

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFEITO DE ANTIOXIDANTES SOBRE O  
ESTRESSE OXIDATIVO E A QUALIDADE  
DO LEITE DE VACAS HOLANDESAS

Autor: Fabio Seiji dos Santos  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lúcia Maria Zeoula  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hélène V. Petit

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
novembro - 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFEITO DE ANTIOXIDANTES SOBRE O  
ESTRESSE OXIDATIVO E A QUALIDADE  
DO LEITE DE VACAS HOLANDESAS

Autor: Fabio Seiji dos Santos  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lúcia Maria Zeoula  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hélène V. Petit

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  
novembro - 2016

### Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S237e	<p>Santos, Fabio Seiji dos Efeito de antioxidantes sobre o estresse oxidativo e a qualidade do leite de vacas holandesas / Fabio Seiji dos Santos. - - Maringá, 2016. 77 f. : il., figs., tabs., color.</p> <p>Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lúcia Maria Zeoula Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Hélène V. Petit</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2016.</p> <p>1. Vacas leiteiras - Efeitos de oxidantes. 2. Vacas Holandesas - Qualidade do Leite. 3. Vaca - Linhaça - Lignana - Produção. 4. Extração de polifenóis. 5. Vacas leiteiras - Lipoperoxidação. I. Zeoula, Lúcia Maria, orient. II. Petit, Hélène V., coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.</p>
CDD 21. ed. 636.22	




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**EFEITO DE ANTIOXIDANTES SOBRE O  
ESTRESSE OXIDATIVO E A QUALIDADE  
DO LEITE DE VACAS HOLANDESAS**

Autor: Fábio Seiji dos Santos  
Orientadora Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lúcia Maria Zeoula

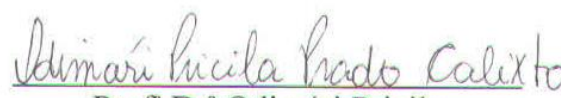
TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 18 de novembro de 2016.

  
Prof. Dr. Luciano Soares de Lima

  
Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

  
Prof. Dr. Luís Carlos Vinhas Ítavo

  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Odímári Pricila  
Prado Calixto

  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lúcia Maria Zeoula  
(Orientadora)

Aos meus pais, Geraldo Tadeu dos Santos e Ely Mitie Massuda, e ao meu irmão, Guilherme Kenzo dos Santos, que dignamente me apoiaram por todo esse árduo caminho com muita honestidade e paciência, o qual serviu de base para minhas conquistas.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A tese é um trabalho individual, mas não solitário. Muitos são os contributos para que, ao final se tenha um bom trabalho e estes são dignos de serem referidos. Por esta razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

à Universidade Estadual de Maringá, ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia e ao Dairy and Swine Research and Development Centre – Agriculture Agri-Food Canada (AFFC), que possibilitaram o desenvolvimento desta tese;

a professora Dr<sup>a</sup> Lúcia Maria Zeoula, minha orientadora e à Dr<sup>a</sup> Hélène V. Petit, minha coorientadora, pela oportunidade concedida, pela orientação dada, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes anos de trabalho, assim como pelas críticas e correções que, sem dúvidas, foram relevantes para a construção de parte do meu conhecimento;

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão das bolsas de estudos no Brasil e no exterior;

aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia e a professora do departamento de Agronomia, Dr<sup>a</sup> Paula Toshimi Matumoto Pinto que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desta tese;

aos pesquisadores do AAFC, Dr<sup>a</sup> Marie-France Palin, Dr. Candido Pomar, Dr. Chaouki Benchaar e Dr. Jérôme Lapoint, pelo apoio e amizade em momentos cruciais;

aos funcionários da Universidade Estadual de Maringá, Vicente Faleiros, Célio Passolongo, Valdeci dos Santos (Du), Denílson Vicentin e Ezupério da Silva e aos funcionários do AAFC, Isabelle Blanchet, Danièle Beaudry, Nathalie Gagnon, Caroline Roy, Steve Méthot e, pelo profissionalismo, pronto atendimento e pela amizade durante a realização dos experimentos;

aos colegas do grupo de pesquisa, Nadine Santos, Erica Machado, Bruna Calvo Augustinho, Jocasta Carraro, Jessyca Caroline Ribas, Janaina Bragatto, Emerson Henri Yoshimura, Thomer Durman, Guilherme Leão, Luciano Soares de Lima, Marcelo Rufino, Rodolfo Prado, Francilaine de Marchi, Camilo Ospina, Cristiane Regina do Amaral Duarte, pela colaboração no experimento realizado na Universidade Estadual de Maringá;

à equipe técnica do laboratório do Programa de Análises do Rebanho Leiteiro do Paraná (PARLPR) da Associação Paranaense dos Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, pela realização das análises de composição normal do leite;

aos amigos pela amizade e apoio;

a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, mais uma vez, muito obrigado.

## BIOGRAFIA

FABIO SEIJI DOS SANTOS, filho de Ely Mitie Massuda e Geraldo Tadeu dos Santos, nasceu na cidade de Rennes, localizada no oeste da França, no dia 15 de setembro de 1987.

Em março de 2011 graduou-se em Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá.

Em fevereiro de 2011, ingressou no mestrado e em março de 2013 recebeu o título de Mestre em Produção Animal, pelo Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

Em março de 2013, ingressou no doutorado em Produção Animal do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

De outubro de 2014 a outubro de 2015, foi contemplado com bolsa de doutorado-sanduiche pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico para a realização do estágio no Dairy and Swine Research Centre – Agriculture and Agri-Food Canada, na cidade de Sherbrooke, Estado de Quebec, Canadá, sob as supervisões das Dr<sup>as</sup> Hélène V. Petit e Marie-France Palin.

No dia 13 do mês de junho de 2016 foi marcado pela qualificação do doutorado o qual foi defendido no mês de novembro no dia 18, às 08 horas.



## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
I – INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Oxidação e antioxidantes.....	1
1.2 Linhaça .....	5
1.3 Balanço energético negativo .....	8
1.4 Erva mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) .....	11
Referências .....	17
II – OBJETIVOS GERAIS .....	25
III – FLAX MEAL SUPPLEMENTATION DECREASES ENERGETIC NEGATIVE BALANCE FOR HIGH-PRODUCING DAIRY COWS IN EARLY LACTATION FED PROTECTED FLAX OIL .....	26
Abstract .....	26
1. Introduction .....	26
2. Material and methods .....	28
2.1. <i>Animals and experimental treatments</i> .....	28
2.2. <i>Chemical analysis</i> .....	29
2.3. <i>Statistical analysis</i> .....	
	0
3. Results .....	30

4. Discussion .....	31
5. Conclusion .....	33
Acknowledgements .....	33
References .....	34
IV – INTAKE, DIGESTIBILITY AND MILK PRODUCTION AND COMPOSITION OF DAIRY COWS FED DIFFERENT LEVELS OF YERBA MATE IN THE DIET .....	42
Abstract .....	42
1. Introduction .....	42
2. Material and methods .....	44
2.1. <i>Animal, experimental design, and treatments</i> .....	44
2.2. <i>Experimental procedures</i> .....	44
2.3. <i>Chemical analysis</i> .....	45
2.4. <i>Statistical analysis</i> .....	47
3. Results .....	47
4. Discussion .....	48
5. Conclusions .....	51
Conflict of interest .....	51
Acknowledgments .....	51
References .....	52
V – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ERVA-MATE ( <i>Ilex paraguariensis</i> ) E VITAMINA E NO DESEMPENHO, QUALIDADE E LIPOPEROXIDAÇÃO DO LEITE DE VACAS RECEBENDO DIETAS CONTENDO GRÃOS DE SOJA .....	59
Resumo .....	59
Abstract .....	60
1. Introdução .....	60
2. Material e métodos .....	62
2.1. <i>Animais, dietas e procedimentos experimentais</i> .....	62
2.2. <i>Análises químicas</i> .....	64
2.3. <i>Análises estatísticas</i> .....	66
3. Resultados e discussão .....	66
4. Conclusão .....	69

Agradecimentos .....	69
Referências .....	69
VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	77

## LISTA DE TABELAS

		Páginas
I – INTRODUÇÃO		
Tabela 1	Variação do peso vivo na vaca leiteira no início da lactação em função de sua produção máxima .....	10
III – FLAX MEAL SUPPLEMENTATION DECREASES ENERGETIC NEGATIVE BALANCE FOR HIGH-PRODUCING DAIRY COWS IN EARLY LACTATION FED PROTECTED FLAX OIL		
Table 1	Ingredients and chemical composition of total mixed rations of Holstein cows fed no flax meal (COFO) or 136 g/kg flax meal (FMFO) in the dry matter (DM) .....	37
Table 2	Intake, milk production and composition and net energy balance of Holstein cows infused with 250 g/d flax oil and fed total mixed rations containing no flax meal (COFO) or 136 g/kg flax meal (FMFO) in the dry matter .....	38
Table 3	Concentrations of metabolites and catalase activity in the plasma of Holstein cows infused with 250g/d flax oil and fed total mixed rations containing no flax meal (COFO) or 136 g/kg flax meal (FMFO) in the dry matter .....	39
IV – INTAKE, DIGESTIBILITY AND MILK PRODUCTION AND COMPOSITION OF DAIRY COWS FED DIFFERENT LEVELS OF YERBA MATE IN THE DIET		
Table 1	Ingredient and chemical composition of the total mixed diet .....	56
Table 2	Intake of dry matter and digestibility of cows not supplemented (0 g/d), or supplemented (250, 500 or 750 g/d) with dried leaves of Yerba Mate in the diet .....	57

Table 3	Milk production and composition of Holstein cows not supplemented (0 g/d), or supplemented (250, 500 or 750 g/d) with dried leaves of Yerba Mate in the diet .....	58
---------	--	----

V – EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*) E VITAMINA E NO DESEMPENHO, QUALIDADE E LIPOPEROXIDAÇÃO DO LEITE DE VACAS RECEBENDO DIETAS CONTENDO GRÃOS DE SOJA

Tabela 1	Ingredientes, composição química das quatro dietas .....	73
Tabela 2	Ingestão de matéria seca, produção de leite e composição do leite de vacas da raça Holandês suplementadas com erva mate e vitamina E ...	74
Tabela 3	Ingestão de matéria seca, produção de leite e composição do leite de vacas da raça Holandês suplementadas com erva mate e/ou vitamina E .....	75
Tabela 4	Composição de ácidos graxos (g/100 g de ácidos graxos) na gordura do leite de vacas da raça Holandês alimentadas com soja e suplementadas com de erva mate e/ou vitamina E .....	76

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
I – INTRODUÇÃO	
Fig. 1	Produção mundial dos maiores produtores de linhaça (em mil toneladas) ..... 5
Fig. 2	Produção de erva mate no Brasil e nos três Estados maiores produtores (mil toneladas) ..... 12
Fig. 3	Ramos de erva-mate descartados no campo durante a poda de colheita (esquerda) e ramos de erva mate aproveitados, “ramúsculos” e ramos descartados pela indústria (direita) ..... 13
Fig. 4	Compostos orgânicos do extrato da <i>Ilex paraguariensis</i> (em % na MS) ..... 13
Fig. 5	Produção de soja no Brasil (tons × 10 <sup>5</sup> ) (FAO, 2014) ..... 15
Fig. 6	Produção de canola no Brasil (tons × 10 <sup>3</sup> ) (FAO, 2014) ..... 16
III – FLAX MEAL SUPPLEMENTATION DECREASES ENERGETIC NEGATIVE BALANCE FOR HIGH-PRODUCING DAIRY COWS IN EARLY LACTATION FED PROTECTED FLAX OIL	
Fig. 1	Body weight (A) and body weight change (B) of Holstein cows infused with 250 g/d flax oil and fed total mixed rations containing no flax meal (COFO) or 136 g/kg flax meal (FMFO) in the dry matter. (a) Data are presented as mean values of COFO (◆, n = 10) and FMFO (■, n = 10). There was a treatment by time interaction (P = 0.02) for body weight. (b) Light shaded bars indicate the COFO treatment (n = 10) and dark shaded bars correspond to the FMFO treatment (n = 10). *P < 0.05; †P < 0.10. error bars indicate SEM ..... 40

Fig. 2 Concentration of protein in milk for each sampled day of Holstein cows infused with 250g/d flax oil and fed total mixed rations containing no flax meal (COFO) or 136 g/kg flax meal (FMFO) in the dry matter. Data are presented as mean values of COFO (■, n = 10) and FMFO (▲, n = 10). Error bars indicate SEM. There was a treatment by time interaction ( $P = 0.0006$ ). \* $P < 0.05$  ..... 41

## RESUMO

Foram conduzidos três experimentos para avaliar o efeito da suplementação de antioxidantes naturais em vacas leiteiras em diferentes estágios de lactação recebendo dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados. No primeiro experimento foram avaliadas vacas em início de lactação. Este período é associado principalmente ao balanço energético negativo pelo aumento repentino das exigências nutricionais junto com uma baixa ingestão de matéria seca. Além disso, doenças são correlacionadas, pois há aumento na concentração de ácido beta-hidroxibutirato e ácidos graxos não esterificados no plasma sanguíneo. O total de 20 vacas multíparas da raça Holandês com cânulas ruminais foi dividido em duas dietas: (1) dieta COFO (controle) com perfusão 250 g de óleo de linhaça/d no abomaso; e (2) dieta FMFO (com 136 g farelo de linhaça na matéria seca) com perfusão de 250 g de óleo de linhaça no abomaso. Em um fatorial simples (2 níveis: COFO e FMFO) e análises de variância com medidas repetidas foram conduzidas para todos os dados. As vacas foram submetidas aos procedimentos experimentais do sétimo dia ao 28º após o parto, e durante os dias 28 aos 49 de lactação, as vacas receberam uma dieta basal. A ingestão de MS expressa em kg/d e em porcentagem no peso vivo aumentou para vacas alimentadas com FMFO quando comparadas com COFO. Conseqüentemente, o balanço energético negativo foi melhor nos animais tratados com FMFO. No segundo experimento, foram avaliadas vacas em meio lactação recebendo erva-mate (EMa) a qual possui antioxidantes naturais. O trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos de níveis crescentes de EMa na alimentação de vacas leiteiras e o efeito da EMa na digestibilidade e qualidade do leite. Os animais foram distribuídos em um duplo quadrado latino  $4 \times 4$ , cada período experimental foi de 21 dias, sendo 14 dias para adaptação e sete dias para coleta de dados e amostras. Os tratamentos experimentais foram: 1) ração-controle sem suplementação de EMa (CONT); 2) ração-



controle + suplementação com 250 g de EMa/dia (250EM); 3) ração-controle + suplementação de 500 g de EMa/dia (500EM); 4) ração-controle + suplementação de 750 g de EMa/dia (750EM). O poder de redução da erva mate no leite mostrou efeito linear positivo ( $P=0,04$ ) em relação ao controle e efeito linear decrescente foi observado com a lactose ( $P=0.0001$ ) e no N-ureico ( $P=0,04$ ) para os níveis de inclusão de EMa. A digestibilidade de extrato etéreo também apresentou efeito linear positivo ( $P=0,05$ ). Os resultados sugerem que a inclusão de EMa foi capaz de aumentar o poder de redução do leite das vacas demonstrando ser um aditivo viável para o aumento do poder antioxidante. Apesar da redução linear de lactose no leite e consequentemente sólidos totais, a EMa não alterou a produção de leite. Em função da oxidação dos ácidos graxos do leite, a inclusão de antioxidantes na alimentação animal é uma alternativa para reduzir oxidação dos AGPI presentes no leite, evitar a formação de compostos tóxicos e, ainda, melhorar a saúde dos animais que os consomem. No terceiro experimento, estudou-se a inclusão de vitamina E e erva mate na dieta de vacas leiteiras recebendo grãos de soja com objetivo de mensurar a transferência do antioxidante para o leite. Foram utilizadas quatro vacas multíparas da raça Holandês ( $549 \pm 57$  kg de peso corporal e  $62 \pm 15$  dias em lactação) distribuídas em quadrado latino ( $4 \times 4$ ) com quatro dietas e quatro períodos experimentais. As dietas experimentais foram: 1) Dieta-controle sem suplementação de EMa e de vit. E; 2) Dieta-controle + suplementação de 350 UI de vit E/kg de MS/dia; 3) Dieta controle + suplementação de 3% de EMa/kg de MS/dia; 4) Dieta-controle + suplementação de 350 UI de vit E/kg de MS/dia + suplementação de 3% de EMa/kg de MS/dia. Cápsulas contendo 10 g de óxido de titânio (via sonda esofágica) foram inseridas no rúmen, após a alimentação da manhã (9h00min) para determinação do fluxo fecal e da digestibilidade. O período experimental foi de 28 dias, sendo 21 dias de adaptação e sete dias de coleta. A ingestão de vit E diminuiu a ingestão de MS e outros nutrientes, enquanto a EMa teve efeito positivo sobre o consumo e a digestibilidade de MS. O consumo de EMa não aumentou a produção de leite, até mesmo diminuindo a concentração de proteína e sólidos totais no leite. Nenhuma alteração foi observada para a composição em ácidos graxos e nos antioxidantes TBARS, dienos conjugados e polifenóis. Entretanto, a suplementação de EMa aumentou o poder de redução do leite. Concluiu-se assim que a erva mate pode ser capaz de substituir a suplementação de vit E na transferência do poder antioxidante para o leite.

Palavras-chave: AGPI, erva mate, lignanas, linhaça, polifenóis, lipoperoxidação

## ABSTRACT

Three experiments were conducted to evaluate the supplementation of natural antioxidant in dairy cows in different lactation stages fed a rich diet of polyunsaturated fatty acids. In the first experiment, dairy cows in early lactation were evaluated. The period between delivery and lactation peak is commonly associated with negative energy balance (NEB) due to a rapid increase in nutritional requirements coupled with a low dry matter intake. Furthermore, diseases are correlated with a concentrated volume of beta-hydroxybutyrate acid (BHBA) and non-esterified fatty acids (NEFA) in plasma. A total of 20 multiparous dairy cows fitted with rumen cannulas were stratified into two groups in two treatments: (1) control diet with 250 g flax oil/d infused in the abomasum (n=10, COFO); and (2) diet with 136 g/kg flax meal (n=10, FMFO) in the dry matter (DM) with 250 g flax oil/d infused in the abomasum. All data were analyzed using the MIXED procedure of SAS, release 9.2. A one-way factorial (2 levels: COFO and FMFO) analysis of variance with repeated measures was conducted for all data. Cows were subjected to experimental treatments from day 7 to 28 of post-partum and fed a common total mixed diet from day 28 to 49 of lactation. Intake of DM, expressed in kg/d and as a percentage of BW, was increased for cows fed FMFO when compared with cows fed COFO. Likewise, the NEB was less severe for cows fed FMFO. However, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) increased when cows were fed flax meal. The second experiment evaluated cows in middle lactation receiving yerba mate (YM) that has good levels of natural antioxidants. The study was to evaluate the effects of increasing levels of YM in dairy cows and the effect of YM on digestibility and quality of milk. The animals were distributed in a double Latin square 4x4, each experimental period was 21 days, 14 days for adaptation and seven days to harvest data and samples. The treatments were: 1) control diet without supplementation YM

(CONT); 2) diet + supplementation with 250 g of YM / day (250EM); 3) diet + supplementation of 500 g of YM / day (500EM); 4) control diet + supplementation of 750 g of YM / day (750EM). The reduction ( $P = 0.04$ ) of yerba mate in milk showed a positive linear effect on the control and decreasing linear effect was observed with lactose ( $P = 0.0001$ ) and urea ( $P = 0.04$ ) for levels inclusion of YM. The ether extract digestibility ( $P = 0.05$ ) also had a positive linear effect. Our results suggest that the inclusion of EMA was able to increase the power reduction of milk cows demonstrated to be a viable additive for increasing the antioxidant power. Despite the linear reduction of lactose in milk and consequently total solids, YM did not affect milk production. After we studied the inclusion of vitamin E (vit E) and yerba mate (YM) in the diet of dairy cows fed soybeans to compare the transfer of the antioxidant for milk. There were four multiparous Holstein cows ( $549 \pm 57$  kg body weight and  $62 \pm 15$  days in milk) distributed in Latin square ( $4 \times 4$ ) with four treatments and four experimental periods. The treatments were: 1) Control diet without supplementation YM and vit E; 2) diet plus supplementation of 350 IU of vit E / kg DMI per day; 3) diet plus supplementation of 3% of YM / kg IMS per day; 4) diet plus supplementation of 350 IU of vit E / kg IMS daily supplementation + 3% of YM / kg IMS per day. Capsules containing 10 g of titanium oxide was inserted into the rumen (by gavage) after the morning feeding (9h00min) for determination of fecal flow and digestibility. The experimental period was 21 days and then seven days of collection. The intake of vit E reduces DM intake and other nutrients, while YM had a positive effect on the intake and digestibility of MS. The intake of YM did not increase milk production, even decreasing the concentration of protein and total solids in milk. No change was observed for the fatty acid composition and TBARS antioxidants, conjugated diene and polyphenols. However, supplementation of YM increased the power reduction of milk. We can conclude that yerba mate can replace the supplementation of vit E is even better than the vit E in the transfer of the antioxidant power to the milk.

Key-words: flax oil, lignan, yerba mate, lipoperoxidation, polyphenols, PUFA

## I – INTRODUÇÃO

O consumo brasileiro de leite é de 170 L/habitante/ano, menor que o recomendado pela World Health Organization, que é de 210 L/habitante/ano (MAPA, 2014). O consumo de leite poderia ser maior caso fosse oferecido um produto com melhor qualidade (da Silva et al., 2007). Outro entrave para o aumento do consumo é o baixo poder aquisitivo da população (Massuda et al., 2010).

O alimento é considerado funcional quando afeta o organismo beneficemente, além do seu valor nutritivo, melhorando o bem-estar e reduzindo os riscos de doenças (Roberfroid, 2002). Deste modo, uma contribuição para melhoria na qualidade do leite é a incorporação de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI). Vários autores mostraram a possibilidade de aumentar a concentração total de AGPI e melhorar a razão ômega 6/ômega 3 (n-6/n-3) no leite (Grummer e Carroll, 1991; Bell et al., 2006; Benchaar et al., 2006; Paschoal et al., 2007; Lima et al., 2014, 2015).

A incorporação de AGPI no leite foi verificada quando vacas são alimentadas com óleo de grãos como a canola (Neves et al., 2007), soja (Neves et al., 2009), linhaça (Côrtes et al., 2010; Kazama et al., 2010; Petit, 2015) e girassol (do Prado et al., 2015). Ao mesmo tempo, tratamentos químicos e físicos também foram testados para verificar qual é a estratégia mais adequada para esse alimento, especialmente, para prevenir bio-hidrogenação ruminal dos AGPI.

### 1.1 Oxidação e antioxidantes

A oxidação é um processo físico-químico que pode ser resumida em redução de reagente espécie química para outra. A espécie química que perdeu um elétron é a que foi oxidada (Neuman, 2013). A transferência de elétron é de difícil observação em uma

redução de moléculas orgânicas, pois normalmente o agente redutor da reação é irrelevante e normalmente é sinalizado pela perda de  $H^+$  na cadeia carbônica (Neuman, 2013).

Os AGPI do leite são comumente oxidados pela presença de luz, metais e oxigênio que produzem um gosto descrito como de peixe e metálico (Fox, 1995; Rafałowski et al., 2014). A taxa de oxidação é definida pelo número, configuração (*trans e cis*) e posição de duplas ligações presentes no ácido graxo (Collomb e Spahni, 2003). De acordo com Matumoto-Pintro et al. (2011), o leite enriquecido com AGPI é suscetível à oxidação, o que pode ser responsável pela rápida degradação do produto, formação de componentes tóxicos e diminuição do tempo de prateleira, comprometendo o produto. Baseado nesta afirmação, trabalhos que estudam meios de preservação de AGPI no leite são de interesse para alcançar um produto saudável e estável.

Uma forma potencialmente segura e efetiva de proteger leite da oxidação seria a incorporação de antioxidantes. Porém, aditivos sintéticos usados para preservação do leite são mal vistos junto aos consumidores que procuram uma dieta saudável e natural. Anesini et al. (2006) atribuíram aos antioxidantes sintéticos efeitos tóxicos ou mutagênicos. Estes autores sugerem que o uso de antioxidante natural, como suplemento na dieta, seria a solução mais adequada.

Existem diversas fontes de antioxidantes que podem ser apresentadas como fontes naturais. Essas fontes podem ser incorporadas diariamente à dieta de vacas leiteiras e, como consequência, esses antioxidantes seriam transferidos para o leite. Antioxidantes como os encontrados na erva mate e no farelo de linhaça podem ter papel de destaque na preservação dos AGPI (Gagnon et al., 2009; Bracesco et al., 2011).

Estudos conduzidos por Petit et al. (2009) mostraram que a transferência de antioxidantes encontrados na dieta para o leite de vaca como, por exemplo, os antioxidantes da linhaça. Outro estudo, mais recente, utilizou o farelo de soja combinado com concentrado proteico de alfafa rico em carotenoides e outra dieta com vitamina E (Fauteux et al., 2016).

Uma dieta suplementada com altos níveis de AGPI é uma estratégia para melhorar a qualidade nutricional do leite e dos produtos lácteos (Silva et al., 2007; Côrtes et al., 2010). Essa técnica pode aumentar a peroxidação no plasma, com consequências prejudiciais à saúde animal (Gobert et al., 2009). Há um aumento no número de pesquisas que procuram diminuir ou eliminar a presença do estresse oxidativo nos animais (Hwang et al., 2012; Abarikwu et al., 2013; De Marchi et al., 2015; Lima et al.,

2015) que contribuem para o aparecimento de problemas na saúde animal, principalmente durante o período de transição (-21 dias e +21 dias do parto). De acordo com (Miller et al., 1993), o estresse oxidativo é relacionado com doenças como mastite, retenção de placenta e endema de úbere.

Antioxidantes presentes na dieta são comumente utilizados para aumentar a defesa do organismo, junto com uma dieta balanceada (Celi e Robinson, 2010). Estudos são desenvolvidos para melhorar a performance do animal, baseada em medidas preventiva, usando várias substâncias antioxidantes, seja pela dieta, seja por outra rota administrativa no animal. Côrtes et al. (2011b) suplementaram vacas leiteiras com casca de linhaça e ou óleo de linhaça e investigaram a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) no plasma sanguíneo e nas glândulas mamárias dos animais. As SOD são metaloenzimas que utilizam um metal redox-ativo para separar duas moléculas de superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, o último dos quais é removido por enzimas CAT e GPx. SODs evoluíram em três ocasiões diferentes, produzindo uma família de Mn e Fe SODs (que uso de um ou de outro metal como co-factor), uma família de Cu / Zn SOD que usa Cu para a catálise, e uma família rara de Ni SODs (Sheng et al., 2014).

A suplementação com casca de linhaça aumentou a atividade plasmática da enzima CAT na glândula mamária (Côrtes et al., 2011b). Os autores também investigaram a abundância de RNA mensageiros relacionados à produção de enzimas oxidativas no plasma e na glândula mamária e verificaram que a casca de linhaça contribui para aumentar a produção de genes relacionados à produção de enzimas na glândula mamária, protegendo o tecido contra estresse oxidativo. Desta forma, concluíram que a inclusão de casca de linhaça pode proteger o animal contra o estresse oxidativo. Todavia, Côrtes et al. (2011b) observaram que a perfusão abomasal de óleo de linhaça resultou na diminuição da atividade da enzima GPx no plasma .

Estudo conduzido por Gobert et al. (2009), com vacas alimentadas com dietas ricas em n-3 (linhaça) e suplementadas com antioxidantes (vitamina E e com extrato de plantas ricas em polifenóis), mostrou eficaz em diminuir a peroxidação dos lipídios, particularmente no plasma, em vacas após o pico de lactação. A vitamina E foi usada em uma dose de 375 UI/kg de matéria seca (MS) (7.500 UI/vaca/dia) e o extrato de planta (patenteado pelo INRA, França) feita à base de alecrim, uvas, toranka e calêndula na dose de 10 g/kg de MS. Foi relatada uma redução na produção de substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e aumento na concentração de vitamina E no

plasma, indicando um papel preventivo na utilização desses antioxidantes contra peroxidação lipídica.

Vázquez-Añón et al. (2008) alimentaram vacas com óleo de soja fresco ou oxidado como fonte de lipídios na proporção de 2% na dieta e a adição de um antioxidante comercial (Agrado Plus<sup>®</sup>, Novus International, St. Louis, MO). Esse composto foi capaz de aumentar a atividade de SOD e GPX no plasma combinado com óleo de soja.

Substâncias como trealose e celobiose foram testadas com o propósito de proteger vacas leiteiras contra estresse oxidativo (Aoki et al., 2010). Estes dissacarídeos foram fornecidos em doses de 1% na MS para aumentar a atividade antioxidante e a atividade da enzima SOD no líquido ruminal 2 h pós-prandial. Ambos os dissacarídeos diminuíram a peroxidação lipídica no plasma e no líquido ruminal estimado pela produção de malonaldeído (MDA). Nesse estudo, particularmente, a trealose foi considerada um suplemento capaz de reduzir o estresse oxidativo.

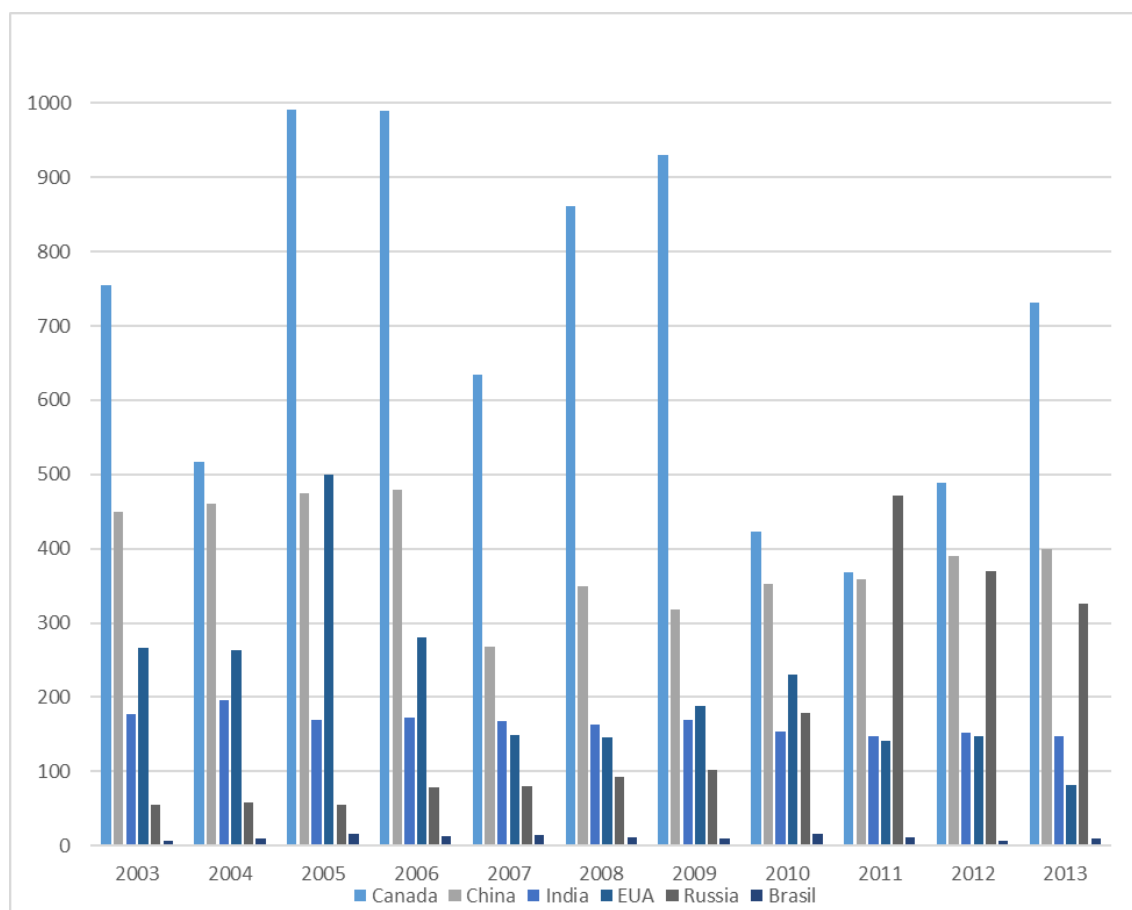
Megahed et al. (2008) publicaram um estudo sobre o efeito de um antioxidante comercial feito com vitamina E e selenito de sódio sobre o perfil oxidativo e taxa de prenhez em búfalas. Pesquisadores avaliaram os níveis plasmáticos de progesterona, estradiol, cortisol e SOD dos animais durante o verão e o inverno como também a taxa de prenhez em cada período. Contudo, durante o verão os animais foram tratados com antioxidantes (02 vezes por semana, durante 06 semanas; 01 dose de 150 mg de vitamina E e 1,67 mg de selenito de sódio) e foi observado aumento na atividade da enzima SOD e aumento nos níveis de estradiol. A taxa de prenhez foi 12,5% unidades percentuais maior em animais que receberam antioxidante. Portanto, houve melhora no perfil oxidativo nos animais e aumentou a produtividade em búfalos.

Fontes orgânicas de Zn, Cu e Se foram testadas por Cortinhas et al. (2010) como prevenção contra mastite subclínica, mastite clínica, em contagem de células somáticas (CSS) e atividade plasmáticas das enzimas SOD, GPx e ceruplasmina. O consumo de minerais foi controlado por um administrador esofágico pré-estabelecido. As atividades enzimáticas não foram modificadas com a fonte mineral usada, mesmo quando as fontes orgânicas conseguiram reduzir o número de mastite subclínica e contagem de células somáticas.

Apesar da resposta animal não ser pontual, ou até mesmo dinâmico, esforços são feitos para uma investigação aprofundada nos efeitos dos antioxidantes na saúde e produção animal.

## 1.2 Linhaça

O Canadá é o maior produtor mundial de linhaça com aproximadamente 40% da produção mundial (Fig. 1), seguido pela China (24%) e Índia (10%) (FAO, 2013). O Brasil não tem produção muito expressiva com uma média de 11 mil toneladas por ano de semente de linhaça nos últimos dez anos (FAO, 2013).



**Fig. 1.** Produção mundial dos maiores produtores de linhaça (em mil toneladas).  
Fonte: dados da FAO (2013).

A linhaça (*Linum usitatissimum*) pertence à família *Lineaceae*, é uma planta anual com aproximadamente 80 cm de altura, suas folhas variam entre 20-40 mm de comprimento e 3 mm de espessura, produzem flores azuladas de 15-25 mm de diâmetro com diversas formas; são capazes de produzir sementes com 5-9 mm de diâmetro e 4-7 mm de comprimento, a cor varia entre ouro e marrom (Muir e Westcott, 2003; Kajla et al., 2014). As sementes, fontes naturais de lipídios, são incluídas na dieta de vacas para melhorar o balanço energético na América do Norte. Entre as fontes de lipídeos, a utilização de AGPI n-3 e n-6 tem aumentado, devido aos seus numerosos atributos a



favor da saúde e o potencial de enriquecer o leite (Wood e Enser, 1997; Côrtes et al., 2010); tem sido atribuídos benefícios à saúde das vacas leiteiras a suplementação de n-3 e n-6 AGPI (Petit et al., 2007). A semente de linhaça, rica em ácido linolênico n-3 (cis-18:3, LNA) diminui a proporção de ácidos graxos de cadeia curta e ácidos graxos de cadeia média e aumenta os AGPI na gordura do leite de vacas leiteiras (Petit, 2002; Tur et al., 2012).

O aumento na quantidade de n-3 AGPI da dieta durante o período de transição aumenta a ingestão de MS pós-parto e produção de leite e melhora o balanço energético (Petit et al., 2004; Zachut et al., 2010). Os ácidos graxos poli-insaturados n-3 têm propriedades anti-inflamatórias, em muitas espécies, incluindo vacas leiteiras (Contreras et al., 2012). A utilização de semente de linhaça é uma maneira eficiente de aumentar a concentração de glicogênio no fígado, enquanto diminui os triglicérides após o parto, o que pode impedir o desenvolvimento de esteatose hepática na vaca leiteira em transição (Petit et al., 2007). A suplementação de vacas leiteiras com AGPI também pode afetar a remodelação e funções imunes da glândula mamária, com consequências benéficas para a sua integridade e saúde (Mach et al., 2011).

Além disso, há cada vez mais evidências de que uma dieta com n-3 AGPI poderia afetar positivamente as funções mitocondriais por meio de seu papel como substratos oxidativos, ligantes para os receptores nucleares que regulam a síntese de proteínas mitocondriais, e componentes estruturais em fosfolipídios de membrana mitocondrial (Andreyev et al., 2005; Stanley et al., 2012). Considerando-se que as mitocôndrias são o sistema de geração de energia primária e a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células, estas propriedades dos AGPI não são negligenciáveis na elaboração de uma dieta específica para vacas de transição (Baltzer et al., 2010). Em conjunto, esses resultados sugerem fortemente que AGPI, especialmente de cadeia longa n-3 AGPI de linhaça, são candidatos de interesse para ser incluídos na dieta de vacas de transição, a fim de melhorar o balanço energético, reduzir o estresse e, finalmente, evitar o uso de antibióticos. No entanto, os AGPI de cadeia longa n-3 e alguns dos seus metabólitos podem estimular a produção de ROS mitocondrial, em particular, de superóxido e de peróxido de hidrogênio e promover o estresse oxidativo (Schönfeld e Wojtczak, 2007). O consumo de dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados torna tecidos como glândula mamária e fígado mais suscetíveis a danos oxidativos e infecções (Jenkinson et al., 1999; Awada et al., 2012).

Em vez de resultar em efeitos benéficos, como a diminuição da necessidade de antibióticos, a utilização de AGPI na dieta poderia aumentar o estresse metabólico e desordens de saúde em vacas de transição que já são afetados pelo estresse oxidativo (Sordillo e Aitken, 2009). Portanto, a inclusão de antioxidantes naturais na dieta de vaca parece interessante para a exploração de todo o potencial dos AGPI, evitando a peroxidação de lipídios. Essa combinação parece ser promissora e foi testada em vacas leiteiras e ratos (Gobert et al., 2009; Deng et al., 2012).

Além do seu alto nível de n-3 AGPI, a linhaça também contém elevada concentração de antioxidantes naturais conhecidos como lignanas (Petit et al., 2008; Schmidt et al., 2012). Cascas de linhaças (ricos em lignanas) aumentam a expressão de alguns genes antioxidantes na glândula mamária e outros tecidos em vacas leiteiras (Côrtes et al., 2012). Efeitos benéficos têm sido relatados (por exemplo, melhor fertilidade, redução no fígado gorduroso e marcadores de oxidação) na alimentação de vacas em lactação com linhaça, mas ainda não se sabe qual o componente da linhaça é responsável por esses efeitos (Petit et al., 2007, 2008).

Em estudo sobre a substituição da suplementação de n-6 por n-3 pelo fornecimento de linhaça no lugar da soja, Didara et al. (2015) utilizaram 20 vacas em período de transição até a sexta semana de lactação. Os autores encontraram que a suplementação de n-3 influenciou na atividade da enzima superóxido dismutase e também a glutathione peroxidase.

Lignanas são grupos de fenilpropanóides diméricas, metabólitos secundários em plantas com propriedades antibacterianas, anti-inflamatória e antioxidante (Aires e Loike, 1990; Saleem et al., 2005). A linhaça é uma excelente fonte de lignana especialmente secoisolariciresinol diglucosídeo (SDG) (Thompson et al., 1991). Sobre a ação dos microrganismos, SDG é metabolizada em lignanas mamárias, enterodiol (ED) e enterolactona (EL) (Saarinen et al., 2002). Em ruminantes, foi reportado que os microrganismos ruminais produzem principalmente EL da SDG (Gagnon et al., 2009). Lignanas mamárias são estudadas pela sua proteção anti-inflamatória (Hallund et al., 2008) e efeitos antioxidantes (Schogor et al., 2013). Tem sido relatado que o SDG reduz o estresse oxidativo *in vitro*, tem grande poder sequestrador de radicais livres, poder redutor e habilidade de sequestrar hidroxil pelo método DDPH (Moree e Rajesha, 2013).

O SDG tem mostrado efeitos anticancerígenos em metástase pulmonar, na glândula mamária e câncer de mama. Estudos mostraram que ratos alimentados com

uma dieta rica em SDG resultaram em diminuição do volume e número de tumores comparado ao grupo-controle (Li et al., 1999). Não se sabe como o SDG age contra as células cancerígenas, porém, há muitas teorias, como o SDG inibi o hormônio denominado fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) que é responsável pelo crescimento do câncer mamário (Rickard et al., 2000; Bergman Jungeström et al., 2007). Outra hipótese seria a mediação do Zn feito pelo SDG que é observado em maior concentração do que nos tratamentos-controle (Zhang et al., 2007).

Fukumitsu et al. (2008) estudaram o metabolismo de lipídios em ratos alimentados com ração contendo 1% de SDG. A administração de SDG diminuiu a gordura visceral, a acumulação de gordura no fígado, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia. Os mesmos autores relataram que a dieta de SDG induziram a expressão gênica da adinopectina, leptina e da proteína transportadora de glicose 4.

Com isso a hipótese do doutorado é que a lignana é capaz de reduzir a concentração do NEFA e BHBA no plasma sanguíneo e diminuir o balanço energético negativo de vacas leiteiras alimentadas com farelo de linhaça. O polifenol melhora o *status* oxidativo e aumenta a atividade antioxidante do leite de vacas leiteiras alimentadas com canola e suplementação de erva mate. A erva mate pode substituir a vitamina E como antioxidante na dieta de vacas leiteiras alimentadas com grão de soja.

### 1.3 Balanço energético negativo

No início da lactação todas as vacas passam pelo balanço energético negativo (BEN), mas em apenas 80% delas o processo é mais evidente. É evidente que o BEN é mais importante nas vacas com maior produção de leite. O problema é que ele vem associada à ocorrência de imunossupressão e dos distúrbios metabólicas (Grummer, 1993). Outros autores relatam problemas reprodutivos (Butler e Smith, 1989) e problemas sanitários, como mastite e afecções do casco (Pyörälä, 2008; Nóbrega e Langoni, 2011). O tempo que dura o BEN é variável e depende de alguns fatores como o nível de produção de leite e, principalmente, a capacidade das vacas de ingerir energia (Grummer et al., 2010). Sabe-se que o BEN é mais intenso nos primeiros 21 dias do parto (Butler, 2007), mas pode perdurar por 45 e 50 dias ou mais (Brixey, 2005; Grummer e Rastani, 2003). Os metabólitos que melhor representam o estado de BEN

nas vacas são ácidos graxos não esterificados (AGNE), e o beta-hidróxido butirato ( $\beta$ -OH-B). Eles aparecem em níveis mais altos no plasma, decorrentes da lipomobilização dos ácidos graxos (Grummer, 2008). Os AGNE podem ser acumulados no fígado, na forma de triglicerídeos e provocar problemas metabólicos, como o fígado gordo diminuindo a posterior produção leiteira (Grummer et al., 2010).

O restabelecimento do balanço energético é possível de forma relativamente rápida, para a maioria das vacas se estas forem alimentadas com dietas nutricionalmente adequadas (Grummer et al., 2010), ou seja, dietas que sejam capazes de fornecer os nutrientes necessários ao animal mesmo diante de um quadro de limitação no consumo de alimentos.

As vacas durante o final da lactação recebem dietas, que são geralmente compostas por forragens, concentrados e minerais. Para a secagem, a dieta das vacas passam a ser constituída, principalmente, de forragens e minerais e pouca ou nenhuma suplementação com concentrado é fornecida. Em consequência disto corre a degeneração das papilas ruminais e modificação na população de microrganismos ruminais, como os celulolíticos e hemicelulolíticos. Mesmo que após a secagem se forneça novamente ração concentrada às vacas secas, a quantidade nunca chega nos patamares do fornecido durante a lactação, pela necessidade de se manter uma proporção de volumoso em relação ao concentrado e também pelo fato de a gestação ser maior nos últimos três meses, o que limita o espaço do rúmen para ingestão de matéria seca. Para que os animais estejam aptos à utilização eficiente da dieta de lactação (ricas em cereais) recomenda-se que nos últimos 21 dias antes do parto seja oferecida mistura concentrada aos animais. Esta prática permite aumento na produção de ácidos graxos voláteis que, por sua vez, promovem o crescimento das papilas ruminais (Santos et al., 2016). Todavia, a inclusão de misturas concentradas à dieta deve ser feita de forma gradativa, principalmente, no caso de cereais ricos em amido. Quando a inclusão é feita de forma brusca, as bactérias amilolíticas ruminais se desenvolvem rapidamente (dentro de 03 a 05 dias), e produzem grandes quantidades de ácido propiônico e também de ácido láctico. Este último não é volátil e exerce grande efeito de redução sobre pH ruminal (Santos et al., 2016). No rúmen, existem bactérias que utilizam ácido láctico transformando-o em composto de menor poder ácido. Todavia, o desenvolvimento deste tipo de bactéria é lento (03 a 04 semanas), gerando um período de risco em situações em que não há tempo suficiente para o adequado desenvolvimento (Casamiglia, 2001). Por isso, a adaptação alimentar é muito importante nesta fase.

A fase mais complicada na vida da vaca leiteira é nos primeiros 21 dias de lactação. Quanto maior a produção de leite das vacas, mais delicado fica o manejo destes animais, pois a quantidade necessária de nutrientes para atender a demanda da glândula mamária é enorme. É por isso que se deve fazer a adaptação pré-parto da vaca e o fornecimento equilibrado dos nutrientes na dieta para amenizar os prejuízos (Santos et al., 2016).

No BEN, quando avaliado pela condição corporal, a vaca não deve perder mais do que 1,25 pontos, entre o parto e 30 dias de lactação (Wildman et al., 1982). Esta perda de ECC no pós-parto ocorre no momento do retorno da ovulação e, por consequência, do cio e tem reflexo na taxa de sucesso na concepção (Bergamaschi et al., 2010). Manter uma pontuação mínima de 2,25 a 2,5 pontos, nesta fase, é desejável para a manutenção da atividade ovariana e de altos níveis de produção de leite (Santos et al., 2010).

No momento do parto, as vacas devem estar com condição corporal próxima de 3,5 e, no máximo, 3,75 pontos (Wildman et al., 1982). Esta condição corporal pode ser considerada ideal para as vacas de alta produção, muitas vezes alcançando pico de produção de leite de 28 a 40 L/dia, com quatro a seis semanas de lactação. Todavia, o pico de ingestão de alimento (matéria seca) somente é atingido por volta de oito a 12 semanas depois do parto. Portanto, antes de atingir o pico de ingestão de alimentos, os elementos nutritivos ingeridos pela vaca, mesmo em dietas de alta qualidade, são insuficientes para atender suas necessidades, desta forma a vaca perde peso. A perda de peso vivo da vaca, no início da lactação, está intimamente ligada com a capacidade individual de produção, uma vez que o animal mobiliza suas reservas corporais para alcançar o seu potencial de produção, resultando em perdas de peso consideráveis (Tabela 1).

### **Tabela 1**

Varição do peso vivo na vaca leiteira no início da lactação em função de sua produção máxima.

Produção de leite no pico (kg/dia)	Perda de peso vivo (kg)
20	15
25	12-20
30	35
35	50
40	70

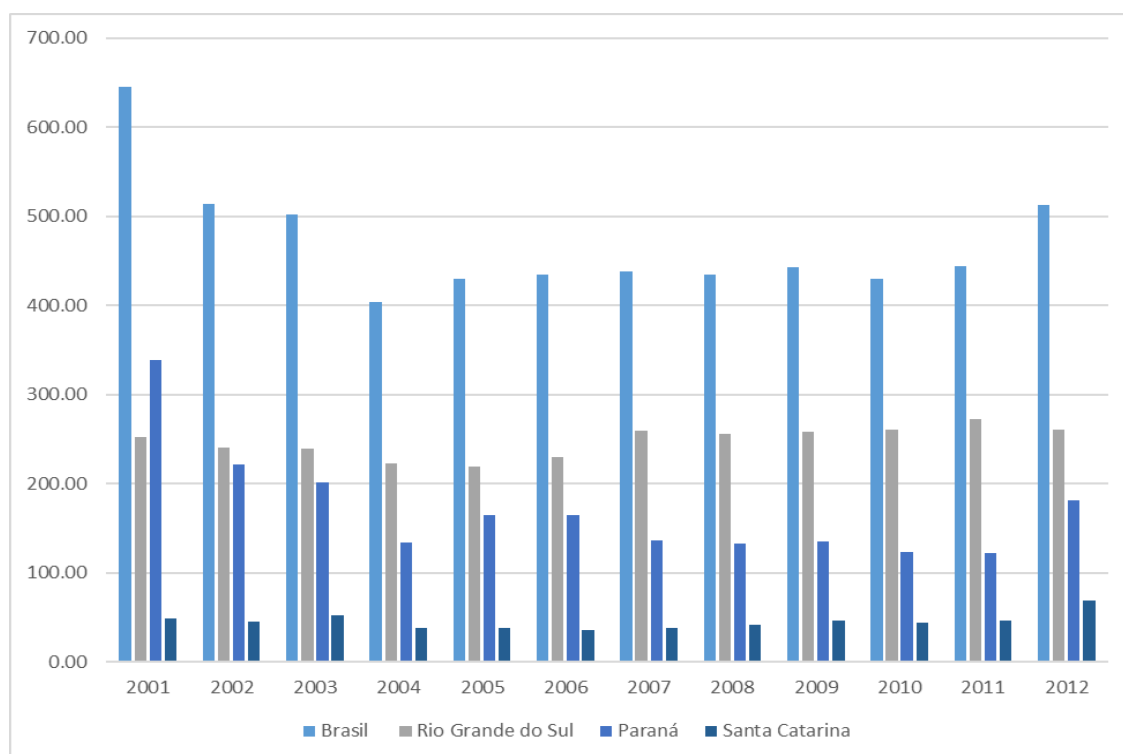
Fonte: INRA (1978).

Atualmente existe substancial interesse em suplementação com lipídios no período de transição. A recomendação do uso de lipídios no início de lactação é feita, principalmente, para aumentar a densidade energética, diminuir o BEN reduzindo as desordens metabólicas ou aumentar o desempenho da lactação (Grummer et al., 2004). A suplementação das vacas leiteiras com lipídeos pode ser feita com o fornecimento de oleaginosas, tais como soja, girassol e caroço de algodão. Porém, o teor total de lipídios na dieta não deve ultrapassar o limite de 6 a 7% na dieta total (Jerred et al., 1990; Chilliard, 1993), porque maiores concentrações podem provocar redução na IMS e efeitos negativos sobre a fermentação ruminal (Schauff e Clark, 1992). Assim, no caso de utilização de oleaginosas deve-se fornecer aos animais de 2 a, no máximo, 3 kg/vaca/dia de caroço de algodão ou soja em grão.

O manejo alimentar no período seco e de transição representa um desafio que os produtores leiteiros devem encarar diariamente se desejam otimizar a produtividade e a saúde de suas matrizes. As exigências nutricionais se triplicam em algumas semanas, combinadas a uma depressão do IMS e da adaptação a um novo ambiente ruminal, induzindo as vacas a experimentar um precário equilíbrio nutricional, colocando sua saúde em sérios riscos. As vacas que passam por este estágio sem problemas exprimem plenamente seu potencial genético, enquanto que as demais vacas que têm o frágil equilíbrio rompido sofrem vários problemas nesta fase (Santos et al., 2016).

#### 1.4 Erva mate (*Ilex paraguariensis*)

A erva mate (EM) é uma espécie nativa da flora sul americana, espalhando –se por extensivas áreas do Brasil, Argentina e Paraguai (Heinrichs e Malavolta, 2001). É um produto agropecuário do sul do Brasil, com um potencial econômico, social e ecológico. O Estado do Paraná é o segundo maior produtor de erva mate no Brasil com produção, em torno de 35% da produção total do país, seguido por Santa Catarina e Mato Grosso do Sul, sendo o Rio Grande do Sul o maior produtor (IBGE, 2012). Por volta de 96% da produção é destinada ao consumo humano. De acordo com Esmelindro et al. (2002), a erva mate pode ser aplicada em várias situações, além dos seus atributos conhecidos por sua composição química.



**Fig. 2.** Produção de erva mate no Brasil e nos três Estados maiores produtores (mil toneladas).

Fonte: adaptado de dados do IBGE (2012) – PAM.

A colheita da erva mate acontece nos meses de setembro a abril, do hemisfério sul. São colhidas as folhas e caules, embaladas e transportadas para a fábrica. Já nas instalações, as folhas e caules são passadas dentro de um cilíndrico metálico aquecido (500°C), a passagem da folha pode durar de 10 segundos a 3 minutos, atingindo uma temperatura de 135°C (Heck e de Mejia, 2007), esse processo é denominado de sapeco. O aquecimento serve para reduzir a atividade das enzimas peroxidase e polifenoloxidase que estão ligadas ao escurecimento e murchamento das folhas verdes (Valduga et al., 1997). Após o sapeco a erva passa pela secagem. Esse procedimento depende de diversas variáveis, quanto à presença de pré-secadores, método de secagem, temperatura, entre outras. O próximo processo se denomina de estacionamento, é opcional; é a maturação da erva mate seca em tonéis de cedro por até dois anos, isso ajuda no desenvolvimento de novos sabores. Por fim o produto é empacotado e transportado para a comercialização (Heck e de Mejia, 2007).

A colheita da erva mate é feita pela poda de ramos com aproximadamente 20 mm de diâmetro, mas folhas e caules com menos de 10 mm são usadas para indústria de chimarrão (Fig. 3). Pagliosa (2009) demonstrou a característica química da casca de EM como importante fonte de fibra solúvel e insolúvel, zinco, cobre, ferro manganês, cálcio,

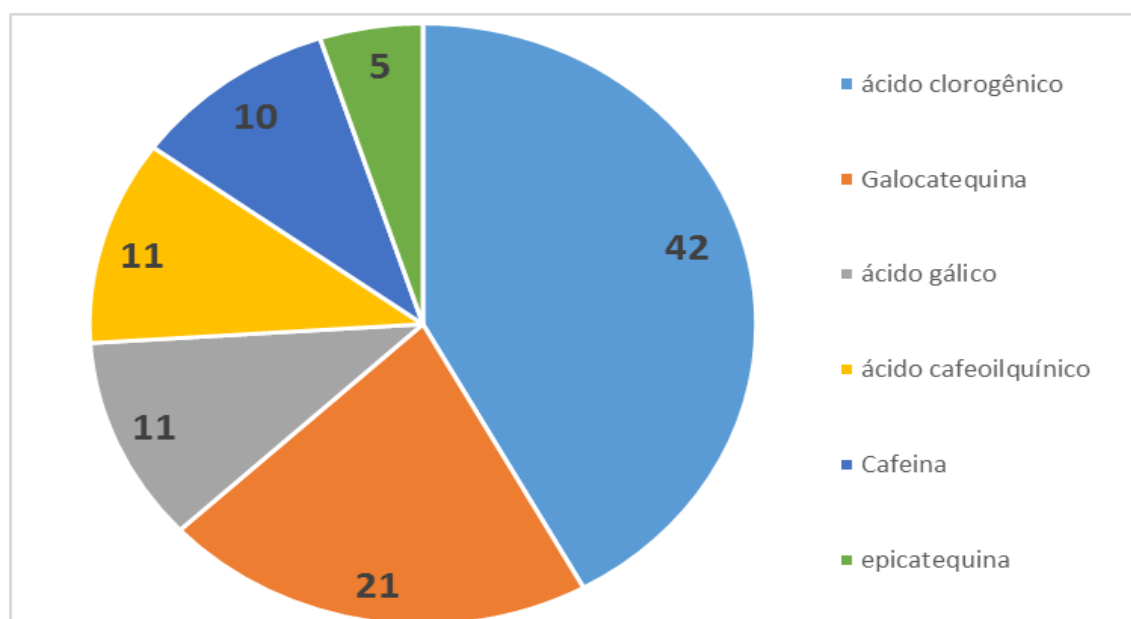
com concentrações mais altas que nas folhas. No mais, este autor encontrou altas concentrações de polifenóis e atividade antioxidante no resíduo da casca, constituindo uma interessante fonte de compostos bioativos para saúde animal.



**Fig. 3.** Ramos de erva-mate descartados no campo durante a poda de colheita (esquerda) e ramos de erva mate aproveitados, “ramúsculos” e ramos descartados pela indústria (direita).

Fonte: Plagiosa (2009).

O interesse nessa planta é principalmente pelos compostos químicos presentes na erva, chamando a atenção para os compostos fenólicos, metilxantinas e saponinas. O extrato de EM de folhas verdes é composta por metilxantinas, flavonoides, vitamina A, C, complexo B, E, taninos, saponinas, ácido clorogênico e seus derivados (Bastos et al., 2007; Heck e de Mejia, 2007; Bracesco et al., 2011) (Fig. 4).



**Fig. 4.** Compostos orgânicos do extrato da *Ilex paraguariensis* (em % na MS).

Fonte: adaptado de Bracesco et al. (2011).



O extrato de erva mate possui níveis de polifenóis semelhantes ao vinho tinto (Gugliucci et al., 2009). O ácido clorogênico, que é um captador de metal radical livre, pode interferir com a expressão gênica de enzimas antioxidantes (Jaiswal et al., 2010), e no metabolismo de glicose (Olthof et al., 2001).

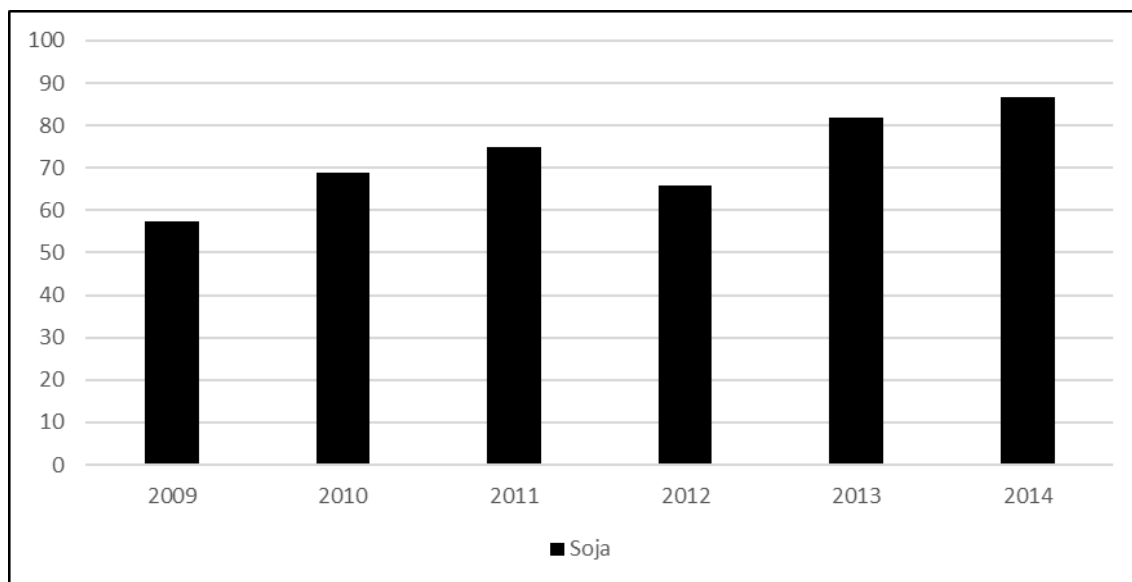
De acordo com Celi e Robinson (2010), a ingestão de erva mate diminui o estresse oxidativo em bezerros. Os resultados *in vitro*, encontrados por de Mejía et al. (2010), verificaram que o sequestrador de radicais livres da EMA é similar ao ácido gálico puro (20 mg/mL). Bastos et al. (2006) demonstraram que a eficiência antioxidante da infusão da erva mate é similar ao hidroxitolueno butilado conhecido como BHT, um antioxidante comercial comumente usado nos alimentos industrializados.

Um estudo realizado por Conforti et al. (2012) indicou que a ingestão prolongada de chá de EMA pelas mulheres na menopausa foi capaz de proteger os ossos contra desmineralização. Outra aplicação para o uso do extrato de EM foi na fabricação de salame, protegendo-o contra a peroxidação lipídica (de Campos et al., 2007).

O efeito da presença de cafeína na EMA sobre a peroxidação lipídica é contraditório na literatura. Schinella et al. (2000) reportaram que o extrato aquoso da EMA foi capaz de inibir a peroxidação lipídica induzida pelo sistema  $Fe^{+2}$ /ascorbato, tanto quanto pelo sistema  $CCL_4$ /NADPH. Anesini et al. (2012) observaram que a cafeína induz à oxidação do ácido linoleico (em solução de etanol), agindo como um composto pró-oxidante. Ainda neste mesmo estudo, os autores demonstraram que o ácido clorogênico, ácido cafeico e a rutina têm grande poder antioxidante presente no extrato de erva mate, estimado pelo método DPPH e pela estimativa da prevenção da peroxidação lipídica.

Estudos conduzidos, na Austrália, por Celi e Raadsma (2010) investigaram que a suplementação para vacas leiteiras, com 250 g/dia, por animal, com erva mate seca peletizada não apresentaram nenhuma alteração no perfil oxidativo dos animais. Os autores determinaram que o consumo de pellets não foi o suficiente para induzir uma diferença no perfil oxidativo de vacas leiteiras, apesar de ser capaz de aumentar a produção de leite. Outra possível causa do efeito nulo dos antioxidantes foi o tratamento de calor das folhas durante a secagem. De acordo com Turner et al. (2011), esse processo industrial diminui o nível de antioxidante da EM. Além do mais, o processo pode mudar as concentrações de lipídios, glicose, sacarose e cafeína na erva mate como descrito por Esmelindro et al. (2002).

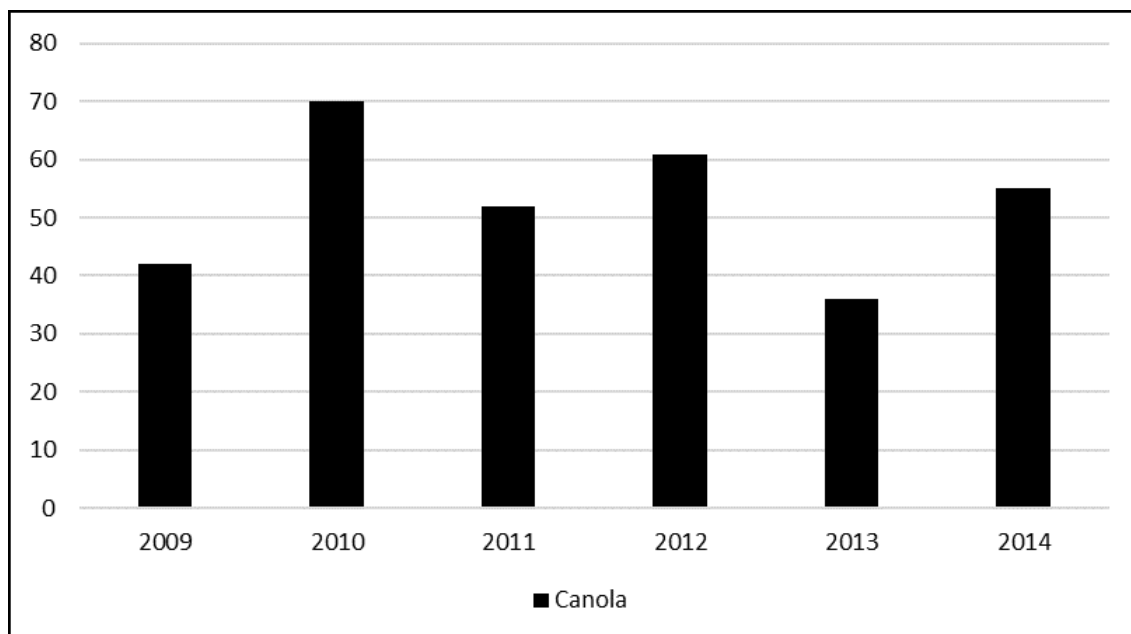
A soja é originária da região Sudoeste da Ásia, provavelmente na Manchúria, China (Hymowitz, 1970). No Brasil, o Estado do Mato Grosso é o maior produtor de soja seguido pelo Paraná e Rio Grande do Sul. A produção de soja brasileira gira em torno de 7.811.128 toneladas de soja nos últimos três anos (Fig. 5).



**Fig. 5.** Produção de soja no Brasil (tons × 10<sup>5</sup>) (FAO, 2014).

Macedo et al. (2016) alimentaram vacas leiteiras com sais de cálcio de soja em vacas a pastejo, os animais aumentaram a produção de leite apesar de não ter influenciado a concentração de sólidos totais, em especial a gordura. Vargas-Bello-Pérez et al. (2016) forneceram dieta a vacas leiteiras com óleo de soja e concluíram que o óleo de soja influencia no transporte de ácidos graxos no plasma sanguíneo, aumentando a concentração de C18:1 *trans*-11 e C18:2 *cis*-9, *trans*-11 em vacas em lactação. Além de também aumentar o teor de HDL no plasma sanguíneo de vacas secas.

A canola (*brassica napus*) é originária de um melhoramento genético da colza, a semente oleaginosa vem se destacando na agricultura brasileira nos últimos anos por ser uma alternativa de produção durante os meses de inverno, sendo conhecida como a soja de inverno (Figueiredo et al., 2003; Kruger, 2011). Sua produção no Brasil é em torno de 50.000 toneladas nos últimos três anos (Fig. 6).



**Fig. 6.** Produção de canola no Brasil (tons × 10<sup>3</sup>) (FAO, 2014).

Brask et al. (2013) trabalharam com produção de metano de vacas leiteiras na Dinamarca e concluíram que a suplementação de óleo de canola em até 6% da ração total diminuiu em até 14% a emissão de metano sem comprometer a digestibilidade de FDN e a produção de leite. A suplementação de canola pode causar depressão na gordura do leite, reduzindo os teores de gordura saturada e aumentando as concentrações dos ácidos graxos mono, poli-insaturados e CLA além de reduzir o colesterol presente no leite (Altenhofer et al., 2014). Quando se fornece a torta de canola há aumentos na produção de proteína do leite, produção de lactose, produção de leite, juntamente com a eficiência aparente de nitrogênio. A melhora na eficiência produtiva é provavelmente pelo aumento da absorção de aminoácidos essenciais pela suplementação de torta de canola para vacas leiteiras (Martineau et al., 2014). Ollier et al. (2009) demonstraram que o leite das cabras alimentadas com pastagem e grãos inteiros de canola tiveram aumento na concentração de cis-9 C18:1, apesar de não ter demonstrado nenhum efeito na expressão gênica de componentes da síntese de gordura.

## Referências

(Normas: Animal Feed Science and Technology)

- Abarikwu, S.O., Pant, A.B., Farombi, E.O., 2013. Quercetin decreases steroidogenic enzyme activity, NF-kappaB expression, and oxidative stress in cultured Leydig cells exposed to atrazine. *Mol. Cell. Biochem.* 373, 19-28.
- Altenhofer, C., Spornraft, M., Kienberger, H., Rychlik, M., Herrmann, J., Meyer, H.H.D., Viturro, E., 2014. Effects of rapeseed and soybean oil dietary supplementation on bovine fat metabolism, fatty acid composition and cholesterol levels in milk. *J. Dairy Res.* 81, 120-128.
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A., 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc.)* 70, 200-214.
- Anesini, C., Ferraro, G., Filip, R., 2006. Peroxidase-like activity of *Ilex paraguariensis*. *Food Chem.* 97, 459-464.
- Anesini, C., Turner, S., Cogoi, L., Filip, R., 2012. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). *LWT - Food Sci. Technol.* 45, 299-304.
- Aoki, N., Furukawa, S., Sato, K., Kurokawa, Y., Kanda, S., Takahashi, Y., Mitsuzumi, H., Itabashi, H., 2010. Supplementation of the diet of dairy cows with trehalose results in milk with low lipid peroxide and high antioxidant content. *J. Dairy Sci.* 93, 4189-4195.
- Awada, M., Soulage, C.O., Meynier, A., Debard, C., Plaisancié, P., Benoit, B., Picard, G., Loizon, E., Chauvin, M.-A., Estienne, M., Peretti, N., Guichardant, M., Lagarde, M., Genot, C., Michalski, M.-C., 2012. Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells. *J. Lipid Res.* 53, 2069-2080.
- Ayres, D.C., Loike, J.D., 1990. Lignans: chemical, biological and clinical properties. Cambridge University Press, New York.
- Baltzer, C., Tiefenböck, S.K., Frei, C., 2010. Mitochondria in response to nutrients and nutrient-sensitive pathways. *Mitochondrion* 10, 589-597.
- Bastos, D.H.M., Ishimoto, E.Y., Marques, M.O.M, Ferri, A.F, Torres, E.A.F.S., 2006. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *J. Food Compos. Anal.* 19, 538-543
- Bastos, D.H., Saldanha, L.A., Catharino, R.R., Sawaya, A.C., Cunha, I.B., Carvalho, P.O., Eberlin, M.N., 2007. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules* 12, 423-432.

- Bell, J.A., Griinari, J.M., Kennelly, J.J., 2006. Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 89, 733-748.
- Benchaar, C., Petit, H.V., Berthiaume, R., Whyte, T.D., Chouinard, P.Y., 2006. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89, 4352-4364.
- Bergman Jungeström, M., Thompson, L.U., Dabrosin, C., 2007. Flaxseed and its lignans inhibit estradiol-induced growth, angiogenesis, and secretion of vascular endothelial growth factor in human breast cancer xenografts in vivo. *Clin. Cancer Res.* 13, 1061-1067.
- Bergamaschi, M.A.C.M., Machado, R., Barbosa, R.T., 2010. Eficiência reprodutiva das vacas leiteiras. Embrapa, São Carlos, SP.
- Bracesco, N., Sanchez, A.G., Contreras, V., Menini, T., Gugliucci, A., 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J. Ethopharmacol.* 136, 378-384.
- Brask, M., Lund, P., Weisbjerg, M.R., Hellwing, A.L.F., Poulsen, M., Larsen, M.K., Hvelplund, T., 2013. Methane production and digestion of different physical forms of rapeseed as fat supplements in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96, 2356-2365.
- Brixey, J., 2005. Validation of a prediction equation for energy balance in Holstein cows and heifers. M.S. Thesis, University of Idaho, Moscow.
- Butler, V.R., 2007. Produção de leite, balanço energético negativo e fertilidade em vacas leiteiras, in: Anais do XI Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos – Leite. Rehagro, Belo Horizonte, pp. 26-32.
- Butler, W.R., Smith, R.D., 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 72, 767-783.
- Casamiglia, S., 2001. Nuevos avances en manejo y alimentación de la vaca durante el parto, in: Rebollar, P.G., de Blas, C., Mateos, G. G. (Eds.), XVI Curso de Especialización FEDNA: avances em nutrición y alimentación animal. FEDNA, Madrid, Espanha, pp. 45-66.
- Celi, P., Raadsma, H.W., 2010. Effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on the productive performance of dairy cows during mid-lactation. *Anim. Prod. Sci.* 50, 339-344.
- Celi, P., Robinson, A., 2010. Effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on the performance of dairy calves. *Anim. Prod. Sci.* 50, 376-381.
- Chilliard, Y., 1993. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: A review. *J. Dairy Sci.* 76, 3897-3931.
- Collomb, M., Spahni, M., 2003. Review of the methods for the determination of lipid oxidation products with special reference to milk lipids. *Schweiz. Milchwirtsch. Forsch.* 25, 3-24.
- Conforti, A.S., Gallo, M.E., Saraví, F.D., 2012. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. *Bone* 50, 9-13.
- Contreras, G.A., Mattmiller, S.A., Raphael, W., Gandy, J.C., Sordillo, L.M., 2012. Enhanced n-3 phospholipid content reduces inflammatory responses in bovine endothelial cells. *J. Dairy Sci.* 95, 7137-7150.
- Côrtes, C., da Silva-Kazama, D.C., Kazama, R., Gagnon, N., Benchaar, C., Santos, G.T.D., Zeoula, L.M., Petit, H.V., 2010. Milk composition, milk fatty acid profile, digestion, and ruminal fermentation in dairy cows fed whole flaxseed and calcium salts of flaxseed oil. *J. Dairy Sci.* 93, 3146-3157.

- Côrtes, C., da Silva-Kazama, D., Kazama, R., Benchaar, C., Zeoula, L.M., Santos, G.T., Petit, H.V., 2011a. Intake and digestibility of fatty acids in late-lactating dairy cows fed flaxseed hulls supplemented with monensin. *J. Dairy Res.* 78, 391-395.
- Côrtes, C., Kazama, R., da Silva-Kazama, D., Benchaar, C., Zeoula, L.M., Santos, G.T., Petit, H.V., 2011b. Digestion, milk production and milk fatty acid profile of dairy cows fed flax hulls and infused with flax oil in the abomasum. *J. Dairy Res.* 78, 293-300.
- Côrtes, C., Palin, M.F., Gagnon, N., Benchaar, C., Lacasse, P., Petit, H.V., 2012. Mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes and concentration of the mammalian lignan enterolactone in milk and plasma of dairy cows fed flax lignans and infused with flax oil in the abomasum. *Br. J. Nutr.* 108, 1390-1398.
- Cortinhas, C.S., Botaro, B.G., Sucupira, M.C.A., Renno, F.P., Santos, M.V., 2010. Antioxidant enzymes and somatic cell count in dairy cows fed with organic source of zinc, copper and selenium. *Livest. Sci.* 127, 84-87.
- da Silva, D.C., Santos, G.T., Branco, A.F., Damasceno, J.C., Kazama, R., Matsushita, M., Horst, J.A., dos Santos, W.B., Petit, H.V., 2007. Production performance and milk composition of dairy cows fed whole or ground flaxseed with or without monensin. *J. Dairy Sci.* 90, 2928-2936.
- de Campos, R.M.L., Hierro, E., Ordóñez, J.A., Bertol, T.M., Terra, N.N., de la Hoz, L., 2007. Fatty acid and volatile compounds from salami manufactured with yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract and pork back fat and meat from pigs fed on diets with partial replacement of maize with rice bran. *Food Chem.* 103, 1159-1167.
- de Lima, L.S., Santos, G.T., Schogor, A.L., de Marchi, F.E., de Souza, M.R., Santos, N.W., Santos, F.S., Petit, H.V., 2015. Effect of abomasal or ruminal administration of citrus pulp and soybean oil on milk fatty acid profile and antioxidant properties. *J. Dairy Res.* 82, 265-271.
- De Marchi, F.E., Palin, M.F., dos Santos, G.T., Lima, L.S., Benchaar, C., Petit, H.V., 2015. Flax meal supplementation on the activity of antioxidant enzymes and the expression of oxidative stress- and lipogenic-related genes in dairy cows infused with sunflower oil in the abomasum. *Anim. Feed Sci. Tech.* 199, 41-50.
- de Mejía, E.G., Song, Y.S., Heck, C.I., Ramírez-Mares, M., 2010. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. *J. Funct. Foods* 2, 23-34.
- Deng, Q., Yu, X., Xu, J., Liu, C., Huang, F., Huang, Q., Yang, J., 2012. Effect of flaxseed oil fortified with vitamin E and phytosterols on antioxidant defense capacities and lipids profile in rats. *J. Food Sci.* 77, H135-H140.
- Đidara, M., Poljičak-Milas, N., Milinković-Tur, S., Mašek, T., Šuran, J., Pavić, M., Kardum, M., Šperanda, M., 2015. Immune and oxidative response to linseed in the diet of periparturient Holstein cows. *Animal* 9, 1349-1354.
- do Prado, R.M., Côrtes, C., Benchaar, C., Petit, H.V., 2015. Interaction of sunflower oil with monensin on milk composition, milk fatty acid profile, digestion, and ruminal fermentation in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 207, 85-92.
- Esmelindro, M.C., Toniazzo, G., Waczuk, A., Dariva, C., Oliveira, D.d., 2002. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. *Food Sci. Technol.* 22, 199-204.
- Figueiredo, D.F., Murakami, A.E., Pereira, M.A.d.S., Furlan, A.C., Toral, F.L.B., 2003. Desempenho e morfometria da mucosa de duodeno de frangos de corte alimentados com farelo de canola, durante o período inicial. *R. Bras. Zootec.* 32, 1321-1329.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2013. FAOSTAT database collections. FAO, Rome, Italy.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2014. FAOSTAT database collections. FAO, Rome, Italy.
- Fox, P.F., 1995. *Advanced Dairy Chemistry-2: Lipids*. Chapman & Hall, London.
- Fukumitsu, S., Aida, K., Ueno, N., Ozawa, S., Takahashi, Y., Kobori, M., 2008. Flaxseed lignan attenuates high-fat diet-induced fat accumulation and induces adiponectin expression in mice. *Brit. J. Nutr.* 100, 669-676.
- Gagnon, N., Côrtes, C., da Silva, D., Kazama, R., Benchaar, C., dos Santos, G., Zeoula, L., Petit, H.V., 2009. Ruminant metabolism of flaxseed (*Linum usitatissimum*) lignans to the mammalian lignan enterolactone and its concentration in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Brit. J. Nutr.* 102, 1015-1023.
- Gobert, M., Martin, B., Ferlay, A., Chilliard, Y., Graulet, B., Pradel, P., Bauchart, D., Durand, D., 2009. Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Dairy Sci.* 92, 6095-6104.
- Grummer, R.R., 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 3882-3896.
- Grummer, R. R., 2008. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet. J.* 176, 10-20.
- Grummer, R.R., Carroll, D.J., 1991. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 69, 3838-3852.
- Grummer, R.R., Rastani, R.R., 2003. Review: When should lactating dairy cows reach positive energy balance? *Prof. Anim. Sci.* 19, 197-203.
- Grummer, R.R., Mashek, D.G., Hayirli, A., 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20, 447-470.
- Grummer, R.R., Wiltbank, M.C.; Fricke, P.M., Watters, R.D., Silva-Del-Rio, N., 2010. Management of dry and transition cows to improve energy balance and reproduction. *J. Reprod. Dev.* 56, S22-S28.
- Gugliucci, A., Bastos, D.H.M., Schulze, J., Souza, M.F.F., 2009. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia* 80, 339-344.
- Hallund, J., Tetens, I., Bügel, S., Tholstrup, T., Bruun, J.M., 2008. The effect of a lignan complex isolated from flaxseed on inflammation markers in healthy postmenopausal women. *Nutr. Metab. Cardiovas.* 18, 497-502.
- Heck, C.I., de Mejia, E.G., 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J. Food Sci.* 72, R138-R151.
- Heinrichs, R., Malavolta, E., 2001. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Cienc. Rural* 31, 781-785.
- Hymowitz, T., 1970. On the domestication of the soybean. *Econ. Bot.* 24, 408-421.
- Hwang, S.-L., Shih, P.-H., Yen, G.-C., 2012. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J. Agr. Food Chem.* 60, 877-885.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2012. *Produção Agrícola Municipal – culturas temporárias e permanentes*. Brasil, Rio de Janeiro.
- Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), 1978. *Alimentation des ruminants*. Ed. INRA Publications, Versailles.
- Jaiswal, R., Patras, M.A., Eravuchira, P.J., Kuhnert, N., 2010. Profile and characterization of the chlorogenic acids in green Robusta coffee beans by LC-MS(n): identification of seven new classes of compounds. *J. Agr. Food Chem.* 58, 8722-8737.

- Jerred, M.J., Carroll, D.J., Combs, D.K., Grummer, R.R., 1990. Effects of fat supplementation and immature alfalfa to concentrate ratio on lactation performance of cattle. *J. Dairy Sci.* 73, 2842-2854.
- Jenkinson, A., Franklin, M.F., Wahle, K., Duthie, G.G., 1999. Dietary intakes of polyunsaturated fatty acids and indices of oxidative stress in human volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.* 53, 523-528.
- Kajla, P., Sharma, A., Sood, D.R., 2014. Flaxseed – a potential functional food source. *Anim. Feed Sci. Technol.* 52, 1857-1871.
- Kazama, R., Côrtes, C., da Silva-Kazama, D., Gagnon, N., Benchaar, C., Zeoula, L.M., Santos, G.T.D., Petit, H.V., 2010. Abomasal or ruminal administration of flax oil and hulls on milk production, digestibility, and milk fatty acid profile of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 4781-4790.
- Kruger, C.A.M.B., 2011. Arranjo de plantas e seus efeitos na produtividade de grãos e teor de óleo em canola. M.S. Thesis, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- Li, D., Yee, J.A., Thompson, L.U., Yan, L., 1999. Dietary supplementation with secoisolariciresinol diglycoside (SDG) reduces experimental metastasis of melanoma cells in mice. *Cancer Lett.* 142, 91-96.
- Lima, L.S., Palin, M.F., Santos, G.T., Benchaar, C., Lima, L.C.R., Chouinard, P.Y., Petit, H.V., 2014. Effect of flax meal on the production performance and oxidative status of dairy cows infused with flax oil in the abomasum. *Livest. Sci.* 170, 53-62.
- Lima, L.S., Palin, M.F., Santos, G.T., Benchaar, C., Petit, H.V., 2015. Effects of supplementation of flax meal and flax oil on mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes in mammary tissue, plasma and erythrocytes of dairy cows. *Livest. Sci.* 176, 196-204.
- Macedo, F.L., de Souza, J., Batistel, F., Chagas, L.J., Santos, F.A.P., 2016. Supplementation with Ca salts of soybean oil interacts with concentrate level in grazing dairy cows: milk production and milk composition. *Trop. Anim. Health Prod.* 48, 1585-1591.
- Mach, N., Jacobs, A.A., Kruijt, L., van Baal, J., Smits, M.A., 2011. Alteration of gene expression in mammary gland tissue of dairy cows in response to dietary unsaturated fatty acids. *Animal* 5, 1217-1230.
- Massuda, E.M., Alves, A.F., Parré, J.L., Santos, G.T., 2010. Panorama da cadeia produtiva do leite no Brasil, in: Santos, G.T., Massuda, E.M., Da Silva-Kazama, D.C., Jobim, C.C., Branco, A.F. (Eds.), *Bovinocultura leiteira – bases zootécnicas, fisiológicas e de produção*. Eduem, Maringá, pp. 9-27.
- Matumoto-Pintro, P.T., Petit, H.V., Giroux, H.J., Côrtes, C., Gagnon, N., Britten, M., 2011. Effect of flaxseed lignans added to milk or fed to cows on oxidative degradation of dairy beverages enriched with polyunsaturated fatty acids. *J. Dairy Res.* 8, 111-117.
- Martineau, R., Ouellet, D.R., Lapierre, H., 2014. The effect of feeding canola meal on concentrations of plasma amino acids. *J. Dairy Sci.* 97, 1603-1610.
- Megahed, G.A., Anwar, M.M., Wasfy, S.I., Hammadeh, M.E., 2008. Influence of heat stress on the cortisol and oxidant-antioxidants balance during oestrous phase in buffalo-cows (*Bubalus bubalis*): thermo-protective role of antioxidant treatment. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 672-677.
- Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska, E., Madsen, F.C., 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy Sci.* 76, 2812-2823.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2014. Plano mais pecuária. MAPA, Brasília, DF.



- Moree, S.S., Rajesha, J., 2013. Investigation of in vitro and in vivo antioxidant potential of secoisolariciresinol diglucoside. *Mol. Cell. Biochem.* 373, 179-187.
- Muir, A.D., Westcott, N.D., 2003. Flax: The genus *Linum*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- National Research Council (NRC), 1989. Nutrient requirements of dairy cattle, 6th ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- National Research Council (NRC), 2001. Nutrient requirements of dairy cattle, 7th revised ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Neuman, R.C.J., 2013. Organic Chemistry. <http://people.chem.ucsb.edu/neuman/robert/orgchembyneuman/BookContents.html> (accessed 20.03.2016).
- Neves, C.A., Santos, G.T., Matsushita, M., Alves, E.M., Oliveira, R.L., Branco, A.F., Silva, D.C., Furlan, A.C., Petit, H.V., 2007. Intake, whole tract digestibility, milk production, and milk composition of Holstein cows fed extruded soybeans treated with or without lignosulfonate. *Anim. Feed Sci. Tech.* 134, 32-44.
- Neves, C.A., dos Santos, W.B.R., Santos, G.T.D., da Silva, D.C., Jobim, C.C., Santos, F.S., Visentainer, J.V., Petit, H.V., 2009. Production performance and milk composition of dairy cows fed extruded canola seeds treated with or without lignosulfonate. *Anim. Feed Sci. Tech.* 154, 83-92.
- Nóbrega, D.B., Langoni, H., 2011. Breed and season influence on milk parameters and in mastitis occurrence. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 1045-1052.
- Ollier, S., Leroux, C., de la Foye, A., Bernard, L., Rouel, J., Chilliard, Y., 2009. Whole intact rapeseeds or sunflower oil in high-forage or high-concentrate diets affects milk yield, milk composition, and mammary gene expression profile in goats. *J. Dairy Sci.* 92, 5544-5560.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* 131, 66-71.
- Paschoal, J.J., Zanetti, M.A., Del Claro, G.R., Melo, M.P.d., Pugine, S.P., Cunha, J.A., 2007. Perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas alimentadas com soja extrusada e selênio orgânico. *Pesq. Agropec. Bras.* 42, 1793-1799.
- Petit, H.V., 2002. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. *J. Dairy Sci.* 85, 1482-1490.
- Petit, H.V., 2015. Milk production and composition, milk fatty acid profile, and blood composition of dairy cows fed different proportions of whole flaxseed in the first half of lactation. *Anim. Feed Sci. Tech.* 205, 23-30.
- Petit, H.V., Germiquet, C., Lebel, D., 2004. Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3889-3898.
- Petit, H.V., Palin, M.F., Doepel, L., 2007. Hepatic lipid metabolism in transition dairy cows fed flaxseed. *J. Dairy Sci.* 90, 4780-4792.
- Petit, H.V., Cavalieri, F.B., Santos, G.T., Morgan, J., Sharpe, P., 2008. Quality of embryos produced from dairy cows fed whole flaxseed and the success of embryo transfer. *J. Dairy Sci.* 91, 1786-1790.
- Pyörälä S., 2008. Mastitis in post-partum dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 252-259.
- Rafałowski, R., Żegarska, Z., Kuncewicz, A., Borejszo, Z., 2014. Oxidative stability of milk fat in respect to its chemical composition. *Int. Dairy J.* 36, 82-87.
- Rickard, S.E., Yuan, Y.V., Thompson, L.U., 2000. Plasma insulin-like growth factor I levels in rats are reduced by dietary supplementation of flaxseed or its lignan secoisolariciresinol diglycoside. *Cancer Lett.* 161, 47-55.

- Roberfroid, M., 2002. Functional food concept and its application to prebiotics. *Dig. Liver Dis.* 34, S105-S110.
- Saarinen, N.M., Smeds, A., Makela, S.I., Ammala, J., Hakala, K., Pihlava, J.M., Ryhanen, E.L., Sjöholm, R., Santti, R., 2002. Structural determinants of plant lignans for the formation of enterolactone in vivo. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 777, 311-319.
- Santos, G.T., Damasceno, J.C., da Silva-Kazama, D.C., 2010. Manejo de vacas em lactação, secas e em período de transição, in: Santos, G.T., Massuda, E.M., KAZAMA, D.C.S., JOBIM, C.C.; BRANCO, A.F. (Orgs.), *Bovinocultura leiteira: bases zootécnicas, fisiológicas e de produção*. Eduem, Maringá, pp. 109-141.
- Santos, G.T., Lima, L.S.; da Silva-Kazama, D.C, Seiji, F.S.; Damasceno, J.C., 2016. Manejo nutricional e alimentar de vacas e novilhas leiteiras no final da gestação e início da lactação, in: *Anais do VII Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil*. Marechal Candido Rondon, PR.
- Saleem, M., Kim, H.J., Ali, M.S., Lee, Y.S., 2005. An update on bioactive plant lignans. *Nat. Prod. Rep.* 22, 696-716.
- Schauff, D.J., Clark, J.H., 1992. Effects of feeding diets containing calcium salts of long-chain fatty acids to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75, 2990-3002.
- Schinella, G.R., Troiani, G., Dávila, V., de Buschiazzi, P.M., Tournier, H.A., 2000. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 357-360.
- Schmidt, T.J., Klaes, M., Sendker, J., 2012. Lignans in seeds of *Linum* species. *Phytochemistry* 82, 89-99.
- Schogor, A.L.B., Palin, M.-F., dos Santos, G.T., Benchaar, C., Lacasse, P., Petit, H.V., 2013. Mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes and oxidative indicators in the blood, milk, mammary tissue and ruminal fluid of dairy cows fed flax meal. *Brit. J. Nutr.* 110, 1743-1750.
- Schönfeld, P., Wojtczak, L., 2007. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1032-1040.
- Sordillo, L.M., Aitken, S.L., 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 104-109.
- Stanley, W.C., Khairallah, R.J., Dabkowski, E.R., 2012. Update on lipids and mitochondrial function: impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 15, 122-126.
- Thompson, L.U., Robb, P., Serraino, M., Cheung, F., 1991. Mammalian lignan production from various foods. *Nutr. Cancer* 16, 43-52.
- Tur, J.A., Bibiloni, M.M., Sureda, A., Pons, A., 2012. Dietary sources of omega 3 fatty acids: public health risks and benefits. *Brit J Nutr* 107, S23-S52.
- Turner, S., Cogoi, L., Isolabella, S., Filip, R., Anesini, C., 2011. Evaluation of the antioxidant activity and polyphenols content of *Ilex paraguariensis* (mate) during industrialization. *J. Food Sci. Tech.* 3, 23-30.
- Valduga, E., Freitas, R.J.S., Reissmann, C.B., Nakashima, T., 1997. Caracterização química da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva mate) e de outras espécies utilizadas na adulteração do mate. *B. do CEPPA* 15,25-36.
- Vargas-Bello-Pérez, E., Íñiguez-González, G., Cancino-Padilla, N., Loor, J.J., Garnsworthy, P.C., 2016. Effect of dietary vegetable oils on the fatty acid profile of plasma lipoproteins in dairy cows. *Arch. Anim. Nutr.* 70, 322-332.

- Vázquez-Añón, M., Nocek, J., Bowman, G., Hampton, T., Atwell, C., Vázquez, P., Jenkins, T., 2008. Effects of feeding a dietary antioxidant in diets with oxidized fat on lactation performance and antioxidant status of the cow. *J. Dairy Sci.* 91, 3165-3172.
- Wildman, E.E., Jones, G.M., Wagner, P.E., Boman, R.L., Troutt Jr., H.F., Lesch, T.N., 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production variables in high producing Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 65, 495-501.
- Wood, J.D., Enser, M., 1997. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *Br. J. Nutr.* 78, S49-S60.
- Zachut, M., Dekel, I., Lehrer, H., Arieli, A., Arav, A., Livshitz, L., Yakoby, S., Moallem, U., 2010. Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. *J. Dairy Sci.* 93, 529-545.
- Zhang, L.Y., Wang, X.L., Sun, D.X., Liu, X.X., Hu, X.Y., Kong, F., 2007. Regulation of zinc transporters by dietary flaxseed lignan in human breast cancer xenografts. *Mol. Biol. Rep.* 35, 595-600.

## II – OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar o efeito da suplementação de antioxidantes naturais em vacas leiteiras em diferentes estágios de lactação recebendo dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados. Desta forma três experimentos foram conduzidos:

1º – objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com antioxidantes do farelo de linhaça sobre o desempenho, qualidade do leite, lipoperoxidação no plasma (catalase) e no leite (TBARS), de vacas recebendo dietas ricas em ácidos graxos ômega-3 provenientes do óleo de linhaça e os efeitos dessa dieta em parâmetro zootécnico de início de lactação (balanço energético, BHBA, NEFA e peso corporal);

2º – avaliaram-se os efeitos da suplementação com antioxidantes provenientes da erva mate em níveis crescentes sobre o desempenho, qualidade do leite e *status* oxidativo do leite de vacas recebendo dietas ricas em ácidos graxos ômega-6 oriundos do grão de canola;

3º – objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação com antioxidantes provenientes da erva mate combinada com a suplementação de vitamina E sobre o desempenho, qualidade do leite, qualidade da gordura do leite em ácidos graxos e *status* oxidativo do leite de vacas recebendo dietas ricas em ácidos graxos ômega-6 oriundos do grão de soja.

### **III – Flax meal supplementation decreases energetic negative balance high-producing dairy cows in early lactation fed protected flax oil**

(Normas: Animal Feed Science and Technology)

#### **Abstract**

The period between calving and lactation peak is commonly associated to negative energy balance (NEB) due to a rapid increase in nutritional requirements coupled with a low dry matter intake. Genetic enhanced dairy cows are more prone to severe NEB, as a result of its high milk production, which can cause metabolic diseases. A total of 20 multiparous dairy cows fitted with rumen cannulas were stratified by groups in two treatments: (1) control diet with 250 g flax oil/d infused in the abomasum (n=10, COFO); and (2) diet with 136 g/kg flax meal (n=10, FMFO) in the dry matter (DM) with 250 g flax oil/d infused in the abomasum. A one way factorial (2 levels: COFO and FMFO) analysis of variance with repeated measure was conducted for all data. Cows were subjected to experimental treatments from day 7 to 28 of post-partum and fed a common total mixed diet from day 28 to 49 of lactation. Intake of DM, expressed in kg/d and as a percentage of BW was increased for cows fed FMFO when compared with cows fed COFO. Likewise, the NEB was less severe for cows fed FMFO.

*Keywords:* Dairy cattle, Energy balance, Fatty acids, Flaxseed, Lignans

*Abbreviations:* ADF, acid detergent fiber BHBA;  $\beta$ -hydroxybutyrate acid; BW, body weight; CAT, catalase; CP, crude Protein; DM, dry matter; DMI, dry matter intake; ED, enterodiol; EL, enterolactona; FM, flax meal; NDF, neutral detergent fiber; NEB, negative energy balance; NEFA, non-esterified fatty acids; PUFA, Polyunsaturated fatty acids; SCC, somatic cell count; SDG, seicoisolariciresinol diglucoside; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

#### **1. Introduction**

The period between calving and lactation peak is commonly associated to negative energy balance (NEB) due to a rapid increase in nutritional requirements coupled with low dry matter intake (Rukkwamsuk et al., 1999; Chikunya et al., 2004). Genetic enhanced dairy cows are more prone to severe NEB as a result of high milk production, which can cause metabolic diseases such as hyperketonemia, displaced

abomasum, and fatty liver (Grummer et al., 2004; Stengärde et al., 2010; McArt et al., 2014).

High plasma concentrations of  $\beta$ -hydroxybutyrate acid (BHBA) and non-esterified fatty acids (NEFA) have been associated with metabolic diseases in early lactation (Gross et al., 2013). Indeed, as a consequence of NEB, a significant amount of adipose tissue is mobilized, thus increasing concentration of NEFA in plasma (van der Drift et al., 2012). Most plasma NEFA is taken up by the liver and used in different metabolic pathways, such as those of  $\beta$ -oxidation, esterification to triacylglycerol, and production of ketones (Reece et al., 2015). Additionally, Bernabucci et al. (2005) have reported that levels of antioxidants decrease, in periparturient dairy cows and those of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and reactive oxygen metabolites increase when concentrations of NEFA and BHBA are high (Wang et al., 2010) reported lower NEFA concentration in plasma when early lactation dairy cows were supplemented with a synthetic antioxidant, suggesting that NEFA concentration tends to reduce due to antioxidant supplementation.

Flaxseed, which is rich in linoleic acid n-3 (cis-18:3, LNA), decreases proportions of short-chain and medium-chain fatty acids and increases those of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in milk fat of dairy cows (Petit, 2002). Increasing n-3 PUFA in the diet during the transition period has been shown to increase milk production and reduce NEB (Petit et al., 2004; Zachut et al., 2010). Flaxseed is an efficient way to increase glycogen in liver while reducing triglycerides after calving, which could contribute to prevent hepatic steatosis in periparturient cows (Petit et al., 2007).

Lignans, a group of dimeric phenylpropanoids, are secondary metabolites in plants with antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant effects (Ayres and Loike, 1990; Saleem et al., 2005). Flaxseed is an excellent source of lignans especially seicoisolariciresinol diglucoside (SDG) (Thompson et al., 1991). Under the action of microorganisms, SDG is metabolized into mammalian lignans, enterodiol (ED) and enterolactone (EL) (Saarinen et al., 2002). In ruminants, rumen microorganisms have been reported to produce mainly EL from SDG (Gagnon et al., 2009). Mammalian lignans have anti-inflammatory (Hallund et al., 2008) and antioxidant (Schogor et al., 2013) properties. In fact, SDG has been reported to reduce *in vitro* oxidative stress and to have greater radical scavenger, reducing power, and hydroxyl-scavenging ability than DPPH (Moree and Rajesha, 2013).

We hypothesized that dietary flax meal (FM) reduces NEB during early lactation. Thus, this study was performed to investigate the effects of flax meal as a source of antioxidant on energy balance, plasma metabolites (NEFA, BHBA glucose and catalase), milk production, and TBARS concentration in milk of high-producing dairy cows in early lactation. Flax oil (FO) was infused in the abomasum to prevent n-3 PUFA from biohydrogenation in rumen and to promote plasma lipid peroxidation (Gladine et al., 2007).

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and experimental treatments

Cows were cared for in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (2009) and experimental procedures were approved by the local Animal Care Committee.

A total of 20 multiparous dairy cows ( $701.2 \pm 53.67$  kg of body weight (BW)) fitted with rumen cannulas (10 cm; Bar Diamond Inc., Parma, ID, USA) were randomly assigned to two treatments: (1) control diet (CO) and infusion of 250 g /d FO in the abomasum (n=10, COFO); and (2) diet with flax meal at 136 g/kg DM and infusion of 250 g/d FO in the abomasum (n=10, FMFO). The amount of oil infused was chosen based on our previous results where abomasal infusion of 250 g/d FO made lactating dairy cows more susceptible to plasma and milk lipid peroxidation (Lima et al., 2014). Cows were subjected to experimental treatments from day 7 to 28 post-partum and fed the CO diet without FO infusion from day 28 to 49 of lactation to look at the residual effects of treatments applied from day 7 to 28 post-partum. Infusion of oil in the abomasum was performed as previously described by Lima et al. (2014). Placement of infusion lines in the abomasum was manually monitored weekly to ensure post-ruminal oil delivery. Flax oil (Pokonobe Industries Inc., Hudson, QC, Canada) contained, expressed in g/kg of total fatty acids, 63.1 of C16:0, 41.2 of C18:0, 191.3 of *cis*9-18:1, 15.7 of *cis*9,*cis*12-18:2, and 544.3 of *cis*9,*cis*12,*cis*15-18:3.

Diets were formulated to meet requirements for cows producing 45 kg milk/day with 3.7 g /100 g fat (NRC, 2001) and were designed to have similar protein and energy contents (Table 1). Cows were housed in individual stalls and fed at 08:30 and 15:00 h for *ad libitum* intake (100 g/kg refusals on as fed basis). Feed intake was recorded daily

from day 7 to 49 post-partum. Samples of total mixed ration were taken monthly. All samples were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  for subsequent drying at  $55^{\circ}\text{C}$  and ground through a 1 mm screen in a Wiley mill for further analyses. Body weight of cows was determined on days 7, 28 and 49. Net energy ( $\text{NE}_L$ ) balance was calculated as the difference between energy intake and required for maintenance and milk production. Energy required for maintenance was estimated as:  $(\text{Mcal/d}) = 0.08 \times 4.184 \times \text{kg of BW}^{0.75}$ ; and energy for lactation:  $(\text{Mcal/d}) = \text{kg of milk yied} \times [(0.0929 \times \text{milk fat \%}) + (0.0547 \times \text{milk protein \%}) + 0.192] \times 4.184$  (NRC, 2001).

Cows were milked twice daily at 7:30 and 19:00 h, and milk production was recorded at each milking. Milk samples were collected on days 7, 14, 21, 28, and 49 from two consecutive milkings and pooled within cow on a yield basis. Milk samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  with 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (Bronopol, D & F Control Systems Inc., San Ramon, CA, USA) as a preservative to determine milk protein, fat, lactose, somatic cell counts (SCC) and urea N. Another milk sample was kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  with Na azide (0.2 g/kg) for TBARS analysis.

Blood samples were collected in from jugular vein 2 h after the morning feeding on days 7, 14, 21, 28 and 49 using vacutainer tubes with  $\text{K}_2$  EDTA (Becton Dickinson and Cie, Rutherford, NJ, USA). Blood samples were centrifuged at 1800g for 12 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and plasma samples were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyzed for concentrations of BHBA, glucose and NEFA and activity of catalase (CAT).

## 2.2. Chemical analysis

The DM was determined using a forced-air oven according to procedure 934.01 of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990). The total N was measured by thermal conductivity detection after sample combustion at high temperature ( $950^{\circ}\text{C}$ ) in pure (99%) oxygen (procedure 990.03; AOAC, 1990). The crude protein (CP) content was estimated as  $\text{N} \times 6.25$ . Procedures 5.1 and 4.1 of the National Forage Testing Association (NFTA, 1993) were used to measure neutral detergent fiber (aNDF) and acid detergent fiber (ADF) concentrations, respectively. The aNDF inclusive of residual ash was measured using a heat-stable  $\alpha$ -amylase, but without sodium sulfite in the neutral detergent solution.

Plasma concentrations of BHBA, NEFA, and glucose were assessed using, respectively,  $\beta$ -hydroxybutyrate Reagent (#H7587, Pointe Scientific Inc., Canton, MI,



USA) HR Series NEFA-HR (2) (Wako Diagnostics, Richmond, VA, USA), and glucose assay (#220-32, Sekisui Diagnostics, Lexington, MA, USA) kits. Plasma CAT activity was determined using a catalase assay (#707002, Cayman, Ann Harbor, MI, USA).

Milk protein, fat, lactose and urea N concentrations were analyzed by infrared spectroscopy (system 6000 MilkoScan, Foss Electric, Hillerød, Denmark) according to method no. 972.16 of AOAC (1990). Milk somatic cell count was obtained using an electronic counter (Fossomatic FC, Foss Electric, Hillerød, Denmark).

Concentration of TBARS in milk was analyzed spectrophotometrically at 532 nm using a commercial TBARS assay kit (OXItek, ZeptoMetrix Corporation, Buffalo, NY, USA), and results were expressed as malondialdehyde (MDA) equivalents (nmol/ml).

### 2.3. Statistical analysis

All data were analyzed using the MIXED procedure of SAS, release 9.2 (2002). A one way (2 levels: COFO and FMFO) analysis of variance with repeated measurements was conducted for all data. Covariance structures were modeled separately for each variable. Values of fit statistics for Akaike's information criterion corrected (AICC) were used to determine the most appropriate covariance structures. Results were reported as least squares means with standard error of the mean (SEM). Significant differences were set at  $P \leq 0.05$  and trends at  $0.05 < P \leq 0.10$ . Whenever significant, the interaction between treatment and sampling time was decomposed into simple comparisons using the SLICE option of the MIXED procedure of SAS.

## 3. Results

There was no interaction between treatment and sampling time for DM intake, expressed in kg/d and g/kg BW, energy balance and milk production. Therefore, only mean values for all sampling times are presented (Table 2). Intake of DM, expressed in kg/d and in g/kg of BW, was higher ( $P = 0.006$  and  $P = 0.003$ , respectively) for cows fed FMFO compared with those fed COFO. Cows fed the COFO diet had lower energy balance than those fed the FMFO diet ( $P = 0.03$ ). Milk production was similar between treatments (Fig. 2). There was an interaction ( $P = 0.022$ ) between time and treatment for BW as a result of a decrease in weight for cows fed COFO and an increase for those fed FMFO from day 7 to 28 (Fig. 1 (a)). There was a treatment effect for BW change (Fig. 1

(b)) between day 7 to 28 ( $P=0.02$ ) and day 7 to 49 ( $P = 0.06$ ); cows fed FMFO gained weight and those fed COFO lost weight. As there was no interaction between treatment and sampling time for yield of protein, fat, lactose and total solids, concentrations of fat, lactose and total solids, and urea N, somatic cell score and TBARS in milk, mean values of the five weeks are reported (Table 2). Milk lactose concentration was not affected by treatment whereas milk fat ( $P = 0.06$ ) and total solids ( $P= 0.06$ ) concentrations tended to be lower for cows fed FMFO than for those fed COFO. There was no difference between COFO and FMFO for yield of milk protein, fat, lactose and total solids and milk urea N concentration. There was no difference ( $P > 0.10$ ) between treatments for milk SCC. Cows fed FMFO tended ( $P = 0.08$ ) to have higher TBARS values than those fed COFO.

There was a treatment by time interaction ( $P = 0.0006$ ) for milk protein concentration. On day 28, protein concentration was higher ( $P = 0.05$ ) for cows fed the FMFO diet than for those fed the COFO diet (Fig. 2).

No interaction between treatment and time was observed for plasma concentrations of BHBA, NEFA and glucose, and for CAT activity. Therefore, mean values of all sampling times are presented in Table 3. There was no difference between diets for BHBA and NEFA concentrations and CAT activity ( $P > 0.10$ ; Table 3). Plasma glucose concentration was higher ( $P = 0.02$ ) for cows fed the FMFO diet compared with those fed the COFO diet.

#### **4. Discussion**

Dry matter intake ranged from 19.63 kg/d for cows fed COFO diet to 24.2 kg/d for those fed FMFO diet. These results agree with Lima et al. (2014) and Schogor et al. (2013) who found that FM supplementation increased DMI of Holstein cows. Kazama et al. (2010) have reported that DM digestibility of dairy cows infused with flax oil in the abomasum and flax hulls administered in the rumen was 734 g/kg. Additionally, SDG supplementation has been reported to improve the metabolism of carbohydrates and nitrogen in rumen (Zhou et al., 2009). Wilkinson (2004) suggested that the digestibility could increase the dry matter intake (DMI) in 50%. Thus, a possible increase in DM digestibility due to lignans concentration could help to explain the increased DMI we observed for cows fed dietary FM. Animals who received flax meal

did not lose any weight between second and seventh week of lactation, it might be because increasing DMI.

Our results are contradictory with those of Benchaar et al. (2012) and Bu et al. (2007) results because the FM is more likely to boost milk production but does not have a lasting effect on milk production. Studying different levels of supplementation of infused with flax oil in dairy cow fed with FM, Lima et al. (2014) also did not have any effect regarding treatments in milk production. Supplementation of dairy cows with flaxseed did not increase the digestibility of protein (Schroeder et al., 2014). Therefore, is less likely to increase urea in milk. The metabolism of lactose was not modified by the addition of FM in the diet as results found by Lima et al. (2014) feeding dairy cows 124 g/kg FM and infused with 250 g of FO in the abomasum.

In the present study a treatment by sampling time interaction for a yield of protein in milk was observed likely due to NRC Met:Lys ratio (0.33) ideal for milk production is similar to what is found in FM (0.44) (NRC, 2001; Haque et al., 2012; Giacomino et al., 2013). In addition, FM has a lower degradability in rumen of crude protein which contributes to increase intestinal supply of RUP improving amino acids quality for milk production (Turner and Mcniven, 2011). Another possible explanation is that high fat supplementation could have interfered with mammary gland uptake of amino acids for milk protein synthesis but this effect was ameliorated by dietary FM. Indeed, fat supplementation has been reported to inhibit somatotropin secretion which has effects on mammary gland uptake of protein (Casper and Schingoethe, 1989). However, physiological basis by which dietary FM could maintain mammary gland amino acids up taken under fat supplementation has never been approached. Milk concentration of total solid was influenced by milk fat results as there was a tendency effect of treatment with a slight decrease for FMFO treatment.

NEB in cows fed FMFO treatment was better, than for those fed COFO treatment, -37,05 MJ/d. It could explain by the increase in DMI for dairy cow supplemented with FM. Feeding dairy cows 125 g/kg of whole flaxseed in the DM has an effect, increasing levels of propionate and decreasing acetate levels in rumen (Gonthier et al., 2004). Propionate is known to be the precursor of glucose in blood (Wiltout and Satter, 1972), this could explain the lower NEB on dairy cows fed with FM. Glucose also was increased in the FMFO treatment that could be explained by the same factors.

In the present study, the antioxidant status of milk was measured through the lipid peroxidation. Milk TBARS concentration tendet to be ligher for FM. However. As

previously described by Kitts et al. (1999) the EL ha some indirect pro-oxidant activities.

Plasma NEFA and BHBA did not differ between treatments even with a better NEB for FMFO treatment. Our results agree with those of Petit et al. (2002) that dairy cow fed flaxseed did not have any effect on NEFA concentration compared with the control diet, however, it was increased when cows were fed a rumen bypass fat. A possible increase in hepatic  $\beta$ -oxidation due to abomasal infusion in both COFO and FMFO treatments could help to explain this lack of effect. Indeed, flax oil infusion in cows abomasum on the peroxisomal proliferator activated receptor mRNA (PPAR $\alpha$  mRNA) increase the activity of hepatic enzymes on the  $\beta$ -oxidation process (Schoonjans et al., 1996; Kerner and Hoppel, 2000). Perhaps the effect of the flax oil hides the effect of lignans.

## **5. Conclusion**

Our results suggest the inclusion of FM in the diet of dairy cows post-partum does not affect the levels of NEFA and BHBA and increase milk TBARS concentration. However, dietary FM may be capable of increasing intake of DMI and therefore, reducing NEB. However, further studies are required to clarify the effect of FM on the intake of DMI during early lactation.

## **Acknowledgements**

The present study was funded by Agriculture and Agri-Food Canada (Grant no. J-000078). The authors express their gratitude to the staff of the Sherbrooke Research and Development Centre for their contribution to the present study. Special thanks to Isabelle Blanchet, Danièle Beaudry and Caroline Roy for technical assistance and to Steve Méthot for his help in statistical analyses. F.S.S. was recipient of a studentship and L.M.Z. was recipient of a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil.

## References

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC, Airlington, VA, USA.
- Ayres, D.C., Loike, J.D., 1990. Lignans: chemical, biological and clinical properties. Cambridge University Press, New York.
- Benchaar, C., Romero-Perez, G.A., Chouinard, P.Y., Hassanat, F., Eugene, M., Petit, H.V., Côrtes, C., 2012. Supplementation of increasing amounts of linseed oil to dairy cows fed total mixed rations: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, protozoal populations, and milk fatty acid composition. *J. Dairy Sci.* 95, 4578-4590.
- Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., Nardone, A., 2005. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88, 2017-2026.
- Bu, D.P., Wang, J.Q., Dhiman, T.R., Liu, S.J., 2007. Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 998-1007.
- Canadian Council on Animal Care (CCAC), 2009. Guide to the Care and Use of Farm Animals in Research, Teaching and Testing. CCAC, Ottawa, ON, Canada.
- Casper, D.P., Schingoethe, D.J., 1989. Model to describe and alleviate milk protein depression in early lactation dairy cows fed a high fat diet. *J. Dairy Sci.* 72, 3327-3335.
- Chikunya, S., Demirel, G., Enser, M., Wood, J.D., Wilkinson, R.G., Sinclair, L.A., 2004. Biohydrogenation of dietary n-3 PUFA and stability of ingested vitamin E in the rumen, and their effects on microbial activity in sheep. *Brit. J. Nutr.* 91, 539-550.
- Gagnon, N., Côrtes, C., da Silva, D., Kazama, R., Benchaar, C., dos Santos, G., Zeoula, L., Petit, H.V., 2009. Ruminal metabolism of flaxseed (*Linum usitatissimum*) lignans to the mammalian lignan enterolactone and its concentration in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Brit. J. Nutr.* 102, 1015-1023.
- Giacomino, S., Peñas, E., Ferreyra, V., Pellegrino, N., Fournier, M., Apro, N., Olivera Carrión, M., Frias, J., 2013. Extruded Flaxseed Meal Enhances the Nutritional Quality of Cereal-based Products. *Plant Foods Hum. Nutr.* 68, 131-136.
- Gonthier, C., Mustafa, A.F., Berthiaume, R., Petit, H.V., Martineau, R., Ouellet, D.R., 2004. Effects of feeding micronized and extruded flaxseed on ruminal fermentation and nutrient utilization by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 1854-1863.
- Gross, J.J., Schwarz, F.J., Eder, K., van Dorland, H.A., Bruckmaier, R.M., 2013. Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction. *J. Dairy Sci.* 96, 5008-5017.
- Grummer, R.R., Mashek, D.G., Hayirli, A., 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 20, 447-470.
- Hallund, J., Tetens, I., Bügel, S., Tholstrup, T., Bruun, J.M., 2008. The effect of a lignan complex isolated from flaxseed on inflammation markers in healthy postmenopausal women. *Nutr. Metab. Cardiovas.* 18, 497-502.
- Haque, M.N., Rulquin, H., Andrade, A., Faverdin, P., Peyraud, J.L., Lemosquet, S., 2012. Milk protein synthesis in response to the provision of an “ideal” amino acid profile at 2 levels of metabolizable protein supply in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 5876-5887.

- Kazama, R., Côrtes, C., da Silva-Kazama, D., Gagnon, N., Benchaar, C., Zeoula, L.M., Santos, G.T.D., Petit, H.V., 2010. Abomasal or ruminal administration of flax oil and hulls on milk production, digestibility, and milk fatty acid profile of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 4781-4790.
- Kerner, J., Hoppel, C., 2000. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1486, 1-17.
- Kitts, D.D., Yuan, Y.V., Wijewickreme, A.N., Thompson, L.U., 1999. Antioxidant activity of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglycoside and its mammalian lignan metabolites enterodiol and enterolactone. *Mol. Cell. Biochem.* 202, 91-100.
- Lima, L.S., Palin, M.F., Santos, G.T., Benchaar, C., Lima, L.C.R., Chouinard, P.Y., Petit, H.V., 2014. Effect of flax meal on the production performance and oxidative status of dairy cows infused with flax oil in the abomasum. *Lives. Sci.*, 170, 53-62.
- McArt, J.A.A., Nydam, D.V., Oetzel, G.R., Guard, C.L., 2014. An economic analysis of hyperketonemia testing and propylene glycol treatment strategies in early lactation dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 117, 170-179.
- Moree, S.S., Rajesha, J., 2013. Investigation of in vitro and in vivo antioxidant potential of secoisolariciresinol diglucoside. *Mol. Cell. Biochem.* 373, 179-187.
- National Forage Testing Association (NFTA), 1993. National Forage Testing Association Recommends Forage Analysis Procedure, 16th ed. NFTA, Omaha, NE, USA.
- National Research Council (NRC), 2001. Nutrients requirements of dairy cattle. 7th revised ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Petit, H.V., 2002. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. *J. Dairy Sci.* 85, 1482-1490.
- Petit, H.V., Dewhurst, R.J., Scollan, N.D., Proulx, J.G., Khalid, M., Haresign, W., Twagiramungu, H., Mann, G.E., 2002. Milk production and composition, ovarian function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. *J. Dairy Sci.* 85, 889-899.
- Petit, H.V., Germiquet, C., Lebel, D., 2004. Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3889-3898.
- Petit, H.V., Palin, M.F., Doepel, L., 2007. Hepatic Lipid Metabolism in Transition Dairy Cows Fed Flaxseed. *J. Dairy Sci.* 90, 4780-4792.
- Reece, W.O., Erickson, H.H., Goff, J.P., Uemura, E.E., 2015. *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. Wiley, Oxford.
- Rukkwamsuk, T., T. A. Kruip, a., Wensing., T., 1999. Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet. Q.* 21, 71-77.
- Saarinen, N.M., Smeds, A., Mäkelä, S.I., Ämmälä, J., Hakala, K., Pihlava, J.-M., Ryhänen, E.-L., Sjöholm, R., Santti, R., 2002. Structural determinants of plant lignans for the formation of enterolactone in vivo. *J. Chromatogr. B.* 777, 311-319.
- Saleem, M., Kim, H.J., Ali, M.S., Lee, Y.S., 2005. An update on bioactive plant lignans. *Nat. Prod. Rep.* 22, 696-716.
- Statistical Analysis System (SAS), 2000. SAS Statistical Analysis System, Release 8.02. SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA.
- Schogor, A.L., Palin, M.F., Santos, G.T., Benchaar, C., Lacasse, P., Petit, H.V., 2013. Mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes and oxidative indicators in the blood, milk, mammary tissue and ruminal fluid of dairy cows fed flax meal. *Br. J. Nutr.* 110, 1743-1750.

- Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J., 1996. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1302, 93-109.
- Schroeder, J.W., Bauer, M.L., Bork, N.R., 2014. Effect of flaxseed physical form on digestibility of lactation diets fed to Holstein steers. *J. Dairy Sci.* 97, 5718-5728.
- Stengårde, L., Holtenius, K., Tråvén, M., Hultgren, J., Niskanen, R., Emanuelson, U., 2010. Blood profiles in dairy cows with displaced abomasum. *J. Dairy Sci.* 93, 4691-4699.
- Turner, T.D., McNiven, M.A., 2011. In vitro N degradability and N digestibility of raw, roasted or extruded canola, linseed and soybean. *Agr. Food Sci.* 20, 298-304.
- van der Drift, S.G.A., Houweling, M., Schonewille, J.T., Tielens, A.G.M., Jorritsma, R., 2012. Protein and fat mobilization and associations with serum  $\beta$ -hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 4911-4920.
- Wang, Y.M., Wang, J.H., Wang, C., Chen, B., Liu, J.X., Cao, H., Guo, F.C., Vazquez-Anon, M., 2010. Effect of different rumen-inert fatty acids supplemented with a dietary antioxidant on performance and antioxidative status of early-lactation cows. *J. Dairy Sci.* 93, 3738-3745.
- Wilkinson, J.M., 2004. Nutrition, in: Andrews, A. H. (Ed.), *Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle*. Blackwell Science, Oxford, UK, pp. 95-122.
- Wiltrout, D.W., Satter, L.D., 1972. Contribution of propionate to glucose synthesis in the lactating and nonlactating. *J. Dairy Sci.* 55, 307-317.
- Zachut, M., Dekel, I., Lehrer, H., Arieli, A., Arav, A., Livshitz, L., Yakoby, S., Moallem, U., 2010. Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. *J. Dairy Sci.* 93, 529-545.
- Zhou, W., Wang, G., Han, Z., Yao, W., Zhu, W., 2009. Metabolism of flaxseed lignans in the rumen and its impact on ruminal metabolism and flora. *Anim. Feed Sci. Tech.* 150, 18-26.

**Table 1**

Ingredients and chemical composition of total mixed rations of Holstein cows fed no flax meal (COFO) or 136 g/kg flax meal (FMFO) in the dry matter (DM).

	Treatments	
	COFO	FMFO
Ingredients (g/kg DM) <sup>a</sup>		
Grass, hay	17	16
Grass, silage	346	342
Corn, silage	231	228
Corn, grain (cracked)	88	200
Beet pulp	142	-
Soybean, meal (480 g/kg CP, solvent)	103	29
Gluten, meal	-	30
Flax, meal	-	136
Top supplement <sup>b</sup>	57	-
Minerals and vitamins <sup>c</sup>	11	11
Calcium carbonate	6	8
Chemical composition <sup>d</sup>		
Dry matter (DM, g/kg)	481	505
Crude protein (g/kg DM)	172	178
Neutral detergent fiber (aNDF, g/kg DM)	338	319
Acid detergent fiber (ADF, g/kg DM)	252	230
Net energy for lactation (NE <sub>L</sub> , MJ/kg DM) <sup>e</sup>	6.36	6.28

<sup>a</sup> Actual values obtained by precise weighing of dietary ingredients.

<sup>b</sup> Contained (per kg as is basis): Contained 200 g of canola meal, 250 g of corn gluten meal, 340 g of soybean meal and 210 g of brewer's corn

<sup>c</sup> Contained (per kg, as is basis): Ca 92.3 g, P 48.0 g, Mg 47.8 g, S 15.2 g, Na 53.9 g, K 13.7 g, Fe 2,014 mg, Zn 2,657 mg, Cu 1,068 mg, Mn 1,796 mg, I 23 mg, Co 57 mg, Se 19.6 mg, vitamin A 441,606 IU, vitamin D3 66,700 IU, and vitamin E 2,630 IU.

<sup>d</sup> One sample obtained from one pooled samples per month and prepared by compositing. NDF and ADF are inclusive of residual ash.

<sup>e</sup> Net energy for lactation as calculated using published values of feed ingredients (NRC, 2001).



**Table 2**

Intake, milk production and composition and net energy balance of Holstein cows infused with 250 g/d flax oil and fed total mixed rations containing no flax meal (COFO) or 136 g/kg flax meal (FMFO) in the dry matter.

	Treatments		SEM	P-value
	COFO n = 10	FMFO n = 10		Treatment
Intake <sup>a</sup>				
Dry matter (kg/d)	19.1	24.0	1.12	0.006
Dry matter (g/kg BW)	27.20	33.96	1.417	0.003
Milk Production (kg/d) <sup>a</sup>	45.7	46.5	1.20	0.65
Milk composition (g/kg) <sup>a</sup>				
Fat	41.5	38.3	1.138	0.06
Lactose	45.0	45.4	0.314	0.40
Total solids	118.9	116.2	0.950	0.06
Yield of milk components (kg/d)				
Protein	1.43	1.43	0.035	0.97
Fat	1.82	1.70	0.083	0.33
Lactose	2.00	2.01	0.063	0.88
Total solids	5.25	5.14	0.165	0.66
Net energy balance (MJ/d)	-37.05	-4.31	9.596	0.03
Milk urea N (mg/dL)	13.52	12.58	0.643	0.31
Somatic cell score <sup>b</sup>	1.79	1.89	0.125	0.55
Milk TBARS (nmol of MDA/ml) <sup>c</sup>	2.17	2.56	0.980	0.08

<sup>a</sup> Mean values for days 7 to 49 post-partum.

<sup>b</sup> Somatic cell score =  $\log_{10}$  of somatic cell count.

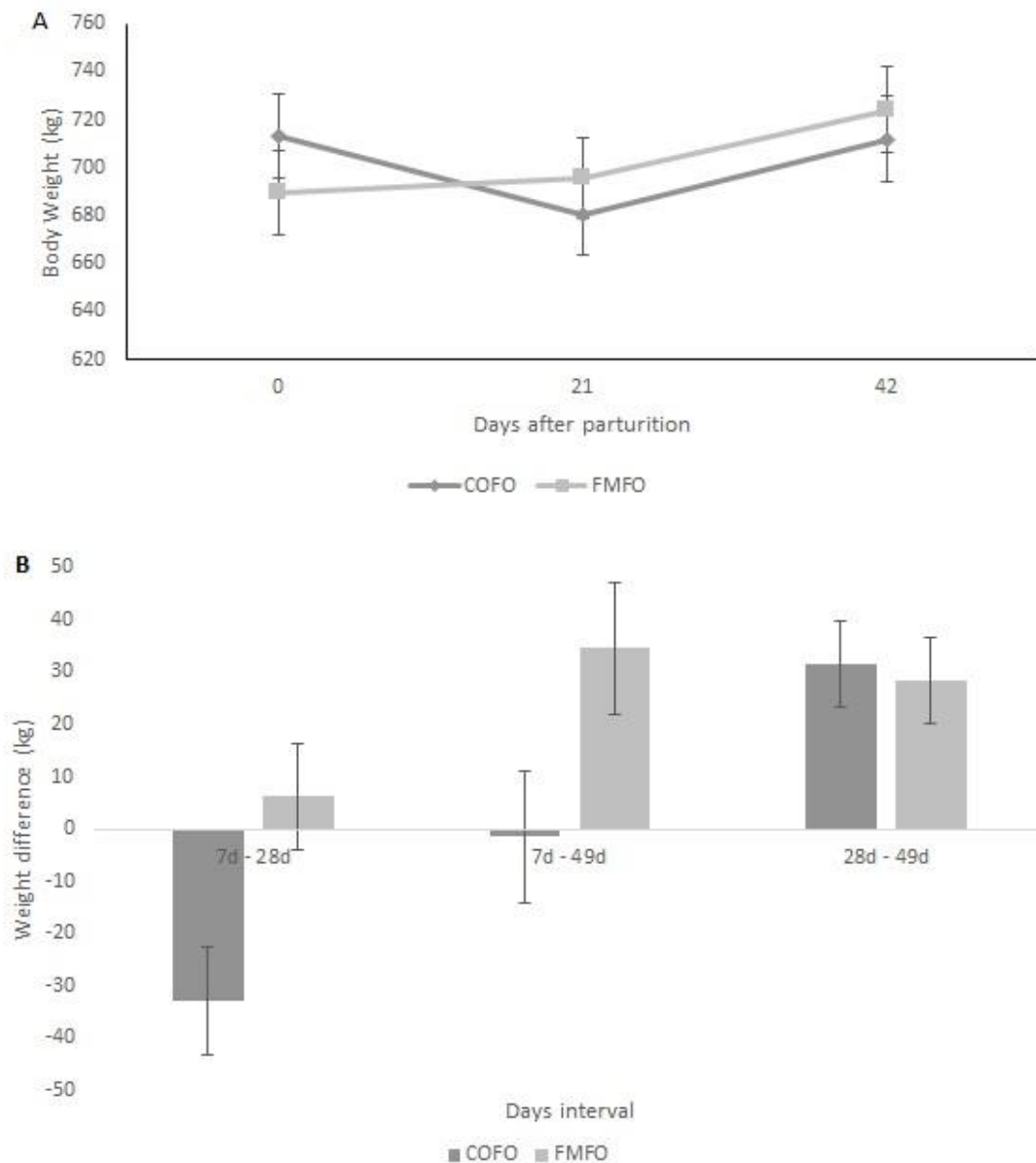
<sup>c</sup> TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; MDA: malondialdehyde.

**Table 3**

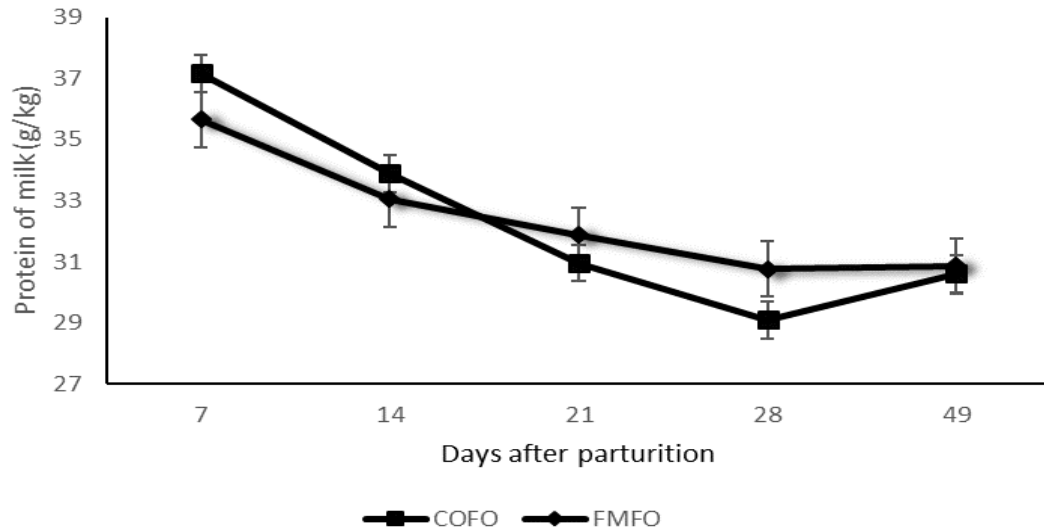
Concentrations of metabolites and catalase activity in the plasma of Holstein cows infused with 250g/d flax oil and fed total mixed rations containing no flax meal (COFO) or 136 g/kg flax meal (FMFO) in the dry matter.

Item <sup>a</sup>	Treatments		SEM	P-value
	COFO n = 10	FMFO n = 10		Treatment
BHBA (mmol/L)	0.98	0.96	0.103	0.90
Glucose (mmol/L)	3.08	3.31	0.006	0.02
NEFA (mmol/L)	0.33	0.25	0.038	0.14
Catalase activity (nmol/min per g of protein)	12.33	12.18	0.852	0.90

<sup>a</sup>BHBA,  $\beta$ -hydroxybutyrate; NEFA, Non-esterified fatty acids.



**Fig. 1.** Body weight (A) and body weight change (B) of Holstein cows infused with 250 g/d flax oil and fed total mixed rations containing no flax meal (COFO) or 136 g/kg flax meal (FMFO) in the dry matter. (a) Data are presented as mean values of COFO (◆, n = 10) and FMFO (■, n = 10). There was a treatment by time interaction ( $P = 0.02$ ) for body weight. (b) Light shaded bars indicate the COFO treatment (n = 10) and dark shaded bars correspond to the FMFO treatment (n = 10). \* $P < 0.05$ ; † $P < 0.10$ . error bars indicate SEM.



**Fig. 2.** Concentration of protein in milk for each sampled day of Holstein cows infused with 250g/d flax oil and fed total mixed rations containing no flax meal (COFO) or 136 g/kg flax meal (FMFO) in the dry matter. Data are presented as mean values of COFO (■, n = 10) and FMFO (▲, n = 10). Error bars indicate SEM. There was a treatment by time interaction ( $P = 0.0006$ ). \* $P < 0.05$ .

## **IV – Intake, digestibility and milk production and composition of dairy cows fed different levels of Yerba Mate in the diet**

(Normas: Animal Feed Science and Technology)

### **Abstract**

Eight multiparous lactating Holstein cows and averaging  $84 \pm 18$  (mean  $\pm$  SD) days in milk and  $598 \pm 55$  kg of body weight were assigned to a replicated  $4 \times 4$  Latin square design to determine the effects of feeding Yerba Mate (YM) on intake, digestibility, milk production, milk composition, and milk concentration of antioxidants. The cows were fed a corn silage-based diet containing ground canola seed. The treatments fed for *ad libitum* intake were: a total mixed ration not supplemented (0 g/d), or supplemented (250, 500 or 750 g/d) with dried leaves of YM. Experimental periods consisted of 14 d for diet adaptation and 7 d for data collection and sampling. Increased supplementation of YM from 0 to 750 g/d had no effect on milk production or yields of protein and fat, and decreased milk yields of lactose and total solids and milk urea N concentration. Digestibility of dry matter, protein and neutral detergent fibre was similar among diets and ether extract digestibility decreased with the level of YM supplementation. Concentrations of total polyphenols and production of conjugated diene hydroperoxides and thiobarbituric acid reactive substances in milk were similar among diets. The reducing power in milk increased with the inclusion level of YM in the diet, thus suggesting that antioxidant activity of milk can be enhanced with this feeding strategy although it was clearly insufficient to overcome the negative effects on milk fat synthesis probably caused by the high levels of fat added to diets as ground canola seed.

*Keywords:* Antioxidants, Digestibility, Polyphenols, Reduction power, TBARS

*Abbreviations:* aNDF, neutral detergent fiber with residual ash; CD, conjugated diene; DM, dry matter; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; YM, yerba mate.

### **1. Introduction**

Supplying lactating dairy cows with polyunsaturated fatty acids increases their proportion in milk fat, which is considered health promoting (Ulbricht and Southgate, 1991). However, milk enriched in polyunsaturated fatty acids may be more susceptible to oxidation with the development of rancid odors and flavors (Timmons et al., 2001),

thus decreasing the nutritional quality and shelf life of milk and dairy products. To prevent milk oxidation, one strategy is to incorporate antioxidant molecules to dairy products (Matumoto-Pintro et al., 2011). A second option is to supplement antioxidants in the diet of dairy cows. For example, previous research has shown that antioxidants present in flax in the form of lignans, which are polyphenolic compounds, were transferred to the milk of cows fed flaxseed meal (Petit et al., 2009). Moreover, cows receiving 50 and 100 g/kg flaxmeal in the diet had lower production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in milk (Schogor et al., 2013). Naturally occurring antioxidants such as polyphenols then may contribute to limit milk oxidation as they exhibit various antioxidant properties (Bravo, 1998).

Yerba mate (YM; *Ilex paraguariensis*) is a South American native plant, and the leaves are used to prepare a beverage consumed in southern Brazil and in neighboring countries such as Argentina, Paraguay and Uruguay. It is known that YM exerts antioxidant activity due to its content of several compounds such as polyphenols (Heck and de Mejia, 2007). Concentration of polyphenols in the extract of YM is higher than that of green tea and red wine (Gugliucci et al., 2009). Moreover, chlorogenic acids, which are present in large amounts in YM (Bracesco et al., 2011), scavenge free radicals and metal modulating gene expression of antioxidant enzymes (Jaiswal et al., 2010). The capacity of YM to scavenge free radicals is similar to that of gallic acid (de Mejía et al., 2010) and Bastos et al. (2006) have reported that both green mate and mate tea infusions had the same antioxidant efficacy as butylated hydroxytoluene, a well-known phenolic synthetic antioxidant used in foods. Altogether, these results suggest that YM could prevent oxidation in milk enriched with polyunsaturated fatty acids and provide the consumers with dairy products with improved health benefits. However, there is little information on YM supplementation to dairy cow. In one study, Celi and Raadsma (2010) fed 250 g/d of dried leaves of YM to mid-lactating dairy cows and reported a small but significant increase in milk yield (22.9 *versus* 21.3 kg/d; YM *versus* control). As little information was found on this topic, the objective of the present study was to determine the effects of different amounts of YM in the diet on feed intake, digestibility and milk composition of dairy cows. The hypothesis was that increased YM amount in the diet improves antioxidant properties and decreases lipoperoxidation in milk when cows are fed a diet enriched with canola seed, a source of polyunsaturated fatty acids.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animal, experimental design, and treatments

Eight multiparous lactating Holstein cows were used in a replicated  $4 \times 4$  balanced Latin square design with four 21-day periods. The cows averaged  $84 \pm 18$  (mean  $\pm$  SD) days in milk at the start of the experiment with an average body weight of  $598 \pm 55$  kg (mean  $\pm$  SD). They were housed in individual tie stalls and had free access to water. Cows were fed for *ad libitum* intake (100 g orts/kg, on an as-fed basis) a total mixed ration (Table 1) not supplemented (0 g/d), or supplemented (250, 500 or 750 g/d) with dried leaves of YM (Laranjeiras, Laranjeiras do Sul, PR, Brazil). On a dry matter (DM) basis, YM contained 126 g/kg crude protein, 35 g/kg ether extract and 380 g/kg neutral detergent fiber (aNDF). The YM was incorporated to the diet to achieve the appropriate feeding rates and diets were offered in equal amounts twice a day at 07:00 and 14:00 h. The experiment was carried out at the Iguatemi Experimental Farm of the Maringa State University in Brazil and was approved by the Local Ethical Committee for Use of Animals in Experimentation at the Maringa State University.

### 2.2. Experimental procedures

Each experimental period consisted of 14 d of adaptation to diets and 7 d for data collection. The cows were milked twice a day at 06:30 and 16:00 h in a milking parlour and milk production was recorded at each milking. Milk samples were obtained from the two consecutive milkings on day 18. Samples were pooled on a yield basis and two aliquots of each milk sample were taken. One aliquot was kept frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  with Na azide (0.2 g/kg) for determination of total polyphenols, conjugated diene (CD) hydroperoxides, reducing power, and TBARS. The second aliquot of milk samples was stored at  $+4^{\circ}\text{C}$  with bronopol-B2 until analysis of normal composition (fat, protein, and lactose).

Samples of diets, refusals and YM were collected daily from day 15 to day 21 and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Samples were composited by cow within period, dried at  $55^{\circ}\text{C}$  for 72 h, ground to pass a 1 mm screen in a Wiley mill (Marconi MA340, Piracicaba, SP, Brazil) and analyzed for DM, organic matter, total N, aNDF, and ether extract. To predict fecal output and digestibility, a gelatin capsule of purified lignin (LIPE<sup>®</sup>) was inserted in the

rumen once daily at 09:00 h from day 11 to day 20, supplying a total of 500 mg of lignin/d. Fecal grab samples (100 g) were taken twice daily at 08:00 and 16:30 h and accumulated from day 15 to day 19. Fecal output was determined with the following equation:

$$\text{Fecal output (g DM/d)} = \text{dosed marker (g/d)} / \text{marker concentration in feces (g/g DM)}$$

Fecal samples were dried in a forced-air oven at 55°C for 72 h, composited by cow within period and ground through a 1-mm screen in a Wiley mill for further analysis.

### 2.3. Chemical analysis

Dry matter of diets, refusals, YM and feces was determined by drying samples in a forced-air oven at 105°C overnight (AOAC, 1998; method 934.01). All samples were ground through a 1 mm mesh before analyses of N, ether extract concentration, and aNDF. Total N was determined with a Tecnal TE-036/1 (Tecnal, Piracicaba, Brazil) according to method 988.05 of the AOAC (1998). Ether extract was determined with Tecnal TE-044/1 following method 920.39 of the AOAC (1998). Ash content was determined by incineration at 600°C for 2 h in a muffle furnace (AOAC, 1998; method 942.05) and the organic matter content was calculated as the difference between 1000 and the content of ash. Determination of aNDF was performed according to Van Soest et al. (1991) using a heat stable  $\alpha$ -amylase (Termamyl 120 L<sup>®</sup> Sigma-Aldrich, 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO, USA) and without sodium sulphite, and expressed inclusive of residual ash.

Protein, fat and lactose concentrations in milk were determined by infrared spectroscopy (Bentley model 2000; Bentley Instrument, Inc., Chaska, MN, USA) following procedure 972.16 of AOAC (1990). Concentrations of milk urea N as determined according to Marsh et al. (1965). Milk somatic cell counts were obtained using an electronic counter (Somacount 500<sup>®</sup>, Chaska, MN, USA) as described by Voltolini et al. (2001).

Content of total polyphenols of milk was determined using the Folin–Ciocalteu technique (Deladino et al., 2013) with the elimination of interfering substances using polyvinylpyrrolidone as reported by Han et al. (2011). Polyphenols were extracted



from milk by mixing 1 mL of each sample with methanol/water (90:10, v/v) and the volume was made up to 10 mL. The extracts were then filtered on a 0.22 µm PTFE membrane filter (Spritzen, Shanghai, China) into a tube protected from light. The assay was performed using a UV-Vis spectrophotometer (PC 300, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The content phenolic compounds was reported as Gallic acid equivalents (GAE; mg/L of milk).

Total reducing power in milk was determined as described by Zhu et al. (2002) with some modifications. Milk proteins were precipitated by adding 1 mL of a trichloroacetic acid solution (20%; v/v) to 1 mL milk. The mixture was vortex-mixed for 10 min and centrifuged at  $1,058 \times g$  for 10 min at 20°C. Absorbance was measured at 700 nm on a UV-Vis spectrophotometer (PC 300, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and reducing power was reported as GAE (mg/L). Production of conjugated diene (CD) hydroperoxides in milk was used to measure lipid oxidation according to the method of Kiokias et al. (2006) with some modifications. Briefly, samples (50 µL) were added to a mixture of 2.5 mL isooctane/2-propanol (2:1; v/v) and vortexed for 10 sec. Samples then were filtered on a 0.22 µm PTFE membrane filter (Spritzen, Shanghai, China). The absorbance was measured at 232 nm using a UV-Vis (PC 300, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The production of CD was calculated as follows:  $CD \text{ (mmol/kg of fat)} = (A/27)/[(a*b)/100000*(c + b/1000)]$ ; where: A = absorbance at 232 nm; a = milk fat proportion (g/100 g); b = sample volume (µ); and c = mixture volume (mL). The measurement of TBARS in milk was performed following the procedure of Payá et al. (1992) with some modifications. Milk proteins were precipitated by adding 2 mL of a thibarbituric acid solution (TBA 1%, TCA 15% and HCl 562.5 mM; v/v) to 0.5 µL milk. The mixture was heated at 100°C for 15 min, cooled for 5 min and centrifuged at  $1,058 \times g$  for 15 min at 20°C. Absorbance was measured at 532 nm on a UV-Vis spectrophotometer (PC 300, Thermo Scientific) and results were expressed in terms of malondialdehyde (MDA) equivalents (mmol/mL).

Samples of feces (2 mg) were ground at constant pressure for 1 min in an agate mortar to obtain a pressed pellet and concentration of LIPE<sup>®</sup> was analyzed directly by infrared spectroscopy (Varian 850 FTIV, Varian BV, Middelburg, The Netherlands) using an ATR device (Saliba et al., 2015). The powdered potassium bromide was also run on the spectrometer alone to establish a background read. Standard calibration curves of LIPE<sup>®</sup> were prepared by measuring the absorbance of 3 different concentrations of LIPE<sup>®</sup> in feces (0.025, 0.05, and 0.1 mg LIPE<sup>®</sup>), which corresponded

to approximately 100, 250, and 500 mg/d of LIPE<sup>®</sup> dosed in the rumen. Each standard was read in triplicate and the mean values were plotted to generate a standard curve of concentration versus area. The data were analyzed using matrix algebra programs of the software associated with the equipment or by using statistical correlation or least squares regression. Each sample was read directly (without dilution), and the value (in mg) was calculated from the standard curve.

#### 2.4. Statistical analysis

Results were analyzed using the MIXED procedure of SAS (SAS 2000; SAS Institute). Data on feed intake and milk production were averaged over the 7 days of the last week of each experimental period and subjected to analysis of variance. All data from the experiment were analyzed as a replicated 4 × 4 balanced Latin square design with the general model:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + A_k + S_l + A/S_{kl} + e_{ijkl}$$

where:  $Y_{ijkl}$  = the dependent variable,  $\mu$  = overall mean,  $T_i$  = fixed effect of treatment ( $i = 0; 250; 500; 750$  g/d DM YM),  $P_j$  = fixed effect of period ( $j = 1$  to 4),  $A_k$  = random effect of cow ( $k = 1$  to 4),  $S_l$  = fixed effect of square ( $l = 1$  and 2),  $A/S_{kl}$  = cow within square, and  $e_{ijkl}$  = random effect of error. Treatment sum of squares were partitioned to provide linear and quadratic contrasts. Significance was declared at  $P < 0.05$  and a trend was accepted at  $P < 0.10$ , unless otherwise stated.

### 3. Results

Intake of DM, expressed in kg/d and as g/kg of body weight, was similar among treatments (Table 2). Treatment had no effect on digestibility of DM, crude protein and aNDF. There was a linear decrease ( $P = 0.02$ ) in digestibility of ether extract with higher dietary amount of YM. Milk yield, milk content of protein and fat and yield of milk components were similar among treatments (Table 3). There was a linear decrease ( $P = 0.03$ ) in lactose and total solids proportions and urea N concentration in milk with greater quantities of YM in the diet. Concentrations of polyphenols, conjugated dienes

and TBARS in milk were not affected by YM supplementation. Reducing power in milk increased in parallel with the amount of YM in the diet (Table 3).

#### 4. Discussion

The lack of a treatment effect on DM intake disagrees with the decrease reported for ewes fed a pellet-based diet supplemented with 25 g/kg DM YM during the first few weeks postpartum although there was no difference during the prepartum period reported by Po et al. (2012). These authors speculated that YM might have different effects on the appetite center according to the different physiological status (growing *versus* lactation) of the animal. Indeed, YM contains the flavonoid quercetin, and effects of stage of lactation on plasma quercetin concentrations have been suggested as indicated by higher concentrations after than before calving of dairy cows (Stoldt et al., 2015). However, flavonoid concentration in plasma was assumed to have no effect on DM intake of lactating cows (Gohlke et al., 2013).

The lack of response to YM supplementation on feed intake is consistent with the unaltered milk yield of cows fed this diet. Indeed, the positive effect of YM on milk yield was observed only 6 weeks after initiating the YM supplementation to mid-lactating dairy cows on pasture and fed corn silage (5 kg, DM basis) and 250 g/d YM (Celi and Raadsma, 2010). Protein degradability is high in fresh forage (NRC, 2001), and YM contains tannins (Heck and de Meija, 2007). Therefore, tannins present in YM may have bound to forage proteins in the rumen of cows on pasture in the experiment of Celi and Raadsma (2010), thus contributing to enhance milk production. As shown by Hartemink et al. (2015), YM decreased ruminal degradability and degradation rate of pasture protein. In the present experiment, cows were fed a corn silage-based diet, which may contain protein of lower degradability than a pasture-based diet. As a result, the beneficial effect of binding proteins with YM tannins would be less important with diets based on corn silage than fresh forage.

Digestibility of DM, protein and fibre was similar among diets, which may indicate that YM had little effect on ruminal fermentation or rate of passage. Results from *in vitro* and *in vivo* experiments often showed conflicting results on the effect of tannins on ruminal fermentation characteristics and the productive response of animals (Piluzza et al., 2014). This is probably due to differences in tannin species and form

(*i.e.*, hydrolysable versus condensed) and percentage inclusion in the diet and to associative effects between tannins and other diet ingredients.

Yerba Mate decreased ether extract digestibility, which was likely a result of the inhibitory effect of YM saponins on lipase activity as shown in mice (Martins et al., 2010) and *in vitro* (Sugimoto et al., 2009). According to Dickel et al. (2007), the effects of YM on lipid metabolism are mediated by caffeine and saponin concentrations, which contribute to lipolytic activity and delay intestinal absorption of dietary fat, respectively.

Milk fat proportion was low on all treatments, which was unexpected as the recommendations of NRC (2001) for dietary fat are around 60 to 70 g/kg DM. However, this level may not apply when using oil that is readily available in the rumen and that may negatively affect ruminal fermentation. Yerba Mate supplementation had no effect on proportion of milk fat, which disagrees with the results of Celi and Raadsma (2010) who reported a decrease when cows were supplemented with 250 g/d YM. Conversely, Po et al. (2012) observed that overall milk fat proportion was higher when ewes were supplemented with YM at a rate of 25 g/kg DM. The level of YM supplementation on proportion of milk protein agrees with the results of Celi and Raadsma (2010) when dairy cows were fed 250 g/d YM although Po et al. (2012) observed an increase when ewes were supplemented with YM at a rate of 25 g/kg DM. The lack of consistent effects of YM on concentrations of milk protein and fat could result of differences in animal species (cattle *versus* sheep), length of supplementation, and associative effects between tannins and other diet ingredients as suggested above.

The decrease in milk lactose proportion agrees with the results previously reported by Po et al. (2012) for ewes supplemented with pelleted YM. Yerba mate contains hydrolysable tannins, and several researchers have demonstrated that rumen microorganisms are able to degrade them, which is followed by absorption and accumulation in blood (Murdiati, 1992; Makkar, 2003). After absorption, YM compounds may then contribute to limit lactose synthesis. Indeed, YM is rich in chlorogenic acid (Bracesco et al., 2011) and Bassolii et al. (2008) have suggested that chlorogenic acid can inhibit activity of glucose-6-phosphatase, which is the enzyme involved in the final step of gluconeogenesis (Arion et al., 1998). Yerba Mate polyphenols also may interfere with intestinal absorption of glucose by reducing gene expression of the glucose co-transporter SGLT1 (Hossain et al., 2002). As shown by Cermak et al. (2004), flavonoids bind competitively to a site on SGLT1, impeding the transport and absorption of glucose.

Although digestibility of protein in the whole gastrointestinal tract was similar among treatments, the amount of YM in the diet was sufficient to lower milk urea N. As discussed earlier, YM tannins may have decreased protein degradability in the rumen as shown by Hartemink et al. (2015), thus decreasing NH<sub>3</sub> absorption and milk urea nitrogen. Moreover, YM is a source of the flavonoid rutin, and in vitro studies have shown that rutin partly protects dietary protein from ruminal degradation (Leiber et al., 2012), further corroborating the protective effect of YM against protein degradation by rumen microbes.

Although it has been shown that polyphenols can be secreted in milk (Petit et al., 2009), YM did not increase polyphenol concentration in milk. As discussed earlier, rumen microorganisms are able to degrade hydrolysable tannins (Murdiati, 1992; Makkar, 2003) and rumen bacteria such as *Clostridium orbiscindens* are also capable of splitting the scaffold of flavonoids (Schoefer et al., 2003). Furthermore, Berger et al. (2012) reported that plasma concentration of quercetin, which is the glycosylated form of rutin present in YM, was very low after administration of quercetin aglycone in the rumen. The liver is particularly important for the elimination of quercetin and its metabolites (Lesser and Wolfram, 2006). Altogether, these results may suggest that YM polyphenols are largely degraded by rumen microbiota, which would considerably lower their bioavailability and transfer into milk.

The similar production of conjugated dienes and TBARS in milk suggests that YM did not decrease lipoperoxidation in milk. Indeed, CD production represents the ability of antioxidants to delay oxidation of polyunsaturated fatty acids (Gladine et al., 2007) and the malondialdehyde production quantified through the TBARS assay is a marker of peroxidation of lipids (Vasconcelos et al., 2007). Reducing power, which is a measurement of antioxidant activity in milk, measures the ability of active compounds to donate electrons to free radicals thereby converting them into thermodynamically stable products (Zhu et al., 2002), which may decrease oxidation of milk lipids. Although concentration of total polyphenols in milk was similar among treatments, there was a linear increase in reducing power of milk with higher amount of YM in the diet. According to Parejo et al. (2000), antioxidant properties of single compounds within a group can vary markedly, so that the same levels of phenolics do not necessarily correspond to the same antioxidant responses. Moreover, as the response of phenolics in the Folin-Ciocalteu assay depends on their chemical structure, the radical-scavenging capacity of an extract could not be predicted only on the basis of its total

polyphenol content (Parejo et al., 2002). Altogether, these results suggest that absorption of antioxidants from the gastrointestinal tract and transfer of these compounds into milk were likely increased with greater level of YM in the diet. In the future, milk polyphenol profile should be analyzed to determine which compound is increased and responsible for enhanced reducing power in milk.

## **5. Conclusions**

Inclusion of YM had no effect on DM intake and milk production of lactating dairy cows fed a diet with 50 g/kg DM of ground canola seed. Increased supplementation of the diet from 0 to 750 g/d DM with YM had no effect on milk production or yields of protein and fat, and decreased milk yields of lactose and total solids and milk urea N concentration. Digestibility of DM, protein and aNDF was similar among diets and ether extract digestibility decreased with the level of YM supplementation. Concentrations of total polyphenols and production of CD hydroperoxides and TBARS in milk were similar among diets. The reducing power in milk was increased with the inclusion level of YM in the diet, thus suggesting that oxidative stability of milk can be enhanced with this feeding strategy although it was clearly insufficient to overcome the negative effects on milk fat synthesis probably caused by the high levels of fat added to diets as ground canola seed.

## **Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## **Acknowledgments**

The present study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Brasília, DF, Brazil). F.S. Santos was recipient of a studentship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Brasília, DF, Brazil). The authors express their gratitude to the staff of the Universidade Estadual de Maringá (Maringá, PR, Brazil) for their contribution to the present study.

## References

- Arion, W.J., Canfield, W.K., Ramos, F.C., SU, M.L., Burger, H.J., Hemmerle, H., Schubert, G., Below, P., Herling, A.W., 1998. Chlorogenic acid analogue S 3483: a potent competitive inhibitor of the hepatic and renal glucose-6-phosphatase systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 351, 279-285.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990. *Official Methods of Analysis*, 15th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1998. *Official Methods of Analysis*. 16th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Bassoli, B.K., Cassolla, P., Borba-Murad, G.R., Constantin, J., Salgueiro-Pagadigorria, C.L., Bazotte, R.B., da Silva, R.S., de Souza, H.M., 2008. Chlorogenic acid reduces the plasma glucose peak in the oral glucose tolerance test: effects on hepatic glucose release and glycemia. *Cell. Biochem. Funct.* 26, 320-328.
- Bastos, D.H.M., Ishimoto, E.Y., Ortiz, M., Marques, M., Fernando Ferri, A., Torres, E.A.F.S., 2006. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *J. Food Compos. Anal.* 19, 538-543.
- Berger, L.M., Blank, R., Wein, S., Metges, C.C., Wolffram, S., 2012. Bioavailability of the flavonol quercetin in cows after intraruminal application of quercetin aglycone and rutin. *J. Dairy Sci.* 95, 5047-5055.
- Bracesco, N., Sanchez, A.G., Contreras, V., Menini, T., Gugliucci, A., 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J. Ethopharmacol.* 136, 378-384.
- Bravo, L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56, 317-333.
- Celi, P., Raadsma, H.W., 2010. Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on the productive performance of dairy cows during mid-lactation. *Anim. Prod. Sci.* 50, 339-344.
- Cermak, R., Landgraf, S., Wolffram, S., 2004. Quercetin glucoside inhibits glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum. *Br. J. Nutr.* 91, 849-855.
- Deladino, L., Teixeira, A.S., Reta, M., García, A.D.M., Navarro, A.S., Martino, M.N., 2013. Major phenolics in Yerba Mate extracts (*Ilex paraguariensis*) and their contribution to the total antioxidant capacity. *Food Nutr. Sci.* 4, 154-162.
- de Mejía, E.G., Song, Y.S., Heck, C.I., Ramírez-Mares, M., 2010. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. *J. Funct. Food* 2, 23-34.
- Dickel, M.L., Rates, S.M., Ritter, M.R., 2007. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 109, 60-71.
- Gladine, C., Rock, E., Morand, C., Bauchart, D., Durand, D., 2007. Bioavailability and antioxidant capacity of plant extracts rich in polyphenols, given as a single acute dose, in sheep made highly susceptible to lipoperoxidation. *Br. J. Nutr.* 98, 691-701.
- Gohlke, A., Ingelmann, C.J., Nürnberg, G., Weitzel, J.M., Hammon, H.M., Görs, S., Starke, A., Wolffram, S., Metges, C.C., 2013. Influence of 4-week intraduodenal supplementation of quercetin on performance, glucose metabolism, and mRNA abundance of genes related to glucose metabolism and antioxidative status in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96, 6986-7000.

- Gugliucci, A., Bastos, D.H.M., Schulze, J., Souza, M.F.F., 2009. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia* 80, 339-344.
- Han, J., Britten, M., St-Gelais, D., Champagne, C.P., Fustier, P., Salmieri, S., Lacroix, M., 2011. Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese. *Food Chem.* 124, 1589-1594.
- Hartemink, E., Giorgio, D., Kaur, R., Di Trana, A., Celi, R., 2015. The effect of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on nutrient degradability in dairy cows: an *in sacco* and *in vitro* study. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 28, 1606-1613.
- Heck, C.I., de Mejia, E.G., 2007. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J. Food Sci.* 72, R138-R151.
- Hossain, S.J., Kato, H., Aoshima, H., Yokoyama, T., Yamada, M., Hara, Y., 2002. Polyphenol-induced inhibition of the response of Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5215-5219.
- Jaiswal, R., Patras, M.A., Eravuchira, P.J., Kuhnert, N., 2010. Profile and characterization of the chlorogenic acids in green robusta coffee beans by LC-MSn: identification of seven new classes of compounds. *J. Agr. Food Chem.* 58, 8722-8737.
- Kiokias, S.N., Dimakou, C.P., Tsaprouni, I.V., Oreopoulou, V., 2006. Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. *Food Biophys.* 3, 115-123.
- Leiber, F., Kunz, C., Kreuzer, M., 2012. Influence of different morphological parts of buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and its major secondary metabolite rutin on rumen fermentation *in vitro*. *Czech. J. Anim. Sci.* 57, 10-18.
- Lesser, S., Wolfram, S., 2008. Oral bioavailability of the flavonol quercetin. *Curr. Top. Nutraceutical Res.* 4, 239-256.
- Makkar, H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rumin. Res.* 49, 241-256.
- Marsh, W.H., Fingerhut, B., Miller, H., 1965. Automated and manual direct methods for the determination of blood urea. *Clin. Chem.* 11, 624-627.
- Martins, F., Nosso, T.M., Porto, V.B., Curiel, A., Garnero, A., Bastos, D.H.M., Ribeiro, M.L., Carvalho, P.O., 2010. Maté tea inhibits *in vitro* pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. *Obesity* 18, 42-47.
- Matumoto-Pintro, P.T., Petit, H.V., Giroux, H.J., Côrtes, C., Gagnon, N., Britten, M., 2011. Effect of flaxseed lignans added to milk or fed to cows on oxidative degradation of dairy beverages enriched with polyunsaturated fatty acids. *J. Dairy Res.* 8, 111-117.
- Murdiati, T.B., 1992. Metabolism in sheep of garlic acid, tannic acid and hydrolysable tannin from *Terminalia oblongata*. *Aust. J. Agric. Res.* 43, 1307-1319.
- National Research Council (NRC), 2001. Nutrients requirements of dairy cattle, 7th revised ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.
- Pagliosa, C.M., Pereira, S.M., Vieira, M.A., Costa, L.A., Teixeira, E., Amboni, R.D.D.M.C., Amante, E.R., 2009. Bitterness in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. *J. Sens. Stud.* 24, 415-426.



- Parejo, I., Codina, C., Petrakis, C., Kefalas, P., 2000. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH· (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44, 507-512.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., Codina, C., 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6882-6890.
- Payá, M., Halliwell, B., Hoult, J.R.S., 1992. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.* 44, 205-214.
- Petit, H. V., Gagnon, N., Mir, P., Cao, R., Cui, S., 2009. Milk concentration of the mammalian lignan enterolactone, milk production, milk fatty acid profile, and digestibility of dairy cows fed diets containing whole flaxseed or flaxseed meal. *J. Dairy Res.* 76, 257-264.
- Piluzza, G., Sulas, L., Bullitta, S., 2014. Tannins in forage plants and their role in animal husbandry and environmental sustainability: a review. *Grass For. Sci.* 69, 32-48.
- Po, E., Xu, Z., Celi, P., 2012. The effect of yerba mate (*Ilex paraguarensis*) supplementation on the productive performance of dorper ewes and their progeny. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 25, 945-949.
- Saliba, E.O.S., Faria, E.P., Rodriguez, N.M., Moreira, G.R., Sampaio, I.B.M., Saliba, J.S., Gonçalves, L.C., Borges, I., Borges, A.L.C.C., 2015. Use of infrared spectroscopy to estimate fecal output with marker Lipe<sup>®</sup>. *Int. J. Food Sci. Nutr. Diet.* S4, 1-10.
- Schoefer, L., Mohan, R., Schwiertz, A., Braune, A., Blaut, M., 2003. Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5849-5854.
- Schogor, A.L.B., Palin, M. F., Santos, G.T.D., Benchaar, C., Lacasse, P., Petit, H.V., 2013. Mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes and oxidative indicators in blood, milk, mammary tissue and ruminal fluid of dairy cows fed flax meal. *Br. J. Nutr.* 110, 1743-1750.
- Stoldt, A.K., Derno, M., Nürnberg, G., Weitzel, J.M., Otten, W., Starke, A., Wolfram, S. II, Metges, C.C., 2015. Effects of a 6-wk intraduodenal supplementation with quercetin on energy metabolism and indicators of liver damage in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 4509-4520.
- Sugimoto, S., Nakamura, S., Yamamoto, S., Yamashita, C., Oda, Y., Matsuda, H., Yoshikawa, M., 2009. Brazilian natural medicines. III. Structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from mate, leaves of *Ilex paraguariensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 57, 257-261.
- Timmons, J.S., Weiss, W.P., Palmquist, D.L., Harper, W.J., 2001. Relationships among dietary roasted soybeans, milk components, and spontaneous oxidized flavor of milk. *J. Dairy Sci.* 84, 2440-2449.
- Ulbricht, T.L.V., Southgate, D.A.T., 1991. Coronary heart-disease - 7 dietary factors. *The Lancet* 338, 985-992.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.

- Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.F., Manfredini, V., Benfato, M. S., Kubota, L.T., 2007. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Quim. Nova* 30, 1323-1338.
- Voltolini, T.V., Santos, G.T., Zambom, M.A., 2001. Influence of lactation stage on milk somatic cell count of Holstein dairy cows and identification of mastitis pathogens in the herd. *Acta Sci. Anim. Sci.* 23, 961-966.
- Zhu, Q.Y., Hackman, R.M., Ensunsa, J.L., Holt, R.R., Keen, C.L., 2002. Antioxidative activities of oolong tea. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6929-6934.

**Table 1**  
Ingredient and chemical composition of the total mixed diet.

Item	Total mixed diet <sup>a</sup>
Ingredient (g/kg dry matter)	
Corn silage	600
Corn grain, ground	87
Wheat	78
Canola seed, cracked	50
Soybean meal (480 g/kg crude protein, solvent)	160
Sodium bicarbonate	10
Minerals and vitamins <sup>b</sup>	15
Chemical composition <sup>c</sup>	
Dry matter (g/kg)	616,7
Organic matter (g/kg dry matter)	929
Crude protein (g/kg dry matter)	155
Ether extract (g/kg dry matter)	47.5
aNeutral detergent fiber (g/kg dry matter)	390
Net energy for lactation (MJ/kg dry matter) <sup>d</sup>	6.57

<sup>a</sup> Actual values obtained by precise weighing of dietary ingredients.

<sup>b</sup> Contained (per kg as is basis): Ca, 240 g; P, 60 g; Mg, 15 g; S, 18 g; Na, 78; Fe, 2200 mg; Zn, 3800 mg; Cu, 680 mg; Mn, 1105 mg; I, 40 mg; Co, 10 mg; Se, 25 mg; vitamin A, 100000 IU; vitamin D3, 66700 IU; and vitamin E, 1000 IU.

<sup>c</sup> One sample obtained from four pool samples prepared by compositing seven daily samples from days 15 to 21. DM = dry matter, CP = crude protein, aNDF = neutral detergent fiber inclusive of residual ash, ADF = acid detergent fiber inclusive of residual ash, NE<sub>L</sub> = net energy for lactation.

<sup>d</sup> Net energy for lactation was calculated using published values of feed ingredients (NRC, 2001).

**Table 2**

Intake of dry matter and digestibility of cows not supplemented (0 g/d), or supplemented (250, 500 or 750 g/d) with dried leaves of Yerba Mate in the diet.

	g/d Yerba Mate				SEM	P	
	0	250	500	750		Linear effect of Yerba Mate	Quadratic effect of Yerba Mate
Dry Matter intake (kg/d)	19.0	18.3	18.9	19.1	0.28	0.66	0.31
Dry matter intake of (g/kg body weight)	3.18	3.10	3.22	3.25	0.053	0.32	0.45
Digestibility (g/kg)							
Dry matter	756	748	756	759	5.4	0.69	0.56
Crude protein	789	763	782	783	7.1	0.96	0.29
Ether extract	904	893	879	884	3.8	0.02	0.24
Neutral detergent fiber	606	575	598	600	9.9	0.94	0.33

$$^2y = -0,6083x + 90,721; R^2 = 0,65$$

**Table 3**

Milk production and composition of Holstein cows not supplemented (0 g/d), or supplemented (250, 500 or 750 g/d) with dried leaves of Yerba Mate in the diet.

	g/d Yerba Mate				SEM	P	
	0	250	500	750		Linear effect of Yerba Mate	Quadratic effect of Yerba Mate
Milk production (kg/d)	27.6	25.0	27.0	26.9	0.69	0.95	0.10
Milk composition (g/kg)							
Protein	30.3	30.0	30.0	30.0	0.27	0.57	0.53
Fat	28.6	27.9	28.0	28.3	0.77	0.91	0.63
Lactose	45.6	44.8	44.1	43.2	0.32	0.0001 <sup>3</sup>	0.93
Total solids	113.4	111.5	110.7	110.2	0.74	0.04 <sup>4</sup>	0.49
Urea N (mg/dL)	15.6	15.3	15.1	13.7	0.61	0.03 <sup>5</sup>	0.39
SCC, log <sub>10</sub> /mL	2.03	2.23	2.44	2.09	0.103	0.65	0.17
Yield of milk components (kg/d)							
Protein	0.81	0.78	0.80	0.80	0.022	0.88	0.45
Fat	0.78	0.74	0.75	0.74	0.030	0.48	0.52
Lactose	1.23	1.17	1.18	1.16	0.041	0.21	0.54
Total solids	3.07	2.91	2.97	2.93	0.094	0.36	0.45
Total polyphenols (mg GAE/L)	16.2	10.2	10.4	11.8	1.69	0.38	0.27
Reducing power (mg GAE/L)	24.3	26.6	32.1	31.6	1.65	0.01 <sup>6</sup>	0.54
Conjugated dienes (mmol/kg of fat)	17.0	19.0	16.6	20.1	0.77	0.37	0.65
TBARS (mmol MDA equivalent/mL)	15.9	11.7	13.7	15.0	1.51	0.62	0.91

GAE, gallic acid equivalent; MDA, malondialdehyde; SCC, somatic cell count; TBARS, thibarbituric acid reactive substances.

<sup>3</sup>y=-0,764x+4,6325; R<sup>2</sup>=0,99

<sup>4</sup>y=-0,1045x+11,406; R<sup>2</sup>=0,90

<sup>5</sup>y=0,6215x+16,478; R<sup>2</sup>=0,84

<sup>6</sup>y=2,4782x+21,804; R<sup>2</sup>=0,99

## **V – Efeito da suplementação com erva mate (*Ilex paraguariensis*) e vitamina E no desempenho, qualidade e lipoperoxidação do leite de vacas recebendo dietas contendo grãos de soja**

### **Resumo**

Estudaram-se a inclusão de vitamina E e erva mate na dieta de vacas leiteiras recebendo grãos de soja para verificar a transferência do antioxidante para o leite e seus efeitos sobre a ingestão, digestibilidade, composição do leite, composição de ácidos graxos no leite, bem como os parâmetros antioxidantes no leite (poder de redução, dieno conjugado, TBARS e polifenóis). Foram utilizadas quatro vacas multíparas da raça Holandês ( $549 \pm 57$  kg de peso corporal e  $62 \pm 15$  dias em lactação) distribuídas em quadrado latino ( $4 \times 4$ ) com quatro dietas e quatro períodos experimentais. As dietas experimentais foram: 1) dieta-controle sem suplementação de erva mate (EMa) e de vitamina E (vit. E); 2) Dieta-controle + suplementação de 350 UI de vit E/kg IMS por dia; 3) Dieta-controle + suplementação de 3% de EMa/kg de matéria seca (MS) por dia; 4) Dieta-controle + suplementação de 350 UI de vit E/kg de MS por dia + suplementação de 3% de EMa/kg de MS por dia. Cápsulas contendo 10 g de óxido de titânio foram inseridas, via sonda esofágica, no rúmen após a alimentação da manhã (9h00min) para determinação do fluxo fecal e da digestibilidade. O período experimental foi de 28 dias (21 dias de adaptação e 7 dias de coleta). A ingestão de vit E diminuiu a ingestão de MS e outros nutrientes, enquanto a EMa teve efeito positivo sobre a ingestão e a digestibilidade de MS. A ingestão de EMa não aumentou a produção de leite, até mesmo diminuindo a concentração de proteína e sólidos totais no leite. Nenhuma alteração foi observada para a composição em ácidos graxos e nos antioxidantes TBARS, dienos conjugados e polifenóis. Entretanto, a suplementação de EMa aumentou o poder de redução do leite. Conclui-se que a erva mate é capaz de substituir a suplementação de vit E sendo eficaz na transferência do poder antioxidante para o leite.

Palavras-chave: Ácidos graxos, Antioxidantes, Vacas leiteiras, Poder de redução, Transferência de antioxidantes

## **Abstract**

We studied the inclusion of vitamin E and mate in the diet of dairy cows fed soybeans to verify the transfer of the antioxidant for milk and its effects on intake, digestibility, milk composition, fatty acid composition in milk and as antioxidant parameters in milk (reduced power, conjugated diene, TBARS and polyphenols). There were four multiparous Holstein cows ( $549 \pm 57$  kg body weight and  $62 \pm 15$  days in milk) distributed in Latin square ( $4 \times 4$ ) with four treatments and four experimental periods. The treatments were: 1) Control diet without supplementation yerba mate (YM) and vitamin E (vit. E); 2) diet plus supplementation of 350 IU of vit E / kg DMI per day; 3) diet plus supplementation of 3% of YM / kg IMS per day; 4) diet plus supplementation of 350 IU of vit E / kg DMI daily supplementation + 3% of YM / kg DMI per day. Capsules containing 10 g of titanium oxide was inserted into the rumen (by gavage) after the morning feeding (9h00min) for determination of fecal flow and digestibility. The experimental period was 21 days and then seven days of collection. The intake of vit E influenced the DM intake and other nutrients, while YM had a positive effect on digestibility of MS. The intake of YM did not increase milk production, even decreasing the concentration of protein and total solids in milk. No change was observed for the fatty acid composition and TBARS antioxidants, conjugated diene and polyphenols. However, supplementation of YM increased the power reduction of milk. We can conclude that yerba mate is able to replace the supplementation of vit E is even better than the vit E in the transfer of the antioxidant power to the milk.

*Keywords:* Antioxidant, Dairy cows, Fatty acids, Reduced power, Transfer of the antioxidant

*Abreviações:* AGMI - ácido graxo monoinsaturado; AGPI - ácido graxo poli-insaturado; AGS - ácido graxo saturado; CCS - contagem de célula somática; EE - extrato etéreo; EMa - erva mate; FDN - fibra insolúvel em detergente neutro; MO - matéria orgânica; MS - matéria seca; PB - proteína bruta; vit E - vitamina E.

## **1. Introdução**

Pesquisas vêm sendo realizadas com objetivo de modificar a proporção dos ácidos graxos que compõem a gordura do leite pela inclusão de grãos de oleaginosas como de

soja, na dieta de vacas em lactação (Boerman e Lock, 2014), girassol (Razzaghi et al., 2016), linhaça (Neveu et al., 2014) e canola (Welter et al., 2016). Em sua maior parte, estes trabalhos mostram redução na proporção dos ácidos graxos saturados (AGS) e um aumento na proporção dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) na gordura do leite. Entretanto, dependendo da fonte de lipídeos, e do processamento do concentrado observa-se queda nos níveis de gordura do leite (da Silva et al., 2007; Neves et al., 2007), pela formação de alguns isômeros do ácido linoleico conjugado no rúmen, que afetam a *síntese de novo* na glândula mamária. De fato, hoje é bem conhecido que fontes ricas em ácidos graxos ômega 6 promovem maior formação de ácidos graxos que interferem na *síntese de novo* na glândula mamária, como o trans-10, cis-12 CLA (Bauman e Griinari, 2003). Outra questão observada quando do fornecimento de fontes de AGPI na dieta de vacas leiteiras e a incorporação dos mesmos no leite, é que com aumento dos AGPI no leite a lipoperoxidação também é aumentada (Havemose et al., 2006). A oxidação dos ácidos graxos, ou lipoperoxidação, pode levar à formação de compostos tóxicos, diminuindo o tempo de prateleira do leite, tornando o leite de melhor qualidade, inviável. Diante disso, a inclusão de antioxidantes na alimentação animal é uma alternativa para reduzir oxidação dos AGPI presentes no leite, evitar a formação de compostos tóxicos e, ainda, melhorar a saúde dos animais que os consomem.

As propriedades da vitamina E (vit E) são inúmeras e uma delas é sua ação antioxidante. A vit E quando suplementada juntamente com Selênio (Se) mostra reduzir significativamente a incidência de infecções intramamárias e mastite clínica (Zigo et al., 2014). As funções dos macrófagos e dos neutrófilos mostram ser melhoradas com a presença de vitamina E na dieta (Hogan et al., 1992; Hogan et al., 1993). Ainda, Ramírez-Mella et al. (2013) observaram que vacas suplementadas com até 12.000 UI de vitamina E/vaca/dia tiveram elevação na concentração do CLA cis-9, trans-11 no leite. O trabalho realizado na Nova Zelândia com animais a pasto suplementados com vit E foi capaz de aumentar a porcentagem de gordura no leite em até 0,23 pontos percentuais, porém sem alterar o perfil de ácidos graxos do leite (Kay et al., 2005). Nyman et al. (2008) observaram redução na contagem de células somáticas em vacas da raça Holandês no início da lactação quando suplementaram os animais com vit E.

Alguns compostos fenólicos encontrados no chá verde, vinho tinto e no extrato de erva mate, também são conhecidos por suas propriedades antioxidantes. O extrato de erva mate (EMa), por exemplo, apresenta altos níveis de flavonoides (Gugliucci et al.,



2009). Um destes compostos fenólicos, o ácido clorogênico, presente em grande quantidade na EMa (Bracesco et al., 2011). Este composto é um potente antioxidante que podem interferir na expressão gênica de enzimas antioxidantes (Jaiswal et al., 2010) e também no metabolismo da glicose (Olthof et al., 2001). A EMa possui também altas concentrações de taninos e saponinas (Heck e de Mejia, 2007). Segundo de Mejía et al. (2010), o sequestro de radicais livres pela EMa foi semelhante ao ácido gálico livre (20 mg/mL). Além disso, Bastos et al. (2006) demonstram que a eficiência antioxidante da infusão do chá de EMa foi similar ao hidroxitolueno butilado (BHT), um antioxidante artificial usado em alimentos.

Diante do apresentado na literatura, a EMa se mostra como uma fonte alternativa de antioxidantes para o leite, e hipotetiza-se que os antioxidantes presentes na EMa podem ser transferidos ao leite, de forma natural, pelo fornecimento de produtos da cultura da EMa na dieta de vacas em lactação, alimentadas com fontes de lipídios, proveniente da soja, na dieta.

Desta forma, o presente trabalho foi realizado visando avaliar a propriedade antioxidante da EMa, comparativamente à vit. E, sobre o perfil oxidativo do leite de vacas leiteiras alimentadas com grãos de soja. Objetivou-se avaliar os efeitos da inclusão de EMa e vit E sobre a produção, composição do leite, composição em ácidos graxos na gordura do leite, concentração de polifenóis, TBARS, dienos conjugados, poder de redução e estabilidade oxidativa do leite de vacas leiteiras alimentadas com ração contendo grãos de soja.

## **2. Material e métodos**

### *2.1. Animais, dietas e procedimentos experimentais*

O experimento foi realizado de acordo com os as normas do Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (Protocolo número 063/2013).

Foram utilizadas quatro vacas multíparas da raça Holandês ( $549 \pm 57$  kg de peso corporal e  $62 \pm 15$  dias em lactação) distribuídas em quadrado latino ( $4 \times 4$ ) com quatro dietas e quatro períodos experimentais. Cada período foi composto de 28 dias, sendo 21 dias para adaptação e sete dias para coleta de dados e amostras. Os animais foram alojados em instalações individuais do tipo *tie-stall* com comedouros e bebedouros

individuais. Foram realizadas duas ordenhas diárias (06h30min e 16h00min) e a produção de leite foi registrada a cada ordenha, em cada período de coleta.

A alimentação foi composta por ração total misturada fornecida duas vezes ao dia (07h00min e 14h00min) para ingestão *ad libitum* (10% de sobras na matéria natural). As dietas experimentais foram: 1) Dieta-controle sem suplementação de EMa e de vit. E; 2) Dieta-controle + suplementação de 350 UI de vit E/kg IMS por dia; 3) Dieta-controle + suplementação de 30 g/kg de EMa/kg de MS por dia; 4) Dieta-controle + suplementação de 350 UI de vit E/kg de MS por dia + suplementação de 30 g/kg de EMa/kg de MS por dia. A fonte da vitamina E utilizada foi em forma de  $\alpha$ -tocophryl em pó. A EMa utilizada foi do tipo cancheada, pura folha (marca Ervateira 81, Turvo, PR) e apresentou a seguinte composição média: 96,6% de matéria seca (MS); 14,6% de proteína bruta (PB) 2,7% de extrato etéreo (EE) e, 46,0% de fibra detergente neutro (FDN). A suplementação da EMa e de vit E foi realizada diariamente, diretamente no cocho sendo misturada manualmente à dieta. A dieta (Tabela 1) foi formulada para atender às exigências nutricionais de vacas em lactação de acordo com o NRC (2001).

Do 11° ao 20°, uma cápsula contendo 10 g de óxido de titânio foi inserida no rúmen (via sonda esofágica) após a alimentação da manhã (9h00min) para determinação do fluxo fecal e digestibilidade.

Do dia 14° ao 28° dia de cada período experimental, amostras das rações, erva mate e sobras foram colhidas e armazenadas a -20°C. As fezes foram colhidas diretamente da ampola retal dos animais 02 h após a alimentação e armazenadas a -20°C. Posteriormente foi feito um *pool* das amostras, resultando em uma única amostra por animal por período as quais foram secas em estufa de ventilação forçada (55°C por 72h) e moídas através de peneiras com crivo de 1 mm em um moinho Wiley para posterior análise bromatológica.

No 27° e 28° dia, amostras de leite compostas foram colhidas nas quatro ordenhas consecutivas. Em seguida, após mistura das amostras das ordenhas da manhã e da tarde dos dois dias foram coletados e encaminhados para análises laboratoriais. Para a determinação da composição do leite (proteína, lactose, gordura, ureia e CCS), as amostras foram armazenadas em frascos contendo bronopol-B2 a 4°C. Para determinação de polifenóis, dieno conjugado, poder de redução e TBARS, as amostras foram armazenadas em frascos contendo azida sódica (0,2 g/kg) a -20° C, e para a análise da composição de ácidos graxos da gordura do leite, as amostras foram armazenadas a -20°C sem conservantes.

## 2.2. Análises químicas

A estimativa da excreção fecal foi obtida a partir da recuperação do indicador externo dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>), segundo Myers et al. (2004) e a concentração de dióxido de titânio foi obtida em espectrofotômetro.

A matéria seca (MS) da dieta, sobras e das fezes foram determinadas em estufa com ventilação forçada de acordo com o procedimento 934-01 (AOAC, 1990). Amostras da ração, das sobras e das fezes foram analisadas para determinação de nitrogênio total (NT), EE, FDN. O NT foi determinado de acordo com o método 988.05 (AOAC, 1998) utilizando o equipamento Tecnal TE-036/1 (Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brazil) e a PB foi estimada a partir do NT x 6,25. O EE foi determinado por meio do equipamento Extrator de gordura da ANKOM de acordo com o método 920.39 (AOAC, 1998). A FDN foi avaliada como descrito por ANKOM (2011) usando a enzima  $\alpha$ -amilase estável à temperatura, sem a utilização de sulfito de sódio. O procedimento da determinação de FDN foi adaptado para a técnica de saco-filtro F57 ANKOM200. A matéria orgânica (MO) foi determinada em mufla de acordo com o procedimento 942,05 (AOAC, 1998).

A produção de dienos conjugados (DC) no leite foi avaliada pela técnica descrita por Kiokias et al. (2006) com as seguintes modificações: as amostras (50  $\mu$ L) foram acrescidas de 2,5 mL de uma solução de iso-octano/2-propanol (2:1 v v-1) e misturadas por 10 segundos e, em , as amostras foram filtradas (filtros de membrana 0,22  $\mu$ m PTFE). A absorbância foi medida a 232 nm usando um espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA). A produção de dieno conjugado foi calculada como segue:  $CD \text{ (mmol/kg de gordura)} = (A/27)/[(a*b)/100000*(c + b/1000)]$ ; em que a = absorbância a 232 nm; a = proporção de gordura no leite (g/100 g); b = volume da amostra ( $\mu$ L); e c = volume da mistura (mL). A análise de TBARS foi realizada de acordo com Payá et al. (1992) com as seguintes modificações, em que uma alíquota de 500  $\mu$ L do leite foi transferida para tubos Falcon de 15 mL contendo 2,0 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA 1%, TCA 15% e HCl 562,5 mM). As amostras foram aquecidas em banho fervente (100°C) durante 15 min, resfriadas em água gelada durante 5 min. e depois centrifugadas por 15 min a 3.000 rpm. A leitura foi feita em espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA) a 540 nm. Os resultados foram expressos em concentração de malondialdeído (MDA) (mmol/mL).

A força de redução aos íons férricos (PRed) foi determinada conforme descrito por Zhu et al. (2002) com as seguintes modificações: as proteínas do leite foram precipitadas pela adição de 1,0 mL de solução de ácido tricloroacético (20%; v/v) em 1,0 mL de leite. A mistura foi agitada por 10 min e centrifugada a  $1.058 \times g$  por 10 min a 20°C. Em tubos protegidos da luz, uma alíquota do soro do leite (1,0 mL) foi misturada a 2,5 mL de solução tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,0) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio  $[K_3Fe(CN)_6]$  (1,0%). A absorvância foi medida a 700 nm em um espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA).

O total de polifenóis das amostras foi determinado de acordo com o método de Folin and Denis (1912), oxidando a amostra diluída com o reagente Folin-Ciocalteu por 3 min. Essa reação foi neutralizada com uma solução de carbonato de sódio 10% (2 mL). Essa solução foi deixada no escuro por 1 h, antes da leitura em um espectrofotômetro a 700 nm. O total de polifenóis foi calculado a partir de uma curva-padrão a qual foi construída usando ácido gálico como padrão expressa em miligramas de ácido gálico equivalente (GAE) por grama de amostra.

A composição química do leite foi analisada por espectroscopia infravermelha (Bentley model 2000; Bentley Instrument Inc., Chaska, MN, USA). A contagem de células somáticas foi obtida usando contador eletrônica (Somacount 500, Chaskam Mn, USA) como descrito por Voltolini et al. (2001). Para estimar o perfil de ácidos graxos do leite, a gordura foi separada por centrifugação, conforme a descrição feita por Murphy et al. (1995) e os ácidos graxos foram metilados de acordo com o método 5509 da ISO (1978) usando KOH/metanol (Synth, São Paulo, Brazil) e n-heptano (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram quantificados em cromatógrafo gasoso (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, West Palm Beach, Florida, USA) autoamostrador, equipado com detector de ionização de chama a 240°C e coluna capilar de sílica fundida (100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20  $\mu$ m, Restek 2560). O fluxo de gases foi de 1,5 mL/min de  $H_2$  (gás de arraste), 30 mL/min para  $N_2$  (gás auxiliar) e 35 e 350 mL/min, respectivamente, para o  $H_2$  e ar sintético (gases para chama). A temperatura inicial da coluna foi estabelecida em 65°C, mantida por 8 min, elevada a 170°C a uma taxa de 50°C/min, mantida por 40 min, chegando a 240°C de temperatura final, sendo elevada a uma taxa de 50°C/min e mantida por 28,5 min. A quantificação dos ácidos graxos da amostra foi efetuada por comparação com o tempo de retenção de ésteres metílicos de ácidos graxos de amostras-padrão (Sigma Aldrich).

### 2.3. Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o procedimento MIXED do software estatístico SAS (2000; SAS Institute, Cary, NC, USA), dentro de um arranjo factorial 2 x 2, de acordo com o quadrado latino 4 x 4 com o seguinte modelo geral:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + A_k + e_{ijkl}$$

em que  $Y_{ijkl}$  é a variável dependente,  $\mu$  é a média geral,  $T_i$  é efeito fixo de tratamento ( $i = 1$  a 4),  $P_j$  é o efeito fixo do período ( $j = 1$  a 4),  $A_k$  é o efeito aleatório do animal ( $k = 1$  a 4);  $e_{ijkl}$  é o erro aleatório do resíduo. Os tratamentos foram comparados para proporcionar contrastes fatoriais: (1) EMa versus sem EMa, (2) vit E versus sem vit E, e (3) a interação entre EMa e vit E. O critério de akaike's corrigido (AICC) foi utilizado para determinar a estrutura de covariância mais adequada. Os resultados foram apresentados como médias dos mínimos quadrados e erro-padrão da média (SEM). Diferenças significativas foram fixadas em  $P < 0,05$  e tendências de  $0,05 < P > 0,10$ . Sempre que significativa, a interação entre EMa e vit E foi decomposto em comparações simples usando a opção slice do procedimento MIXED do SAS.

### 3. Resultados e discussão

As diferentes dietas influenciaram a ingestão de matéria seca (Tabela 2) tanto com as suplementações de vit E ( $P=0,04$ ) quanto para a vit E associada com EMa ( $P=0,07$ ). A diminuição da ingestão de MS com vit E diferiu dos resultados encontrados por O'Donnell-Megaro et al. (2012) que observaram aumento no consumo de vacas leiteiras suplementadas com vit E. Da mesma forma, Celi e Raadsma (2010) mostraram que a erva mate aumenta a ingestão de MS em cordeiros e este resultado não foi observado sobre a ingestão de vacas leiteiras. Porém, quando a EMa foi adicionada juntamente com a vit E na dieta ocorreu uma tendência a efeito positivo na ingestão. Comportamento semelhante foi observado para ingestão de MO. Houve interação da vit E e a EMa sobre a ingestão de PB ( $P = 0,03$ ), sendo um efeito positivo (Tabela 2). A menor ingestão de FDN ( $P=0,03$ ) foi observada para suplementação de vit E. De modo geral o impacto negativo da vit E sobre o consumo da MS e nutrientes (MO, PB e FDN) das dietas foram neutralizados quando a suplementação da vit E foi feita juntamente

com a EMa. A maior digestibilidade da MS para dietas com adição de erva mate pode ter refletido em efeitos positivos, sobre o consumo. Provavelmente, a ação da saponina, presente em grande quantidade na EMa, pode se ligar aos ácidos biliares reduzindo a absorção de vitaminas lipossolúveis, como a vit E (Jenkins e Atwal, 1994). Contudo a adição de vit E não teve reflexo na digestibilidade (Tabela 2).

A adição de erva mate nas dietas proporcionou maiores digestibilidade para MS ( $P=0,04$ ) e matéria orgânica ( $P=0,07$ ). Hartemink et al. (2015) estudaram o efeito da digestibilidade de erva mate *in sacco* e *in vitro* obtiveram resultados conflitantes para as duas metodologias. Enquanto que a digestibilidade de MS *in sacco* não resultou em diferença com vacas a pastos, os resultados da digestibilidade de MS *in vitro* foram aumentados o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho. A saponina presente em grande quantidade na EMa pode ser responsável pelos aumentos na digestibilidade da MS e MO. Embora a molécula de saponina reduza a fermentação do rúmen, aumentos na digestibilidade no intestino delgado podem ter ocorrido como observado por Lu e Jorgensen (1987) com reflexo positivo na digestibilidade total. Para digestibilidade de PB ( $P=0,03$ ) verificou-se interação da suplementação de vit E e EMa. Na presença da EMa os efeitos negativos da vit E sobre a digestibilidade da PB foram anulados. O tanino está presente em grande quantidade na EMa (Heck e de Mejia, 2007); este composto polifenólico se liga à proteína impedindo a sua degradação no rúmen e aumentando a proteína não degradável no rúmen o que aumenta o fluxo de proteína para o intestino (Dentinho et al., 2007). Ainda a EMa possui fatores antinutricionais contrários à digestibilidade de FDN e EE. O efeito contra FDN é causado pela inibição das enzimas microbianas responsáveis pela fermentação da fibra (Makkar et al., 2007). Em relação ao EE, o tanino pode causar a inibição da lipase (Sugimoto et al., 2009; Martins et al., 2010). Contudo nenhum efeito sobre essas duas variáveis foi encontrado nesse experimento. Provavelmente é devido aos diferentes espécies e formas de tanino (hidrossolúvel vs condensado) e a porcentagem incluída na dieta e seu efeito associativo com outros ingredientes.

Não houve interações da vit E e EMa para produção de leite, gordura, proteína, lactose, sólidos totais e ureia no leite, contagem de células somáticas (CCS) ( $P > 0,10$ ) conforme a Tabela 3. Apesar de resultados encontrados por Celi e Raadsma (2010) ao fornecerem EMa para vacas leiteiras, observaram aumento na produção. Os resultados observados neste trabalho não foram influenciados pela suplementação de EMa ( $P > 0,10$ ). A proteína ( $P = 0,04$ ) do leite diminuiu quando o animal recebeu 3% de EMa/kg

de MS por dia. A EMa pode reduzir a fermentação ruminal da proteína devido pela presença da saponina que diminui a população de protozoários no rúmen (Lu e Jorgensen, 1987; Wallace et al., 1994; Klita et al., 1996). Da mesma forma a presença de tanino na EMa proporciona menor degradabilidade da proteína. Por consequência, haveria aumento na concentração de proteína não degradada no rúmen que levaria a um aumento da proteína no leite (Wright et al., 1997). Entretanto, o que se observou foi a diminuição da proteína do leite quando vacas leiteiras foram alimentadas com EMa. Os sólidos totais do leite de vacas suplementadas com EMa reagiram da mesma maneira diminuindo sua concentração quando as vacas recebiam a dieta contendo EMa. Houve tendência de queda na CCS ( $P = 0,09$ ) quando as vacas foram suplementadas com vit E. Todavia, na literatura não há ocorrências do mesmo e o efeito causador é desconhecido.

Ainda na Tabela 3 verifica-se que a EMa foi capaz de aumentar o poder de redução do leite ( $P=0,001$ ). Huang et al. (2014), em estudo em laboratório, observaram maior resposta do poder de redução, 2,2-difenil-1-picril-hidrazi (DPPH) e 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico (ABTS) à medida que os níveis de erva mate aumentaram de 100 a 500 ppm. O poder de redução não está sempre ligado com a atividade oxidante do composto uma vez que os agentes oxidantes agem de forma distinta entre si (Cheng e Li, 2004). Contudo, a erva é conhecida pelo seu poder antioxidante, e por vários autores é possível afirmar que os resultados encontrados nesse trabalho demonstram que a suplementação de EMa foi eficaz ao aumentar a atividade antioxidante do leite (Bastos et al., 2007; Celi e Raadsma, 2010; de Mejía et al., 2010).

De acordo com Bracesco et al. (2011), a EMa possui 92 mg de polifenóis nas suas folhas e caules, porém esse elevado nível não foi capaz de aumentar a concentração de polifenóis no leite ( $P>0,10$ ). Os resultados contidos na Tabela 3 demonstraram que as diferenças entre as dietas, nas variáveis de dieno conjugados, polifenóis e TBARS não foram significativas. Estes são marcadores de oxidação dos ácidos graxos. Assim com base nestes métodos verificou-se que nem a vit E nem a EMa foram capazes de reduzir a oxidação do leite.

As médias das dietas para ácidos graxos na gordura do leite ( $P>0,10$ ) não foram influenciadas pela suplementação com erva mate ou vit E (Tabela 4). Esta resposta, provavelmente, se deve ao fato que em todas as quatro dietas a quantidade de grãos de soja foi a mesma. De fato, não se esperava que a adição de Ema tivesse algum efeito no perfil de ácidos graxos no leite. Os altos valores do erro-padrão da média (EPM)

mostram grande variação nos dados obtidos não permitindo que as diferenças fossem significativas.

#### 4. Conclusão

A erva mate aumentou o poder de redução do leite além de melhorar a digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta.

A suplementação de ambas as fontes de antioxidantes foi capaz de aumentar a ingestão de matéria seca, matéria orgânica e proteína apesar de não afetar a produção de leite.

Portanto, a suplementação de erva mate pode substituir totalmente a suplementação de vit E.

#### Agradecimentos

O presente trabalho foi financiado pelo ao CNPq, projeto Universal Proc. No. 484.959/2012-3 e pela Capes, ao conceder bolsa de doutorado ao primeiro autor.

#### Referências

- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC, Airlington, VA, USA.
- Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), 1998. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
- Ankom Technology, 2011. NDF Method: Neutral Detergent Fiber in Feeds - Filter Bag Technique (for A200 and A200I). Ankom Technology, Macedon, NY. [http://www.ankom.com/media/documents/Method\\_6\\_NDF\\_4013011\\_A200,A200I.pdf](http://www.ankom.com/media/documents/Method_6_NDF_4013011_A200,A200I.pdf) (Accessed 03.02.2016).
- Bastos, D., Saldanha, L., Catharino, R., Sawaya, A., Cunha, I., Carvalho, P., Eberlin, M., 2007. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules* 12, 423.
- Bastos, D.H.M., Ishimoto, E.Y., Ortiz M. Marques, M., Fernando Ferri, A., Torres, E.A.F.S., 2006. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *J. Food Compos. Anal.* 19, 538-543.
- Bauman, D.E., Griinari, J.M., 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23, 203-227.
- Boerman, J.P., Lock, A.L., 2014. Effect of unsaturated fatty acids and triglycerides from soybeans on milk fat synthesis and biohydrogenation intermediates in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 97, 7031-7042.



- Bracesco, N., Sanchez, A.G., Contreras, V., Menini, T., Gugliucci, A., 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J. Ethopharmacol.* 136, 378-384.
- Celi, P., Raadsma, H.W., 2010. Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on the productive performance of dairy cows during mid-lactation. *Anim. Prod. Sci.* 50, 339-344.
- Cheng, Z., Li, Y., 2004. Reducing power: the measure of antioxidant activities of reductant compounds? *Redox Rep.* 9, 213-217.
- da Silva, D.C., Santos, G.T., Branco, A.F., Damasceno, J.C., Kazama, R., Matsushita, M., Horst, J.A., dos Santos, W.B., Petit, H.V., 2007. Production performance and milk composition of dairy cows fed whole or ground flaxseed with or without monensin. *J. Dairy Sci.* 90, 2928-2936.
- de Mejía, E.G., Song, Y.S., Heck, C.I., Ramírez-Mares, M., 2010. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. *J. Funct. Food* 2, 23-34.
- Dentinho, M.T.P., Moreira, O.C., Pereira, M.S., Bessa, R.J.B., 2007. The use of a tannin crude extract from *Cistus ladanifer* L. to protect soya-bean protein from degradation in the rumen. *Animal* 1, 645-650.
- Folin, O., Denis, W., 1912. Phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 12, 239-243.
- Gugliucci, A., Bastos, D.H.M., Schulze, J., Souza, M.F.F., 2009. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. *Fitoterapia* 80, 339-344.
- Hartemink, E., Giorgio, D., Kaur, R., Di Trana, A., Celi, P., 2015. The effect of Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on nutrient degradability in dairy cows: an in sacco and in vitro study. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 28, 1606-1613.
- Havemose, M.S., Weisbjerg, M.R., Bredie, W.L.P., Poulsen, H.D., Nielsen, J.H., 2006. Oxidative stability of milk influenced by fatty acids, antioxidants, and copper derived from feed. *J. Dairy Sci.* 89, 1970-1980.
- Heck, C.I., de Mejia, E.G., 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J. Food Sci.* 72, R138-R151.
- Hogan, J.S., Weiss, W.P., Smith, K.L., 1993. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *J. Dairy Sci.* 76, 2795-2803.
- Hogan, J.S., Weiss, W.P., Todhunter, D.A., Smith, K.L., Schoenberger, P.S., 1992. Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. *J. Dairy Sci.* 75, 399-405.
- Huang, W.-Y., Lee, P.-C., Hsu, J.-C., Lin, Y.-R., Chen, H.-J., Lin, Y.-S., 2014. Effects of water quality on dissolution of yerba mate extract powders. *Sci. World J.* 2014, 6.
- Jaiswal, R., Patras, M.A., Eravuchira, P.J., Kuhnert, N., 2010. Profile and characterization of the chlorogenic acids in green Robusta coffee beans by LC-MS(n): identification of seven new classes of compounds. *J. Agr. Food Chem.* 58, 8722-8737.
- Jenkins, K.J., Atwal, A.S., 1994. Effects of dietary saponins on fecal bile acids and neutral sterols, and availability of vitamins A and E in the chick. *J. Nutr. Biochem.* 5, 134-137.
- Kay, J.K., Roche, J.R., Kolver, E.S., Thomson, N.A., Baumgard, L.H., 2005. A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *J. Dairy Res.* 72, 322-332.

- Kiokias, S.N., Dimakou, C.P., Tsaprouni, I.V., Oreopoulou, V., 2006. Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. *Food Biophys.* 1, 115-123.
- Klita, P.T., Mathison, G.W., Fenton, T.W., Hardin, R.T., 1996. Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. *J. Anim. Sci.* 74, 1144-1156.
- International Organization for Standardization (ISO), 1978. Animal and vegetable fats and oils – Preparation of methyl esters of fatty acids (Method ISO 5509). ISO, Geneve.
- Lu, C.D., Jorgensen, N.A., 1987. Alfalfa saponins affect site and extent of nutrient digestion in ruminants. *J. Nutr.* 117, 919-927.
- Makkar, H.P.S., Singh, B., Dawra, R.K., 2007. Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. *Brit. J. Nutr.* 60, 287-296.
- Martins, F., Noso, T.M., Porto, V.B., Curiel, A., Gambero, A., Bastos, D.H.M., Ribeiro, M.L., Carvalho, P.O., 2010. Maté tea inhibits in vitro pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. *Obesity* 18, 42-47.
- Murphy, J.J., Connolly, J.F., McNeill, G.P., 1995. Effects on milk fat composition and cow performance of feeding concentrates containing full fat rapeseed and maize distillers grains on grass-silage based diets. *Livest. Production Sci.* 44, 1-11.
- Myers, W.D., Ludden, P.A., Nayigihugu, V., Hess, B.W., 2004. Technical note: a procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *J. Anim. Sci.* 82, 179-183.
- Neveu, C., Baurhoo, B., Mustafa, A., 2014. Effect of feeding extruded flaxseed with different grains on the performance of dairy cows and milk fatty acid profile. *J. Dairy Sci.* 97, 1543-1551.
- National Research Council (NRC), 2001. Nutrients requirements of dairy cattle. 7th revised ed. National Academies Press, Washington, DC, USA.
- Neves, C.A., Santos, G.T., Matsushita, M., Alves, E.M., Oliveira, R.L., Branco, A.F., Silva, D.C., Furlan, A.C., Petit, H.V., 2007. Intake, whole tract digestibility, milk production, and milk composition of Holstein cows fed extruded soybeans treated with or without lignosulfonate. *Anim. Feed Sci. Tech.* 134, 32-44.
- Nyman, A.K., Emanuelson, U., Holtenius, K., Ingvarsen, K.L., Larsen, T., Persson Waller, K., 2008. Metabolites and immune variables associated with somatic cell counts of primiparous dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 2996-3009.
- O'Donnell-Megaró, A.M., Capper, J.L., Weiss, W.P., Bauman, D.E., 2012. Effect of linoleic acid and dietary vitamin E supplementation on sustained conjugated linoleic acid production in milk fat from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 7299-7307.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C.H., Katan, M.B., 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* 131, 66-71.
- Payá, M., Halliwell, B., Hoult, J.R.S., 1992. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem. Pharmacol.* 44, 205-214.
- Ramírez-Mella, M., Hernández-Mendo, O., Ramírez-Bribiesca, E.J., Améndola-Massiotti, R.D., Crosby-Galván, M.M., Burgueño-Ferreira, J.A., 2013. Effect of vitamin E on milk composition of grazing dairy cows supplemented with microencapsulated conjugated linoleic acid. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 1783-1788.

- Razzaghi, A., Valizadeh, R., Naserian, A.A., Mesgaran, M.D., Carpenter, A.J., Ghaffari, M.H., 2016. Effect of dietary sugar concentration and sunflower seed supplementation on lactation performance, ruminal fermentation, milk fatty acid profile, and blood metabolites of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99, 3539-3548.
- Sugimoto, S., Nakamura, S., Yamamoto, S., Yamashita, C., Oda, Y., Matsuda, H., Yoshikawa, M., 2009. Brazilian natural medicines. III. structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from mate, leaves of *Ilex paraguariensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 57, 257-261.
- Voltolini, T.V., Santos, G.T., Zambom, M.A., Ribas, N.P., Müller, E.E., Damasceno, J.C., Ítavo, L.C.V., Veiga, D.R., 2001. Influence of lactation stages on the counting of somatic cells of Holstein milk cows and identification of sources of mastitis pathogens in cattle. *Acta Sci. Anim. Sci.* 23, 961-966.
- Wallace, R.J., Arthaud, L., Newbold, C.J., 1994. Influence of *Yucca shidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1762-1767.
- Welter, K.C., Martins, C.M.d.M.R., de Palma, A.S.V., Martins, M.M., dos Reis, B.R., Schmidt, B.L.U., Saran Netto, A., 2016. Canola oil in lactating dairy cow diets reduces milk saturated fatty acids and improves its omega-3 and oleic fatty acid content. *PLoS One* 11, e0151876.
- Wright, T.C., Moscardini, S., Luimes, P.H., Susmel, P., McBride, B.W., 1997. Effects of rumen-undegradable protein and feed intake on nitrogen balance and milk protein production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81, 784-793.
- Zhu, Q.Y., Hackman, R.M., Ensunsa, J.L., Holt, R.R., Keen, C.L., 2002. Antioxidative activities of oolong tea. *J. Agr. Food Chem.* 50, 6929-6934.
- Zigo, F., Farkasová, Z., Eleko, J., Lapin, M., Chripková, M., Czerski, A., 2014. Effect of parenteral administration of Selenium and vitamin E on health status of mammary gland and on selected antioxidant indexes in blood of dairy cows. *Pol. J. Vet. Sci.* 17, 217-223.

**Tabela 1**

Ingredientes, composição química das quatro dietas.

Item	Dieta total misturada			
	Cont	Vit E	EMa	Vit E & EMa
Ingrediente (g/kg DM)				
Silagem de milho	600,0	600,0	570,0	570,0
Erva mate	0,0	0,0	30,0	30,0
Milho moído	170,6	170,6	170,6	170,6
Grão de soja triturado	172,0	172,0	172,0	172,0
Farelo de soja	45,0	45,0	45,0	45,0
Fosfato bicálcico	3,0	3,0	3,0	3,0
Suplemento mineral e vitamínico <sup>1</sup>	9,4	9,4	9,4	9,4
Vit E (UI/kg MS)	0,0	350,0	0,0	350,0
Análises químicas (base na MS) <sup>2</sup>				
Proteína bruta (g/kg MS)	145,1	145,1	146,1	146,1
Extrato etéreo (g/kg MS)	65,2	65,2	65,9	65,9
Fibra em detergente neutro (g/kg MS)	423,4	423,4	413,2	413,3
Energia líquida de lactação (Mcal/kg MS) <sup>3</sup>	1,63	1,63	1,63	1,63
Ácidos graxos (g/kg de ácidos graxos) no óleo extraído do grão de soja <sup>4</sup>				
16:0	118,0	118,0	118,0	118,0
18:0	20,0	20,0	20,0	20,0
Cis9 18:1	258,0	258,0	258,0	258,0
Cis6 18:2	545,0	545,0	545,0	545,0
Cis3 18:3	46,0	46,0	46,0	46,0
Não identificados	13,0	13,0	13,0	13,0

<sup>1</sup> Composição média (por kg do produto): Ca 240 g; P 60 g; Mg 15,0 g; S 18,0 g; Na 78,0; Fe 2.200 mg; Zn 3.800 mg; Cu 680 mg; Mn 1.105 mg; I 40 mg; Co 10 mg; Se 25 mg; vitamina A 100.000 IU; vitamina D3 66.700 IU; e vitamina E 1.000 IU.

<sup>2</sup> Amostra obtida de quatro amostras compostas preparadas por meio da mistura homogênea das amostras diárias coletadas entre os dias 15 a 21.

<sup>3</sup> Estimado a partir de valores publicados para cada ingrediente (ELL (Mcal/kg de MS) = 0,0245 x NDT(%) - 0,12) (NRC, 2001).

<sup>4</sup> Composição em ácidos graxos obtido da publicação de Lima et al. (2015).

**Tabela 2**

Ingestão de matéria seca, produção de leite e composição do leite de vacas da raça Holandês suplementadas com erva mate e vitamina E.

Item	Dietas <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	P Contrastes		
	Cont	Vit E	EMa	Vit E & EMa		EMa <sup>3</sup>	Vit E <sup>4</sup>	Int <sup>5</sup>
Ingestão (kgMS/d)								
MS	15,99	15,03	16,06	16,47	0,450	0,42	0,04	0,07
MO	15,01	14,21	15,00	15,43	0,433	0,55	0,08	0,07
PB	2,54	2,28	2,67	2,66	0,12	0,02	0,01	0,03
EE	0,93	0,93	0,92	0,97	0,099	0,26	0,43	0,26
FDN	5,68	5,39	5,90	5,93	0,189	0,38	0,03	0,31
Digestibilidade (g/kg)								
MS	717,2	680,8	718,9	705,3	0,924	0,04	0,20	0,26
MO	738,2	704,7	735,3	725,8	0,986	0,07	0,39	0,26
PB	773,7	714,1	775,1	757,5	0,981	0,02	0,02	0,03
EE	741,0	719,9	751,4	721,5	3,080	0,43	0,85	0,089
FDN	572,5	499,0	549,8	539,7	2,020	0,10	0,65	0,17

<sup>1</sup> Cont - Dieta controle sem suplementação de EM e sem vit E; vit E – Dieta-controle + suplementação de 350 UI de vit E/kg de MS/dia; EMa - Dieta controle + suplementação de 3% de EMa/kg de MS/dia; vit E & EMa - Dieta controle + suplementação de 350 UI de vit E/kg de MS/dia + suplementação de 3% de EMa/kg de MS/dia.

<sup>2</sup> EPM = Erro-padrão da média.

<sup>3</sup> Contraste entre os tratamentos com EMa e sem EMa.

<sup>4</sup> Contraste entre os tratamentos com vit E e sem vit E.

<sup>5</sup> Verificação do efeito associativo da vit E com a EMa.

**Tabela 3**

Ingestão de matéria seca, produção de leite e composição do leite de vacas da raça Holandês suplementadas com erva mate e/ou vitamina E

Item	Tratamentos <sup>1</sup>				P Contrastes			
	Cont	Vit E	EMa	Vit E & EMa	EPM <sup>2</sup>	EMa <sup>3</sup>	Vit E <sup>4</sup>	Int <sup>5</sup>
Produção de leite (kg/d)	23,7	22,5	22,9	23,05	0,53	0,61	0,90	0,52
Composição do leite (g/kg)								
Gordura	38,3	38,9	38,2	37,2	1,57	0,85	0,58	0,64
Proteína	31,3	30,5	30,8	30,1	0,62	0,04	0,18	0,91
Lactose	45,9	45,5	46,5	44,5	0,80	0,16	0,83	0,35
Sólidos totais	125,4	123,5	125,1	122,4	2,54	0,02	0,42	0,64
CCS, (log <sub>10</sub> /mL) <sup>6</sup>	1,96	1,76	1,91	1,74	0,18	0,09	0,70	0,86
N-Ureico (mg/dL)	10,89	10,22	10,79	9,97	0,66	0,17	0,73	0,88
TBARS (nmol of MDA <sup>7</sup> /L)	6,17	5,61	6,41	6,94	0,68	0,49	0,88	0,75
Dieno conjugado (mmol/kg of fat)	68,49	64,95	62,42	62,59	3,24	0,79	0,51	0,77
Poder de redução (µg GAE/mL)	11,61	10,66	12,05	10,64	0,59	0,001	0,36	0,32
Polifenóis (µg QE/mL)	11,11	10,56	10,01	11,00	0,44	0,81	0,72	0,41

<sup>1</sup> Cont - Dieta controle sem suplementação de EM e sem vit E; vit E - Dieta controle + suplementação de 350 UI de vit E/kg de MS/dia; EMa - Dieta controle + suplementação de 3% de EMa/kg de MS/dia; vit E & EMa - Dieta controle + suplementação de 350 UI de vit E/kg de MS/ dia + suplementação de 3% de EMa/kg de MS/dia.

<sup>2</sup> EPM = Erro-padrão da média.

<sup>3</sup> Contraste entre os tratamentos com EMa e sem EMa

<sup>4</sup> Contraste entre os tratamentos com vit E e sem vit E

<sup>5</sup> Verificação do efeito associativo da vit E com a EMa

<sup>6</sup> Contagem de células somáticas;

<sup>7</sup> MDA = malonaldeído

**Tabela 4**

Composição de ácidos graxos (g/100 g de ácidos graxos) na gordura do leite de vacas da raça Holandês alimentadas com soja e suplementadas com de erva mate e/ou vitamina E

	Dieta <sup>1</sup>				EPM <sup>2</sup>	P Contrastes		
	Cont	Vit E	EMa	Vit E & EMa		EMa <sup>3</sup>	Vit E <sup>4</sup>	Int <sup>5</sup>
C4:0	0,71	0,50	0,71	0,85	0,1339	0,8872	0,4963	0,4618
C6:0	1,20	0,94	1,07	1,36	0,1838	0,9805	0,6695	0,4252
C12:0	7,74	5,75	6,86	7,90	1,1611	0,6441	0,9532	0,3420
C14:0	23,53	20,81	22,29	24,14	4,1125	0,8930	0,9510	0,3294
C15:0	2,67	2,04	2,01	2,84	0,3960	0,9246	0,8975	0,3270
C15:1	0,02	0,02	0,01	0,02	0,0872	0,5832	0,4833	0,1411
C16:0	38,83	38,91	34,26	35,73	3,981	0,5441	0,2602	0,3181
C17:1	0,33	0,19	0,15	0,21	0,0315	0,1872	0,4631	0,0905
C18:0	13,56	19,27	18,84	16,98	2,8165	0,7235	0,6886	0,5241
C18:1n9t	6,47	6,45	6,91	6,43	4,7751	0,2314	0,2313	0,5893
C18:2n6t	0,09	0,40	0,01	0,26	0,0267	0,4242	0,4387	0,3695
C18:2n6c	0,20	0,29	0,32	0,32	0,0839	0,9560	0,9121	0,5102
C18:3n6	0,29	0,22	0,17	0,26	0,1132	0,8511	0,9582	0,7161
C18:3n3	2,03	1,73	1,80	1,72	0,6776	0,5100	0,4532	0,4923
C20:0	0,01	0,04	0,17	0,01	0,4141	0,4699	0,4402	0,2727
C20:1	0,01	0,15	0,16	0,04	0,0255	0,9387	0,9387	0,2780
C21:0	0,14	0,07	0,01	0,11	0,3199	0,5115	0,8054	0,1923
C20:2	0,41	0,39	0,34	0,36	0,6630	0,7169	0,9983	0,8574
C22:0	0,01	0,05	0,07	0,08	0,0230	0,2957	0,5456	0,7029
C20:3n6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0027	0,2508	0,3464	0,6480
C22:1n9	0,01	0,00	0,00	0,01	0,0025	0,9979	0,7262	0,5648
C20:3n3	0,02	0,01	0,02	0,02	0,0094	0,8762	0,7007	0,7811
C20:4n6	0,01	0,00	0,01	0,01	0,0011	0,7917	0,1983	0,1836
C23:0	0,17	0,12	0,12	0,08	0,0277	0,4196	0,3454	0,9790
C22:2	0,02	0,01	0,00	0,01	0,0015	0,5090	0,3063	0,5520
C24:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0038	0,1330	0,7182	0,7160
C22:6 n3	0,03	0,02	0,02	0,03	0,0039	0,9243	0,6490	0,1730
Outros	1,51	1,64	2,68	0,23	0,1546	0,9439	0,8582	0,5318
Total	100,0	100,00	100,0	100,0				

<sup>1</sup>Cont – Dieta-controle sem suplementação de EM e sem vit E; vit E - Dieta controle + suplementação de 350 UI de vit E/kg de MS/dia; EMa - Dieta controle + suplementação de 3% de EMa/kg de MS/dia; vit E & EMa - Dieta controle + suplementação de 350 UI de vit E/kg de MS/dia + suplementação de 3% de EMa/kg de MS/dia.

<sup>2</sup>EPM = Erro-padrão da média.

<sup>3</sup> Contraste entre os tratamentos com EMa e sem EMa

<sup>4</sup> Contraste entre os tratamentos com vit E e sem vit E

<sup>5</sup> Verificação do efeito associativo da vit E com a EMa

## VI – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação de antioxidantes naturais para vacas leiteiras se mostrou uma boa alternativa para reduzir os efeitos negativos encontrados em vários estádios da vaca leiteira. Durante o início da lactação a lignana encontrada na casca da linhaça foi capaz de reduzir a perda de peso das vacas e aumentar a ingestão de matéria seca. Apesar dos níveis sanguíneos de ácidos graxos não esterificados e de beta hidroxibutirados não serem alterados pelo tratamento.

A lignana não alterou a lipoperoxidação sanguínea e nem no leite, porém a suplementação de erva mate aumentou o poder de redução no leite de vacas nos dois experimentos. A erva mate também diminuiu os níveis de lactose no leite sem alterar a produção, além de reduzir o N-ureico do leite. A suplementação de erva mate com vitamina E foi capaz de aumentar a ingestão de MS apesar de não afetar a produção de leite. Portanto, a suplementação de erva mate foi capaz de substituir a suplementação de vit E sendo até melhor que a vit E na transferência do poder antioxidante para o leite.

O fornecimento de fonte de antioxidantes naturais é capaz de melhorar o perfil oxidativo do leite de vacas leiteiras além de outros benefícios fisiológicos.