este leite apresentassem maior ingestão de AGPI e
336 CLA.

337 Os compostos fenólicos do leite em sua maioria são provenientes da dieta do
338 ruminante (O'connell & Fox, 2001), que são metabólitos dos compostos fenólicos
339 dietéticos modificados no rúmen antes da absorção (Gagnon *et al.*, 2009). A
340 suplementação das vacas leiteiras com produto à base de própolis e vitamina E
341 enriqueceu o leite com compostos fenólicos, cuja ingestão pelos ratos foi elevada nesse
342 grupo experimental, com efeito positivo no aumento da massa muscular indicando
343 menor taxa de catabolismo proteico. Na DM a ingestão de compostos fenólicos é
344 benéfica por sua atividade hipoglicêmica, como observado em plantas medicinais que
345 contêm os flavonoides como principais compostos fenólicos (Malviya *et al.*, 2010; Patel
346 *et al.*, 2012). Segundo Górecka *et al.* (2014), em testes *in vitro* e *in vivo*, a epicatequina
347 (flavonoide) estimula a síntese de insulina e o nível de AMPc nas células β das ilhotas
348 de Lagerhans, aumentando a secreção de insulina. E outra catequina, epigallocatequina-
349 3-galato (EGCG), tem efeito hipoglicêmico constatado pela inibição na produção de
350 glicose no fígado.

351 No DM ocorrem mudanças significativas na concentração, composição e
352 metabolismo de lipídios. As alterações são de natureza oxidativa, com aumento da
353 peroxidação lipídica associado com a hiperlipidemia (Malviya *et al.*, 2010). A
354 dislipidemia é um importante fator de risco para doenças cardiovasculares em pacientes
355 com DM (Qidwai & Ashfaq, 2014) e estes apresentam de 2 a 3 vezes mais risco de
356 sofrer um infarto do miocárdio e um acidente vascular cerebral (Turner *et al.*, 1998).
357 Desta forma, o controle destes parâmetros é fundamental para prevenir as complicações
358 decorrentes do DM.

359 A redução da concentração sanguínea de LDL observada nos ratos diabéticos
360 suplementados com leite rico em AGPI é benéfica devido a seu fator de risco para
361 ocorrência de doenças coronarianas (Pfeuffer & Schrezenmeir, 2000). Esse fato pode ter
362 relação com a composição desse leite que, em comparação ao leite integral, continha
363 menores teores de AG 12:0, 14:0 e 16:0, os quais são reportados por apresentar
364 propriedades de aumento do colesterol (Fernandez & West, 2005). Por outro lado, a
365 diminuição do LDL pode ter resultado do aumento de atividade dos receptores a essa
366 lipoproteína e catabolismo de colesterol no fígado em razão da maior ingestão de AG
367 ômega 6 (Fernandez & West, 2005) com o leite enriquecido. A ingestão suplementar de
368 AGMI, como a proporcionada aos ratos diabéticos neste estudo, foi relatada por
369 (Nicolosi, 1997) como causa da remoção hepática de LDL em hamsters alimentados
370 com óleos vegetais poli-insaturados.

371 A DM pode produzir descompensações metabólicas e com o tempo gerar
372 complicações crônicas, como a cegueira (Kollias & Ulbig, 2010; Payne *et al.*, 2014),
373 aterosclerose (Strahan *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015), insuficiência renal (Pálsson &
374 Patel, 2014) e infarto (Horton *et al.*, 2015). O controle da hiperglicemia em pacientes
375 diabéticos é essencial na prevenção destas doenças crônicas associadas (Smith-Palmer
376 *et al.*, 2014). Estudos constatam que há uma relação inversa entre a ingestão de produtos
377 lácteos e suscetibilidade ao diabetes (Hirahatake *et al.*, 2014).

378 Os ratos diabéticos que receberam suplementação alimentar com leite apresentaram
379 quadro hiperglicêmico mais ameno logo após a indução do diabetes com a
380 estreptozotocina e, também, melhor tolerância à glicose durante o GTT oral. Tais
381 efeitos podem estar relacionados com a presença de cálcio ou com as proteínas do soro
382 do leite, ambos com efeitos indiretos sobre a glicemia. Em estudo com modelos de ratos
383 obesos, a suplementação de cálcio diminuiu a produção de citocinas inflamatórias,
384 estresse oxidativo e acúmulo de lipídios em células gordurosas (Sun & Zemel, 2006),
385 tais reduções podem levar a melhor sensibilidade à insulina e, portanto, redução na
386 hiperglicemia do DM. A manutenção dos níveis adequados de cálcio é importante,
387 pois, quando este mineral está em baixa concentração na dieta há uma elevada produção
388 nos níveis sanguíneos de calcitriol (1,25-dihidroxitamina D) derivado da vitamina D
389 reguladora de cálcio, a qual tem atividade pró-inflamatória e atividade obesogênica
390 (Zemel, 2003). As proteínas do soro podem conferir propriedades reguladoras da
391 glicemia por meio de estímulo a secreção de hormônios intestinais e incretinas, os quais
392 regulam a liberação de insulina (Jakubowicz & Froy, 2013).

393 O consumo de leite foi citado com uma correlação negativa significativa com a
394 síndrome metabólica em homens de meia idade em um estudo realizado no Reino Unido
395 (Elwood *et al.*, 2007). Em outro trabalho realizado com humanos, com 5232
396 participantes, para avaliar a associação entre ingestão de produtos lácteos e a incidência
397 de DM2 (Struijk *et al.*, 2013), os autores constataram que a ingestão de queijo e
398 produtos lácteos fermentados não apresentou um efeito forte suficiente para evitar o
399 risco de diabetes, mas reduziram significativamente os níveis glicêmicos.

400 A gordura marrom consiste em pequenos adipócitos, com muitas gotículas de
401 lipídios no citoplasma (multiloculares), núcleo central e um elevado número de
402 mitocôndrias que, quando ativadas produzem calor, importante no desenvolvimento do
403 neonato (Tews & Wabitsch, 2011). Esta gordura depende principalmente do
404 metabolismo de lipídios, tendo as proteínas UCP1 ativadas pelos ácidos graxos.
405 Adicionalmente ao uso de lipídios, a gordura marrom exibe uma elevada taxa de
406 captação de glicose, particularmente sob ativação simpática (Cannon & Nedergaard,
407 2004). Este tecido também responde à insulina com um aumento de 5 vezes na captação
408 de glicose, sem qualquer alteração no fluxo sanguíneo (Orava *et al.*, 2011). No presente
409 trabalho, ratos diabéticos que receberam a suplementação láctea apresentaram maior
410 depósito de gordura marrom que os do grupo controle. O aumento de tal tecido pode ter
411 contribuído para os efeitos metabólicos benéficos constatados pela suplementação.

412 O equilíbrio entre os ácidos graxos AG n6:n3 no grupo L-AGPI apresentou razão
413 2,28:1, ficando abaixo do valor máximo recomendado de 4:1 para benefícios na saúde
414 (HMSO, 1994). Os grupos de ratos diabéticos suplementados com leite rico em AGPI
415 apresentaram parâmetros plasmáticos com maior capacidade antioxidante, ou ainda,
416 com quadro de estresse oxidativo reduzido, e conseqüentemente apresentaram menor
417 glicemia de jejum. Os AGPI e os AG-n3 foram reconhecidos pelos seus efeitos
418 benéficos na saúde humana (Guadarrama-López *et al.*, 2014). Estes benefícios foram
419 constatados por regulação em vias metabólicas e inflamatórias, doenças
420 cardiovasculares, e também na homeostase da glicose e sensibilidade à insulina (Serhan
421 *et al.*, 2008; Flachs *et al.*, 2014). Em meta-análise em artigos publicados com humanos,
422 foi constatado que a ingestão de AG-n3 reduziu estatisticamente o risco de DM2 (Muley
423 *et al.*, 2014).

424 Um dos parâmetros avaliados neste trabalho foi a concentração plasmática de
425 frutosamina. A frutosamina representa, de forma genérica, as proteínas glicadas que se
426 transformam em uma cetoamina estável, cuja maior parcela está ligada a albumina. Os

427 níveis de frutamina no sangue refletem, portanto, o controle da glicemia nas últimas
428 semanas, pois há uma relação direta entre os níveis hiperglicêmicos e o grau de glicação
429 de proteínas no sangue. São diversos os distúrbios funcionais resultantes da glicação de
430 proteínas, sendo um dos principais determinantes das doenças vasculares associadas
431 com o DM (Koga, 2014). No presente trabalho, a ingestão de leite reduziu os níveis de
432 frutamina no sangue de ratos diabéticos, indicando que tais animais apresentaram um
433 controle glicêmico melhor que os animais diabéticos que não ingeriram leite.

434 A composição do leite integral contém vitaminas E, A e C (Lindmark-Månsson &
435 Åkesson, 2000) em boas concentrações, e traços de outros compostos, como os
436 fenólicos. No entanto, estas concentrações não foram suficientes para aumentar a
437 capacidade antioxidante plasmática. O leite enriquecido naturalmente pela alimentação
438 da vaca com AGPI, própolis e vitamina E apresentou maior quantidade de compostos
439 fenólicos e estes foram efetivos em aumentar a capacidade antioxidante no plasma dos
440 ratos diabéticos. Efeito semelhante ao deste estudo foi observado por (Baro *et al.*, 2003)
441 ao utilizar leite semidesnatado enriquecido industrialmente com AGPI ômega-3 e
442 vitaminas, incluindo A e E. O consumo deste leite reduziu fatores de risco para doenças
443 cardiovasculares, como as concentrações sanguíneas de homocisteína, colesterol total,
444 LDL e resistência à oxidação da LDL.

445 Não foram encontrados trabalhos semelhantes a este na literatura. Sendo assim, foi
446 possível constatar que a alimentação de vacas leiteiras com adição de óleo rico em
447 AGPI e antioxidantes transfere parte destas características ao produto leite. E que o leite
448 obtido enriquecido naturalmente com AGPI, comprovou a nossa hipótese, com um
449 efeito funcional no seu consumidor final, neste caso a melhora na capacidade
450 antioxidante plasmática e redução na hiperglicemia de jejum de ratos diabéticos.

451

452 **5. Conclusão**

453 O leite de vaca integral e enriquecido naturalmente com ácidos graxos poli-
454 insaturados e antioxidantes, por meio de dietas especiais oferecidas às vacas, agregaram
455 funcionalidades a este alimento que são relevantes para o controle metabólico do
456 diabetes mellitus.

457

458

459

460

461 **6. Apoio Financeiro**

462 O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
463 Tecnológico (CNPQ), Brasília, DF, Brasil, nº do processo: 485566/2012-5,
464 Universal/2012.

465

466 **7. Referências**

467

468 Aune D, Norat T, Romundstad P & Vatten LJ (2013) Dairy products and the risk of
469 type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis of cohort
470 studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* **98**, 1066-1083.

471 Ballali S & Lanciari F (2012) Functional food and diabetes: a natural way in diabetes
472 prevention? *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **63**, 51-61.

473 Baro L, Fonolla J, Pena JL, Martinez-Ferez A, Lucena A, Jimenez J, Boza JJ & Lopez-
474 Huertas E (2003) n-3 Fatty acids plus oleic acid and vitamin supplemented milk
475 consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of
476 endothelial adhesion molecules in healthy humans. *Clin Nutr* **22**, 175-182.

477 Benchaar C, Romero-Pérez G, Chouinard P, Hassanat F, Eugene M, Petit H & Côrtes C
478 (2012) Supplementation of increasing amounts of linseed oil to dairy cows fed
479 total mixed rations: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics,
480 protozoal populations, and milk fatty acid composition. *Journal of dairy science*
481 **95**, 4578-4590.

482 Bligh EG & Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification.
483 *Canadian journal of biochemistry and physiology* **37**, 911-917.

484 Cannon B & Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological
485 significance. *Physiological reviews* **84**, 277-359.

486 Elwood PC, Givens DI, Beswick AD, Fehily AM, Pickering JE & Gallacher J (2008)
487 The Survival Advantage of Milk and Dairy Consumption: an Overview of
488 Evidence from Cohort Studies of Vascular Diseases, Diabetes and Cancer.
489 *Journal of the American College of Nutrition* **27**, 723S-734S.

490 Elwood PC, Pickering JE & Fehily AM (2007) Milk and dairy consumption, diabetes
491 and the metabolic syndrome: the Caerphilly prospective study. *Journal of*
492 *epidemiology and community health* **61**, 695-698.

493 Erel O (2004) A novel automated direct measurement method for total antioxidant
494 capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical*
495 *biochemistry* **37**, 277-285.

496 Faure P & Lafond J-L (1995) Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups
497 as a possible indicator of protein oxidation. In *Analysis of free radicals in*
498 *biological systems*, pp. 237-248: Springer.

499 Fernandez ML & West KL (2005) Mechanisms by which Dietary Fatty Acids Modulate
500 Plasma Lipids1. *The Journal of Nutrition* **135**, 2075-2078.

501 Flachs P, Rossmeisl M & Kopecky J (2014) The effect of n-3 fatty acids on glucose
502 homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol Res* **63**, S93-118.

503 Folch J, Lees M & Sloane-Stanley G (1957) A simple method for the isolation and
504 purification of total lipids from animal tissues. *J Biol chem* **226**, 497-509.

505 Friedewald WT, Levy RI & Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of
506 low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative
507 ultracentrifuge. *Clinical chemistry* **18**, 499-502.

- 508 Gagnon N, Côrtes C, da Silva D, Kazama R, Benchaar C, dos Santos G, Zeoula L &
509 Petit HV (2009) Ruminant metabolism of flaxseed (*Linum usitatissimum*) lignans
510 to the mammalian lignan enterolactone and its concentration in ruminal fluid,
511 plasma, urine and milk of dairy cows. *British Journal of Nutrition* **102**, 1015-
512 1023.
- 513 Górecka AK, Stojko AR, Górecki M, Stojko J, Sosada M & Zięba GS (2014) Structure
514 and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules* **19**, 78-
515 101.
- 516 Guadarrama-López AL, Valdés-Ramos R & Martínez-Carrillo BE (2014) Type 2
517 Diabetes, PUFAs, and Vitamin D: Their Relation to Inflammation. *Journal of*
518 *Immunology Research* **2014**, 860703.
- 519 Harlev E, Nevo E, Mirsky N & Ofir R (2013) Antidiabetic attributes of desert and
520 steppic plants: a review. *Planta medica* **79**, 425-436.
- 521 Hartman L & Lago R (1973) Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids.
522 *Laboratory practice* **22**, 475.
- 523 Hirahatake KM, Slavin JL, Maki KC & Adams SH (2014) Associations between dairy
524 foods, diabetes, and metabolic health: Potential mechanisms and future
525 directions. *Metabolism* **63**, 618-627.
- 526 HMSO U (1994) Nutritional aspects of cardiovascular disease (report on health and
527 social subjects No. 46): London: HMSO.
- 528 Horton WB, Taylor JS, Ragland TJ & Subauste AR (2015) Diabetic muscle infarction: a
529 systematic review. *BMJ Open Diabetes Research & Care* **3**, e000082.
- 530 Jakubowicz D & Froy O (2013) Biochemical and metabolic mechanisms by which
531 dietary whey protein may combat obesity and Type 2 diabetes. *The Journal of*
532 *Nutritional Biochemistry* **24**, 1-5.
- 533 Jensen RG (1995) *The Handbook of Milk Composition* Academic Press.
- 534 Joseph J & Ackman R (1992) Capillary column gas chromatographic method for
535 analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study.
536 *Journal of AOAC international* **75**, 488-506.
- 537 Kiokias SN, Dimakou CP, Tsaprouni IV & Oreopoulou V (2006) Effect of
538 compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food
539 emulsions. *Food Biophysics* **1**, 115-123.
- 540 Koga M (2014) Glycated albumin; clinical usefulness. *Clinica Chimica Acta* **433**, 96-
541 104.
- 542 Kollias AN & Ulbig MW (2010) Diabetic Retinopathy: Early Diagnosis and Effective
543 Treatment. *Deutsches Arzteblatt International* **107**, 75-84.
- 544 Kouba M & Mourot J (2011) A review of nutritional effects on fat composition of
545 animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids.
546 *Biochimie* **93**, 13-17.
- 547 Lindmark-Månsson H & Åkesson B (2000) Antioxidative factors in milk. *British*
548 *Journal of Nutrition* **84**, 103-110.
- 549 Maia EL & Rodriguez-Amaya DB (1993) Avaliação de um método simples e
550 econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies
551 de peixes. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **53**, 27-35.
- 552 Malviya N, Jain S & Malviya S (2010) Antidiabetic potential of medicinal plants. *Acta*
553 *Poloniae Pharmaceutica* **67**, 113-118.
- 554 Martin CA, de Oliveira CC, Visentainer JV, Matsushita M & de Souza NE (2008)
555 Optimization of the selectivity of a cyanopropyl stationary phase for the gas
556 chromatographic analysis of trans fatty acids. *Journal of Chromatography A*
557 **1194**, 111-117.

- 558 McGuire S (2011) U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and
559 Human Services, Dietary Guidelines for Americans, 2010. 7th Edition,
560 Washington, DC: U.S. Government Printing Office, January 2011. *Advances in*
561 *Nutrition: An International Review Journal* **2**, 293-294.
- 562 Mirmiran P, Bahadoran Z & Azizi F (2014) Functional foods-based diet as a novel
563 dietary approach for management of type 2 diabetes and its complications: A
564 review. *World journal of diabetes* **5**, 267.
- 565 Muley A, Muley P & Shah M (2014) ALA, fatty fish or marine n-3 fatty acids for
566 preventing DM?: a systematic review and meta-analysis. *Current diabetes*
567 *reviews* **10**, 158-165.
- 568 Nicolosi RJ (1997) Dietary fat saturation effects on low-density-lipoprotein
569 concentrations and metabolism in various animal models. *The American Journal*
570 *of Clinical Nutrition* **65**, 1617S-1627S.
- 571 Novelli E, Diniz Y, Galhardi C, Ebaid G, Rodrigues H, Mani F, Fernandes AAH,
572 Cicogna AC & Novelli Filho J (2007) Anthropometrical parameters and markers
573 of obesity in rats. *Laboratory Animals* **41**, 111-119.
- 574 O'connell J & Fox P (2001) Significance and applications of phenolic compounds in the
575 production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy*
576 *Journal* **11**, 103-120.
- 577 Orava J, Nuutila P, Lidell ME, Oikonen V, Noponen T, Viljanen T, Scheinin M,
578 Taittonen M, Niemi T & Enerbäck S (2011) Different metabolic responses of
579 human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell metabolism*
580 **14**, 272-279.
- 581 Pálsson R & Patel UD (2014) Cardiovascular Complications of Diabetic Kidney
582 Disease. *Advances in chronic kidney disease* **21**, 273-280.
- 583 Patel DK, Prasad SK, Kumar R & Hemalatha S (2012) An overview on antidiabetic
584 medicinal plants having insulin mimetic property. *Asian Pacific Journal of*
585 *Tropical Biomedicine* **2**, 320-330.
- 586 Payne AJ, Kaja S, Naumchuk Y, Kunjukunju N & Koulen P (2014) Antioxidant Drug
587 Therapy Approaches for Neuroprotection in Chronic Diseases of the Retina.
588 *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 1865-1886.
- 589 Pfeuffer M & Schrezenmeir J (2000) Bioactive substances in milk with properties
590 decreasing risk of cardiovascular diseases. *British Journal of Nutrition* **84**, 155-
591 159.
- 592 Qidwai W & Ashfaq T (2014) Effect of Dietary Supplementation of Black Seed (N.
593 Sativa L.) on Lipid Profile of Patients Suffering from Diabetes. *Anti-*
594 *Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Cu* **13**,
595 3-8.
- 596 Rice BH, Quann EE & Miller GD (2013) *Meeting and exceeding dairy*
597 *recommendations: effects of dairy consumption on nutrient intakes and risk of*
598 *chronic disease*.
- 599 Serhan CN, Chiang N & Van Dyke TE (2008) Resolving inflammation: dual anti-
600 inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* **8**, 349-361.
- 601 Shaw JE, Sicree RA & Zimmet PZ (2010) Global estimates of the prevalence of
602 diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* **87**, 4-14.
- 603 Silva S, Bronze MR, Figueira ME, Siwy J, Mischak H, Combet E & Mullen W (2015)
604 Impact of a 6-wk olive oil supplementation in healthy adults on urinary
605 proteomic biomarkers of coronary artery disease, chronic kidney disease, and
606 diabetes (types 1 and 2): a randomized, parallel, controlled, double-blind study.
607 *The American Journal of Clinical Nutrition* **101**, 44-54.

- 608 Smith-Palmer J, Brändle M, Trevisan R, Orsini Federici M, Liabat S & Valentine W
609 (2014) Assessment of the association between glycemic variability and diabetes-
610 related complications in type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Research and*
611 *Clinical Practice* **105**, 273-284.
- 612 Sponer P, Kucera T, Brtkova J & Srot J (2013) The management of Charcot midfoot
613 deformities in diabetic patients. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **56**, 3-8.
- 614 Strahan S, Harvey RM, Campbell-Lloyd A, Beller E, Mundy J & Shah P (2013)
615 Diabetic control and coronary artery bypass: effect on short-term outcomes.
616 *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals* **21**, 281-287.
- 617 Struijk EA, Heraclides A, Witte DR, Soedamah-Muthu SS, Geleijnse JM, Toft U & Lau
618 CJ (2013) Dairy product intake in relation to glucose regulation indices and risk
619 of type 2 diabetes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* **23**, 822-
620 828.
- 621 Sun X & Zemel MB (2006) Dietary calcium regulates ROS production in aP2-agouti
622 transgenic mice on high-fat//high-sucrose diets. *Int J Obes* **30**, 1341-1346.
- 623 Tews D & Wabitsch M (2011) Renaissance of Brown Adipose Tissue. *Hormone*
624 *Research in Paediatrics* **75**, 231-239.
- 625 Turner RC, Millns H, Neil HAW, Stratton IM, Manley SE, Matthews DR & Holman
626 RR (1998) *Risk factors for coronary artery disease in non-insulin dependent*
627 *diabetes mellitus: United Kingdom prospective diabetes study (UKPDS: 23)*.
- 628 Visentainer JV (2012) Analytical aspects of the flame ionization detector response of
629 fatty acid esters in biodiesels and foods. *Química Nova* **35**, 274-279.
- 630 Vyncke W (1970) Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic
631 acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette, Seifen,*
632 *Anstrichmittel* **72**, 1084-1087.
- 633 Zemel M (2003) Role of dietary calcium and dairy products in modulating adiposity.
634 *Lipids* **38**, 139-146.
- 635 Zhu QY, Hackman RM, Ensunsa JL, Holt RR & Keen CL (2002) Antioxidative
636 activities of oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 6929-
637 6934.
- 638 Zulueta A, Maurizi A, Frígola A, Esteve M, Coli R & Burini G (2009) Antioxidant
639 capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *International Dairy Journal*
640 **19**, 380-385.
641

1 **Funcionalidade do leite de vacas alimentadas com óleo de linhaça e antioxidantes**
2 **como suplemento dietético para ratos obesos**

3 (Normas: British Journal of Nutrition)
4

5 **Resumo**

6 A composição dos ácidos graxos do leite pode ser alterada pela alimentação das
7 vacas para melhorar o consumo dos ácidos graxos na saúde humana, adicionando outra
8 funcionalidade a este alimento. Desta forma, objetivou-se avaliar os efeitos da
9 suplementação na dieta de ratos obesos de leite integral e leite enriquecido
10 naturalmente, com ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e antioxidantes, pela
11 alimentação da vaca, em parâmetros relevantes para os distúrbios metabólicos causados
12 pela obesidade. Foram utilizados quarenta ratos machos, linhagem *Wistar* com 28 dias
13 de idade, distribuídos em quatro tratamentos experimentais de ratos obesos (indução por
14 dieta hipercalórica). Os tratamentos foram: controle (CON), leite integral (L-COM),
15 leite enriquecido com AGPI (L-AGPI), leite enriquecido com AGPI e antioxidantes (L-
16 AGPI/A). A suplementação na dose de 0,005 mL/g de peso corporal foi realizada
17 durante 85 dias. A suplementação com leite integral reduziu o diâmetro de adipócitos
18 ($P=0,068$) e reduziu a resistência à insulina, com valores de área sob a curva no
19 tratamento L-COM ($15.072,9 \pm 1.801,4$), L-AGPI ($16.032,2 \pm 2.773,2$) e L-AGPI/A
20 ($16.952,0 \pm 2.232,7$) menores em relação ao tratamento CON ($18.289,7 \pm 1.617,3$;
21 $P=0,002$). A taxa de desaparecimento da glicose (kitt) aumentou com a suplementação
22 alimentar de leite ($P=0,002$). O leite enriquecido com ômega-3 e antioxidantes (L-
23 AGPI/A) resultou em maior deposição de massa muscular ($P=0,030$), menor acúmulo
24 de tecido adiposo de gordura mesentérica ($P=0,037$) e menor concentração sanguínea de
25 LDL ($P=0,076$). As suplementações com leite integral e enriquecido com AGPI e
26 antioxidantes reduziram os efeitos metabólicos da obesidade, como a resistência à
27 insulina e aumento da taxa de desaparecimento da glicose.

28
29 **Palavras-chave:** alimentos funcionais, insulina, obesidade, ômega-3, própolis
30
31
32
33
34

35 **1. Introdução**

36 A obesidade é considerada um desafio global de saúde pública, caracterizada por um
37 acúmulo excessivo de gordura que acompanha uma grande variedade de problemas para
38 a saúde (Yatsuya *et al.*, 2014). Sua etiologia pode decorrer da associação de diversos
39 fatores como a idade, o gênero, predisposição genética, como também por hábitos de
40 sedentarismo e consumo de alimentos altamente calóricos (Diniz *et al.*, 2008).

41 As taxas de obesidade estão aumentando no geral e também em adultos mais velhos,
42 em ambos os gêneros, em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (Finucane *et al.*,
43 2011). O excesso de peso e a obesidade são fatores de risco para doenças
44 cardiovasculares (Glück *et al.*, 2015), hipertensão, dislipidemia (Mishra *et al.*, 2016),
45 diabetes tipo 2 (Hurt *et al.*, 2010) e uma série e tipos de câncer (Calle & Kaaks, 2004).

46 Desenvolver políticas públicas para apoiar e melhorar a nutrição apresenta-se como
47 alternativa de ótimo custo-benefício para a manutenção da saúde, principalmente em
48 ambientes de recursos limitados (McKinnon *et al.*, 2015). O consumo de leite e
49 produtos lácteos, além da sua importante função nutricional, tem sido associado a efeitos
50 benéficos na saúde como o controle de distúrbios metabólicos (Crichton *et al.*, 2011;
51 Rice *et al.*, 2011; Ricci-Cabello *et al.*, 2012; Hirahatake *et al.*, 2014), regulação no peso
52 corporal (Eller & Reimer, 2010b) e controle da sensibilidade a insulina (Eller & Reimer,
53 2010a). Os componentes como a proteína do soro (Jakubowicz & Froy, 2013) e cálcio
54 (Sun & Zemel, 2006) tem sido relacionado com estes benefícios.

55 Os ácidos graxos poli-insaturados, particularmente o ômega-3, presente nos
56 alimentos funcionais apresentam diversos benefícios na saúde humana, dentre eles o
57 efeito antiobesidade (Balogun & Cheema, 2016). Em estudos com roedores, o efeito do
58 ômega-3 reduziu o tamanho dos adipócitos (Parrish *et al.*, 1990), impediu o
59 desenvolvimento de resistência à insulina (Kuda *et al.*, 2009) e reduziu a obesidade
60 (Ruzickova *et al.*, 2004).

61 Os compostos fenólicos são estudados em pesquisa com animais e humanos por
62 seus benefícios para a saúde, por apresentarem efeito anti-hipertensivo, cardioprotetor
63 (Ebaid *et al.*, 2010), hipoglicemiante (Hocayen *et al.*, 2015), hipolipidêmico (Monika &
64 Geetha, 2015), anti-inflamatório (Marimoutou *et al.*, 2015), antioxidante (Cushnie &
65 Lamb, 2005) e coadjuvante no tratamento da obesidade por inibir a diferenciação dos
66 adipócitos (Santiago-Mora *et al.*, 2011).

67 Neste sentido, a partir da produção de um leite naturalmente enriquecido pela
68 alimentação das vacas leiteiras com ômega-3 (óleo de linhaça) e antioxidantes (própolis

69 e vitamina E) foi testada a hipótese de que este pode atuar como alimento funcional na
70 prevenção e redução da obesidade. Objetivou-se avaliar a suplementação alimentar de
71 leite enriquecido em parâmetros metabólicos de ratos obesos.

72

73 **2. Material e Métodos**

74 *2.1. Animais, tratamentos e procedimentos experimentais*

75 O experimento foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (DFS) e os
76 animais obtidos do Biotério Central, ambos pertencentes à Universidade Estadual de
77 Maringá. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso
78 de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (UEM, Maringá,
79 Paraná, Brasil) – Parecer nº115/2012.

80 Foram utilizados quarenta ratos (*Rattus norvegicus*) machos, linhagem *Wistar*, com
81 28 dias de idade. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas coletivas
82 (46×24×20 cm), com cinco animais por gaiola. As condições do biotério foram:
83 temperatura de 24°C, fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, água e ração *ad*
84 *libitum*.

85 A suplementação com leite foi iniciada logo após o desmame dos animais (idade de
86 28 dias) e realizada diariamente por sonda esofágica, as 09h00m. Foi estabelecida, a
87 partir da recomendação do Guia Dietético para Americanos (McGuire, 2011), a dose de
88 0,005 mL/g de peso corporal. A dose foi ajustada semanalmente de acordo com o peso
89 dos animais. Foram estabelecidos quatro tratamentos experimentais (n=8 para cada
90 tratamento): 1) água (controle-CON), 2) leite integral (L-COM), 3) leite enriquecido
91 com AGPI (L-AGPI) e 4) leite enriquecido com AGPI e antioxidantes (L-AGPI/A).

92 Os três tipos leite in natura (Tabela 1) utilizado para a suplementação dos ratos foi
93 obtido de vacas leiteiras utilizadas no experimento prévio (capítulo I da tese) como
94 segue: L-COM proveniente de vacas que receberam uma dieta controle; L-AGPI
95 provenientes de vacas alimentadas com dieta controle + óleo de linhaça, 25 g/kg na MS;
96 L-AGPI/A proveniente de vacas alimentadas com dieta basal + óleo de linhaça + aditivo
97 à base de própolis, 10 mg de flavonoides/kg de MS + vitamina E, 375 UI/kg de MS.

98 As amostras de leite foram acondicionadas em tubos de polietileno (12 mL) e
99 congeladas em freezer (-12° C). Imediatamente antes de fornecer aos ratos, o leite foi
100 descongelado em geladeira (2° C) e homogeneizado em agitador tipo vortex durante 5
101 minutos.

102

103 Tabela 1. Composição dos três tipos de leites utilizados na suplementação alimentar de
 104 ratos obesos; L-COM: leite integral; L-AGPI: leite enriquecido com ácidos graxos poli-
 105 insaturados (AGPI); L-AGPI/A: leite enriquecido com AGPI e antioxidantes

	Tratamentos		
	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A
Composição química (mg/mL)			
Gordura	29,80	26,86	27,78
Proteína	28,99	28,99	29,26
Lactose	46,31	45,81	47,50
Sólidos totais	114,40	112,59	113,95
Composição de ácidos graxos (mg/mL)			
12:0	0,82	0,64	0,67
14:0	2,70	2,53	2,49
16:0	7,02	5,96	5,34
18:0	1,73	3,34	3,28
18:1n9t	0,18	0,58	0,70
18:1n-9	4,01	6,52	5,89
18:2n-6	0,47	0,66	0,70
18:3n-3	0,06	0,30	0,29
18:2n(9c11t)	0,09	0,12	0,12
18:2(t10c12)	0,02	0,03	0,03
Total CLA	0,11	0,15	0,15
AGS ¹	13,98	14,00	13,42
AGMI	5,43	8,23	7,61
AGPI	0,67	1,14	1,17
n-6/n-3	8,61	2,28	2,55
Qualidade antioxidante e estabilidade oxidativa			
Compostos fenólicos (EAG mg/L)	11,33	10,16	18,15
Orac (ET mmol/L)	10,57	11,18	14,70
Poder redutor (EAG mg/L)	25,85	35,78	38,32
Dieno conjugados (mmol/kg gordura)	41,51	59,55	54,53
TBARS (mmol/kg gordura)	2,68	5,28	3,43

106 ¹CLA=ácido linoleico conjugado, AGS=ácidos graxos saturados, AGMI=ácidos graxos monoinsaturados,
 107 AGPI=ácidos graxos poli-insaturados, EAG=equivalente ácido gálico, ET=equivalente Trolox®.

108

109 O período experimental foi de 85 dias. Os ratos foram alimentados com dieta
 110 hipercalórica desde o início do experimento para indução da obesidade. A dieta foi à
 111 base de ração Nuvilab CR1 (Nuvital®, Colombo, PR, Brasil) (51.4%), leite condensado
 112 (33%), açúcar (7%) e água (8.6%) (de Lima *et al.*, 2008). Apresentou a composição
 113 química (g/kg MS): 156,5 g/kg de proteína bruta, 22,9 g/kg de fibra, 995,5 g/kg de
 114 matéria orgânica e 4.303,2 kcal/kg de energia bruta.

115 Um grupo de animais controle (n=8) foi alimentado com uma dieta basal comercial
116 Nuvilab CR1 (Nuvital®, Colombo, PR, Brasil), sem nenhum tipo de suplementação,
117 para servir de parâmetro na confirmação da obesidade dos demais grupos.

118

119 *2.1.1. Parâmetros avaliados durante o período experimental*

120 Ingestão alimentar: A quantidade de ração fornecida e a não ingerida pelos animais
121 (sobras) foi diariamente registrada para obtenção da ingestão alimentar.

122 Ganho de peso corporal: os animais foram pesados semanalmente, possibilitando
123 calcular o ganho de peso corporal durante o período experimental.

124 O teste de tolerância a insulina intraperitoneal (ITT; 1 U insulina/kg) foi realizada
125 nos animais obesos, amostras de sangue foram coletadas no tempo 0 (basal), 15, 30, 60,
126 120, 240, e 300 minutos após a injeção de insulina. A taxa de desaparecimento da
127 glicose (Kitt) foi calculada pela curva de regressão linear do logaritmo neperiano da
128 glicose versus tempo entre os tempos 0 e 120 minutos e foi expresso em % por minuto.

129

130 *2.1.2. Eutanásia dos animais e parâmetros avaliados*

131 Ao final do período experimental, os animais, em jejum noturno por 12 horas, foram
132 anestesiados com thionembusal sódico (Thionembusal®, Abbott, São Paulo, SP, Brasil),
133 com dose de 40 mg/kg de peso corporal. Após o registro do comprimento nasoanal, os
134 animais foram submetidos à laparotomia mediana e amostras de sangue foram colhidas
135 através da veia cava inferior. Tais amostras foram centrifugadas (2.500g, 20 min) e
136 armazenadas em freezer (-20°C) para posteriores análises bioquímicas. Após
137 eutanasiados foram retirados e pesados o fígado, testículos, vesículas seminais, rins,
138 músculos sóleo e gastrocnêmico e os depósitos de gordura periepididimal,
139 retroperitoneal, mesentérica, subcutânea e marrom. Um fragmento do fígado foi
140 congelado em nitrogênio líquido e mantido em freezer -80°C. A determinação da
141 quantidade de gordura hepática foi feita por métodos gravimétricos. O índice de Lee foi
142 obtido pela razão entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento nasoanal do rato.

143 Os adipócitos foram isolados de acordo com Rodbell (1964) com modificações, e o
144 diâmetro determinado. O tecido adiposo retroperitoneal foi fragmentado e colocado em
145 4 mL de tampão digestivo (DMEM/HEPES 25 mM (SciencePro, São Caetano do Sul,
146 SP), soro albumina bovina fração V (BSA) a 4%, colagenase II 1,25 mg/mL, pH 7,4 a
147 37°C) por 20 minutos (37°C), sob agitação constante (150 rpm em banho-maria de
148 agitação orbital). Em seguida, o tecido digerido foi filtrado, colocado em tubo cônico e

149 lavado três vezes com 25 mL de tampão EHB (EARLE/HEPES, São Caetano do Sul,
150 SP) 20 mM contendo BSA a 1%, piruvato de sódio 1mM, sem glicose, pH 7,4 a 37°C
151 (tampão EARLE/HEPES/BSA – EHB). O diâmetro dos adipócitos (100 células por
152 animal) foi mensurado através de um sistema de análise de imagem (Image-Pro Plus
153 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

154

155 2.2. *Análises bioquímicas*

156 A determinação das concentrações sanguíneas de glicose, colesterol total, HDL,
157 triglicerídeos, aspartato aminotransferase (AST), e alanina aminotransferase (ALAT) foi
158 realizada com uso de métodos colorimétricos (Gold Analisa[®], Belo Horizonte, MG) e
159 espectrofotômetro (Bioplus2000[®], São Paulo, SP). A concentração de LDL foi
160 calculada pela equação Friedewald, $LDL \text{ (mg/dL)} = \text{colesterol total} - HDL -$
161 $(\text{triglicerídeo}/2.2)$.

162 A oxidação de proteínas sanguíneas foi avaliada pela determinação de tióis
163 reduzidos (Faure & Lafond, 1995). O radical ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-
164 6-ácido sulfônico]) foi utilizado para análise da capacidade antioxidante total (TAC) do
165 sangue (Orel, 2004).

166

167 2.3. *Análises estatísticas*

168 O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. As variáveis
169 foram submetidas à análise de variância segundo modelo geral: $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$, em
170 que: Y_{ij} = variáveis observadas; μ = média geral; T_i = efeito do tratamento k, de 1 a 4; e_{ij}
171 = erro aleatório. Contrastes ortogonais foram utilizados para comparar os efeitos de: 1)
172 Efeito do leite (CON vs L-COM, L-AGPI e L-AGPI/A), 2) efeito leite enriquecido com
173 AGPI (L-COM vs L-AGPI e L-AGPI/A), e 3) efeito do leite enriquecido com
174 antioxidante (L-AGPI vs L-AGPI/A). A significância foi considerada em $P < 0,05$ e
175 tendências foram aceitas em $P \leq 0,10$.

176

177 3. **Resultados**

178 O quadro característico da obesidade foi confirmado com base nos parâmetros de
179 peso corporal final (397,20 vs 376,65 g), índice de lee (307, 37 vs 304,98) e soma das
180 quantidades de gordura periepididimal, retroperitoneal, subcutânea e mesentérica (22,63
181 vs 15,86 g), respectivamente, para valores médios de todos os animais obesos (n=32)
182 em comparação com um grupo controle (n=8) que recebeu uma dieta convencional.

183 A ingestão dos componentes do leite, proteína e lactose, não diferiram entre os
184 diferentes tipos de leite suplementados. A maior ingestão de gordura foi superior no L-
185 COM em relação ao L-AGPI e não diferiu do tratamento L-AGPI/A. O perfil dos ácidos
186 graxos ingeridos provenientes da suplementação com leite foi alterada de acordo com o
187 tipo de leite fornecido. A suplementação com L-COM proporcionou maior ($P<0,001$)
188 ingestão dos AG de cadeia média (12:0, 16:0) e menor ingestão dos AG de cadeia longa
189 (C18:0, 18:1, 18:2, 18:3 e CLA) ($P<0,001$). Os tratamentos L-AGPI e L-AGPI/A
190 resultaram em maior ingestão ($P<0,001$) dos AG de cadeia longa, AGMI e AGPI e na
191 menor razão n6:n3. Ainda o tratamento L-AGPI/A resultou em maior ingestão de
192 compostos fenólicos ($P<0,001$) (Tabela 2).

193 A suplementação com leite (contraste 1) reduziu o diâmetro de adipócitos ($P=0,068$)
194 e não alterou os parâmetros de peso corporal (inicial e final), comprimento nasoanal,
195 índice de lee, músculos, órgãos e composição de gordura (Tabela 3). A suplementação
196 com leite enriquecido com ômega-3 e antioxidantes (L-AGPI/A) resultou em maior
197 índice de lee ($P=0,061$) e maior peso de massa muscular do músculo gastrocnemio
198 ($P=0,030$) e músculo sóleo ($P=0,082$). Ainda neste grupo experimental houve menor
199 acúmulo de tecido adiposo de gordura mesentérica ($P=0,037$) comparado ao tratamento
200 L-AGPI.

201 Os ratos obesos do tratamento L-AGPI/A apresentaram menor concentração
202 sanguínea de LDL ($P=0,076$). Os demais parâmetros plasmáticos não foram alterados
203 pelos tratamentos experimentais (Tabela 4).

204 A curva glicêmica (Tabela 5) dos ratos obesos suplementados com leite foi alterada
205 nos primeiros horários (0 e 2 horas). O leite enriquecido com ômega-3 reduziu a
206 glicemia no tempo zero ($P=0,075$) e o efeito do leite (contraste 1) reduziu a glicemia
207 no tempo de 2 horas ($P=0,031$).

208 A suplementação alimentar dos ratos obesos com leite reduziu a resistência a
209 insulina (Tabela 5), houve redução significativa da glicemia após a administração da
210 insulina nos tempos, 15 ($P=0,001$), 60 ($P=0,001$), 120 ($P=0,077$), 180 ($P=0,048$) e 300
211 minutos ($P=0,002$) e, também no valor médio glicêmico ($P=0,002$) e no valor da área
212 sob a curva ($P=0,002$). A taxa de desaparecimento da glicose (kitt) aumentou
213 significativamente com a suplementação alimentar de leite ($P=0,002$).

214

215

216 Tabela 2. Ingestão (mg/dia) de gordura, proteína, lactose e ácidos graxos da
 217 suplementação por leite dos ratos obesos com leite integral (L-COM), leite enriquecido
 218 com ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI) e leite enriquecido com ácidos graxos
 219 poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)

Item (mg/d)	Tratamentos ¹			EPM	P
	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A		
Gordura	36,92a	32,90b	33,86ab	0,623	0,016
Proteína	35,91	33,88	35,68	0,598	0,366
Lactose	57,38	50,50	57,91	0,897	0,725
12:0	1,02a	0,71b	0,82b	0,023	<0,001
14:0	3,34	2,79	3,04	0,055	0,053
16:0	8,70a	6,57b	6,51c	0,210	<0,001
18:0	2,14b	3,68a	4,00a	0,180	<0,001
18:1n9t	0,23c	0,64b	0,85a	0,052	<0,001
18:1n-9	4,96c	7,98a	7,18b	0,266	<0,001
18:2n-6	0,58b	0,72a	0,85a	0,025	<0,001
18:3n-3	0,07b	0,33a	0,35a	0,025	<0,001
18:2n(9c11t)	0,11b	0,13a	0,15a	0,004	<0,001
Total CLA	0,14b	0,17a	0,18a	0,005	<0,001
AGS ²	17,31	15,43	16,36	0,277	0,329
AGMI	6,72b	9,07a	9,28a	0,306	<0,001
AGPI	0,83b	1,25a	1,42a	0,055	<0,001
Compostos fenólicos	0,014b	0,011c	0,022a	0,001	<0,001

220 ¹L-COM, grupo obeso suplementado com leite integral; L-AGPI, grupo obeso suplementado com leite
 221 enriquecido com AGPI; L-AGPI/A, grupo obeso suplementado com leite enriquecido com AGPI e
 222 antioxidantes, ²AGS = ácidos graxos saturados, AGMI = ácidos graxos monoinsaturados, AGPI = ácidos
 223 graxos poliinsaturados. Compostos fenólicos = equivalente ácido gálico. Valores com letras diferentes
 224 nas linhas diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

225 Tabela 3 – Peso corporal, comprimento nasoanal, índice de Lee, peso de órgãos, tecidos musculares e tecidos adiposos de ratos obesos
 226 suplementados com leite integral (L-COM), leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI) e leite enriquecido com ácidos
 227 graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)

Parâmetros	Tratamentos ¹				EPM	Contrastes ortogonais ²		
	COM	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A		1	2	3
Peso corporal inicial (g)	75,90 ± 9,78	78,05 ± 9,97	76,85 ± 9,20	77,56 ± 13,30	1,369	0,684	0,840	0,887
Peso corporal final (g)	406,90 ± 26,39	391,25 ± 27,20	393,25 ± 33,84	397,44 ± 25,31	4,554	0,228	0,719	0,759
Comprimento naso-anal (cm)	23,79 ± 0,71	23,43 ± 0,69	23,51 ± 0,46	23,20 ± 0,66	0,109	0,095	0,610	0,182
Índice de lee	311,53 ± 8,98	312,09 ± 4,58	311,38 ± 5,36	316,84 ± 3,29	1,061	0,382	0,371	0,061
Fígado (g/100g)	3,60 ± 0,34	3,47 ± 0,27	3,63 ± 0,23	3,61 ± 0,23	0,045	0,883	0,165	0,954
Músculo gastrocnemio (g/100g)	0,57 ± 0,06	0,55 ± 0,09	0,54 ± 0,11	0,62 ± 0,12	0,016	0,789	0,232	0,030
Músculo sóleo (g/100g)	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,001	0,792	0,697	0,082
Gordura no fígado (g/100g)	4,05 ± 0,27	4,08 ± 0,22	4,03 ± 0,30	4,10 ± 0,30	0,057	0,900	0,932	0,705
Diâmetro de adipócitos (µm)	45,07 ± 2,06	43,88 ± 4,66	45,01 ± 3,42	44,36 ± 6,00	3,634	0,068	0,971	0,953
	Gorduras (g/100g PC)							
Periepididimal	1,64 ± 0,34	1,53 ± 0,22	1,56 ± 0,22	1,77 ± 0,37	0,044	0,929	0,385	0,351
Retroperitoneal	1,94 ± 0,30	1,94 ± 0,39	1,86 ± 0,21	2,20 ± 0,31	0,049	0,824	0,697	0,084
Subcutânea	1,50 ± 0,38	1,42 ± 0,36	1,28 ± 0,34	1,61 ± 0,38	0,061	0,557	0,978	0,129
Mesentérica	0,89 ± 0,24	0,66 ± 0,16	0,92 ± 0,16	0,82 ± 0,24	0,046	0,162	0,053	0,406

228 Dados apresentados em média ± desvio padrão. ¹CON, grupo obeso controle; L-COM, grupo obeso suplementado com leite integral; L-AGPI, grupo obeso suplementado com
 229 leite enriquecido com AGPI; L-AGPI/A, grupo obeso suplementado com leite enriquecido com AGPI e antioxidantes. ²Probabilidade de contrastes ortogonais significativos,
 230 Os efeitos testados usando contrastes ortogonais foram 1) CON vs, L-COM, L-AGPI e L-AGPI/A, 2) L-COM vs, L-AGPI e L-AGPI/A, e 3) L-AGPI vs, L-AGPI/A.

231
 232
 233
 234
 235

236 Tabela 4 - Parâmetros plasmáticos de ratos obesos suplementados com leite integral (L-COM), leite enriquecido com ácidos graxos poli-
 237 insaturados (L-AGPI) e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)

Parâmetros	Tratamentos ¹				EPM	Contrastes ortogonais ²		
	CON	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A		1	2	3
Glicose (mg/dL)	82,40 ± 8,00	82,60 ± 8,58	82,10 ± 7,88	87,38 ± 8,40	1,320	0,595	0,514	0,184
Triglicerídeos (mg/dl)	86,14 ± 9,41	88,86 ± 7,31	85,86 ± 7,71	86,52 ± 8,72	1,595	0,811	0,527	0,893
Colesterol (mg/dl)	77,63 ± 7,48	80,40 ± 8,32	76,41 ± 9,70	75,65 ± 9,41	1,557	0,970	0,266	0,869
VLDL (mg/dl)	17,23 ± 1,88	17,77 ± 1,46	17,17 ± 1,54	17,30 ± 1,74	0,319	0,811	0,527	0,893
HDL (mg/dl)	30,01 ± 6,23	31,50 ± 4,56	30,27 ± 4,22	33,12 ± 3,72	0,821	0,429	0,924	0,240
LDL (mg/dl)	30,39 ± 3,97	30,13 ± 2,09	28,97 ± 3,07	25,23 ± 4,66	0,836	0,264	0,124	0,076
TGO (mg/dl)	98,82 ± 9,67	95,00 ± 14,19	93,08 ± 16,00	95,67 ± 4,42	2,392	0,487	0,922	0,72
TGP (mg/dl)	30,48 ± 4,24	30,71 ± 6,31	29,98 ± 4,51	29,68 ± 5,76	0,956	0,883	0,722	0,919
Tióis (nmol/mL)	221,87 ± 19,78	211,24 ± 16,32	218,50 ± 17,90	223,44 ± 22,40	3,614	0,630	0,313	0,637
Tióis (nmol/mg proteína)	3,39 ± 0,41	3,30 ± 0,47	3,36 ± 0,46	3,37 ± 0,41	0,078	0,819	0,756	0,989
TAC (umoles/50 uL)	13,94 ± 2,08	12,98 ± 3,13	12,14 ± 3,91	13,58 ± 1,75	0,609	0,501	0,943	0,421
TAC (umoles/mg proteína)	3,84 ± 0,32	3,77 ± 0,40	3,70 ± 0,27	3,87 ± 0,28	0,065	0,718	0,928	0,405

238 Dados apresentados em média ± desvio padrão. ¹CON, grupo obeso controle; L-COM, grupo obeso suplementado com leite integral; L-AGPI, grupo obeso suplementado com
 239 leite enriquecido com AGPI; L-AGPI/A, grupo obeso suplementado com leite enriquecido com AGPI e antioxidantes. ²Probabilidade de contrastes ortogonais significativos,
 240 Os efeitos testados usando contrastes ortogonais foram 1) CON vs, L-COM, L-AGPI e L-AGPI/A, 2) L-COM vs, L-AGPI e L-AGPI/A, e 3) L-AGPI vs, L-AGPI/A.

241
 242
 243
 244
 245
 246
 247

248 Tabela 5 – Valores de glicemia (mg/dL) na curva glicêmica em ratos obesos suplementados com leite integral (L-COM), leite enriquecido com
 249 ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI) e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)

Horário	Tratamentos ¹				EPM	Contrastes ortogonais ²		
	CON	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A		1	2	3
18:00h	98,86 ± 6,41	99,43 ± 3,46	91,86 ± 5,98	96,71 ± 7,32	1,208	0,283	0,075	0,140
20:00h	113,71 ± 6,34	107,14 ± 6,20	105,71 ± 8,98	107,86 ± 5,27	1,352	0,031	0,911	0,563
22:00h	120,43 ± 5,38	119,43 ± 10,47	116,57 ± 8,83	121,14 ± 10,99	1,670	0,733	0,894	0,361
06:00h	108,71 ± 7,16	106,71 ± 10,05	102,43 ± 7,76	106,86 ± 6,39	1,485	0,340	0,579	0,308
Média	110,43 ± 5,55	108,18 ± 6,13	104,14 ± 4,32	108,14 ± 4,80	1,031	0,128	0,410	0,166
Área sob a curva	1363,29 ± 64,93	1337,71 ± 87,95	1295,86 ± 43,78	1345,57 ± 75,31	13,332	0,238	0,604	0,195

250 Dados apresentados em média ± desvio padrão. ¹CON, grupo obeso controle; L-COM, grupo obeso suplementado com leite integral; L-AGPI, grupo obeso suplementado com
 251 leite enriquecido com AGPI; L-AGPI/A, grupo obeso suplementado com leite enriquecido com AGPI e antioxidantes. ²Probabilidade de contrastes ortogonais significativos,
 252 Os efeitos testados usando contrastes ortogonais foram 1) CON vs, L-COM, L-AGPI e L-AGPI/A, 2) L-COM vs, L-AGPI e L-AGPI/A, e 3) L-AGPI vs, L-AGPI/A.
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265

266 Tabela 6 - Valores de glicemia (mg/dL) no teste de tolerância a insulina em ratos obesos suplementados com leite integral (L-COM), leite
 267 enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados (L-AGPI) e leite enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes (L-AGPI/A)

Parâmetros	Tratamentos ¹				EPM	Contrastes ortogonais ²		
	CON	L-COM	L-AGPI	L-AGPI/A		1	2	3
0 minuto	91,30 ± 9,03	98,7 ± 7,27	95,50 ± 7,90	99,11 ± 7,24	1,317	0,031	0,666	0,340
15 minutos	88,90 ± 13,66	70,40 ± 9,12	69,20 ± 5,09	77,44 ± 7,84	1,944	0,001	0,436	0,067
30 minutos	52,10 ± 5,38	49,80 ± 8,84	46,20 ± 3,71	55,33 ± 11,12	1,299	0,561	0,750	0,014
60 minutos	41,20 ± 6,80	32,20 ± 6,55	31,50 ± 5,56	33,22 ± 4,82	1,123	0,001	0,945	0,537
120 minutos	32,80 ± 9,32	24,60 ± 4,50	26,60 ± 4,22	33,89 ± 7,24	1,204	0,077	0,036	0,022
180 minutos	66,20 ± 8,74	47,60 ± 15,51	55,20 ± 19,74	56,78 ± 22,80	2,877	0,048	0,224	0,844
240 minutos	77,30 ± 11,91	70,20 ± 11,98	76,80 ± 19,11	75,00 ± 17,40	2,407	0,562	0,349	0,800
300 minutos	88,90 ± 8,89	72,10 ± 12,01	76,80 ± 10,94	78,89 ± 10,59	1,924	0,002	0,177	0,672
Média	67,34 ± 4,99	58,20 ± 5,07	59,74 ± 6,92	63,71 ± 5,40	1,047	0,002	0,120	0,135
Área sob a curva	18.289,7 ± 1617,3	15.072,9 ± 1801,4	16.032,2 ± 2773,2	16.952,0 ± 2232,7	383,564	0,006	0,100	0,358
Kitt ¹ (%/min)	1,47 ± 0,31	1,88 ± 0,40	1,87 ± 0,31	1,89 ± 0,35	0,060	0,002	0,991	0,955

268 Dados apresentados em média ± desvio padrão. ¹CON, grupo obeso controle; L-COM, grupo obeso suplementado com leite integral; L-AGPI, grupo obeso suplementado com
 269 leite enriquecido com AGPI; L-AGPI/A, grupo obeso suplementado com leite enriquecido com AGPI e antioxidantes. ²Probabilidade de contrastes ortogonais significativos,
 270 Os efeitos testados usando contrastes ortogonais foram 1) CON vs, L-COM, L-AGPI e L-AGPI/A, 2) L-COM vs, L-AGPI e L-AGPI/A, e 3) L-AGPI vs, L-AGPI/A. ¹Kitt:
 271 Taxa de desaparecimento da glicose.

272

273 4. Discussão

274 A obesidade é definida como acúmulo excessivo de gordura e está associada a
275 condições fisiopatológicas como o diabete mellitus tipo 2 (DM2), doença cardiovascular
276 e dislipidemia (Hurt *et al.*, 2010). Ao nível celular, a obesidade é caracterizada por
277 aumento na massa de tecido adiposo, principalmente pelo aumento no tamanho
278 (hipertrofia) dos adipócitos (Van Harmelen *et al.*, 2003). A suplementação com leite,
279 independente do enriquecimento com ômega-3 e antioxidantes, reduziu o diâmetro dos
280 adipócitos do tecido adiposo. Apesar de não observar alterações na massa de tecido
281 adiposo e na lipídemia plasmática, sabe-se que adipócitos menores liberam menos
282 ácidos graxos e produzem menos triglicerídeos em relação aos maiores (Jamdar, 1978).

283 Diversos componentes encontrados no leite são sugeridos por regular a composição
284 corporal, como os aminoácidos, a vitamina D, o cálcio, fósforo e a lactose (Huth *et al.*,
285 2006). Sendo que o nível de regulação no peso corporal e composição corporal pode ser
286 dependente da fonte proteica e da concentração Ca na dieta (Eller & Reimer, 2010b;
287 Eller & Reimer, 2010a; Fried *et al.*, 2012).

288 A obesidade e a resistência a insulina são fatores que predispõem a de tolerância a
289 glicose e aumentam os riscos para o desenvolvimento do DM2. A suplementação de
290 ratos obesos com leite melhorou a resistência à insulina, sendo de fundamental
291 importância para evitar o aparecimento do próprio DM2 e doenças associadas.
292 Corroborando os resultados observados, Hirahatake *et al.* (2014) obtiveram por meio de
293 metanálise que a ingestão de leite e produtos lácteos reduziu à tolerância a glicose,
294 particularmente pelo aumento da sensibilidade a insulina e na função endócrina do
295 pâncreas. Este efeito pode estar relacionado com as proteínas do leite em conferir
296 propriedades de regulação da glicose por meio de hormônios intestinais e incretinas que
297 regulam a liberação de insulina e a motilidade intestinal (Jakubowicz & Froy, 2013).
298 Em estudo realizado com adultos obesos, o consumo de produtos lácteos por doze
299 semanas melhorou a resistência a insulina associado com redução de marcadores da
300 inflamação e estresse oxidativo, bem como o aumento de 55% nos níveis basais de
301 secreção do hormônio adiponectina produzido e secretado nos adipócitos, responsável
302 pela regulação da glicemia e sensibilidade a insulina (Stancliffe *et al.*, 2011).

303 O aumento da sensibilidade a insulina foi correlacionado com a leucina, um
304 aminoácido essencial presente no leite e produtos lácteos (Zemel, 2005). Eller *et al.*
305 (2013) ao estudarem o efeito da leucina, na alimentação de ratos obesos, constataram
306 uma maior sensibilidade a insulina, especificamente, por dois genes principais o

307 substrato do receptor de insulina (IRS hepática) e proteína quinase B (AKT), ambos
308 responsáveis pela sensibilidade a insulina. Adicionalmente, os mesmos autores
309 observaram menor peso corporal e redução na massa gorda com a suplementação de
310 leucina.

311 A adição de produto à base própolis e vitamina E na dieta com óleo de linhaça para
312 vacas leiteiras enriqueceu o leite com maior concentração de compostos fenólicos,
313 conseqüentemente, houve maior ingestão destes compostos pelos ratos obesos deste
314 grupo experimental que apresentou efeito hipolipidêmico e aumento da massa muscular
315 magra. Em estudo semelhante com ratos obesos, a suplementação com compostos
316 fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e fitoesteróis) proveniente de extrato de frutas
317 obteve resultado semelhante com menor concentração plasmática de LDL (Monika &
318 Geetha, 2015). Este efeito pode estar relacionado com a ação antioxidante dos
319 compostos fenólicos (Kurek-Górecka *et al.*, 2013) em reduzir as reações inflamatórias
320 característica da obesidade e da hiperlipidemia.

321 Alterações na composição corporal com o aumento da massa gorda e diminuição da
322 massa muscular magra são comumente observadas no quadro de envelhecimento (Landi
323 *et al.*, 2014). A perda de massa muscular induz de 2 a 3% no declínio da taxa
324 metabólica basal por década após os 20 anos de idade, e uma queda de 4% por década
325 após a idade de 50 anos (Buch *et al.*, 2016). Este quadro associado à inflamação
326 subclínica induzida pela obesidade pode contribuir para o desenvolvimento de
327 sarcopenia (Kim *et al.*, 2014). Desta forma, o aumento da massa muscular magra,
328 observado no presente trabalho, com a suplementação de leite enriquecido com ômega-
329 3 e antioxidantes pode reduzir a deterioração e disfunção muscular observado nos
330 quadros associados de obesidade.

331

332 **5. Conclusão**

333 O leite de vaca integral e enriquecido com ácidos graxos poli-insaturados e
334 antioxidantes apresentaram característica de um alimento funcional, por alterarem
335 parâmetros importantes no controle da obesidade, como a redução da resistência à
336 insulina e aumento da taxa de desaparecimento da glicose.

337

338

339

340

341 **6. Apoio Financeiro**

342 O projeto foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
 343 Tecnológico (CNPQ), Brasília, DF, Brasil, nº do processo: 485566/2012-5,
 344 Universal/2012.

345

346 **7. Referências**

- 347 Balogun KA & Cheema SK (2016) Dietary Omega-3 Fatty Acids Prevented Adipocyte
 348 Hypertrophy by Downregulating DGAT-2 and FABP-4 in a Sex-Dependent Fashion.
 349 *Lipids* **51**, 25-38.
- 350 Buch A, Carmeli E, Boker LK, Markus Y, Shefer G, Kis O, Berner Y & Stern N (2016) Muscle
 351 function and fat content in relation to sarcopenia, obesity and frailty of old age—An
 352 overview. *Experimental Gerontology*.
- 353 Calle EE & Kaaks R (2004) Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and
 354 proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* **4**, 579-591.
- 355 Crichton G, Bryan J, Buckley J & Murphy K (2011) Dairy consumption and metabolic
 356 syndrome: a systematic review of findings and methodological issues. *Obesity reviews*
 357 **12**, e190-e201.
- 358 Cushnie TT & Lamb AJ (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of*
 359 *Antimicrobial Agents* **26**, 343-356.
- 360 de Lima DC, Silveira SA, Haibara AS & Coimbra CC (2008) The enhanced hyperglycemic
 361 response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex.
 362 *Metabolic Brain Disease* **23**, 361-373.
- 363 Diniz YS, Burneiko RM, Seiva FR, Almeida FQ, Galhardi CM, Novelli Filho JLV, Mani F &
 364 Novelli EL (2008) Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects.
 365 *International Journal of Cardiology* **124**, 92-99.
- 366 Ebaid GM, Seiva FR, Rocha KK, Souza GA & Novelli EL (2010) Effects of olive oil and its
 367 minor phenolic constituents on obesity-induced cardiac metabolic changes. *Nutr J* **9**,
 368 46-46.
- 369 Eller LK & Reimer RA (2010a) Dairy protein attenuates weight gain in obese rats better than
 370 whey or casein alone. *Obesity* **18**, 704-711.
- 371 Eller LK & Reimer RA (2010b) A high calcium, skim milk powder diet results in a lower fat
 372 mass in male, energy-restricted, obese rats more than a low calcium, casein, or soy
 373 protein diet. *J Nutr* **140**, 1234-1241.
- 374 Eller LK, Saha DC, Shearer J & Reimer RA (2013) Dietary leucine improves whole-body
 375 insulin sensitivity independent of body fat in diet-induced obese Sprague–Dawley rats.
 376 *The Journal of nutritional biochemistry* **24**, 1285-1294.
- 377 Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, Singh GM, Gutierrez
 378 HR, Lu Y & Bahalim AN (2011) National, regional, and global trends in body-mass
 379 index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and
 380 epidemiological studies with 960 country-years and 9· 1 million participants. *The*
 381 *Lancet* **377**, 557-567.
- 382 Fried A, Manske SL, Eller LK, Lorincz C, Reimer RA & Zernicke RF (2012) Skim milk
 383 powder enhances trabecular bone architecture compared with casein or whey in diet-
 384 induced obese rats. *Nutrition* **28**, 331-335.
- 385 Glück T, Rupp H & Alter P (2015) Mechanisms increasing n-3 highly unsaturated fatty acids in
 386 the heart. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*.
- 387 Hirahatake KM, Slavin JL, Maki KC & Adams SH (2014) Associations between dairy foods,
 388 diabetes, and metabolic health: potential mechanisms and future directions.
 389 *Metabolism: Clinical and Experimental* **63**, 618-627.
- 390 Hocayen PdA, Grassioli S, Leite NC, Pochapski MT, Pereira RA, da Silva LA, Snack AL,
 391 Michel RG, Kagimura FY & da Cunha MA (2015) Baccharis dracunculifolia methanol

- 392 extract enhances glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets of
393 monosodium glutamate induced-obesity model rats. *Pharmaceutical biology*, 1-9.
- 394 Hurt RT, Kulisek C, Buchanan LA & McClave SA (2010) The obesity epidemic: challenges,
395 health initiatives, and implications for gastroenterologists. *Gastroenterology &*
396 *hepatology* **6**, 780.
- 397 Huth P, DiRienzo D & Miller G (2006) Major scientific advances with dairy foods in nutrition
398 and health. *Journal of Dairy Science* **89**, 1207-1221.
- 399 Jakubowicz D & Froy O (2013) Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey
400 protein may combat obesity and Type 2 diabetes. *The Journal of Nutritional*
401 *Biochemistry* **24**, 1-5.
- 402 Jamdar SC (1978) Glycerolipid biosynthesis in rat adipose tissue. Influence of adipose-cell size
403 and site of adipose tissue on triacylglycerol formation in lean and obese rats. *Biochem. J*
404 **170**, 153-160.
- 405 Kim TN, Park MS, Ryu JY, Choi HY, Hong HC, Yoo HJ, Kang HJ, Song W, Park SW & Baik
406 SH (2014) Impact of visceral fat on skeletal muscle mass and vice versa in a
407 prospective cohort study: the Korean Sarcopenic Obesity Study (KSOS). *PLoS ONE* **9**,
408 e115407.
- 409 Kuda O, Jelenik T, Jilkova Z, Flachs P, Rossmeisl M, Hensler M, Kazdova L, Ogston N,
410 Baranowski M & Gorski J (2009) n-3 fatty acids and rosiglitazone improve insulin
411 sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice
412 fed a high-fat diet. *Diabetologia* **52**, 941-951.
- 413 Kurek-Górecka A, Rzepecka-Stojko A, Górecki M, Stojko J, Sosada M & Świerczek-Zięba G
414 (2013) Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis.
415 *Molecules* **19**, 78-101.
- 416 Landi F, Marzetti E, Martone AM, Bernabei R & Onder G (2014) Exercise as a remedy for
417 sarcopenia. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* **17**, 25-31.
- 418 Marimoutou M, Le Sage F, Smadja J, d'Hellencourt CL, Gonthier M-P & Robert-Da Silva C
419 (2015) Antioxidant polyphenol-rich extracts from the medicinal plants *Antirhea*
420 *borbonica*, *Doratoxylon apetalum* and *Gouania mauritiana* protect 3T3-L1
421 preadipocytes against H₂O₂, TNF α and LPS inflammatory mediators by regulating the
422 expression of superoxide dismutase and NF- κ B genes. *Journal of Inflammation* **12**, 10.
- 423 McGuire S (2011) U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human
424 Services, Dietary Guidelines for Americans, 2010. 7th Edition, Washington, DC: U.S.
425 Government Printing Office, January 2011. *Advances in Nutrition: An International*
426 *Review Journal* **2**, 293-294.
- 427 McKinnon RA, Siddiqi SM, Chaloupka FJ, Mancino L & Prasad K (2015) Obesity-Related
428 Policy/Environmental Interventions: A Systematic Review of Economic Analyses.
429 *American Journal of Preventive Medicine*.
- 430 Mishra AK, Dubey V & Ghosh AR (2016) Obesity: An overview of possible role (s) of gut
431 hormones, lipid sensing and gut microbiota. *Metabolism: Clinical and Experimental* **65**,
432 48-65.
- 433 Monika P & Geetha A (2015) The modulating effect of *Persea americana* fruit extract on the
434 level of expression of fatty acid synthase complex, lipoprotein lipase, fibroblast growth
435 factor-21 and leptin-A biochemical study in rats subjected to experimental
436 hyperlipidemia and obesity. *Phytomedicine* **22**, 939-945.
- 437 Parrish C, Pathy D & Angel A (1990) Dietary fish oils limit adipose tissue hypertrophy in rats.
438 *Metabolism: Clinical and Experimental* **39**, 217-219.
- 439 Ricci-Cabello I, Herrera MO & Artacho R (2012) Possible role of milk-derived bioactive
440 peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome. *Nutrition Reviews* **70**,
441 241-255.
- 442 Rice BH, Cifelli CJ, Pikosky MA & Miller GD (2011) Dairy components and risk factors for
443 cardiometabolic syndrome: recent evidence and opportunities for future research.
444 *Advances in Nutrition: An International Review Journal* **2**, 396-407.
- 445 Rodbell M (1964) Localization of lipoprotein lipase in fat cells of rat adipose tissue. *Journal of*
446 *Biological Chemistry* **239**, 753-755.

- 447 Ruzickova J, Rossmeisl M, Prazak T, Flachs P, Sponarova J, Vecka M, Tvrzicka E, Bryhn M &
448 Kopecky J (2004) Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice
449 by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids* **39**, 1177-1185.
- 450 Santiago-Mora R, Casado-Diaz A, De Castro M & Quesada-Gómez J (2011) Oleuropein
451 enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis: the effect on differentiation in
452 stem cells derived from bone marrow. *Osteoporosis International* **22**, 675-684.
- 453 Stancliffe RA, Thorpe T & Zemel MB (2011) Dairy attenuates oxidative and inflammatory
454 stress in metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr*, ajcn. 013342.
- 455 Sun X & Zemel MB (2006) Dietary calcium regulates ROS production in aP2-agouti transgenic
456 mice on high-fat/high-sucrose diets. *Int J Obes* **30**, 1341-1346.
- 457 Van Harmelen V, Skurk T, Röhrig K, Lee Y, Halbleib M, Aprath-Husmann I & Hauner H
458 (2003) Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity
459 in women. *International Journal of Obesity* **27**, 889-895.
- 460 Yatsuya H, Li Y, Hilawe EH, Ota A, Wang C, Chiang C, Zhang Y, Uemura M, Osako A &
461 Ozaki Y (2014) Global trend in overweight and obesity and its association with
462 cardiovascular disease incidence. *Circulation Journal* **78**, 2807-2818.
- 463 Zemel MB (2005) The role of dairy foods in weight management. *Journal of the American*
464 *College of Nutrition* **24**, 537S-546S.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação com óleo de linhaça na dieta de vacas leiteiras pode alterar a população de microrganismos ruminais; a presença dos ácidos graxos poli-insaturados reduziu a população de protozoários ciliados e alterou a população de bactérias ruminais.

A associação de própolis e vitamina E não alterou os parâmetros digestivos e a microbiota ruminal. Os ácidos graxos poli-insaturados provenientes do óleo de linhaça foram parcialmente biohidrogenados no rúmen e a maior parte deles incorporados na gordura do leite, um fator importante para aumentar a qualidade e a funcionalidade do leite.

Os benefícios do consumo de leite integral foram constatados em ratos diabéticos pela redução de parâmetros glicêmicos e em ratos obesos por reduzir a resistência à insulina. O enriquecimento do leite com ácidos graxos poli-insaturados naturalmente pela alimentação das vacas com óleo de linhaça proporcionou menor concentração plasmática do colesterol LDL em ratos diabéticos e obesos. Estes resultados demonstram a importância do leite como alimento e sua funcionalidade na prevenção de doenças metabólicas como o diabetes e a obesidade.