

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**GLICERINA BRUTA NA SUPLEMENTAÇÃO DE CABRAS LACTANTES  
E AVALIAÇÃO DA GORDURA DO LEITE COMO FONTE DE MicroRNA  
MAMÁRIO EM BOVINOS**

**DAIANE LAGO NOVAIS**

**SALVADOR - BAHIA  
MARÇO - 2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**GLICERINA BRUTA NA SUPLEMENTAÇÃO DE CABRAS LACTANTES**  
**E AVALIAÇÃO DA GORDURA DO LEITE COMO FONTE DE MicroRNA**  
**MAMÁRIO EM BOVINOS**

**DAIANE LAGO NOVAIS**

**Zootecnista**

**SALVADOR - BAHIA**

**MARÇO - 2017**

**DAIANE LAGO NOVAIS**

**GLICERINA BRUTA NA SUPLEMENTAÇÃO DE CABRAS  
LACTANTES E AVALIAÇÃO DA GORDURA DO LEITE COMO  
FONTE DE MicroRNA MAMÁRIO EM BOVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Zootecnia

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Gleidson Giordano Pinto de Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Laudí Cunha Leite

Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Christine Leroux

**SALVADOR - BA**

**MARÇO - 2017**

Sistema de Bibliotecas -- UFBA

D132 Novais, Daiane Lago  
Glicerina bruta na suplementação de cabras lactantes e  
avaliação da gordura do leite como fonte de microRNA mamário  
em bovinos / Daiane Lago Novais. -- Salvador, 2017.  
87 f.

Orientador: Gleidson Giordano Pinto de  
Carvalho. Coorientador: Laudí Cunha Leite.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) -  
- Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina  
Veterinária e Zootecnia, 2017.

1. coproduto. 2. glândula mamária. 3. leite. 4.  
biomarcadores. 5. microRNA. I. Giordano Pinto de  
Carvalho, Gleidson. II. Cunha Leite, Laudí. III. Título.

**GLICERINA BRUTA NA SUPLEMENTAÇÃO DE CABRAS  
LACTANTES E AVALIAÇÃO DA GORDURA DO LEITE COMO  
FONTE MICRORNA MAMÁRIO EM BOVINOS**

**Daiane Lago Novais**

**Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de  
Doutor em Zootecnia**

**Salvador, 29 de março de 2017**

**Comissão examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Gleidson Giordano Pinto de Carvalho**  
**UFBA**  
**Orientador / Presidente**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. José Esler de Freitas Junior**  
**UFBA**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Luís Fernando Batista Pinto**  
**UFBA**

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. Douglas dos Santos Pina**  
**UFBA**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Mara Lúcia de Albuquerque Pereira**  
**UESB**

Ao meu bom Deus, por todos os dias  
me mostrar o quanto sou capaz e que  
posso ir bem longe...

Ao meu marido e amigo Carlos,  
companheiro de todas as horas.

À minha mãe, por ser um exemplo de  
humildade.

Às minhas irmãs, Débora e em  
especial Danúbia por ser uma guerreira na  
luta pela vida.

Aos meus amados sobrinhos Afonso  
e Bento.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação por me proporcionarem o acesso ao conhecimento.

Ao *Institut National de la Recherche Agronomique* – INRA, França, pela oportunidade de realizar o Doutorado Sanduíche.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de Doutorado no Brasil e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche na França.

Ao Professor e orientador Dr. Gleidson Giordano Pinto de Carvalho e aos coorientadores Dr. Laudí Cunha Leite e Dr.<sup>a</sup> Christine Leroux, pela amizade e pelos ensinamentos.

Aos estagiários UFRB, pela ajuda durante o experimento, em especial Fernanda Gazar, Maria Selma Matos, Cinara Peixoto, Valdir Oliveira, Roberto Filho, Rodrigo Reis, Rodrigo Santana, Lourival Neto, Grazielle Rocha, Leandro Andrade e Luana Correia.

Aos amigos UFBA/UFRB, Jusaline Vieira, Ana Lúcia Santana, Isis Nicory, Paula Aguiar, Luis Henrique Matos pelo carinho de sempre.

A todos os colegas de trabalho do INRA, em especial aqueles da unidade UMRH, equipe Alimentation Génomique Lactation (AGL), Pascale Béraud, Karol Pawłowski, Sébastien Bes, Lucas Prado, Hélène Fougère, Céline Boby, José Pires, Martine Tourret, Cyril Labonne, je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi, je ne vous oublierai jamais.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

## BIOGRAFIA DO AUTOR

DAIANE LAGO NOVAIS – Filha de Antônio Oliveira Novais e Maria Helena Palmeira Lago, nasceu em Sapeaçu, Bahia, em 22 de Abril de 1987.

Iniciou o Curso de Graduação em Zootecnia na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em 2006, concluindo o mesmo em fevereiro de 2011.

Ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal em Março de 2011, pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, sob a orientação inicial do professor Jair de Araújo Marques (*In memoriam*), sendo transferida para a professora Adriana Regina Bagaldo, defendendo a dissertação de Mestrado em Fevereiro de 2013. Em maio de 2013 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela Universidade Federal da Bahia, sob a orientação do professor Gleidson Giordano Pinto de Carvalho, submetendo-se ao Exame de Qualificação em Abril de 2015.

De Maio de 2015 à Abril de 2016 realizou o Intercâmbio Estudantil através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) contemplada com bolsa cedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), para a realização do estágio no *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA) - Centre de Theix, Clermont-Ferrand, França.

No dia 29 de Março de 2017, submeteu-se à banca de defesa da Tese e foi aprovada para receber a titulação de Doutora em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal da Bahia.



# LISTA DE FIGURAS

## Capítulo 1

### Revisão de literatura: Glicerina bruta na suplementação alimentar de cabras lactantes em pastagem

- Figura 1.** Matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel (perfil nacional) .... 19
- Figura 2.** Reação de transesterificação.....20

## Capítulo 2

### Revisão de literatura: Avaliação da gordura do leite como fonte de microRNA mamário em bovinos

- Figura 1.** Resumo das vias para o transporte de gotículas lipídicas e secreção a partir de células epiteliais mamárias. .... 62
- Figura 2:** Biogênese e mecanismo de regulação pós-transcricional exercido pelos miRNAs. .... 63

### Artigo 2: Milk fat as a source of mammary microRNA in the bovine

- Figure 1:** Analysis of the expression of nine miRNA in mammary gland compared with milk fat globule..... 86
- Figure 2:** Venn diagram of biological processes. .... 87
- Figure 3:** Representation of miRNA secretion within milk fat globules. .... 88

# LISTA DE TABELAS

## Capítulo 1

### Revisão de literatura: Glicerina bruta na suplementação alimentar de cabras lactantes criadas em pastagem

<b>Tabela 1.</b> Propriedades químicas e físicas da glicerina bruta à temperatura ambiente ..	18
<b>Tabela 2.</b> Composição da glicerina bruta .....	21

### Artigo 1: Glicerina bruta na suplementação alimentar de cabras lactantes em pastagem

<b>Tabela 1.</b> Disponibilidade, composição morfológica e químico-bromatológica do pasto <i>Panicum maximum</i> cv. Aruana consumido pelos animais durante o período experimental.....	34
<b>Tabela 2.</b> Proporção de ingredientes e composição químico-bromatológica do suplemento alimentar .....	35
<b>Tabela 3.</b> Consumo da matéria seca e componentes nutricionais .....	40
<b>Tabela 4.</b> Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca e componentes nutricionais.....	41
<b>Tabela 5.</b> Produção e composição do leite .....	41
<b>Tabela 6.</b> Perfil de ácidos graxos do leite (g/ 100g de ácidos graxos totais) .....	43
<b>Tabela 7.</b> Valores médios relativos aos somatórios dos ácidos graxos do leite (g/ 100g de ácidos graxos totais) .....	44
<b>Tabela 8.</b> Metabólitos sanguíneos e balanço de nitrogênio.....	45

## Capítulo 2

### Artigo 2: Milk fat as a source of mammary microRNA in the bovine

<b>Table 1.</b> Biological process targeted exclusively by both miR-126 and miR-204.....	85
--	----

## SUMÁRIO

RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
INTRODUÇÃO GERAL .....	14
OBJETIVOS .....	15
CAPÍTULO 1 .....	16
REVISÃO DE LITERATURA: Glicerina bruta na suplementação alimentar de cabras lactantes em pastagem .....	17
1. Glicerina bruta .....	17
2. Origem da glicerina bruta .....	17
3. Produção de glicerina bruta .....	19
4. Glicerina bruta na alimentação de ruminantes .....	21
5. Referências bibliográficas .....	24
ARTIGO 1. Glicerina bruta na suplementação alimentar de cabras lactantes em pastagem .....	31
RESUMO .....	31
INTRODUÇÃO .....	32
MATERIAL E MÉTODOS .....	33
RESULTADOS .....	40
DISCUSSÃO .....	45
CONCLUSÃO .....	50
AGRADECIMENTOS .....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
CAPÍTULO 2 .....	59
REVISÃO DE LITERATURA: Avaliação da gordura do leite como fonte de microRNA mamário em bovinos .....	60
1. Gordura do leite: mecanismo de secreção .....	60
2. microRNA: Biogênese e mecanismos de regulação .....	62

3. microRNAs como biomarcadores .....	64
4. Referências bibliográficas .....	66
ARTIGO 2. Milk fat as a source of mammary microRNA in the bovine .....	71
ABSTRACT .....	71
INTRODUCTION .....	72
MATERIALS AND METHODS .....	73
RESULTS .....	76
DISCUSSION.....	77
CONCLUSIONS .....	80
ACKNOWLEDGMENTS .....	81
REFERENCES .....	82
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	89

## RESUMO

O presente trabalho abrange dois domínios da zootecnia, um sobre nutrição e produção de ruminantes e o outro sobre a biologia molecular e expressão gênica (epigenética). A tese foi dividida em duas partes: a primeira sobre a utilização de alimentos alternativos no desempenho de cabras lactantes e a segunda sobre a utilização de uma fonte não invasiva de microRNA em bovinos. PARTE I – Avaliar a inclusão de níveis de glicerina bruta no suplemento de cabras lactantes em pastagem. Oito cabras da raça Alpina, com peso corporal de  $45,2 \pm 7,5$  kg, distribuídas em quadrado latino duplicado, foram utilizadas para avaliar os efeitos dos níveis de glicerina bruta (0, 35, 70, 105 g kg<sup>-1</sup> MS) sobre o consumo, digestibilidade, balanço de nitrogênio, metabólitos sanguíneos, produção, composição e perfil dos ácidos graxos do leite. Os resultados mostraram que o uso da glicerina bruta não limita o consumo de matéria seca, reduz a excreção de nitrogênio via urina e aumenta o nitrogênio retido em relação ao ingerido. Reduz a glicose pré-prandial, sendo esta reestabelecida quatro horas após o fornecimento do suplemento contendo a GB. Aumenta a percentagem da gordura do leite, além de elevar a concentração dos ácidos graxos poli-insaturados do leite. PARTE II – Avaliar o uso da gordura do leite como fonte não invasiva de microRNAs (miRNAs) e verificar sua representatividade na glândula mamária, além de comparar o perfil dos miRNAs candidatos entre glândula mamária (GM) e glóbulo de gordura do leite (GG). Assim, o estudo foi conduzido no *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA). Foram utilizadas 12 vacas lactantes da raça Holandesa. O RNA total foi extraído a partir da GM e GG desses animais. Nove miRNAs (miR-29a, miR-125b, miR-126, miR-141, miR-148a, miR-204, miR-223, miR-320a e miR-494) foram escolhidos com base na sua expressão na glândula mamária realizadas por ensaios com a utilização de RT- qPCR. Dentre os miRNAs analisados, dois não foram encontrados no GG (miR-126 e miR-204). Três foram significativamente mais abundantes na GM (miR-29a, miR-125b e miR-148a). Quatro miRNAs foram igualmente expressos na GM e GG (miR-141, miR-223, miR-320a e miR-494). Tais resultados sugerem que existem mecanismos seletivos da passagem dos miRNAs para o leite ou existem expressões específicas nos diferentes tipos de células na GM. Glóbulo de gordura do leite pode ser utilizado como fonte não invasiva de miRNAs, mas não refletem exatamente o que ocorre na glândula mamária.

**Palavras-chave:** coproduto, glândula mamária, leite, ruminantes

## ABSTRACT

This paper presents two areas of animal science, one on the nutrition and ruminant production and other one on the molecular biology and genetic expression (epigenetics). Therefore the thesis divided into two parts: the first on the performance of dairy goats and the second on the use of a non-invasive source of microRNA in cattle. PART I - To evaluate the inclusion of crude glycerin levels in the supplement of lactating goats on pasture. Eight Alpine goats, were used to evaluate the effects of CG (0, 35, 70, 105 g kg<sup>-1</sup> DM) on intake, digestibility, nitrogen balance, blood biochemical composition, milk production and composition and profile of milk fatty acids. The use of CG does not limit dry matter intake, reduces the excretion of nitrogen in the urine and increases the nitrogen retained in relation to the ingested. It reduces preprandial glucose, which is reestablished four hours after the supply of the supplement containing the CG. Increases the percentage of milk fat, in addition to raising the concentration of polyunsaturated fatty acids in milk. PART II - To avoid the use of invasive sampling of mammary gland (MG), our objective was to assess the use of milk fat (MF) from mid-lactation cows as a source of microRNA (miRNA), and whether the latter are representative of MG miRNA expression (miRNome). Thus, a study was conducted at the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Twelve lactating Holstein cows were used. Total RNA was extracted from the MG and MF of these animals. Nine miRNA (miR-29a, miR-125b, miR-126, miR-141, miR-148a, miR-204, miR-223, miR-320a, miR-494), chosen on the base of their expression in MG, were quantified by RT-qPCR. Among these, 2 miRNA. RT-qPCR. Among these, 2 miRNA (miR-126 and miR-204) were not detected in MF, 3 miRNA were significantly more abundant in MG than in MF (miR-29a, miR-125b and miR-148a). Four studied miRNA were detected in both MF and MG as equally present (miR-141, miR-223, miR-320a and miR-494). These results suggest that specific expression exists in the different cell-types of MG or that there are selective mechanisms of miRNA transfer to milk fat globule. In conclusion, MF can be used as non-invasive source of miRNA but do not reflect exactly the mammary miRNome.

**Keywords:** co-product, mammary gland, milk, ruminants

## INTRODUÇÃO GERAL

A inclusão de glicerina bruta em dietas para ruminantes representa alternativa para aumentar a produtividade do sistema e preservar o meio ambiente. A glicerina bruta tem sido utilizada em pesquisas, como fonte energética em substituição ao milho com objetivo de aumentar a produção e a qualidade do leite, bem como a eficiência (Wilbert et al., 2013; Ezequiel et al., 2015), e a diminuição da produção de metano (Van Cleef et al., 2015). Com base nas respostas obtidas pelos estudos publicados até o momento sobre o uso em dietas de bovinos, ovinos e caprinos de corte e bovinos de leite (Gunn et al., 2010a; Eiras et al., 2014; San Vito et al., 2016), concluiu-se que este é um alimento potencial para a suplementação dessas espécies. Podendo assim, apresentar resultados promissores quando adicionado ao suplemento alimentar de cabras lactantes em pastagem.

MicroRNAs são pequenos RNAs não codificantes (~ 22 nucleotídeos), que controlam vários processos biológicos como proliferação, crescimento e morte celular, resposta imune e metabolismo. Os microRNA, podem regular pelo menos 60% dos genes (Friedman et al., 2009), e estão envolvidos em vários processos celulares, regulando a expressão gênica no nível pós-transcricional. A presença de microRNA na glândula mamária e a presença de células epiteliais mamária no leite têm sugerido a ocorrência de microRNA no leite. No entanto, glóbulos de gordura do leite bovino não foram considerados como uma fonte de microRNA.

Para a parte I, a hipótese é que a adição da GB no suplemento concentrado para cabras Alpinas em pastagem (*Panicum maximum* cv. Aruana) eleva o valor energético do suplemento e, conseqüentemente no desempenho produtivo dos animais.

Na parte II a hipótese é que a gordura do leite bovino é representativa do que ocorre na glândula mamária e pode ser usada como fonte não invasiva de microRNA.

## OBJETIVOS

Avaliar o efeito da adição de níveis de glicerina bruta ao suplemento alimentar fornecido a cabras da raça Alpina, mantidas em pasto de *Panicum maximum* cv. Aruana, sobre os parâmetros de consumo e digestibilidade aparente da matéria seca e componente nutricionais, produção, composição e perfil dos ácidos graxos do leite, balanço de nitrogênio e metabólitos sanguíneos.

Avaliar o uso da gordura do leite como fonte não invasiva de microRNA e sua representatividade na glândula mamária, comparando o perfil de microRNAs candidatos na glândula mamária e glóbulo de gordura do leite.



## **CAPÍTULO 1**

**GLICERINA BRUTA NA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR DE CABRAS  
LACTANTES EM PASTAGEM**

## **REVISÃO DE LITERATURA: Glicerina bruta na suplementação alimentar de cabras lactantes em pastagem**

### **1. Glicerina bruta**

O recente aumento no uso do biodiesel no Brasil e no exterior, associado a disponibilidade de grandes quantidades de glicerina, gerou interesse de sua utilização na alimentação animal (SILVA et al., 2014). Vários estudos (Mach et al., 2009; Gunn et al., 2010a; Gomes et al., 2011; Kass et al., 2013; Chanjula et al., 2014; Van Cleef et al., 2014; Eiras et al., 2014) têm sido desenvolvidos para determinar os efeitos da glicerina sobre o desempenho animal e qualidade dos produtos (carne e leite).

O glicerol contido na glicerina se destaca como componente na dieta de ruminantes por ser classificada como fonte energética assimilável pelos microrganismos da flora ruminal e metabolizada no fígado (Abo El-Nor et al., 2010), podendo substituir o milho da dieta (DEFRAIN et al., 2004). Ao ser disponibilizado para o ruminante, o glicerol é rapidamente utilizado pelos microrganismos ruminais na formação de ácidos graxos voláteis – AGVs (WANG et al., 2009; FERRARO et al., 2009; ABUGHAZALEH et al., 2011).

Embora a glicerina possa ser uma fonte de energia alternativa para os animais, há muitas questões que ainda não foram totalmente esclarecidas, como níveis de inclusão, impacto e o nível de contaminantes, valor nutricional em relação a outras fontes de energia (DONKIN, 2008). Levando-se em consideração a diversidade de pesquisas e informações acerca da utilização da glicerina na nutrição de ruminantes, com resultados bastante variados e qualidade dos produtos distintos, aliada à grande importância da atividade de produção de biodiesel no Brasil.

### **2. Origem da glicerina bruta**

O glicerol foi acidentalmente descoberto pelo químico sueco Carl W. Scheele no final do século XVIII, durante o processo de saponificação de azeite de oliva (PAGLIARO & ROSSI, 2008). Sua importância econômica (bem como a importância militar) veio quase cem anos depois, quando Alfred Nobel inventou a dinamite (glicerol é o precursor da nitroglicerina), o que levou a utilização significativa de glicerol no

desenvolvimento industrial (SDA, 1990). Devido às suas propriedades físicas e químicas (Tabela 1), o glicerol tem sido utilizado como ingrediente ou auxiliar de processamento, em diversos setores industriais, tais como indústrias de alimentos, medicamentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (SDA, 2000). O glicerol, fórmula química  $C_3H_5(OH)_3$ , é um poli álcool, conhecido comercialmente como glicerina. É quase incolor, viscoso à temperatura ambiente, higroscópico, inodoro quando puro, e adocicado (PERRY et al., 1997).

Tabela 1. Propriedades químicas e físicas da glicerina bruta à temperatura ambiente

Características	Unidade	Valor
Massa molecular	$g\ mol^{-1}$	92,09
Densidade	$g\ cm^{-3}$	1,26
Viscosidade	Pa.s	1,50
Ponto de fusão	°C	18,2
Ponto de ebulição	°C	290
Energia	$kcal\ g^{-1}$	4,32

(Pagliaro & Rossi, 2008)

Devido aos esforços governamentais para reduzir a percentagem de combustíveis fósseis consumidos e diminuir a emissão de gases de efeito estufa, por meio do uso de biocombustíveis, a glicerina bruta está se tornando cada vez mais disponíveis para uso (ANP, 2016). Hoje, a maior parte da glicerina é produzida como coproduto do processo de fabricação do biodiesel (TAN et al., 2013). O biocombustível é produzido a partir da reação química de transesterificação em que um óleo vegetal, ou gordura animal, combinado com um álcool e um catalisador resulta em biodiesel e glicerina bruta (VAN GERPEN, 2005; THOMPSON & HE, 2006).

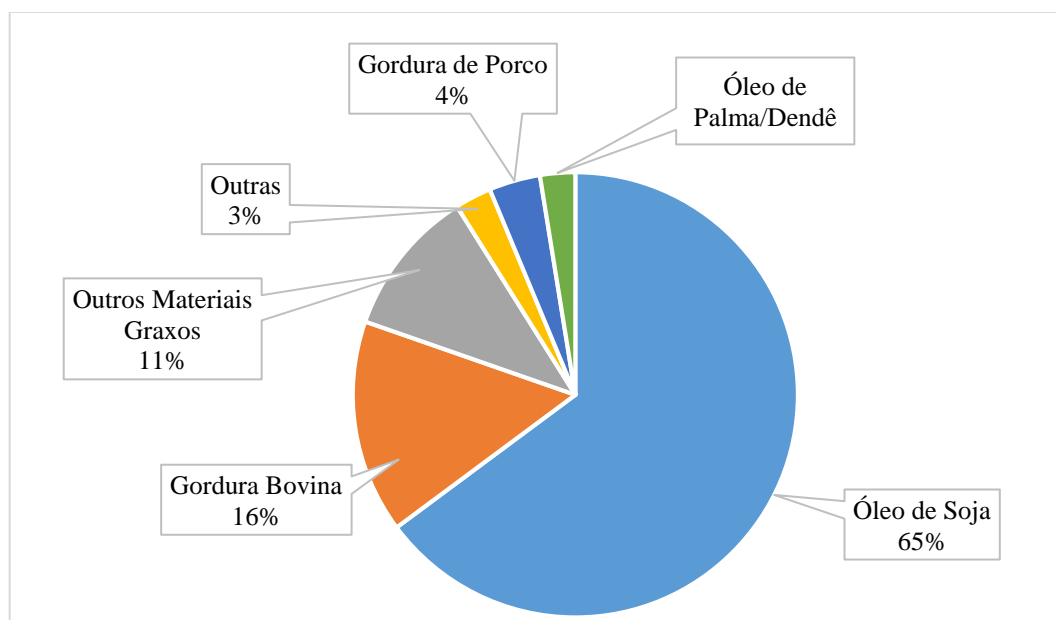
O processamento de biocombustíveis resulta em forma impura de glicerina, o que limita sua aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética. Além disso, para a maioria dos produtos destas indústrias, a glicerina é usada em pequenas quantidades (QUISPE et al., 2013). A glicerina oriunda da produção de biodiesel apresenta em média 80% de glicerol, para esta ser considerada como fonte de alimento para humanos e uso farmacológico, ainda, deve ser submetida ao processo de destilação como requisito para a segurança alimentar (Toohey et al., 2003) e alcançar o grau de pureza de 99,9%. No entanto, o processo de destilação pode elevar o custo de produção, tornando muitas vezes inviável, o que leva a mais coproduto sem destinação.

### 3. Produção de glicerina bruta

A produção de biodiesel no Brasil é crescente, segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP), foram produzidos em 2015 aproximadamente 3,9 milhões de m<sup>3</sup> de biodiesel (ANP, 2016). De acordo com Dasari et al. (2005), a cada litro de biodiesel produzido são gerados cerca de 100 mL glicerina bruta como coproduto, com isso, anualmente são produzidos cerca de 390 mil m<sup>3</sup> de glicerina no território nacional. O crescente volume de coproduto residual deve-se, em partes, a adição obrigatória de 8% de biodiesel ao óleo diesel comercializado no Brasil (Lei nº 13.263/2016 - ANP, 2016). Esse crescimento na produção cria alguns problemas relacionados ao escoamento desse coproduto, principalmente a contaminação do meio ambiente, mas pode gerar também oportunidades, como a utilização na alimentação animal (EIRAS et al., 2014).

As principais matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel brasileiro (Figura 1) são: óleo de soja, gordura bovina, além de outros materiais graxos. Dentre a categoria “Outras” estão contidos o óleo de algodão (0,44%), óleo de fritura (0,80%), gordura de frango (0,52%) e óleo de canola (0,89%), (ANP, 2017).

Figura 1. Matérias-primas utilizadas para a produção de biodiesel (perfil nacional)



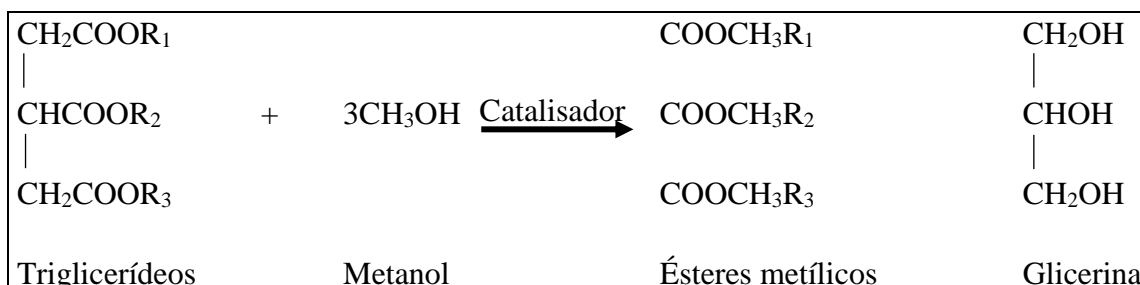
Fonte: ANP, 2017

No Brasil, o biodiesel é produzido principalmente a partir de óleo de soja, por meio do processo de transesterificação. O processo de transesterificação descrito por

Thompson & He (2006) envolve a reação de óleos vegetais ou gorduras animais, com um álcool, tal como metanol, na presença de um catalisador (por exemplo, hidróxido de sódio), resultando na produção de ésteres metílicos de ácidos graxos e glicerina bruta (Figura 2).

O processo de produção do biodiesel é afetado pela natureza do catalisador, a razão molar de álcool e óleo vegetal, a temperatura da reação, o teor de água dos reagentes e teor de ácidos graxos livres (SCHUCHARDT et al., 1998). Aproximadamente 10% do biodiesel produzido são considerados como resíduos do processo de transesterificação, contendo algumas impurezas tais como o metanol e vários sais (THOMPSON & HE, 2006; TAN et al., 2013). Portanto, o teor de glicerol e outros resíduos na matéria-prima devem ser monitorados devido à variação na composição entre vegetais e entre lotes durante o processo de extração (HANSEN et al., 2009). De acordo com Zhang et al. (2003), o processo de destilação permite a remoção do excesso de água e metanol elevando o teor de glicerol (de 85 para 92%) da matéria-prima, melhorando a qualidade da glicerina bruta antes que ele possa ser utilizado como componente para formulação da ração para animais.

Figura 2. Reação de transesterificação



Fonte: Adaptado de Thompson & He (2006)

A natureza da matéria-prima e do catalisador utilizado na reação pode afetar a qualidade e pureza da glicerina bruta (TAN et al., 2013). Glicerina refinada contém cerca de 99,8% de glicerol, enquanto que a glicerina bruta pode conter apenas 36,2% de glicerol (Lage et al., 2014), sendo essa variação muito comum em experimentos com animais. O catalisador utilizado no processo de transesterificação afeta a presença e concentração de sais minerais e impurezas na glicerina (YANG et al., 2012). Quantidades consideráveis de macro e microelementos, tais como sódio, fósforo, magnésio, enxofre, potássio e cálcio encontram-se presentes na glicerina produzida (THOMPSON & HE, 2006). Apesar de não ser relatado na literatura, há uma grande

preocupação dos pesquisadores quanto à possível presença de metais pesados na forma impura da glicerina, sendo um risco potencial para os animais e humanos.

A utilização da glicerina como aditivo em alimentos vem desde 1959 nos Estados Unidos, sendo este reconhecido como substância atóxica “GRAS” (Generally Regarded as Safe) pelo Food and Drug Administration dos Estados Unidos da América e segura para alimentação animal (FDA, 2010). No entanto, deve-se atentar para as impurezas presentes na glicerina, como o teor de metanol (Donkin, 2008), qualidade da água e os ésteres metílicos (BOURNAY et al., 2005). No Brasil, a utilização da glicerina como aditivo na alimentação humana e animal é assegurada pela resolução nº 386 de 5 de Agosto de 1999 (ANVISA, 1999). De acordo com o MAPA (2010), a glicerina disponibilizada para alimentação animal deve conter um padrão mínimo de qualidade, sendo disponibilizados, no mínimo, 0,8 kg de glicerol para cada kg de glicerina, com valores máximos 130g de umidade e 150 mg de metanol. Segundo Drackley (2008) o teor de metanol deve ser inferior a 0,5% na glicerina bruta para obter a segurança alimentar dos animais de produção.

Tabela 2. Composição da glicerina bruta

% Matéria Seca	Lage et al. (2014)	Kass et al. (2012)	Gunn et al. (2010a)	Thompson & He (2006)	Schröder & Südekum (1999)
Glicerol	36,20	82,60	87,50	76,20	63,30
Metanol	8,66	0,40	0,009	-	26,70
Cinzas	2,05	-	3,63	2,73	-
AGT*	46,48	0,60	-	7,98	0,71

\*AGT = ácidos graxos totais

#### 4. Glicerina bruta na alimentação de ruminantes

O excedente de coprodutos oriundos da produção do biodiesel presente nas usinas possibilita sua utilização na alimentação animal (DONKIN & DOANE, 2007). A utilização da glicerina como fonte energética tem sido proposta na alimentação de bovinos leiteiros (Donkin & Doane, 2007; Drackley, 2008, Wilbert et al., 2013; Meneses et al., 2014), bovinos de corte (Eiras et al., 2014), ovinos (Gunn et al., 2010a; Gunn et al., 2010b) caprinos (Ye et al., 2014; Chanjula et al., 2014), suínos (Lammers et al., 2008; Schieck et al., 2010) e aves (Dozier et al., 2008; Swiatkiewicz & Koreleski, 2009; Min et al., 2010).

As primeiras tentativas de avaliar a eficiência de uso da glicerina como aditivo na alimentação animal mostraram resultados promissores em termos de prevenção e tratamento da cetose em ruminantes (JOHNSON, 1951). Estudos posteriores têm demonstrado a ação dos produtos da fermentação do glicerol sobre o metabolismo animal (WRIGHT, 1969; RÉMOND et al., 1993).

De acordo com Chung et al. (2007), a alimentação com glicerol aumenta a concentração de propionato no rúmen e, portanto, considerada como uma substância gliconeogênica eficiente para vacas leiteiras no pós-parto. Em doses elevadas, o glicerol é considerado menos tóxico que o propilenoglicol, que é alternativa usualmente utilizada para vacas com cetose (NIELSEN & INGVAERTSEN, 2004). Portanto, o uso de substâncias gliconeogênicas, como o glicerol, pode ser uma ferramenta eficiente para garantir que as vacas leiteiras alcancem seu potencial produtivo durante a lactação (WANG et al., 2009). Além de proporcionar maior eficiência da conversão de ração em leite para vacas leiteiras (Chung et al., 2007), ajudando a reduzir os custos de alimentação e diminuindo a ocorrência de doenças metabólicas em animais de alta eficiência produtiva (KREHBIEL, 2008; WANG et al., 2009). Outra característica interessante é que a glicerina (fonte de glicerol) com sua alta densidade de energia torna-se atraente para complementar outras fontes energéticas, tais como grãos de cereais, na alimentação de ruminantes (MACH et al., 2009; FERRARO et al., 2009; WANG et al., 2009; ABO EL-NOR et al. 2010).

O glicerol presente na glicerina é disponibilizado diretamente para produção de ácidos graxos de cadeia curta no rúmen, sendo absorvidos para obtenção de energia. Ou ainda, o glicerol pode ser absorvido e metabolizado no fígado, sendo utilizado para a manutenção dos níveis plasmáticos de glicose (KREHBIEL, 2008).

Considerando os benefícios da suplementação com glicerina bruta na dieta de ruminantes, alguns fatores devem ser considerados para que se tenha sucesso no desempenho animal. Dentre esses fatores, o teor de glicerol e o grau de pureza, como presença de sais e metanol, são os principais. Segundo Lage et al. (2010), a glicerina obtida do processo de transesterificação do óleo vegetal com presença de impurezas, como metais pesados, excesso de lipídeos e metanol, podem acarretar em impactos negativos sobre o consumo, digestibilidade dos componentes da dieta e conseqüentemente, no desempenho animal.

## **Ovinos e caprinos**

Considerando a importância da glicerina bruta na alimentação animal, diversos estudos foram realizados com objetivo de avaliar sua influência na dieta de ruminantes e em especial para pequenos ruminantes. Contudo, resultados variáveis em relação ao desempenho dos animais foram relatados. Em relação à produção de ovinos, Gomes et al. (2011) mostraram ser possível adicionar até 30% de glicerina bruta (substituição total do milho) sem alterar o desempenho animal e rendimento dos cortes nobres de cordeiros. Entretanto, na presença de elevados níveis de sais, a inclusão de até 45% glicerina bruta reduz o consumo de matéria seca, com consequente efeito no desempenho de ovinos (GUNN et al., 2010b). Estudos realizados por Lage et al. (2014) mostraram redução no desempenho de ovinos ao adicionar até 12% de glicerina com baixos níveis de glicerol (36,2%) e elevadas concentrações de lipídios (46,5%).

Em relação à adição da glicerina bruta na dieta de caprinos, os efeitos encontrados estão associados também à qualidade do coproduto. Chanjula et al. (2014) não encontraram efeitos deletérios quando adicionaram até 20% de glicerina bruta na dieta de caprinos. Porém, Chanjula et al. (2016) encontraram redução no consumo e digestibilidade da matéria seca, quando caprinos foram alimentados com até 6% de glicerina bruta (63,42% de glicerol, 4,38% de metanol e 47,78% de lipídios). Vale destacar a grande variabilidade na composição da glicerina bruta, principalmente as encontradas no Brasil. Essas diferenças são as principais responsáveis pela variabilidade sobre resultados de desempenho dos animais.

## **Bovinos**

Em relação ao desempenho de bovinos, particularmente sobre a ingestão de nutrientes em vacas lactantes, o efeito da glicerina bruta também é variável. Apesar da presença de odor e sabor específico na glicerina bruta, Werner Omazic et al. (2009) não identificaram efeitos adversos sobre a ingestão de alimentos ou produtividade de vacas leiteiras. Porém, quando a glicerina foi utilizada como substituta do farelo de cevada em associação a silagem de capim, houve um aumento no consumo de matéria seca, indicando a inclusão desse coproduto sem qualquer efeito negativo sobre desempenho de vacas lactantes (KASS et al., 2012). Resultados similares foram encontrados por Kass et al. (2013) quando adicionaram 500 mL de (82,6% de glicerol) na dieta de vacas



no início de lactação. No entanto, apesar de não identificar diferenças significativas sobre o consumo de matéria seca, Costa et al. (2013) verificaram incremento de até 20% sobre a produção de leite ao adicionar até 12% de glicerina bruta na dieta de vacas em lactação.

A glicerina bruta mostra-se interessante na substituição parcial e total da fonte energética da dieta (milho grão) não influenciando nas variáveis produtivas quando fornecidas a vacas em lactação (WILBERT et al., 2013; PIMENTEL et al., 2014). Não mostrando diferenças no desempenho quando fornecidas em diferentes graus de pureza (Werner Omazic et al., 2013), nem quando os animais são suplementados em pastagens tropicais (SANTANA JÚNIOR et al., 2013).

Van Cleef et al. (2014) avaliaram a inclusão de até 30% de glicerina bruta (86% de glicerol) na alimentação de bovinos de corte e não verificaram efeito significativo sobre o consumo e digestibilidade da matéria seca. Os autores concluíram que a glicerina bruta pode ser uma boa fonte de energia em dietas para bovinos, já que nenhuma diferença foi observada sobre o desempenho desses animais. Quando adicionada ao suplemento para bovinos em pastagem em até 280 g kg<sup>-1</sup>, a glicerina proporciona incrementos no ganho de peso e eficiência de alimentação (SAN VITO et al., 2016).

## 5. Referências bibliográficas

- ABO EL-NOR, S.; ABUGHAZALEH, A. A.; POTU, R. B.; HASTINGS, D. KHATTAB, M.S.A. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v. 162, p. 99-105, 2010.
- ABUGHAZALEH, A.A.; ABO EL-NOR, S.; IBRAHIM, S. A. The effect of replacing corn with glycerol on ruminal bacteria in continuous culture fermenters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 95, p. 313-319, 2011.
- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. 2017. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº386, de 5 de agosto de 1999. (DOU 09/08/1999). <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/386_99.htm)>. Acesso em 20/10/2016.
- BOURNAY, L.; CASANAVE, D.; DELFORT, B.; HILLION, G.; CHODORGE, J.A. New heterogeneous process for biodiesel production: A way to improve the quality and the

value of the crude glycerine produced by biodiesel plants. **Catalysis Today**, v. 106, p. 190-192, 2005.

CHANJULA, P.; PAKDEECHANUAN, P.; WATTANASIT, S. Effects of dietary crude glycerin supplementation on nutrient digestibility, ruminal fermentation, blood metabolites, and nitrogen balance of goats. **Asian Australas Journal Animal Sciences**, v. 27, p. 365-374, 2014.

CHUNG, Y. H.; RICO, D.E; MARTINEZ, C. M.; CASSIDY, T. W.; NOIROT, V.; AMES, A.; VARGA, G. A. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. **Journal Dairy Science**, v. 90, p. 5682-5691, 2007.

COSTA, L.T.; SILVA, F.F.; PIRES, A.J.V.; BONOMO, P.; RODRIGUES, E.S.O.; SOUZA, D.D.; ROCHA NETO, A.L.; SILVA, R.R.; SCHIO, A.R.. Análise bioeconômica de níveis de glicerina bruta em dietas de vacas lactantes alimentadas com cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p. 833-844, 2013.

DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P-P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. – **Applied Catalysis A: General**, v. 281, p. 225–231, 2005.

DEFRAIN, J. M.; HIPPEN, A. R.; KALSCHEUR, K. F.; JARDONS, P. W. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 4195-4206.

DONKIN, S.S.; DOANE, P. **Glycerol as a feed ingredient for dairy cows**. In: Three-State Dairy Nutrition Conference. The Ohio State University, Michigan State University, Purdue University. Fort Wayne, IN. p. 97 -103, 2007.

DONKIN, S. S. Glicerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, S37, p. 280-286, 2008.

DOZIER, W.A.; KERR, B.J.; CORZO, M.T.; KIDD, T.E.; WEBER, K.; BREGENDAHL, K. Apparent metabolizable energy of glycerin for broiler chickens. **Poultry Science**, v. 87, p. 317-322, 2008.

DRACKLEY, J.K. **Opportunities for Glycerol Use in Dairy Diets**. – Four-State Dairy Nutrition and Management Conference, June 11–12, 2008, Dubuque, Iowa, p. 113-118, 2008.

EIRAS, C.E.; BARBOSA, L. P; MARQUES, J.A.; PRADO, R.M.; VALERO, M.V.; BONAFÉ, E.G.; ZAWADZKIC, F.; PEROTTO, D.; PRADO, I. N. Glycerine levels in

the diets of crossbred bulls finished in feedlot: carcass characteristics and meat quality. **Meat Science**, v. 96, p. 930-936, 2014.

FDA – **Food and Drug Administration**. 2010. Food additives permitted in fed and drinking water of animals. Methyl esters of higher fatty acids. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFR.Search.cfm?fr=172.225&SearchTerm=fatty%20acids>. Acesso em: 20 de Outubro de 2016.

FERRARO, S.M.; MENDONZA, G.D.; MIRANDA, L.A. GUTIÉRREZ, C.G. *In vitro* gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. **Animal feed Science and Technology**, v. 154, p. 112-118, 2009.

GOMES, M.A.B.; MORAES, G.V.; MATAVELI, M.; MACEDO, F.A.F.; CARNEIRO, T.C.; ROSSI, R.M. Performance and carcass characteristics of lambs fed on diets supplemented with glycerin from biodiesel production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 2211-2219, 2011.

GUNN, P.J.; NEARY, M.K.; LEMENAGER, R.P.; LAKE, S.L. Effects of crude glycerin on performance and carcass characteristics of finishing wether lambs. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 1771-1776, 2010a.

GUNN, P.J.; SCHULTZ, A.F.; VAN EMON, K.L.; NEARY, M.K.; LEMENAGER, R.P.; RUSK, C.P.; LAKE, S.L. Effects of elevated crude glycerin concentrations on feedlot performance, carcass characteristics, and serum metabolite and hormone concentrations in finishing ewe and wether lambs. **The Professional Animal Scientist**, v. 22, p. 298-306, 2010b.

HANSEN, C.F.; HERNANDEZ, A.; MULLAN, B.P.; MOORE, K.; TREZONA-MURRAY, M.; KING, R.H.; PLUSKE, J.R. A chemical analysis of samples of crude glycerol from the production of biodiesel in Australia, and the effect of feeding crude glycerol to growing-finishing pigs on performance, plasma metabolites and meat quality at slaughter. **Animal Production Science**, v. 49, p. 154-161, 2009.

JOHNSON, R.B. 1951. New methods for treating ketosis. A Preliminary report. **The North American Veterinarian**, v. 31, p. 327-332, 1951.

KASS, M.; ARIKO, T.; KAART, T.; RIHMA, E.; OTS, M.; ARNEY, D.; KÄRT, O. Effect of replacement of barley meal with crude glycerol on lactation performance of primiparous dairy cows fed a grass silage-based diet. **Livestock Science**, v. 150, p. 240-247, 2012.

KASS, M.; ARIKO, T.; SAMARÜTELA, J.; LINGA, K.; JAAKSONA, H.; KAART, T.; ARNEYA, D.; KÄRT, O.; OTSA, M. Long-term oral drenching of crude glycerol to

- primiparous dairy cows in early lactation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 184, p. 58-66, 2013.
- KREHBIEL, C.R. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 392, 2008.
- LAGE, J.F.; PAULINO, P.V.R.; PEREIRA, L.G.R.; DUARTE, M.S.; VALADARES FILHO, S.C.; OLIVEIRA, A.S.; SOUZA, N.K.P.; LIMA, J.C.M. Carcass characteristics of feedlot lambs fed crude glycerin contaminated with high concentrations of crude fat. **Meat Science**, v. 96, p. 108–113, 2014.
- LAMMERS, P.J.; KERR, B.J.; WEBER, T.E.; DOZIER, W.A.; KIDD, M.T.; BREGENDAHL, K.; HONEYMAN, M.S. 2008. Digestible and metabolizable energy of crude glycerol for growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 602-608, 2008.
- MACH, N.; BACH, A.; DEVANT, M. Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 632-638, 2009.
- MAPA. **Ministério da agricultura autoriza novo uso da glicerina**. 2010. Disponível em: <[http://www.sindiracoes.org.br/index.php?option=com\\_content&task=view&id=972Itemid=1](http://www.sindiracoes.org.br/index.php?option=com_content&task=view&id=972Itemid=1)>. Acesso em: 07/07/2016.
- MENESES, M.A.; SILVA, F.F.; SCHIO, A.R.; SILVA, R.R.; SOUZA, D.D.; PORTO JUNIOR, A.F. Feeding behavior of dairy cows in feedlot and fed on crude glycerin levels in the diet. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 36, p. 171-176, 2014.
- MIN, Y.N.; YAN, F.; LIU, F.Z.; COTO, C.; WALDROUP, P.W. Glycerin – A New Energy Source for Poultry. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, p. 1-4, 2010.
- NIELSEN, N.I.; INGVARTSEN, K.L. Propylene glycol for dairy cows: A review of the metabolism of propylene glycol and its effects on physiological parameters, feed intake, milk production and risk of ketosis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 115, p. 191-213, 2004.
- PAGLIARO, M.; ROSSI, M. **Glycerol: Properties and Production**. In: The Future of Glycerol: New Uses of Versatile Raw Material. RSC Publishing. 2008
- PERRY, R.H.; GREEN, D.W.; MALONEY, J.O.H. 1997. **Perry's chemical engineers' handbook**. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1997.
- PIMENTEL, L.R.; MARCONDES, M.I.; SILVA, M.V.; SIQUEIRA, J.G.; BRAHIM, M.C. Inclusão da glicerina bruta na dieta de vacas da raça Holandesa sobre o consumo,

produção e composição do leite. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p. 1439-1446, 2014.

QUISPE, C.A.G.; CORONADO, C.J.R.; CARVALHO JR., J.A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. – **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 475-493, 2013.

REMOND, B.; SOUDAY, E.; JOUANY, J.P. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 2, p. 121-132, 1993.

SANTANA JÚNIOR, H.A.; FIGUEIREDO, M.P.; CARDOSO, E.O.; MENDES, F.B.L.; ABREU FILHO, G.; PINHEIRO, A.A.; VIANA, P.T.; ROSEIRA, J.P.S. Crude glycerin in supplement to primiparous lactating cows grazing on tropical pasture: nutritional and productive characteristics. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, p. 117-124, 2013.

SAN VITO, E., J. F. LAGE, J. D. MESSANA, E. E. DALLANTONIA, R. T. S. FRIGHETTO, R. A. REIS, A. J. NETO, T. T. BERCHIELLI. Performance and methane emissions of grazing nellore bulls supplemented with crude glycerin. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 4728–4737, 2016.

SCHIECK, S.J.; SHURSON, G.C.; KERR, B.J.; JOHNSTON, L.J. Evaluation of glycerol, a biodiesel co-product, in grow-finish pig diets to support growth and pork quality. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 3927–3935, 2010.

SCHRÖDER, A.; SÜDEKUM, K.H. 1999. **Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants**. In: New Horizons for and Old Crop. Proc. 10th Int. Rapeseed Congress, Canberra, Australia, p. 241, 1999.

SCHUCHARDT, U., SERCHELI, R., VARGAS, R.M. 1998. Transesterification of vegetable oils: A Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, p. 199–210, 1998.

SDA (The Soap and Detergent Association). 2000. **Why Glycerin**, USP Washington, USA.

SDA (The Soap and Detergent Association). 1990. **Glycerine: An overview**. The Soap and Detergent Association.

SILVA, V.O.; LOPES, E.; ANDRADE, E.F.; SOUSA, R.V.; ZANGERONIMO, M.G.; PEREIRA, L.J. Use of biodiesel co-products (Glycerol) as alternative sources of energy in animal nutrition: a systematic review. **Arquivo de Medicina Veterinária**, v. 46, p. 111-120, 2014.

SWIATKIEWICZ, S., KORELESKI, J. 2009. Effect of crude glycerin level in the diet of laying hens on egg performance and nutrient utilization. **Poultry Science**, v. 88, p. 615-619, 2009.

- TAN, H.W.; ABDUL AZIZ, A.R.; AROUA, M.K. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 118-127, 2013.
- THOMPSON, J.C.; HE, B.B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstock. – **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, p. 261–265, 2006.
- TOOHEY, D. E.; JAYANATH, A.; Crase, L. **Pre-feasibility study into biodiesel opportunity. A study conducted for the Pratt Water Murrumbidgee Valley Water Efficiency Feasibility Project.** 2003. Disponível em: <<http://www.napswq.gov.au/publications/prattwater/workingpapers/pubs/biodiesel.pdf>> Acesso em: 19 de Junho de 2016.
- VAN CLEEF, E.H.C.B.; EZEQUIEL, J.M.B.; D`AUREA, A.P.; FÁVARO, V.R.; SANCANARI, J.B.D. 2014. Crude glycerin in diets for feedlot Nellore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, p. 86-91, 2014.
- VAN GERPEN, J. 2005. Biodiesel processing and production. – **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1097-1107, 2005.
- WANG, C.; LIU, Q.; HUO, W. J.; YANG, W. Z.; DONG, K. H.; HUANG, Y.X.; GUO, G. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. **Livestock Science**, v. 121, p. 15-20, 2009.
- WERNER OMAZIC, A.; BERTILSSON, J.; TRÅVEN, M.; HOLTENIUS, K. **Dietary glycerol supplementation to dairy cows: effects on lactation performance and metabolism.** – Proceedings of the 11th International Symposium on Ruminant Physiology (Eds. Y. Chilliard et al.), Clermont-Ferrand, France, p. 694-695, 2009.
- WERNER OMAZIC, A.; TRÅVEN, M.; BERTILSSON, J.; HOLTENIUS, K. 2013. High and low glycerine supplementation to dairy cows in early lactation: effects on silage intake, milk production and metabolism. **Animal**, v. 7, p. 1479 -148, 2013.
- WILBERT, C.A.; PRATES, E.R.; BARCELLOS, J.O.J.; SCHAFHÄUSERD, J. Crude glycerin as an alternative energy feedstuff for dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 183, p. 116 - 123, 2013.
- WRIGHT, D.E. Fermentation of glycerol by rumen micro-organisms. – **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 12, p. 281–286, 1969.
- YANG, F.; HANNA, M.A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol – a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1-10, 2012.

YE, G.; ZHU, Y.; LIU, J.; CHEN, X.; HUANG, K. 2014. Preparation of glycerol-enriched yeast culture and its effect on blood metabolites and ruminal fermentation in goats. **Plos One**, v. 9, p. 1371.

ZHANG, Y.; DUBE, M.A.; MCLEAN, D.D.; KATES, M. 2003. Biodiesel production from waste cooking oil: 1. Process design and technological assessment. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 1-16.

## **ARTIGO 1. Glicerina bruta na suplementação alimentar de cabras lactantes em pastagem**

### **RESUMO**

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de níveis de glicerina bruta ao suplemento alimentar fornecido a cabras lactantes mantidas em pastagem de *Panicum maximum* cv. Aruana sobre os parâmetros de desempenho e metabolismo dos animais. Foram utilizadas oito cabras da raça Alpina, com peso corporal de  $45,2 \pm 7,5$  kg, distribuídas em quadrado latino 4×4 duplicado. O suplemento alimentar utilizado foi composto por milho grão, farelo de soja, glicerina bruta (0; 35, 70 e 105 g kg<sup>-1</sup> de glicerina bruta na MS do suplemento alimentar), calcário calcítico e mistura mineral. Não houve efeito da adição de glicerina bruta (GB) sobre o consumo e digestibilidade aparente da matéria seca e dos componentes nutricionais, com exceção do extrato etéreo. O teor de gordura do leite aumentou ( $P = 0,0004$ ) com os níveis de GB. A composição dos ácidos graxos C13:0, C18:1 n9, C18:2 n-6 *cis* e C18:2 n-6 *trans* no leite apresentou efeito quadrático em função dos níveis de GB. Os níveis de GB provocaram efeito quadrático também na proporção de ácidos graxos poli-insaturados, ômega 3 e 6 e a proporção dos ácidos graxos poli-insaturados. Os índices de glicose pré-prandial apresentaram redução linear com a adição de níveis de GB no suplemento alimentar dos animais, porém, foram reestabelecidos pós-prandial. O nitrogênio (N) ureico no plasma sanguíneo, consumo e excreção de N no leite e a proporção de N absorvido e retido pelo organismo dos animais não foram modificados com a adição de GB no suplemento alimentar dos animais. A proporção de N retido em relação ao N ingerido foi maior quando a GB foi adicionada. O fornecimento de GB no suplemento alimentar de cabras sob pastejo permite a melhor utilização do nitrogênio presente na dieta pelo organismo animal e atua como fonte de glicose nas primeiras horas após a alimentação. A GB adicionada ao suplemento alimentar de cabras em pastagem permite a melhor utilização do N pelo organismo animal e atua como fonte de glicose nas primeiras horas após a alimentação, além de elevar o teor de ácidos graxos poli-insaturados no leite, podendo ser adicionada em até 105 g kg<sup>-1</sup> no suplemento de cabras lactantes em pastagem.

**Palavras-chave:** coproduto, glicerol, pequenos ruminantes, sistema a pasto.



## INTRODUÇÃO

A glicerina pode ser utilizada como fonte energética alternativa na alimentação animal, particularmente para ruminantes (Terré et al., 2011; Facuri et al., 2014; Lage et al., 2014). O glicerol contido na glicerina bruta apresenta teor de energia semelhante ao milho grão (Schröder and Südekum, 1999), demonstrando resultados satisfatórios na substituição parcial deste em dietas de ruminantes (Gunn et al., 2010a; Santana Junior et al., 2013; Chanjula et al., 2014).

O composto é disponibilizado diretamente para produção de ácidos graxos de cadeia curta, em especial propionato que serão absorvidos no rúmen para obtenção de energia (Rémond et al., 1993; Wang et al., 2009a). No entanto, o aumento na concentração de propionato e butirato com uso de glicerina nas dietas está relacionado à diminuição no teor de acetato presente no rúmen (Shin et al., 2012).

O glicerol não metabolizado no rúmen, flui para o duodeno junto com a digesta, sendo absorvido no fígado, principalmente para a manutenção dos níveis plasmáticos de glicose (Krehbiel, 2008). No fígado, a depender da condição metabólica do animal, o glicerol é convertido em glicerol-3-fosfato e ADP para ser utilizado na glicólise ou na gliconeogênese (Krehbiel, 2008).

No entanto, a utilização da glicerina pelo organismo animal está diretamente relacionada ao teor de glicerol e das impurezas contidas no composto (Donkin and Doane, 2007). Da mesma forma, a escassez de estudos avaliando a utilização de glicerina bruta na dieta de cabras lactantes e às peculiaridades encontradas nos hábitos de consumo (Van Soest et al., 1994) e no sistema digestório (Chilliard et al., 2003) desta espécie, diferentes efeitos sobre o aproveitamento da glicerina bruta no ambiente ruminal e absorção dos animais podem ser encontrados.

A criação de caprinos em regime de pastejo em condições tropicais requer o uso de concentrados para complementar os nutrientes para atender as exigências nutricionais principalmente em animais lactantes. De acordo com os resultados já reportados na literatura (Chanjula et al., 2015; Ezequiel et al., 2015; Souza et al., 2015; San Vito et al., 2016) referentes a utilização da glicerina bruta, acredita-se que esse coproduto tenha grande potencial como suplemento para cabras em lactação.

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da adição de glicerina bruta ao suplemento alimentar fornecido a cabras da raça Alpina, manejadas em pastagem com capim *Panicum maximum* cv. Aruana,

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local, animais e dietas

O experimento e os procedimentos envolvendo os animais foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e desenvolvidos no setor de Caprinocultura da Fazenda Experimental desta Universidade entre os meses de Outubro e Dezembro de 2013.

Foram utilizadas oito cabras lactantes da raça Alpina, previamente vermifugadas, com peso corporal de  $45,2 \pm 7,5$  kg, após o pico de lactação, em quadrado latino 4×4 duplicado. O experimento foi constituído por quatro períodos de 17 dias, sendo doze dias para adaptação à dieta e cinco dias para a coleta de dados.

Os animais foram mantidos diariamente em uma área de 2,0 ha de pastagem formada por *Panicum maximum* cv. Aruana das 08:00 às 16:00 h, com bebedouro regulado por boia automática com vazão de água suficiente para atender a necessidade de todos os animais.

A avaliação da disponibilidade de massa de forragem do capim *Panicum maximum* cv. Aruana e a simulação de pastejo dos animais foram realizadas ao 17º dia de cada período experimental. Para avaliação quantitativa, a forragem foi cortada rente ao solo em cinco áreas escolhidas aleatoriamente no piquete experimental, sendo delimitadas por um quadrado metálico com lados medindo 0,5 m, segundo método proposto por Gardner (1986). As amostras foram pesadas individualmente utilizando balança digital (CS-15, Filizola, SP, Brasil), homogeneizadas e divididas em duas alíquotas semelhantes, utilizadas para avaliação da disponibilidade total de matéria seca por hectare e análises da composição morfológica (McMeniman, 1997) e químico-bromatológica da forragem.

A simulação de pastejo foi realizada através da observação dos hábitos de consumo dos animais, identificando-se o tipo de material consumido e coletando-se uma amostra semelhante ao alimento ingerido de acordo com o método descrito por Johnson (1978). As amostras de forragem coletadas (massa de forragem e a simulação de pastejo dos animais) foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 h, trituradas em moinho de facas dotado de crivos a 1mm e armazenadas para posteriores análises.

A suplementação dos animais foi realizada duas vezes ao dia (07:00 h e 16:00 h), de forma individual, em cocho de polipropileno, após a ordenha manual. O suplemento alimentar utilizado foi composto por milho grão, farelo de soja, glicerina bruta (0, 35, 70 e 105 g kg<sup>-1</sup> de

GB na MS do suplemento alimentar), calcário calcítico e mistura mineral (Tabela 2). A proporção de volumoso e concentrado consumida pelos animais foi de 45:55.

Tabela 1. Disponibilidade, composição morfológica e químico-bromatológica do pasto *Panicum maximum* cv. Aruana consumido pelos animais durante o período experimental

	Período Experimental			
	P1	P2	P3	P4
Massa de forragem (ton. MS ha <sup>-1</sup> )	3,91	4,67	6,48	4,55
Altura (cm)	36,0	38,1	45,7	40,8
Lâmina foliar (%)	34,7	31,3	21,1	33,3
Colmo e bainha (%)	58,2	58,5	65,1	52,2
Material morto (%)	7,10	10,2	13,8	14,4
Composição químico-bromatológica				
Matéria seca (g kg <sup>-1</sup> )	347	364	357	356
Cinzas (g kg <sup>-1</sup> MS)	62	60	72	71
Matéria orgânica (g kg <sup>-1</sup> MS)	938	940	928	929
Proteína bruta (g kg <sup>-1</sup> MS)	81	78	81	91
FDNcp (g kg <sup>-1</sup> MS)	691	683	663	692
FDNi (g kg <sup>-1</sup> MS)	415	376	345	357
Fibra em detergente ácido (g kg <sup>-1</sup> MS)	365	327	301	315
Extrato Etéreo (g kg <sup>-1</sup> MS)	17	18	14	16
Carboidratos totais (g kg <sup>-1</sup> MS)	840	846	830	822
Carboidratos não fibrosos (g kg <sup>-1</sup> MS)	148	162	168	130

P1: Período entre 21 de Outubro a 05 de Novembro de 2013; P2: Período entre 06 a 22 de Novembro de 2013; P3: Período entre 23 de Novembro a 08 de Dezembro de 2013; P4: Período entre 09 de Dezembro a 25 de Dezembro de 2013; FDNcp: Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; FDNi: Fibra em detergente neutro indigestível

Os suplementos alimentares foram formulados e balanceados segundo NRC (2007) para serem isoenergéticos e isonitrogenados, a fim de atender as exigências nutricionais de manutenção e lactação de cabras após o pico de lactação. A GB foi adicionada como ingrediente energético alternativo a utilização do milho grão e, portanto, sua inclusão apresentou redução na quantidade de milho da dieta para os níveis 35; 70 e 105 g kg<sup>-1</sup> de GB (6,85%; 12,3% e 19,2%, respectivamente) nas dietas experimentais. A análise da composição físico-química da glicerina bruta (434 g kg<sup>-1</sup> de glicerol; 266 g kg<sup>-1</sup> de água; 238 g kg<sup>-1</sup> de ácidos graxos; 36,0 g

kg<sup>-1</sup> de cinzas e 26,0 g kg<sup>-1</sup> de metanol) foi realizado no Instituto de Tecnologia do Paraná – TECPAR, PR, Brasil.

Tabela 2. Proporção de ingredientes e composição químico-bromatológica do suplemento alimentar

	Glicerina bruta (g kg <sup>-1</sup> )			
	0	35	70	105
Milho grão moído (g kg <sup>-1</sup> MS)	635	591	556	513
Farelo de soja (g kg <sup>-1</sup> MS)	339	348	348	356
Glicerina bruta (g kg <sup>-1</sup> MS)	0	35	70	105
Calcário calcítico (g kg <sup>-1</sup> MS)	87	87	87	87
Mistura mineral <sup>1</sup> (g kg <sup>-1</sup> MS)	174	174	174	174
Composição químico-bromatológica				
Matéria seca (g kg <sup>-1</sup> )	876	871	867	862
Cinzas (g kg <sup>-1</sup> MS)	33	34	35	37
Matéria orgânica (g kg <sup>-1</sup> MS)	967	966	965	963
Proteína bruta (g kg <sup>-1</sup> MS)	217	217	214	214
Extrato etéreo (g kg <sup>-1</sup> MS)	27	34	41	48
FDNcp (g kg <sup>-1</sup> MS)	119	116	112	108
Fibra em detergente ácido (g kg <sup>-1</sup> MS)	52	51	50	50
Carboidratos totais (g kg <sup>-1</sup> MS)	723	715	710	701
Carboidratos não fibrosos (g kg <sup>-1</sup> MS)	604	599	598	593
Nutrientes digestíveis totais (g kg <sup>-1</sup> MS)	798	793	789	784
Perfil de ácidos graxos (g 100 g <sup>-1</sup> de ácidos graxos totais)				
C14:0	0,15	0,15	0,15	0,14
C16:0	14,10	14,23	14,32	14,45
C18:0	2,79	2,90	2,99	3,09
C18:1n7	1,44	1,47	1,49	1,52
C18:1n9	26,92	26,63	26,49	26,19
C18:2n6	47,15	47,27	47,32	47,44
Outros	7,45	7,35	7,24	7,17

<sup>1</sup>Mistura mineral: Cálcio, 230 g; Fósforo, 160 g; Sódio, 102 g; Enxofre, 5800 mg; Ferro, 1300 mg; Cobre, 1000 mg; Manganês, 800 mg; Zinco, 2680 mg; Cobalto, 100 mg; Iodo, 77 mg; Magnésio, 2000 mg; Selênio, 15 mg; FDNcp: Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína

## **Análises químicas-bromatológicas da forragem, alimentos e fezes**

As análises químico-bromatológicas da forragem, alimentos e fezes foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. A matéria seca foi determinada pela desidratação das amostras em estufa a 105 °C por 3 horas de acordo com método 930.15 descrito pela (AOAC, 1998). As cinzas foram obtidas pela combustão das amostras a 550 °C por 16 horas (AOAC, 1998; ID 942.05). A matéria orgânica (MO) foi determinada pela fórmula:  $MO (\% MS) = 100 - MM (\% MS)$  da forragem, alimentos e fezes. A concentração de nitrogênio (N) foi determinada pelo método Kjeldahl (AOAC, 1998; ID 988.05) e, posteriormente a proteína bruta (PB) foi determinada pela multiplicação do teor de N obtido e o fator 6,25.

O extrato etéreo (EE) foi obtido de acordo com a metodologia descrita pela AOAC (1998; ID 920.39). O teor de fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína foi determinado segundo recomendações de Licitra et al. (1996) e adaptações propostas por Mertens (2002). O teor de fibra em detergente ácido das amostras foi obtido de acordo com o método 973.18 descrito pela AOAC (1998). Os carboidratos totais (CT) foram calculados pela equação:  $CT = 100 - (\% PB + \% EE + \% Cinzas)$  descrita por Sniffen et al. (1992). Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram estimados pela diferença entre os CT e FDN. Os nutrientes digestíveis totais foram obtidos pela digestibilidade aparente (d) dos componentes nutricionais de acordo com a equação proposta pelo NRC (2001):  $NDT (\%) = dCNF + dPB + (dEE \times 2,25) + dFDN$ . A proporção de componentes nutricionais presentes na forragem, alimentos e fezes foram apresentados em gramas por kg de matéria seca ( $g\ kg^{-1}\ MS$ ).

## **Consumo e coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca e componentes nutricionais**

O fornecimento de suplemento alimentar foi calculado pelo NRC (2007) a fim de atender as exigências nutricionais de cabras no terço médio de lactação em função do peso vivo e da produção de leite.

O consumo de forragem foi estimado pelo cálculo proposto por Detmann et al. (2001). Para estimar o consumo de forragem foram utilizados dois marcadores, o dióxido de titânio ( $TiO_2$ ) foi o marcador externo usado para estimar a excreção fecal de MS, sendo fornecido aos animais 2 gramas por 10 dias consecutivos no suplemento alimentar (sete dias para a estabilização de excreção do marcador nas fezes e três dias de coleta). Durante os três dias finais de cada período experimental, foram realizadas coletas de fezes dos animais. As

amostras foram coletadas individualmente e diretamente da ampola retal, seguindo a distribuição: 1º dia (8:00 h e 14:00 h), 2º dia (10:00 h e 16:00 h) 3º dia (12:00 h e 18:00 h). A análise do dióxido de titânio presente nas fezes foi realizada por colorimetria (Titgemeyer et al., 2001). As amostras de fezes foram armazenadas a -10 °C e ao final do período experimental foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 h, trituradas em moinho de facas dotado de crivos a 1mm e armazenadas para posteriores análises.

A excreção da matéria seca fecal foi estimada com base na razão entre a quantidade de indicador (TiO<sub>2</sub>) fornecido aos animais e sua concentração nas fezes, sendo:

$$\text{MS Fecal (kg d}^{-1}\text{)} = \text{QFT} / \text{CTFz}$$

Em que: QFT = quantidade fornecida de TiO<sub>2</sub> (g); CTFz = concentração de TiO<sub>2</sub> nas fezes (g kg<sup>-1</sup> de fezes).

Para determinar o consumo individual de forragem, a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) foi utilizada como marcador interno. O consumo de forragem foi obtido pela relação entre a concentração de FDNi na forragem, e o seu teor nas fezes dos animais.

Para quantificar a FDNi, amostras de fezes, forragem e alimentos foram incubadas *in situ* utilizando sacos F57 (Ankom Technology, NY, USA), por um período de 288 horas (Valente et al., 2011). A quantidade da amostra incubada foi de 20 mg MS/cm<sup>2</sup> para forragem, alimentos e fezes. O material remanescente da incubação foi submetido à extração com detergente neutro e o resíduo considerado como a fração indigestível (FDNi).

### **Produção, composição e perfil dos ácidos graxos do leite**

A produção e a composição do leite dos animais foram mensuradas em cada período com base em duas ordenhas diárias (07:00 h e 16:00 h), realizadas de maneira manual, durante cinco dias consecutivos de coletas. Após a coleta, as amostras foram individualmente armazenadas em frascos plásticos, utilizando 2-bromo 2-nitropropano 1-3-diol (Bromopol) como conservante, e encaminhadas à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Clínica do Leite, SP, Brasil; para análises quantitativas do leite (teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado) segundo métodos descritos por IDF (1996). As análises foram realizadas utilizando analisador infravermelho Bentley-2000 (Bentley Instruments, MN, USA). A correção do teor de gordura do leite para 3,5% foi realizada conforme a equação de Gravert (1987):

$$\text{LCG 3,5\%} = (0,4337 \times \text{kg de leite}) + (16,218 \times \text{kg de gordura})$$

### **Perfil dos ácidos graxos do leite**

As análises para quantificação dos ácidos graxos da gordura do leite foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá. Para obter a composição dos 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 (2000) usando KOH/metanol (Synth, SP, Brasil) e n-heptano (Vetec, RJ, Brasil). Foram transferidos aproximadamente 100 mg da gordura do leite de cada amostra para tubos tipo Falcon (Consalab, SP, Brasil) com tampa rosqueável e capacidade máxima de 10 mL, onde foram adicionados 2,0 mL de n-heptano. O material foi agitado até solubilização total da gordura, sendo adicionado 2,0 mL de solução composta por 2 mol/L de KOH em metanol e realizado a agitação vigorosa por mais 5 minutos. Após separação das fases, o sobrenadante contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos foi cuidadosamente pipetado, transferido para *vials* (Sigma-Aldrich, SP, Brasil) de vidro até a realização da injeção em cromatógrafo gasoso.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram quantificados em cromatógrafo gasoso (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, FL, USA) auto-amostrador, equipado com detector de ionização de chama a 240°C e coluna capilar de sílica fundida (100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 µm, Restek 2560). O fluxo de gases foi de 1,5 mL/min de H<sub>2</sub> (gás de arraste), 30 mL/min para N<sub>2</sub> (gás auxiliar) e 35 e 350 mL/min, respectivamente, para o H<sub>2</sub> e ar sintético (gases para chama). A temperatura inicial da coluna foi estabelecida em 65°C, mantida por 8 minutos, 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 minutos. A quantificação dos ácidos graxos da amostra foi efetuada por comparação com o tempo de retenção de ésteres metílicos de ácidos graxos de amostras padrões (Sigma-Aldrich, SP, Brasil).

### **Metabólitos do sangue**

A coleta de sangue foi realizada ao 16º dia de cada período experimental, em jejum e após quatro horas do arraçoamento matinal, a partir da veia jugular, coletado em tubos a vácuo contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para as análises de ureia e fluoreto de potássio para as análises de glicose. Logo após a coleta de sangue, os tubos a vácuo foram refrigerados e submetidos à centrifugação (80-2B, Centribio, SP, Brasil) a 3.200 rpm por 10 min para a total separação do plasma sanguíneo. Após, o plasma sanguíneo oriundo de tubos à

vácuo com EDTA foram acondicionados em tubos tipo Eppendorf (3810X, Eppendorf, SP, Brasil) e armazenados a -20°C para posteriores análises. Os valores de ureia foram convertidos em nitrogênio ureico multiplicando pelo fator 0,4667, que corresponde ao teor de nitrogênio na ureia. Enquanto, o plasma oriundo de tubos a vácuo com fluoreto de potássio foi imediatamente testado para teores de glicose. As análises de metabólitos sanguíneos foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, com o uso de kits comerciais (Doles, GO, Brasil).

### **Balço de Nitrogênio**

Ao 16º dia de cada período experimental, aproximadamente quatro horas após o fornecimento da suplementação matinal, foram realizadas coletas individuais de urina na forma de amostra *spot* por micção espontânea dos animais. As amostras coletadas foram filtradas em gaze e alíquotas de 10 mL foram separadas e diluídas com 40 mL de ácido sulfúrico (0,036 N) de acordo com metodologia proposta por Valadares et al. (1999) e congeladas a -20 °C para posteriores análises. O volume total urinário foi estimado a partir da razão entre a excreção urinária diária de creatinina (mg/L) e a concentração de creatinina (mg/L) na amostra *spot* de urina. O valor de excreção diária de creatinina utilizado foi de 26,05 mg / kg de PV, conforme descrito por Fonseca et al. (2006) para cabras Alpinas em lactação.

As amostras de alimentos, urina e fezes foram analisadas quanto ao teor nitrogênio total segundo o método Kjeldahl (AOAC, 1998; ID 988.05). O nitrogênio ureico do leite foi analisado pelo método enzimático e espectrofotométrico de transreflectância (Chem Spec 150, Bentley Instruments, MN, USA).

O balanço de nitrogênio (BN) no organismo animal foi calculado pela equação adaptada de Decandia et al. (2000), sendo:

$$\text{BN} = \text{N ingerido (g)} - \text{N nas fezes (g)} - \text{N na urina (g)} - \text{N no leite (g)}$$

### **Análises estatísticas**

O delineamento experimental foi em quadrado latino 4×4 duplicado e os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o programa SAS (2004). Os dados obtidos foram analisados por PROC MIXED (Statistical Analysis System - SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) onde o tratamento, período e quadrado foram utilizados como efeitos fixos e o animal como efeito aleatório. As médias foram comparadas por meio de Contrastos Ortogonais. O



primeiro contraste comparou o tratamento controle (sem glicerina bruta) e tratamentos com inclusão da glicerina bruta (GB) e os demais permitiram a avaliação de efeitos de ordem linear (L) e quadrática (Q) em função dos níveis de adição de glicerina bruta no suplemento alimentar dos animais.

## RESULTADOS

### Consumo e coeficiente de digestibilidade aparente de matéria seca e componentes nutricionais

O consumo de forragem, de matéria seca (total e % PV), fibra em detergente neutro e de proteína bruta não diferiram ( $P > 0,05$ ) com a adição de glicerina bruta (GB) ao suplemento alimentar ofertado a cabras lactantes manejadas em pastagem (Tabela 3). No entanto, a adição de GB no suplemento alimentar aumentou o consumo de extrato etéreo (CEE) pelos animais ( $P = 0,0002$ ). O CEE dos animais apresentou efeito linear crescente ( $P = 0,0004$ ) em função da adição de GB no suplemento alimentar dos animais.

Tabela 3. Consumo da matéria seca e componentes nutricionais

	Glicerina Bruta (g kg <sup>-1</sup> )				EPM	P – valor		
	0	35	70	105		0 vs. GB	L	Q
CMSF (g d <sup>-1</sup> )	1130	1136	934	1329	0,06	0,979	0,235	0,065
CSUP (g d <sup>-1</sup> )	1035	914	1004	877	0,03	0,104	0,618	0,126
CMST (g d <sup>-1</sup> )	2165	2050	1938	2206	0,06	0,517	0,379	0,285
CMS (% PV)	4,82	4,61	4,36	4,91	0,15	0,565	0,451	0,278
CFDN (g kg <sup>-1</sup> )	992	885	791	1020	0,04	0,292	0,209	0,123
CFDN (% PV)	2,22	2,01	1,68	2,31	0,11	0,355	0,303	0,075
CPB (g kg <sup>-1</sup> )	315	288	293	312	0,01	0,270	0,218	0,666
CEE (g kg <sup>-1</sup> )	459	521	627	708	0,01	<0,01	<0,01	0,742
CNF (g kg <sup>-1</sup> )	707	725	751	676	0,02	0,861	0,711	0,157

EPM: Erro padrão da média; CMSF: Consumo de matéria seca da forragem; CSUP: Consumo de matéria seca do suplemento alimentar; CMST: Consumo de matéria seca total; CMS: Consumo de matéria seca em percentagem do peso vivo; CFDN: Consumo de fibra em detergente neutro; CPB: Consumo de proteína bruta; CEE: Consumo de extrato etéreo; CNF: Consumo de carboidratos não fibrosos; L = linear; Q = quadrático.

A adição de GB no suplemento alimentar dos animais não influenciou ( $P > 0,05$ ) o coeficiente de digestibilidade da matéria seca (DMS), fibra em detergente neutro (DFDN) e proteína bruta (DPB; Tabela 4). Porém, a adição de GB aumentou ( $P = 0,001$ ) o coeficiente

de digestibilidade do extrato etéreo (DEE) das dietas. A DEE das dietas apresentou efeito quadrático ( $P = 0,031$ ) em função dos níveis de GB.

Tabela 4. Coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca e componentes nutricionais

	Glicerina Bruta ( $\text{g kg}^{-1}$ )				EPM	$P$ – valor		
	0	35	70	105		0 vs. GB	L	Q
DMS ( $\text{g kg}^{-1}$ )	679	671	708	664	0,85	0,886	0,769	0,063
DFDN ( $\text{g kg}^{-1}$ MS)	484	455	463	451	1,03	0,063	0,781	0,548
DPB ( $\text{g kg}^{-1}$ MS)	751	730	780	742	0,97	0,978	0,649	0,066
DEE ( $\text{g kg}^{-1}$ MS)	541	623	752	684	2,30	0,001	0,215	0,031
DCNF ( $\text{g kg}^{-1}$ MS)	879	866	892	852	0,60	0,470	0,444	0,286

EPM: Erro padrão da média; DMS: Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca; DFDN: Coeficiente de digestibilidade aparente da fibra em detergente neutro; DPB: Coeficiente de digestibilidade aparente da proteína bruta; DEE: Coeficiente de digestibilidade aparente do extrato etéreo; DCNF: Digestibilidade dos carboidratos não fibrosos; L = linear; Q = quadrático.

### Produção e composição do leite

A adição de GB ao suplemento alimentar fornecido a cabras mantidas em pastagem não influenciou ( $P > 0,05$ ) a produção de leite ( $\text{kg d}^{-1}$  e corrigido para 3,5% de gordura), teor de proteína, de lactose, de sólidos totais e o extrato seco desengordurado do leite no terço médio de lactação (Tabela 5). No entanto, a concentração de gordura presente no leite apresentou efeito linear crescente ( $P = 0,011$ ) em função da adição de GB no suplemento alimentar.

Tabela 5. Produção e composição do leite

	Glicerina Bruta ( $\text{g kg}^{-1}$ )				EPM	$P$ – valor		
	0	35	70	105		0 vs. GB	L	Q
PL ( $\text{kg d}^{-1}$ )	2,31	2,31	2,24	2,16	0,09	0,433	0,182	0,902
PLC ( $\text{kg d}^{-1}$ )	2,07	2,07	2,04	2,00	0,09	0,683	0,476	0,989
Gordura (%)	2,82	2,83	2,90	3,05	0,08	0,133	0,011	0,577
Proteína (%)	2,81	2,76	2,73	2,71	0,03	0,197	0,472	0,994
Lactose (%)	4,30	4,33	4,35	4,33	0,03	0,189	0,908	0,581
Sólidos totais (%)	10,9	10,9	10,9	10,9	0,12	0,368	0,112	0,835
ESD (%)	8,06	8,05	8,04	8,00	0,05	0,538	0,359	0,792

EPM: Erro padrão da média; PL: Produção de leite; PLC: Produção de leite corrigido para 3,5% de gordura; ESD: Extrato seco desengordurado; L = linear; Q = quadrático.

### Perfil dos ácidos graxos do leite

Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) na concentração de ácidos graxos do leite de cabras mantidas em pastagem e alimentadas com ou sem GB no suplemento alimentar, exceto para C22:1n9 (Tabela 6). Os ácidos graxos de cadeia curta (C6 – C8) e média (C10 – C16) no leite de cabras não foram influenciados pelos níveis de adição de GB no suplemento alimentar, exceto o ácido graxo n-tridecílico (C13:0). As mudanças geradas pelos níveis de adição de GB na composição dos ácidos graxos foram caracterizadas pelo efeito quadrático dos ácidos graxos C13:0 ( $P = 0,019$ ), C18:1 n9 ( $P = 0,042$ ), C18:2 n-6 *cis* ( $P = 0,014$ ) e C18:2 n-6 *trans* ( $P = 0,029$ ). Enquanto, os níveis de adição de GB no suplemento alimentar aumentaram a concentração de C22:1 n9 ( $P = 0,014$ ).

Os valores médios relativos aos somatórios de ácidos graxos do leite não foram alterados ( $P > 0,05$ ) com a adição de GB no suplemento alimentar dos animais (Tabela 7). Entretanto, os níveis de adição de GB foram responsáveis pelo efeito quadrático observado na proporção de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI;  $P = 0,012$ ), ômega 3 (n-3;  $P = 0,030$ ) e ômega 6 (n-6;  $P = 0,018$ ) e a proporção dos ácidos graxos poli-insaturados em detrimento dos ácidos graxos saturados (AGPI:AGS;  $P = 0,016$ ).

Tabela 6. Perfil de ácidos graxos do leite (g/ 100g de ácidos graxos totais)

	Glicerina Bruta (g kg <sup>-1</sup> )				EPM	P – valor		
	0	35	70	105		0 vs. GB	L	Q
C6:0	0,89	0,87	0,85	0,87	0,03	0,775	0,964	0,957
C8:0	1,81	1,77	1,78	1,78	0,06	0,831	0,918	0,898
C10:0	8,59	8,13	7,83	8,52	0,17	0,310	0,473	0,480
C12:0	5,54	5,18	5,25	4,99	0,14	0,216	0,454	0,375
C13:0	0,21	0,18	0,20	0,18	0,01	0,071	0,996	0,019
C14:0	12,1	12,2	12,2	12,0	0,22	0,785	0,840	0,437
C16:0	30,3	29,9	27,1	29,1	0,56	0,241	0,583	0,295
C17:0	0,96	1,06	0,93	1,01	0,05	0,817	0,738	0,427
C18:0	11,5	11,0	11,9	11,8	0,47	0,798	0,410	0,239
C20:0	0,05	0,05	0,04	0,05	0,14	0,463	0,716	0,517
C22:0	0,03	0,01	0,01	0,02	0,01	0,231	0,502	0,563
C14:1	0,91	0,92	0,77	0,83	0,08	0,738	0,724	0,721
C15:1	0,02	0,03	0,02	0,03	0,01	0,189	0,907	0,299
C16:1	1,49	1,60	1,37	1,59	0,07	0,941	0,928	0,177
C17:1	0,23	0,29	0,24	0,28	0,02	0,422	0,809	0,397
C18:1n9	22,9	24,2	26,4	24,1	0,64	0,109	0,993	0,042
C20:1	0,08	0,08	0,08	0,07	0,01	0,319	0,701	0,428
C22:1n9	0,03	0,03	0,04	0,05	0,01	0,014	0,560	0,998
C24:1	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,205	0,415	0,979
C18:2 n-6 <i>cis</i>	0,24	0,20	0,26	0,19	0,01	0,302	0,890	0,014
C18:2 n-6 <i>trans</i>	0,18	0,16	0,21	0,15	0,01	0,810	0,523	0,029
C20:2	0,69	0,80	0,99	0,81	0,06	0,192	0,944	0,187
C18:3 n-3	1,00	1,04	1,14	1,20	0,01	0,746	0,965	0,460
C18:3 n-6	0,26	0,24	0,25	0,26	0,01	0,638	0,406	0,747
C20:3 n-6	0,03	0,02	0,02	0,02	0,01	0,196	0,603	0,571
C20:5 n-3	0,06	0,08	0,08	0,09	0,01	0,260	0,110	0,546

EPM: Erro padrão da média; L = linear; Q = quadrático.

Tabela 7. Valores médios relativos aos somatórios dos ácidos graxos do leite (g/ 100g de ácidos graxos totais)

	Glicerina Bruta (g kg <sup>-1</sup> )				EPM	P – valor		
	0	35	70	105		0 vs. GB	L	Q
AGS	72,9	71,4	69,3	71,5	0,69	0,085	0,957	0,057
AGI	27,1	28,6	30,7	28,5	0,44	0,094	0,881	0,433
AGMI	25,6	27,0	28,8	26,9	0,44	0,080	0,862	0,453
AGPI	1,55	1,58	1,91	1,62	0,03	0,519	0,741	0,012
n-3	0,11	0,11	0,12	0,12	0,01	0,760	0,531	0,030
n-6	0,75	0,68	0,80	0,69	0,02	0,511	0,809	0,018
n-6:n-3	6,63	6,27	6,51	5,74	0,23	0,797	0,430	0,815
AGPI:AGS	0,02	0,02	0,03	0,02	0,01	0,576	0,925	0,016

EPM: Erro padrão da média; AGS: Ácidos graxos saturados; AGI: Ácidos graxos insaturados; AGMI: Ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: Ácidos graxos poli-insaturados; n-3: Ácidos graxos ômega 3; n-6: Ácidos graxos ômega 6; AGPI:AGS: Proporção dos ácidos graxos poli-insaturados em detrimentos dos ácidos graxos saturados; L = linear; Q = quadrático.

### Metabólitos do sangue, consumo e balanço de nitrogênio

Os níveis séricos de glicose pós-prandial e nitrogênio (N) ureico não foram alterados ( $P > 0,05$ ) pela adição de GB no suplemento alimentar dos animais (Tabela 8). No entanto, os índices de glicose pré-prandial foram reduzidos ( $P < 0,001$ ) em função do aumento dos níveis de adição de GB na dieta dos animais.

O consumo de N não foi alterado ( $P = 0,272$ ) e nem a excreção de N na urina ( $P = 0,185$ ) pela adição de GB no suplemento alimentar de cabras mantidas em pastagem. No entanto, a excreção de N nas fezes apresentou efeito quadrático ( $P = 0,039$ ) com o aumento dos níveis de GB no suplemento alimentar.

A excreção de N no leite ( $P = 0,315$ ) e a proporção de N absorvido ( $P = 0,256$ ) e retido ( $P = 0,834$ ) pelo organismo dos animais não foi modificado pela adição de GB no suplemento. Entretanto, a proporção de N retido em detrimentos ao N ingerido teve efeito linear crescente ( $P < 0,001$ ) para os níveis de GB.

Tabela 8. Metabólitos sanguíneos e balanço de nitrogênio

	Glicerina Bruta (g kg <sup>-1</sup> )				EPM	P - valor		
	0	35	70	105		0 vs.GB	L	Q
Metabólitos sanguíneos (mg dL <sup>-1</sup> )								
Glicose pré-prandial	75,5	81,5	65,4	53,1	3,10	0,067	<0,001	0,681
Glicose pós-prandial	69,5	75,2	72,1	66,6	3,73	0,803	0,321	0,875
N ureico plasmático	15,2	14,4	14,9	11,9	1,27	0,251	0,124	0,213
Balanço de N								
N ingerido (g d <sup>-1</sup> )	50,5	46,1	46,9	50,0	1,29	0,272	0,222	0,675
N na urina (g d <sup>-1</sup> )	4,96	4,57	3,64	3,69	1,07	0,185	0,328	0,507
N nas fezes (g d <sup>-1</sup> )	12,6	12,4	10,1	13,9	0,57	0,717	0,338	0,039
N no leite (g d <sup>-1</sup> )	11,0	10,8	10,5	9,88	0,45	0,315	0,192	0,776
N absorvido (g d <sup>-1</sup> )	37,9	33,7	36,8	36,1	1,13	0,256	0,345	0,395
N retido (g d <sup>-1</sup> )	21,9	18,3	22,7	22,5	1,08	0,834	0,107	0,949
N retido:ingerido	0,43	0,40	0,48	0,45	0,01	0,977	<0,001	0,008

EPM: Erro padrão da média; L = linear; Q = quadrático.

## DISCUSSÃO

A ausência de efeitos da GB sobre o consumo de MS, e conseqüentemente, no CPB e, CFDN corroboram com a literatura (Chanjula et al., 2014; Avila-Stagno et al., 2014; San Vito et al., 2016) que demonstraram que a ingestão dessas frações dietéticas não foram modificadas com a inclusão desse composto, sendo esses resultados associados a utilização da GB contendo acima de 85% de glicerol. No entanto, seu efeito sobre o consumo para animais em pastejo ou confinados depende da presença de impurezas e concentração de glicerol (Lage et al., 2014; Chanjula et al.; 2016) e da proporção de concentrado e volumoso utilizada na dieta total dos animais (Wang et al., 2009b).

Efeitos deletérios sobre o consumo foram encontrados quando animais consumiram glicerina com elevados teores de ácidos graxos e glicerol abaixo de 70% (Lage et al., 2014; Chanjula et al., 2016) ou quantidades elevadas de sais (Gunn et al., 2010b; Ezequiel et al., 2015). Apesar da baixa pureza da GB utilizada (434 g kg<sup>-1</sup> de glicerol; 26,0 g kg<sup>-1</sup> de metanol e 238 g kg<sup>-1</sup> de ácidos graxos), as exigências nutricionais para cabras no terço médio de lactação (NRC, 2007) foram atendidas (Tabela 3). Entretanto, a concentração de ácidos graxos presentes na GB elevou o teor de extrato etéreo do suplemento alimentar em até 34%

(Tabela 2), o que proporcionou maior consumo (CEE) e digestibilidade do extrato etéreo (DEE) pelos animais alimentados com níveis de GB, corroborando com Chanjula et al. (2016) que observaram aumento na DEE e atribuíram esses resultados ao teor de lipídeos contidos na glicerina (47,78%). Porém, esses autores encontraram depressão no consumo e digestibilidade da MS.

Segundo Lage et al. (2010), falhas envolvidas no processo de separação entre biodiesel e glicerol, assim como, os ácidos graxos presentes na matéria prima extraída para a produção de GB estão relacionados com a pureza do composto obtido e apresentam efeito sobre seu aproveitamento pelo trato digestório de ruminantes. Dessa forma, o CMS dos animais alimentados com GB na dieta não está associado somente à concentração de glicerol existente no composto, mas também ao teor de impurezas presente no coproduto e o seu nível de utilização nas dietas.

A glicerina apresenta maior degradabilidade ruminal frente ao amido, sendo justificado pelo seu rápido desaparecimento do ambiente ruminal devido à absorção do composto pelo trato gastrointestinal do animal, ou ainda, devido a sua rápida fermentação pelos microrganismos do rúmen (Schröder and Südekum, 1999). Diversos autores demonstraram que além do consumo, a digestibilidade aparente da matéria seca e componentes nutricionais da dieta também está relacionada com a pureza do composto utilizado e com o nível de glicerina fornecido aos animais (Santana Junior et al., 2013; Wilbert et al., 2013; Chanjula et al., 2014).

De acordo com Krueger et al. (2010) a adição acima de 200 g kg<sup>-1</sup> de glicerina de alta pureza na MS da dieta apresenta efeitos negativos sobre a cinética ruminal *in vitro*, reduzindo a produção de ácidos graxos voláteis e demonstrando baixos índices de digestão da fibra pelas bactérias ruminais. Enquanto, AbuGhazaleh et al. (2011) observaram que a ingestão diária de até 36 g kg<sup>-1</sup> de glicerina de alta pureza na MS da dieta (995 g kg<sup>-1</sup> de glicerol) não afeta a população microbiana e a fermentação ruminal de vacas alimentadas com 400 g kg<sup>-1</sup> de volumoso e 600 g kg<sup>-1</sup> de concentrado, corroborando com Abo El-Nor et al. (2010) quando não observaram alterações na DMS com a adição de até 72 g kg<sup>-1</sup> de glicerina de alta pureza na dieta de vacas (995 g kg<sup>-1</sup> de glicerol). Os autores ressaltam ainda que os efeitos negativos sobre as populações de bactérias responsáveis pela fermentação e degradação da fibra são encontrados a partir da adição de 72 g kg<sup>-1</sup> do composto na MS da dieta.

Provavelmente, a alta seletividade na ingestão de forragem ocasionada pelos hábitos de pastejo dos animais (Van Soest et al., 1994) e a elevada metabolização e absorção da GB no

trato digestório de ruminantes (Krehbiel, 2008) pode ter favorecido a semelhança entre os coeficientes de digestibilidade aparente dos suplementos alimentares.

Os resultados do presente estudo referentes a produção e composição do leite são consistentes com dados da literatura, indicando que fontes de lipídios na dieta de cabras lactantes elevam de forma significativa o teor de gordura do leite e não aumenta a produção do leite (Chilliard et al., 2003; Bernard et al., 2005; Chilliard et al., 2014).

A composição dos ácidos graxos de cadeia curta e média (C6-C14 e parte do C16) presentes na gordura do leite mostram que a inclusão de GB possivelmente não interferiu na *síntese de novo* na glândula mamária. É provável que a GB não influenciou a produção de acetato e beta-hidroxibutirato, resultantes da fermentação ruminal e precursores para a *síntese de novo* de ácidos graxos por células epiteliais mamária (Palmquist et al., 1993). Entretanto, outros fatores além da dieta, como paridade, raça, genótipo, estágio de lactação e a expressão de genes também podem influenciar a lipogênese na glândula mamária de caprinos (Chilliard et al., 2003).

A presença de ácidos graxos de cadeia ímpar no leite está relacionada a absorção intestinal de lipídeos da membrana de bactérias que deixam o rúmen (Eifert et al., 2006; Vlaeminck et al., 2006). Os resultados encontrados neste estudo demonstram efeito quadrático no C13:0, porém os ácidos graxos C15:1, C17:0 e C17:1, que também são de cadeia ímpar não foram influenciados pela adição de GB. Ainda não está totalmente elucidado o processo de regulação da composição lipídica pelas bactérias, porém, Demeyer & Doreau (1999) relataram que em dietas contendo altas proporções de lipídios, pode haver incorporação de ácidos graxos de cadeia longa na estrutura da membrana das bactérias e protozoários, inibindo a *síntese de novo* microbiana, o que justifica a menor proporção de ácidos de cadeia ímpar nas dietas com GB.

Dietas a base de forragens, em particular, de forragem jovem é uma maneira eficiente em aumentar as concentrações de ácidos graxos insaturados na gordura do leite, como por exemplo, o C18:1n9, C18:1t11, C18:2c9t11 e C18:3n3 (Nudda et al., 2003; Ferlay et al., 2008). A secreção do C18:1n9 no leite pode ser aumentada pela ingestão dietética, como adição de óleos vegetais desprotegidos ou sementes contendo altos níveis de ácidos oleico, linoleico e linolênico ou através da ação da dessaturase mamária sobre o ácido esteárico (Chilliard e Ferlay 2004). O ácido oleico do leite do presente estudo teve aumento de 22,9 (sem adição de GB) para 26,4 g/ 100 g de ácidos graxos totais com adição de 70 g kg<sup>-1</sup> de GB, havendo efeito quadrático, comportamento esse também verificado para o ácido linoleico (C18:2n6), que pode ser justificado pela presença desses ácidos graxos na GB (30 e 47 g/100g



AG para o C18:1 n9 e C18:2 n6, respectivamente). Além disso, o glicerol pode reduzir a lipólise ruminal em até 77%, e conseqüentemente, promover maior taxa de passagem ruminal dos lipídeos (Krueger et al., 2010), proporcionando assim maiores proporções de gordura insaturada benéfica para serem incorporadas ao leite.

Nesta pesquisa, não houve diferença entre dietas para a relação n-6 e n-3, e todos os valores estão acima do máximo recomendado por Wood et al. (2003), que preconizam que valores abaixo de 4 no leite são benéficos para a saúde humana. Sendo a relação n-6 e n-3 indicador importante da qualidade nutricional do leite, sendo que esta relação tem influência sobre o aparecimento de doenças como câncer e doenças coronarianas, entre outros (Enser et al., 2001).

A glicerina apresenta alta capacidade de metabolização pelos microrganismos ruminais, sendo fermentado em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no ambiente ruminal (Bergner 1995). Krehbiel (2008) relata que 13% do glicerol consumido na dieta desaparece do rúmen acompanhando a digesta, 44% pela fermentação e 43% pela absorção através da parede ruminal. Corroborando com Rémond et al. (1993) quando afirma que a fermentação em AGCC no ambiente ruminal, principalmente em propionato, é a grande responsável pelo desaparecimento do glicerol consumido na dieta. Além disso, a glicerina presente na dieta pode ser absorvida através da parede ruminal ou carregada com a digesta até o intestino delgado dos animais (Gunn et al., 2010b). De modo geral, o fornecimento de níveis de glicerina está associado à redução nas concentrações de amido presente nas dietas, afetando a taxa de passagem pelo trato gastrointestinal e a fermentação ruminal, resultando na maior absorção do composto e de nutrientes pelo intestino delgado dos animais.

Dessa forma, a glicerina absorvida diretamente pelo trato gastrointestinal é metabolizada à glicose no fígado, aumentando a concentração de glicose sérica de ruminantes (Brisson et al., 2011). Enquanto, parte do propionato absorvido pelo epitélio ruminal é convertido à piruvato e o remanescente é convertido em glicose após o ciclo de Krebs, sendo considerada a principal fonte precursora de energia em ruminantes (Kozloski, 2011; Krehbiel, 2008).

No presente estudo, a rápida metabolização da glicerina em ácido propiônico no ambiente ruminal e, ainda, a transformação hepática do glicerol absorvido pelo trato gastrointestinal, elevou os níveis de glicose sérica nas primeiras horas após a alimentação. De fato, houve semelhança nos índices de glicose pós-prandial observados 4 horas após a alimentação dos animais, indiferente do suplemento alimentar utilizado. Entretanto, a limitada ação da glicose em ruminantes e a sua rápida metabolização pelas enzimas hepáticas

(González et al., 2000) explicam o déficit energético encontrado em animais alimentados com níveis de GB após 16 horas do fornecimento do suplemento alimentar (i.e. glicose pré-prandial).

O balanço de nitrogênio (N) no organismo animal permite avaliar o equilíbrio metabólico e a eficiência do metabolismo proteico sob determinadas condições alimentares e fisiológicas (Kolb, 1987). Segundo Bach et al. (2005) a capacidade de utilização do N pelos microrganismos ruminais é um dos fatores limitantes da degradação proteica, podendo ser mensurado pelo acúmulo de N no rúmen. Além desse, a determinação do N excretado nas fezes e urina têm se mostrado como indicador confiável do teor de N sanguíneo (Broderick, 2003).

De acordo com Van Soest (1994), a quantidade de N retido pelo organismo está relacionada com o teor de proteína bruta da dieta. Assim, em situações onde a taxa de degradação proteica dos alimentos excede a fermentação de carboidratos presentes no rúmen ocorre à excessiva formação de amônia, sendo essa em partes não aproveitada pela microbiota ruminal e absorvida para a corrente sanguínea (Russel, 1992).

Após a absorção, a amônia é metabolizada em ureia no fígado, sendo circulante no organismo e após excretada na urina, ou ainda, reciclada pela saliva e corrente sanguínea para ser reutilizada no ambiente ruminal (Butler et al., 1996). Dessa forma, o excesso de N excretado na urina, fezes e leite dos animais é indicativo da ineficiência da utilização da proteína degradável no rúmen (PDR) fornecida pela dieta. Assim como, os teores de N ureico no plasma sanguíneo são indicadores sensíveis e imediatos da conversão de amônia pelo fígado, e conseqüentemente, da ingestão da proteína pelos animais.

No presente estudo, o semelhante consumo de proteína bruta pelos animais permitiu que a ingestão de N fosse similar entre os tratamentos. Dessa forma, os valores de N ureico no plasma sanguíneo encontram-se dentro dos padrões de referência para cabras lactantes (12,3 – 16,9 mg dL<sup>-1</sup> de N ureico), indicando adequada metabolização do N pelo organismo animal (Pazzola et al., 2011).

Enquanto, o aumento no teor de carboidratos de rápida fermentação no rúmen fornecido pelos suplementos alimentares com adição de GB apresenta relação com melhor aproveitamento da PDR pela microbiota ruminal. De acordo Church (1974) o adequado consumo e absorção N pelos animais, associado à baixa excreção de N na urina, indica aproveitamento da fração N pelos ruminantes. DeFrain et al. (2004) associaram a tendência ( $P = 0,08$ ) de redução na excreção de N observado no leite de vacas alimentadas com 430 g d<sup>-1</sup> de glicerina (802 g kg<sup>-1</sup> de glicerol; 13 g kg<sup>-1</sup> de metanol e 115 g kg<sup>-1</sup> de sais) ao aumento no

aporte energético oriundo da intensa metabolização do glicerol no ambiente ruminal. Enquanto, Donkin et al. (2009) relataram a melhor eficiência de utilização de N pelos animais alimentados com glicerina de alta pureza (995 g kg<sup>-1</sup> de glicerol) na dieta. Dessa forma, o maior aproveitamento de N pelo ambiente ruminal dos animais alimentados com GB no suplemento alimentar pode estar relacionado com a melhor razão entre N retido pelo organismo e N ingerido pelos animais do presente estudo.

## CONCLUSÃO

A GB adicionada ao suplemento alimentar de cabras em pastagem de *Panicum maximum* cv. Aruana permite a melhor utilização do nitrogênio presente na dieta e atua como fonte de glicose nas primeiras horas após a alimentação, além de elevar o teor de ácidos graxos poli-insaturados do leite que são considerados benéficos a saúde humana.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto pesquisa, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão da bolsa de estudos e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante o Doutorado Sanduiche. A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) pela concessão dos animais, estrutura física e laboratorial para a execução do experimento e a Universidade Estadual de Maringá pela realização das análises de perfil dos ácidos graxos do leite.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abo El-Nor, S., A. A. AbuGhazaleh, R. B. Potu, D. Hastings and M. S. A. Khattab. 2010. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria. *Animal Feed Science and Technology* 162:99-105.
- AbuGhazaleh, A. A., S. Abo El-Nor and S. A. Ibrahim. 2011. The effect of replacing corn with glycerol on ruminal bacteria in continuous culture fermenters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95:313-319.
- AOAC. 1998. Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Official Methods of Analysis, Arlington, VA, USA.
- Avila-Stagno, J., A. V. Chaves, M. L. He, O. M. Harstad, K. A. Beauchemin, S. M. McGinn, and T. A. McAllister. 2014. Effects of increasing concentrations of glycerol in concentrate diets on nutrient digestibility, methane emissions, growth, fatty acid profiles, and carcass traits of lambs. *Journal of Animal Science* 91:829–837.
- Bach, A., S. Calsamiglia, M. D. Stern. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 88: E9-E21.
- Bernard, L., J. Rouel, C. Leroux, A. Ferlay, Y. Faulconnier, P. Legrand, and Y. Chilliard. 2005. Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in alpine goats fed vegetable lipids. *Journal of Dairy Science* 88:1478–1489.
- Bergner, H., C. Kijora, Z. Ceresnakova and J. Szakacs. 1995. *In vitro* studies on glycerol transformation by rumen microorganisms. *Archiv fur Tierernahrung* 48:245-256.
- Brisson, D., M. C. Vohl, J. St-Pierre, T. J. Hudson, and D. Gaudet. 2011. Glycerol: a neglected variable in metabolic process. *BioEssays* 23:534-542.
- Broderick, G. A. 2003. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86:1370-1381.
- Butler, W. R., J. J. Calaman, and S. W. Beam. 1996. Plasma and milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *Journal of animal science* 74:858-865.

- Chanjula, P., P. Pakdeechanuan and S. Wattanasit. 2014. Effects of dietary crude glycerin supplementation on nutrient digestibility, ruminal fermentation, blood metabolites, and nitrogen balance of goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 27:365-374.
- Chanjula, P., P. Pakdeechanuan and S. Wattanasit. 2015 Effects of feeding crude glycerin on feedlot performance and carcass characteristics in finishing goats. *Small Ruminant Research* 123: 95-102.
- Chanjula, P., S. Pongprayoon., S. Kongpan, A. Cherdthong. 2016. Effects of crude glycerin from waste vegetable oil supplementation on feed intake, ruminal fermentation characteristics, and nitrogen utilization of goats. *Tropical Animal Health Production* 48:995-1004.
- Chilliard, Y., and A. Ferlay. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development* 44:467-492
- Chilliard, Y., A. Ferlay, J. Rouel and G. Lamberet. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science* 86:1751-1770.
- Chilliard, Y., P. G. Toral, K. J. Shingfield, J. Rouel, C. Leroux and L. Bernard. 2014. Effects of diet and physiological factors on milk fat synthesis, milk fat composition and lipolysis in the goat: A short review. *Small Ruminant Research* 122:31-37.
- Church, D. C., P. D. Maluenda, S. C. París, and J. C. Urgel. 1974. *Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes*. Vol. 2. Acribia.
- Decandia, M., M. Sitzia, A. Cabiddu, D. Kababya and G. Molle. 2000. The use of polyethylene glycol to reduce the anti-nutritional effects of tannins in goats fed woody species. *Small Ruminant Research* 38:157-164.
- DeFrain, J., A. Hippen, K. Kalscheur, and P. Jardon. 2004. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. *Journal of dairy science* 87:4195-4206.
- Demeyer, D. and M. Doreau. 1999. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proceedings of the nutrition society* 58:593-607.

- Detmann, E., M. F. Paulino, J. T. Zervoudakis, S. C. Valadares Filho, R. F. Euclides, R. P. Lana and D. S. Queiroz. 2001. Chromium and internal markers in intake determination by crossbred steers, supplemented at pasture. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30:1600-1609.
- Donkin, S.; Doane, P. Glycerol as a feed ingredient for dairy cows. In: *Tristate Nutrition Dairy Nutrition Conference, 2007, Fort Wayne. Proceedings...* Fort Wayne: Eastridge, M. L. 2007. p. 97-103.
- Donkin, S.S., S.L. Koser, H.M.White, P.H. Doane, M.J. Cecava. 2009. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92: 5111-5119.
- Eifert, E. C., R. P. Lana,; D. P. D. Lana, W. M. Leopoldino, P. B. Arcuri, M.I. Leão, M. R. Cota, S. C. Valadares Filho. 2006. Perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e monensina no início da lactação. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35:219-228.
- Enser, M., N. Scollan, S. Gulati, I. Richardson, G. Nute, and J. Wood. 2001. The effects of ruminally-protected dietary lipid on the lipid composition and quality of beef muscle. Pages 186-187 in *Proc. INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY*. Japan Society for Meat Science and Technology.
- Ezequiel, J.M.B., J.B.D. Sancanari, O.R. Machado Neto, Z.F. Silva, M.T.C. Almeida, D.A.V. Silva, F.O.S.Van Cleef, E.H.C.B. Van Cleef. 2015. Effects of high concentrations of dietary crude glycerin on dairy cow productivity and milk quality. *Journal Dairy Science* 98: 8009-8017.
- Facuri, L. M. A. M., R. R. Silva, F. F. Silva, G. G. P. Carvalho, C. B. Sampaio, F. B. L. Mendes, M. M. Lisboa, D. S. Barroso, V. M. Carvalho and M. M. S. Pereira. 2014. Ingestive behavior of heifers supplemented with glycerin in substitution of corn on *Brachiaria brizantha* pasture. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 27:1584.
- Ferlay, A., C. Agabriel, C. Sibra, C. Journal, B. Martin, and Y. Chilliard. 2008. Tanker milk variability in fatty acids according to farm feeding and husbandry practices in a French semi-mountain area. *Dairy Science & Technology* 882:193-215.
- Fonseca, C. E. M. , R. F. D. Valadares, S. C. Valadares Filho, M. I. Leão, P. R. Cecon, M. T. Rodrigues, D. S. Pina, M. I. Marcondes, M. L. Paixão and A. M. Araújo. 2006. Estimativa

- da produção microbiana em cabras lactantes alimentadas com diferentes teores de proteína na dieta. *Revista Brasileira de Zootecnia*.
- Gardner, A. L. 1986. Técnicas de pesquisa em pastagens e aplicabilidade de resultados em sistemas de produção. IICA/ EMBRAPA - CNPGL, Brasília, DF, BR.
- González, F. H. D., J. Barcellos, H. O. Patiño and L. A. Ribeiro. 2000. Perfil metabólico em ruminantes. UFRGS, Porto Alegre.
- Gravert, H. O. Dairy Cattle Production. Nova York: Elsevier Science, 1987. 234p.
- Gunn, P. J., M. K. Neary, R. P. Lemenager and S. L. Lake. 2010a. Effects of crude glycerin on performance and carcass characteristics of finishing wether lambs. *Journal of Animal Science* 88:1771-1776.
- Gunn, P. J., A. F. Schultz, M. L. Van Emon, M. K. Neary, R. P. Lemenager, C. P. Rusk and S. L. Lake. 2010b. Effects of elevated crude glycerin concentrations on feedlot performance, carcass characteristics, and serum metabolite and hormone concentrations in finishing ewe and wether lambs. *The Professional Animal Scientist* 26:298-306.
- IDF. 1996. International Dairy Federation. Inventory of IDF/ISO/AOAC international adopted methods of analysis and sampling for milk and milk products. 15<sup>th</sup> ed. International Dairy Federation, Brussels, BE.
- ISO, 2000. Animal and vegetable fats and oils -Preparation of methyl esters of fatty acids. ISO 5509:2000. International Organization for Standardization
- Johnson, A. D. 1978. Sample preparation and chemical analysis of vegetation. Measurement of grassland vegetation and animal production. Aberystwyth: Commonwealth Agricultural Bureaux:96-102.
- Kolb, E.; Ketz, A.; Gürtler, H. 1987. *Fisiologia Veterinária*, 4.ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 612p.
- Kozloski, G.V. 2011. *Bioquímica dos Ruminantes*. Santa Maria: Editora Santa Maria, 3<sup>a</sup> ed., 216 p.
- Krehbiel, C. R. 2008. Ruminal and physiological metabolism of glycerin. *Journal of Animal Science* 86:392.



- Krueger, N. A., R. C. Anderson, L. O. Tedeschi, T. R. Callaway, T. S. Edrington and D. J. Nisbet. 2010. Evaluation of feeding glycerol on free-fatty acid production and fermentation kinetics of mixed ruminal microbes in vitro. *Bioresource Technology* 101:8469-8472.
- Lage, J. F., P. V. R. Paulino, L. G. R. Pereira, M. S. Duarte, A. S. Oliveira, N. K. P. Souza and J. C. M. Lima. 2014. Carcass characteristics of feedlot lambs fed crude glycerin contaminated with high concentrations of crude fat. *Meat Science* 96:108-113.
- Lage, J. F., P. V. R. Paulino, L. G. R. Pereira, S. C. Valadares Filho, A. S. Oliveira, E. Detmann, N. K. P. Souza and J. C. M. Lima. 2010. Crude glycerin on finishing lamb diets. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45:1012-1020.
- Licitra, G., T. M. Hernandez and P. J. Van Soest. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 57:347-358.
- McMeniman, N. P. 1997. Methods of estimating intake of grazing animals. *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia* 34:131-168.
- Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC international* 85:1217-1240.
- Murphy, J., J. Connolly, G. McNeill. 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. *Livestock Production Science* 44: 1-11.
- NRC. 2007. National Research Council. Nutrient requirements of small ruminants: Angora, dairy, and meat goats. 7<sup>th</sup> ed. National Academy Press Washington, DC, USA.
- Nudda, A., M. Mele, G. Battacone, M. G. Usai, and N. P. P. Macciotta. 2003. Comparison of conjugated linoleic acid (CLA) content in milk of ewes and goats with the same dietary regimen. *Italian Journal of Animal Science* 2:515-517.
- Palmquist, D. L.; Beaulieu, A. D.; Barbano, D. M. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal Dairy Science* 76:1753-1771, 1993.

- Pazzola, M., M. L. Dettori, V. Carcangiu, S. Luridiana, M. C. Mura and G. M. Vacca. 2011. Relationship between milk urea, blood plasma urea and body condition score in primiparous browsing goats with different milk yield level. *Archiv Fur Tierzucht-Archives of Animal Breeding* 54:546-556.
- Rémond, B.; Souday, E.; Jouany, J.P. 1993. In vitro and in vivo fermentation of glycerol by rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology* 2: 121-132.
- Russell, J. B., J. D. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, and C. J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. *Journal of animal science* 70:3551-3561.
- San Vito, E., J. F. Lage, J. D. Messana, E. E. Dallantonia, R. T. S. Frighetto, R. A. Reis, A. J. Neto, T. T. Berchielli. 2016. Performance and methane emissions of grazing nellore bulls supplemented with crude glycerin. *Journal of Animal Science* 94:4728–4737.
- Santana Junior, H. A., M. P. Figueiredo, E. O. Cardoso, F. B. L. Mendes, G. Abreu Filho, A. A. Pinheiro, P. T. Viana and J. P. S. Roseira. 2013. Crude glycerin in supplement to primiparous lactating cows grazing on tropical pasture: nutritional and productive characteristics. *Revista Brasileira de Zootecnia* 42:117-124.
- SAS. 2004. SAS/STAT User guide, Version 9.1.2. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.
- Schröder, A.; Südekum, K.H. 1999. Glycerol as a by-product of biodiesel production in diets for ruminants. In: *New Horizons for and Old Crop. Proc. 10th Int. Rapeseed Congress, Canberra, Australia* 241p.
- Shin, J.H., Wang, D., Kim, S.C., Adesogan, A.T., Staples, C.R., 2012. Effects of feeding crude glycerin on performance and ruminal kinetics of lactating Holstein cows fed corn silage or cottonseed hull-based, low-fiber diets. *Journal Dairy Science* 95: 4006-4016.
- Sniffen, C. J., J. D. O'connor, P. J. Van Soest, D. G. Fox and J. B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability.
- Souza, L. L., J. A. G. Azevêdo, G. G. L. de Araújo, C. L. dos Santos-Cruz, Í. dos Santos Cabral, F. M. de Almeida, G. A. de Oliveira, B. S. Oliveira. 2015. Crude glycerin for Santa Inês and F1 Dorper × Santa Inês lambs. *Small Ruminant Research* 129: 1–5.

- Terré, M., A. Nudda, P. Casado and A. Bach. 2011. The use of glycerine in rations for light lamb during the fattening period. *Animal Feed Science and Technology* 164:262-267.
- Titgemeyer, E. C., C. K. Armendariz, D. J. Bindel, R. H. Greenwood and C. A. Löest. 2001. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. *Journal of Animal Science* 79:1059-1063.
- Valadares, R. F. D., G. A. Broderick, S. C. Valadares Filho and M. K. Clayton. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *Journal of Dairy Science* 82:2686-2696.
- Valente, T. N. P., E. Detmann, A. C. Queiroz, S. C. Valadares Filho, D. I. Gomes and J. F. Figueiras. 2011. Evaluation of ruminal degradation profiles of forages using bags made from different textiles. *Revista Brasileira de Zootecnia* 40:2565-2573.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2<sup>nd</sup> ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, S. Tamminga, R. J. Dewhurst, A. Van Vuuren, D. Brabander, D. Demeyer. 2006. Milk odd- and branched-chain fatty acids in relation to the rumen fermentation pattern. *Journal of Dairy Science* 89:3954-3964.
- Wang, C., Q. Liu, W. J. Huo, W. Z. Yang, K. H. Dong, Y. X. Huang and G. Guo. 2009a. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. *Livestock Science* 121:15-20.
- Wang, C., Q. Liu, W. Z. Yang, W. J. Huo, K. H. Dong, Y. X. Huang, X. M. Yang and D. C. He. 2009b. Effects of glycerol on lactation performance, energy balance and metabolites in early lactation Holstein dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 151:12-20.
- Wilbert, C. A., E. R. Prates, J. O. J. Barcellos and J. Schafhäuser. 2013. Crude glycerin as an alternative energy feedstuff for dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 183:116-123.
- Wood, J. D., R. I. Richardson, G. R. Nute, A. V. Fisher, M. M. Campo, E. Kasapidou, P. R. Sheard, and M. Enser. 2004. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science* 66:21-32.

## **CAPÍTULO 2**

### **AVALIAÇÃO DA GORDURA DO LEITE COMO FONTE DE MicroRNA MAMÁRIO EM BOVINOS**

## **REVISÃO DE LITERATURA: Avaliação da gordura do leite como fonte de microRNA mamário em bovinos**

### **1. Gordura do leite: mecanismo de secreção**

Os lipídeos do leite são secretados em forma de coloides que apresentam composições complexas e estruturas com diversas propriedades (ARGOV et al., 2008). Sendo os lipídeos fornecidos no leite através de sistema de distribuição único: glóbulos de gordura do leite. A transferência de gordura no leite é muito intensa em recursos porque partes da membrana de células epiteliais mamárias são sacrificadas para secretar os glóbulos de gordura do leite (MATHER & KEENAN 1998; ARGOV et al., 2008).

A gordura do leite é secretada em forma de gotículas lipídicas chamada glóbulo de gordura do leite (GG), revestida por uma membrana complexa, chamada membrana do glóbulo de gordura (MGG) que preserva sua integridade (KEENAN & DYLEWSKI, 1994; MULDER & WALSTRA, 1974). A MGG é formada por três camadas de fosfolipídio: uma monocamada interna da membrana do retículo endoplasmático e de uma bicamada exterior derivada da membrana plasmática da célula epitelial mamária. Proteínas, lipídios e polissacarídeos são ligadas a membrana (MULDER & WALSTRA, 1974).

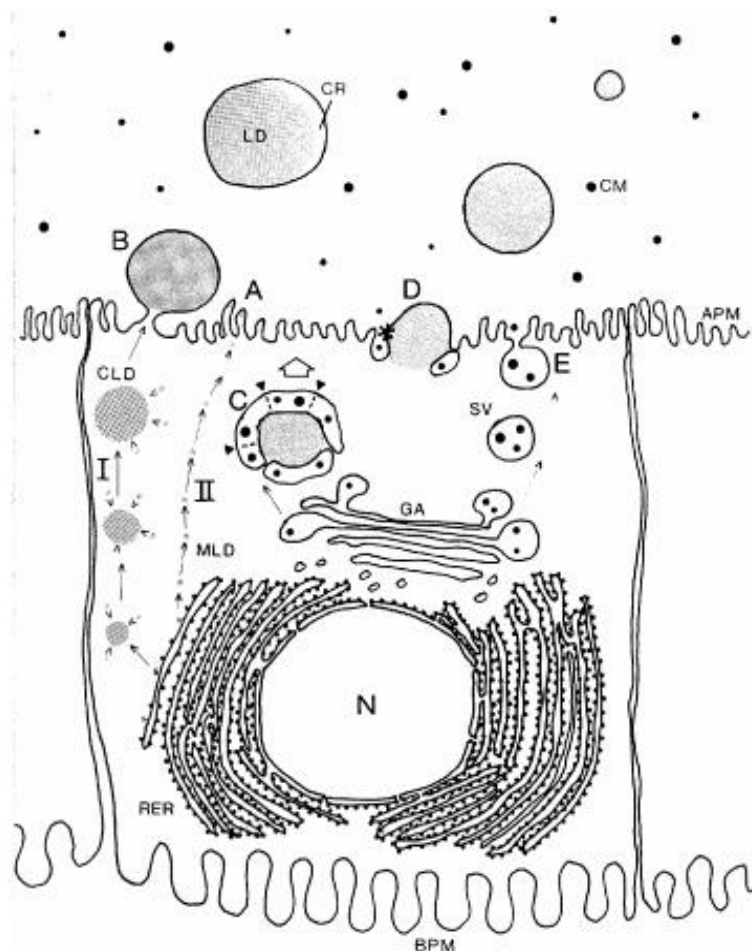
Os GG são basicamente constituídos por glicerídeos que se dividem em triglicerídeos (98%), diglicerídeos (0,3%) e monoglicerídeos (0,03%), ácidos graxos livres (0,07%), colesterol (0,3%), carotenoides (0,001%) que compõem o interior do GG do leite, além das vitaminas lipossolúveis (0,005%); já a MGG é constituída por fração lipídica que em sua maioria são fosfolipídios (0,4%) e triglicerídeos e a fração proteica (0,9%) que é composta por polipeptídios e glicoproteínas, além de algumas enzimas e substâncias diversas como riboflavina e RNA (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O tamanho dos GG da vaca varia entre 0,2 e 20  $\mu\text{m}$  com tamanho médio de 4  $\mu\text{m}$  (Michalski et al., 2001), o que implica que algumas gotículas lipídicas cresçam substancialmente entre o momento da sua formação e o tempo de sua secreção (SCOW, BLANCHETTE-MACKIE & SMITH, 1980). Além disso, pós-secreção, alguns dos maiores GG podem fundir com os menores e por isso aumentar o seu diâmetro.

Os triglicerídeos dos GG são sintetizados no retículo endoplasmático rugoso, acumulam-se em domínios ricos em triglicerídeos variados em tamanho, que são liberados como gotas discretas ao citoplasma, revestidas com lipídios polares e proteínas derivadas do retículo endoplasmático (MATHER & KEENAN, 1998). A partir do seu local de origem, as gotículas lipídicas migram para o polo apical da célula a partir da qual serão secretadas (ARGOV et al., 2008). Os GG seguem por processo de exportação distinto em que a própria membrana plasmática envolve o glóbulo emergente (WOODING, 1971). Portanto, todas as características físicas, químicas e funcionais da membrana apical são transportadas ao leite pela MGG.

Os mecanismos de secreção e transporte das gotículas lipídicas a partir de células epiteliais mamárias estão ilustrados na Figura 1. As gotículas microlipídicas (MLD) formadas no retículo endoplasmático rugoso (RER) podem fundir-se entre si e com gotículas lipídicas citoplasmática (CLD) maiores à medida que são transportados para o citoplasma apical (Via I). Alternativamente, muitos MLD transitam para o citoplasma apical diretamente sem maior acréscimo de tamanho (Via II). Gotículas lipídicas podem ser secretadas a partir da membrana plasmática apical, quer como MLD (mecanismo A), ou CLD (mecanismo B). Sob certas circunstâncias, as gotículas de gordura podem ser secretadas após as vesículas secretoras cercarem os CLD e fundirem-se progressivamente umas com as outras para formar vacúolos intracitoplasmáticos (mecanismo C; linhas tracejadas na Figura 1 marcam os limites anteriores das vesículas secretoras fundidas).

Supõe-se que estes vacúolos sejam transportados para a superfície apical (ponta de flecha, mecanismo C) e o conteúdo libertado pela exocitose (não mostrado). A combinação de ambas as vias vesiculares apical e secretoras pode ser possível (mecanismo D) (o asterisco marca a vesícula secretora que acaba de fundir-se com a membrana apical). As inclusões citoplasmáticas, “crescentes”, estão presas entre a camada da membrana externa e o glóbulo lipídico em algumas gotículas de gordura secretadas. As caseínas e outras proteínas do leite são processadas através da via secretora e são secretadas com a fase aquosa do leite por qualquer dos compostos (não ilustrados) ou exocitose simples a partir de vesículas secretoras na membrana plasmática apical (mecanismo E) (MATHER E KEENAN, 1998).



Mather e Keenan, (1998)

Figura 1. Resumo das vias para o transporte de gotículas lipídicas e secreção a partir de células epiteliais mamárias. Membrana plasmática apical (APM); Membrana plasmática basal (BPM); Gotícula lipídica citoplasmática (CLD); Micela de caseína (CM); Crescente citoplasmático (CR); Retículo endoplasmático rugoso (RER); Gotícula lipídica (LD); Aparelho de Golgi (GA); Gotícula microlipídica (MLD); Núcleo (N); Vesícula secretora (SV).

## 2. microRNA: Biogênese e mecanismos de regulação

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs endógenos com aproximadamente, 22 nucleotídeos que podem desempenhar papéis reguladores importantes através da repressão traducional ou degradação dos seus RNAs mensageiros (RNAm) complementares inibindo a síntese de sua respectiva proteína (BARTEL, 2004).

Os miRNAs funcionam como reguladores de diversos processos dos eucariotos como proliferação, diferenciação, desenvolvimento e morte celular (AMBROS 2004; SUN & LAI 2013), metabolismo (WILFRED et al. 2007; MOORE et al. 2010), entre outros.

Já foram identificados mais de 28.000 miRNAs em animais, plantas e vírus (versão 21, [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)), e estima-se que os genes de miRNA podem representar de 2% a 5% de todos os genes de mamíferos e coletivamente regular a expressão de até 60% de genes codificadores de proteínas (FRIEDMAN et al., 2009).

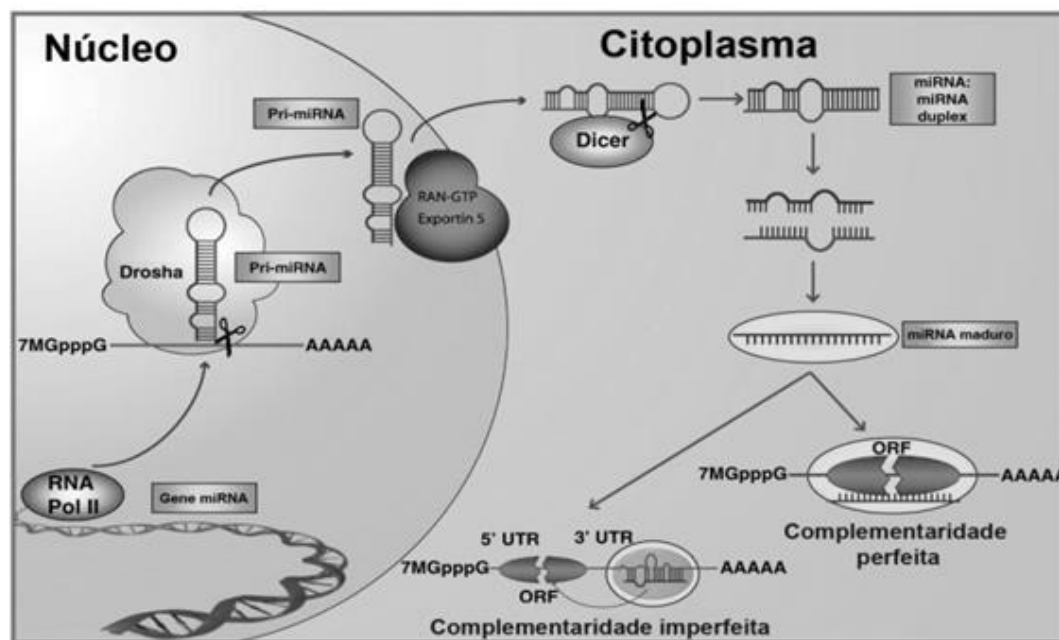


Figura 2: Biogênese e mecanismo de regulação pós-transcricional exercido pelos miRNAs.

Fonte: Adaptado de Kutanzi et al. (2011)

Dois eventos de processamento levam à formação de miRNA maduro em animais. O primeiro evento ocorre no núcleo e o segundo ocorre no citoplasma (Figura 2).

A transcrição dos genes miRNAs é mediada pela RNA polimerase II (LEE et al., 2004). No núcleo, os miRNAs primários (pri-miRNA) apresentam estrutura em forma de grampo (hairpin) e são processados por endonucleases da família da ribonuclease III (RNase III) chamada Drosha e seu cofator DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region gene 8), resultando em estrutura chamada miRNA precursor (pre-miRNA) com cerca de 70 nucleotídeos (LEE et al., 2003), que será exportado para o citoplasma com o auxílio da Exportina 5 (EXP-5) (LUND et al., 2004). No citoplasma, os pre-miRNAs são processados por outra RNase III chamada Dicer, que remove a estrutura em forma de grampo (hairpin), resultando na formação de miRNA fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos (BERNSTEIN et al., 2001) que será incorporado ao RISC (RNA-Induced Silence Complex ou complexo de silenciamento induzido por RNA), que inclui as proteínas Argonautas como principais componentes. Uma destas fitas sofre



degradação e a outra permanece associada ao RISC e constitui o miRNA maduro (SCHWARZ et al., 2003). O RISC associado ao miRNA maduro interage com os mRNAs alvo por complementaridade parcial para degradá-los ou reprimir sua tradução (ETHERIDGE et al., 2011).

### **3. microRNAs como biomarcadores**

Os miRNAs têm sido encontrados em amostras de diferentes origens (órgãos, tecidos e fluidos) como, cérebro (SCHRATT et al., 2006), coração (BOSTJANCIC et al., 2010), tecido adiposo (GU et al. 2007), glândula mamária (GU et al. 2007; LE GUILLOU et al., 2014), tumores (LI et al., 2010), sangue (HOEKSTRA et al., 2010; GOLBY et al., 2014), leite (IZUMI et al., 2012; MUNCH et al., 2013).

Mesmo que a maioria dos miRNAs tenha sido encontrados em ambiente intracelular, números significativos de miRNAs tem sido observado extracelularmente (WEBER et al., 2010; CHEN et al., 2010). A presença de miRNAs livres de células na urina, saliva (WEBER et al., 2010), leite (HATA et al., 2010; SUN et al., 2015), tem se mostrado interessante linha de pesquisa. A quantidade e a concentração total de diferentes miRNAs varia muito entre os tipos de fluido corporal, além de possuírem perfil alterado em estados de doença (WEBER et al., 2010; ARROYO et al., 2011), o que leva à possibilidade desses miRNAs representarem valiosa ferramenta como biomarcadores não invasivos (IZUMI et al., 2015), podendo ser utilizados para o diagnóstico de várias doenças, como câncer (CHEN et al., 2008), danos cardíacos (CORSTEN et al., 2010; WANG et al., 2010), diabetes (CHEN et al., 2008), mastite (DILDA et al., 2012; CHEN et al., 2014) entre outros.

Em estudos com animais, os métodos tradicionais de coleta de amostra de material genético é realizada de forma invasiva. Como exemplo, a extração de material genético a partir da glândula mamária, em que há dificuldade de obter material genético de forma significativa dessa amostra. Normalmente, as técnicas de amostragem cirúrgica a partir de biópsias mamárias ou de amostras de tecido tomadas no momento do abate fornecem grandes quantidades de tecido (FARR et al., 1996). Porém, podem surgir múltiplas complicações pós-invasivas e, devido à grande heterogeneidade do tecido mamário, estas amostras podem não ser representativas do tecido sintetizador do leite e da biologia mamária, além disso, não é possível fornecer amostragens múltiplas para acompanhamento de alterações epiteliais ocorridas nesse tecido (BRENAUT et al.,

2012). Além de ser caracterizada como técnica demorada e difícil, essa técnica provoca estresse nos animais. Em virtude dessas desvantagens, métodos alternativos têm surgido para tornar a obtenção das amostras como processo menos desgastante, tanto para o pesquisador quanto para os animais.

Com o objetivo de comparar métodos invasivos e não invasivos, CÁNOVAS et al. (2014) avaliaram cinco diferentes fontes de RNA (tecido mamário, células somáticas do leite, célula epitelial mamária dissecada a laser, célula epitelial mamária capturada com anticorpo e glóbulo de gordura do leite) para examinar o transcriptoma da glândula mamária bovina em lactação. Os autores concluíram que tanto células somáticas, quando os glóbulos de gordura do leite são representativos do que ocorre no tecido mamário e na célula epitelial mamária e podem ser utilizados como amostras significativas e alternativas para estudar a expressão da glândula mamária sem a necessidade de realizar biópsia de tecido.

Brenaut et al. (2012) utilizaram como método não invasivo os glóbulos de gordura de leite como fonte de RNA mamário para acompanhar a dinâmica da resposta transcricional global de células epiteliais mamárias durante o curso de uma infecção bacteriana em caprinos. Como resultado, foi demonstrado que o glóbulo de gordura do leite representa fonte não invasiva de RNA, sendo representativa da célula epitelial mamária, possibilitando avaliar a dinâmica da expressão do gene na célula epitelial mamária *in vivo*, especialmente durante os primeiros passos da infecção, iniciando assim, o caminho para a descoberta de biomarcadores precoces para o controle de infecções intramamárias. Além disso, esta técnica não invasiva poderia ser utilizada para fornecer dados transcriptômicos mamários em grande escala, preenchendo assim a lacuna entre dados genômicos e fenotípicos.

Chen et al. (2008) relataram que miRNAs do soro sanguíneo humano são estáveis e podem ser utilizados como biomarcadores precoces para o diagnóstico de câncer e outras doenças. Farrell et al. (2015) coletaram soro sanguíneo de bezerros submetidos ou não a infecção com *Mycobacterium avium* e identificaram miRNA como potenciais biomarcadores para doenças infecciosas em bovinos. Golby et al. (2014) extraíram miRNAs de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de bovinos para avaliar sua possível utilização como biomarcadores específicos de proteção ou estágio da doença quando submetidos ao desafio com *Mycobacterium bovis*. Os autores verificaram o potencial dos miRNAs, principalmente o miR-155 como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico da doença em animais com patologia avançada. Baier et al.

(2014) relataram que quantidades significativas de miRNA foram detectadas no plasma isolado de indivíduos humanos saudáveis após a ingestão de doses nutricionalmente relevantes de leite de vaca. Hata et al. (2010) também mostraram que quantidade considerável de miRNAs da glândula mamária relacionados com imunidade estavam presentes nas microvesículas derivadas do leite. Izumi et al. (2015) também relataram a presença de miRNAs nos exossomos do leite bovino.

Chen et al. (2010) através de análise sistemática de miRNAs de leite bovino em vários estádios de lactação, identificaram sete miRNAs estáveis presentes no leite e seus níveis podem servir como "padrão" ou "biomarcador" interno para controle de qualidade do leite. Este novo biomarcador baseado em miRNA pode refletir com precisão vários aspectos da qualidade do leite, o que por sua vez pode revelar o conteúdo real de leite cru no leite "manipulado" ou leite com má qualidade. A identificação de miRNAs como novos ingredientes e indicadores de qualidade do leite cru terá grande potencial para revolucionar toda a indústria de laticínios, particularmente a área de controle de qualidade do leite.

#### 4. Referências bibliográficas

- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, p. 350–355, 2004.
- ARGOV, N.; LEMAY, D.G.; GERMAN, J.B. Milk Fat Globule structure & function; nanoscience comes to milk production. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, p. 617-623, 2008.
- ARROYO, J.D.; CHEVILLET, J.R.; KROH, E.M.; RUF, I.K.; PRITCHARD, C.C.; GIBSON, D.F.; MITCHELL, P.S.; BENNETT, C.F.; POGOSOVA-AGADJANYAN, E.L.; STIREWALT, D.L.; TAIT, J.F.; TEWARI, M. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 5003-5008, 2011.
- BAIER, S.R.; NGUYER, C.; XIE, F.; WOOD, J.R.; ZEMPLINI, J. Micrnas are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, hek-293 kidney cell cultures, and mouse livers. **The Journal of Nutrition**, v. 144, p. 1495-1500, 2014.

- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, p. 281-297, 2004.
- BERNSTEIN, E.; CAUDY, A.A.; HAMMOND, S.M.; HANNON, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, p. 363-366, 2001.
- BOSTJANCIC, E.; ZIDAR, N.; STAJER, D.; GLAVAC, D. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. **Cardiology**, v. 115, p. 163-169, 2010.
- BRENAUT, P.; BANGERA, R.; BEVILACQUA, C.; REBOURS, E.; CEBO, C.; MARTIN, P. Validation of RNA isolated from milk fat globules to profile mammary epithelial cell expression during lactation and transcriptional response to a bacterial infection. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 6130-6144, 2012.
- CÁNOVAS, A.; RINCÓN, G.; BEVILACQUA, C.; ISLAS-TREJO, A.; BRENAUT, P.; HOVEY, R. C.; BOUTINAUD, M.; MORGENTHALER, C.; VANKLOMPENBERG, M. K.; MARTIN, P.; MEDRANO, J. F. Comparison of five different RNA sources to examine the lactating bovine mammary gland transcriptome using RNA-Sequencing. **Scientific Reports**, v. 4, p. 5297, 2014.
- CHEN, X.; BA, Y.; MA, L.; CAI, X.; YIN, Y.; WANG, K.; GUO, J.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; GUO, X.; LI, Q.; LI, X.; WANG, W.; ZHANG, Y.; WANG, J.; JIANG, X.; XIANG, Y.; XU, C.; ZHENG, P.; ZHANG, J.; LI, R.; ZHANG, H.; SHANG, X.; GONG, T.; NING, G.; WANG, J.; ZEN, K.; ZHANG, J.; ZHANG, C.Y. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. **Cell Research**, v. 18, p. 997-1006, 2008.
- CHEN, X.; GAO, C.; LI, H.; HUANG, L.; SUN, Q.; DONG, Y.; TIAN, C.; GAO, S.; DONG, H.; GUAN, D.; HU, X.; ZHAO, S.; LI, L.; ZHU, L.; YAN, Q.; ZHANG, J.; ZEN, K.; ZHANG, C.-Y. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. **Cell Research**, v. 20, p. 1128-1137, 2010.
- CHEN, L.; LIU, X.; LI, Z.; WANG, H.; LIU, Y.; HE, H.; YANG, J.; NIU, F.; WANG, L.; GUO, J. Expression differences of miRNAs and genes on NF- $\kappa$ B pathway between the healthy and the mastitis Chinese Holstein cows. **Gene**, v. 545, p. 117-125, 2014.
- CORSTEN, M. F.; DENNERT, R.; JOCHEMS, S.; KUZNETSOVA, T.; DEVAUX, Y.; HOFSTRA, L.; WAGNER, D. R.; STAESSEN, J. A.; HEYMANS, S.; SCHROEN, B.

- Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 3, p. 499-506, 2010.
- DILDA, F.; GIOIA, G.; PISANI, L.; RESTELLI, L.; LECCHI, C.; ALBONICO, F.; BRONZO, V.; MORTARINO, M.; CECILIANI, F. Escherichia coli lipopolysaccharides and Staphylococcus aureus enterotoxin B differentially modulate inflammatory microRNAs in bovine monocytes. **The Veterinary Journal**, v. 192, p. 514-516, 2012.
- FARR, V. C.; STELWAGEN, K.; CATE, L. R.; MOLENAAR, A. J.; MCFADDEN, T. B.; DAVIS, S. R. An Improved Method for the Routine Biopsy of Bovine Mammary Tissue. **Journal of Dairy Science**, v. 79, n. 4, p. 543-549, 1996.
- FARRELL, D.; SHAUGHNESSY, R. G.; BRITTON, L.; MACHUGH, D. E.; MARKEY, B.; GORDON, S. V. The Identification of Circulating MiRNA in Bovine Serum and Their Potential as Novel Biomarkers of Early Mycobacterium avium subsp paratuberculosis Infection. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0134310, 2015.
- FRIEDMAN, R. C., K. K. H. FARH, C. B. BURGE, AND D. P. BARTEL. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, v. 19, p. 92-105, 2009.
- GOLBY, P.; VILLARREAL-RAMOS, B.; DEAN, G.; JONES, G. J.; VORDERMEIER, M. MicroRNA expression profiling of PPD-B stimulated PBMC from *M. bovis*-challenged unvaccinated and BCG vaccinated cattle. **Vaccine**, v. 32, n. 44, p. 5839-5844, 2014.
- GU, Z.; ELESWARAPU, S.; JIANG, H. Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. **FEBS Letters**, v. 581, n. 5, p. 981-988, 2007.
- HATA, T.; MURAKAMI, K.; NAKATANI, H.; YAMAMOTO, Y.; MATSUDA, T.; AOKI, N. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 396, p. 528-533, 2010.
- HOEKSTRA, M.; VAN DER LANS, C. A. C.; HALVORSEN, B.; GULLESTAD, L.; KUIPER, J.; AUKRUST, P.; VAN BERKEL, T. J. C.; BIESSEN, E. A. L. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, n. 3, p. 792-797, 2010.
- IZUMI, H.; KOSAKA, N.; SHIMIZU, T.; SEKINE, K.; OCHIYA, T.; TAKASE, M. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. **Journal Dairy Science**, v. 95, p. 4831-4841, 2012.

- IZUMI, H.; TSUDA, M.; SATO, Y.; KOSAKA, N.; OCHIYA, T.; IWAMOTO, H.; NAMBA, K.; TAKEDA, Y. Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages. **Journal Dairy Science**, v. 98, p. 2920-2933, 2015.
- KEENAN, T. W.; DYLEWSKI, D.P. **Intracellular origin of milk lipid globules and the nature and structure of the milk lipid globule membrane**. In P. F. Fox (ed.), *Advanced Dairy Chemistry-2-Lipids*, Chapman and Hall, London, p. 89-130, 1994.
- LE GUILLOU, S.; MARTHEY, S.; LALOE, D.; LAUBIER, J.; MOBUCHON, L.; LEROUX, C.; LE PROVOST, F. Characterisation and Comparison of Lactating Mouse and Bovine Mammary Gland miRNomes. **PloS one**, v. 9, p. e91938, 2014.
- LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RÅDMARK, O.; KIM, S.; KIM, V.N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, p. 415-419, 2003.
- LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.; YEOM, K.H.; LEE, S.; BAEK, S.H.; KIM, V.N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The Embo Journal**, v. 23, p. 4051-4060, 2004.
- LI, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; DING, J.; WU, K.; FAN, D. Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature. **Gut**, v. 59, p. 579-585, 2010.
- LUND, E; GUTTINGER, S.; CALADO, A.; DAHLBERG, J.E.; KUTAY, U. Nuclear export of microRNA precursors. **Science**, v. 303, p. 95-98, 2004.
- MATHER, I.H.; KEENAN, T.W. Origin and secretion of milk lipids. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 3, p. 259-273, 1998.
- MICHALSKI, M.C.; BRIARD, V.; MICHEL, F. Optical parameters of milk fat globules for laser light scattering measurements. **Lait**, v. 81, p. 787-796, 2001.
- MOORE, K.J.; RAYNER, K.J.; SUAREZ, Y.; FERNANDEZ-HERNANDO, C. MicroRNAs and cholesterol metabolism. **Trends in Endocrinology e Metabolism**, v. 21, p. 699 - 706, 2010.
- MULDER, H.; WALSTRA, P. **The Milk Fat Globule**, Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, The Netherlands, p. 296, 1974.
- MUNCH, E. M.; HARRIS, R. A.; MOHAMMAD, M.; BENHAM, A. L.; PEJERREY, S. M.; SHOWALTER, L.; HU, M.; SHOPE, C. D.; MANINGAT, P. D.; GUNARATNE, P. H.; HAYMOND, M.; AAGAARD, K. Transcriptome profiling of microrna by next-gen deep sequencing reveals known and novel miRNA species in the lipid fraction of human breast milk. **Plos One**, v. 8, n. 2, p. e50564, 2013.

- ORDOÑEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, F. D. G. F.; PERALES, L. H.; CORTECERO, M. D. S. **Características gerais do leite e componentes fundamentais**. In: Tecnologia de alimentos. Tradução: Maria Murad. Porto Alegre/RS/Brasil: Artmed, v. 2, p. 13-40, 2005.
- SCHRATT, G. M.; TUEBING, F.; NIGH, E. A.; KANE, C. G.; SABATINI, M. E.; KIEBLER, M.; GREENBERG, M. E. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. **Nature**, v. 439, n. 7074, p. 283-289, 2006.
- SCHWARZ, D.S.; HUTVAGNER, G.; DU, T.; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P.D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, p. 199-208, 2003.
- SCOW, R.O.; BLANCHETTE-MACKIE, E.J.; SMITH, L.C. Transport of lipid across capillary endothelium. **Federation Proceedings**, v. 39, p. 2610-2617, 1980.
- SUN, K. ; LAI, E.C. Adult-specific functions of animal microRNAs. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, p. 535-548, 2013.
- SUN, J.; ASWATH, K.; SCHROEDER, S. G.; LIPPOLIS, J. D.; REINHARDT, T. A.; SONSTEGARD, T. S. MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response to *Staphylococcus aureus* infection. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 806, 2015.
- WEBER, J. A.; BAXTER, D. H.; ZHANG, S.; HUANG, D. Y.; HOW HUANG, K.; JEN LEE, M.; GALAS, D. J.; WANG, K. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 1733-1741, 2010.
- WILFRED, B.R.; WANG, W.X.; NELSON, P.T. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR- 103/107 regulates human metabolic pathways. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 91, p. 209 -217, 2007.
- WOODING, F. B. P. The Mechanism of Secretion of the Milk Fat Globule. **Journal of Cell Science**, v. 9, n. 3, p. 805-821, 1971.

**ARTIGO 2. Milk fat as a source of mammary microRNA in the bovine****ABSTRACT**

MicroRNA (miRNA) are a class of small noncoding RNA acting as post-transcriptional regulators of gene expression. They have been shown to influence mammary gland (MG) development and function. Samples for MG gene expression studies are usually obtained via invasive and expensive methods (biopsy or post-mortem) that limit kinetic and extensive analyses. Milk fat (MF) globules may be a satisfactory alternative source of mRNA used to assess the gene expression in the secretory mammary epithelium. However, the use of the bovine MF as the source of miRNA has not been studied so far. The objective of this study was to assess MF as a source of small RNAs to profile miRNA and to ensure that MF miRNA are representative of MG miRNA expression. Total RNA was extracted from MF (n=6) and MG (n=6) from mid-lactation Holstein cows. Nine miRNA (*miR-29a*, *miR-125b*, *miR-126*, *miR-141*, *miR-148a*, *miR-204*, *miR-223*, *miR-320a*, *miR-494*), chosen on the base of their expression in MG, were assayed by RT-qPCR. Among them, 2 (*miR-126* and *miR-204*) were not detected in MF whereas at least *miR-126* was highly abundant in MG, 3 were significantly more abundant in MG than in MF, *miR-29a*, *miR-125b* and *miR-148a* exhibiting a fold change value of 23.2, 13.9 and 8.7, respectively, with  $p < 0.05$ . Four studied miRNA were detected in both MF and MG as equally expressed. Such results suggest that there are selective mechanisms of miRNA transfer to milk or that specific expression exist in the different cell-types of MG. Arguments obtained with bioinformatics analyses using Pathway Studio software were in more favor of the first hypothesis but is not enough strong to be certified. In conclusion, MF can be used as non-invasive source of miRNA but do not reflect exactly the MG miRNome.

Key words: miRNA, milk fat, mammary gland, expression



## INTRODUCTION

Milk is a complex secretion of mammary gland (MG) providing the nutrients for growth and development of the mammalian neonate. During lactation, MG synthesizes and secretes large quantities of milk components, including proteins, lactose and lipids, which have a considerable effect on the nutritional, technological, and sensorial properties of milk products. Among those components, milk fat (MF) consists mostly of globules which are small discrete droplets composed mainly of triglycerides. They are released into the cytoplasm and surrounded by a bilayer polar lipids and proteins deriving from the endoplasmic reticulum membrane (Mather and Keenan, 1998; Heid and Keenan, 2005).

Cytoplasmic lipid droplets (CLD) of all sizes are transported unidirectionally towards the apical portion of the cell, and are released into the alveolar lumen. CLD are enveloped in the outer plasma membrane of the mammary epithelial cell (MEC). During this apocrine secretion process, cytoplasmic material, including nucleic acids is trapped within the MF globules (Mather and Keenan, 1998; Heid and Keenan, 2005). This characteristic was recently exploited as a non-invasive method to sample RNA from milk.

Conventional sampling of mammary tissue via biopsy is invasive and may be deleterious because it can lead to post-surgical complications. Non-invasive techniques using MF can overcome such limitations. This approach has been used first by Maningat et al. (2007) to analyze regulation of gene expression in human. Later on, MF globules have been used as an alternative source of mRNA to assess the transcriptional activity of the secretory mammary epithelium in livestock (Brenaut et al., 2012; Canovas et al., 2014), showing satisfactory results. Moreover, due to the great heterogeneity of the mammary tissue, conventional MG samples may not be

representative of the milk-synthesizing cells namely MEC (Brenaut et al., 2012). Recently, Lemay et al. (2013) showed using RNA sequencing that mammary epithelium-specific mRNA were abundant in macaque milk fat.

MicroRNA (miRNA) are small non-coding RNA (~22 nucleotides), which control various biological processes such as proliferation, growth and cell death, immune response and metabolism. MiRNA are thought to regulate at least 60% of genes, and are involved in all cellular processes, regulating gene expression at the post-translational level (Bartel, 2004; Friedman et al., 2009).

Recently, ruminant mammary miRNomes have been reported (Le Guillou et al., 2014; Li et al., 2015; Mobuchon et al., 2015b) and shown as being involved in the regulation of the mammary function. For example, Le Guillou et al. (2014) reported that the overexpression of miR-30b in mice led to a reduction in the size of alveolar lumen, a defect of the lipids droplets in MEC, and a persistency of some differentiated structures during mammary involution. The presence of miRNA in MG and the attendance of MEC in milk have suggested the occurrence of miRNA in milk. Chen et al. (2010) and Izumi et al. (2012) compared miRNA isolated from bovine colostrum and mature milk, whereas more recently Izumi et al. (2015) have identified miRNA from bovine milk-derived exosomes. Nevertheless, to our knowledge, bovine MF have not been considered as a source of miRNA.

With the aim to evaluate the use of MF as a source of miRNA and to appreciate their representativeness of mammary miRNome, we compared the profile of candidate miRNA in MG and MF.

## **MATERIALS AND METHODS**

### ***Animals and Sample Preparation***

All cows were housed at the experimental unit of INRA Research Center of Theix (UERT) and were allowed ad libitum intake to meet or exceed nutrient requirements. The cows were housed in stalls with free access to water and were cared for and handled in compliance with INRA Animal Care Committee guidelines (CEMEAA: Ethics Committee for animal experimentation in Auvergne). Mammary tissue was collected from six multiparous mid-lactation Holstein cows by biopsies in a previous study (Leroux et al., 2016). Milk samples (50 mL) were collected from six multiparous cows that were paired according to lactation state of the biopsied animals. Immediately after standard morning milking, residual milk was collected by hand into sterile, RNase-free tubes, and centrifuged immediately at  $2,000 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  to isolate milk fat (Brenaut et al., 2012).

### ***Total RNA Isolation***

Total MF RNA was extracted as described by Brenaut et al. (2012), with slight modifications. Immediately after centrifugation of milk samples, 1 g of MF was transferred into a 15-mL Falcon tube, 2.0 mL of TRIzol LS solution (Invitrogen Life Technologies Inc.) were added immediately, and the mixture was vortexed vigorously before the addition of 600  $\mu\text{L}$  of chloroform. After a strong mix, the solution was centrifuged at  $12,000 \times g$  for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$  to separate lipids, proteins and phenol. After centrifugation, the upper aqueous layer (approximately 700  $\mu\text{L}$ ), which contains RNA, was transferred to a new 2 mL tube, and RNA was precipitated by adding 500  $\mu\text{L}$  of isopropanol per mL of aqueous layer. After a second centrifugation ( $12,000 \times g$  for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ), RNA pellets were washed with 70% ethanol, dissolved in 50  $\mu\text{L}$  of RNase-free water, and finally stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . All RNA samples were analyzed using the

Bioanalyzer Small RNA kit (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) to measure the miRNA concentration (Mobuchon et al., 2015a).

### ***Quantification of miRNA by RT-qPCR and Data Analyses***

Nine miRNA were chosen for RT-qPCR analyses among known miRNA based on their level of expression in MG: *miR-29a-3p* (TaqMan® ID 007600\_mat), *miR-125b-5p* (TaqMan® ID 000449), *miR-126-3p* (TaqMan® ID 008451\_mat), *miR-141-3p* (TaqMan® ID 000463), *miR-148a-3p* (TaqMan® ID 000470), *miR-204-5p* (TaqMan® ID 000508), *miR-223-3p* (TaqMan® ID 002295), *miR-320-3p* (TaqMan® ID 002277) and *miR-494-3p* (TaqMan® ID 002365). All miRNA levels were normalized to the values of *U6* snoRNA (Le Guillou et al., 2014; Mobuchon et al., 2015b).

Reverse transcription was performed on 200 ng of total RNA using the TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the StepOne Plus thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Briefly, each 15 µL reaction was reverse transcribed 30 min at 16°C, 30 min at 42°C and 5 min at 85°C. Then, 1.3 µL of miRNA-specific cDNA from the reaction were amplified using TaqMan® Small RNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Amplification was performed at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min in triplicate. Only threshold cycle (Ct) values > 30 were considered as specific amplification. The results expressed as fold change of Ct values relative to the control using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak and Schmittgen, 2001). The significance of differences was determined using *t*-test for comparisons between 2 groups with *P*-value < 0.05 considered significant difference.

### ***Analysis of Targeted Biological Processes***

Targets genes of studied miRNA and corresponding putative pathways were investigated through the use of the Elsevier's Resnet Mammal DataBase version 11.2, which is part of the Pathway Studio software (Nikitin et al., 2003), (<http://www.elsevier.com/online-tools/pathway-studio>).

## **RESULTS**

Nine miRNA were selected based on their expression in the MG (Mobuchon et al., 2015a) and analyzed (Figure 1) in 6 total RNA from MG samples of lactating Holstein cows and in 6 total RNA obtained from MF of cows in the same physiological state. We detected 7 of the miRNAs in both MG and MF, whereas 2 miRNA (*miR-126* and *miR-204*) were not detected in MF and considered as lacking. Moreover, we identified 3 miRNAs (*miR-29a*, *miR-125b* and *miR-148a*) more abundant in MG, as compared with the MF (Figure 1) exhibiting a fold change value of 23.2, 13.9 and 8.7, respectively with *P*-value < 0.05.

We investigated the functional role of miRNA only detected in MG (*miR-126* and *miR-204*), using Pathway Studio, through the biological processes (**BP** with a *P*-value < 0.01) involving genes they potentially target. *MiR-126* potentially targets genes involved in 834 BP whereas *miR-204* is involved in 446 BP. They have 197 common BP (Figure 2A). The same analyses performed for the 4 miRNA not differentially present in MG and MF (*miR-141*, *miR-223*, *miR-320a* and *miR-494*) showed that they are potentially involved in a total of 1,398 BP, with 207 BP common for the 4 miRNA. The comparison between the 197 BP commonly targeted by *miR-126* and *miR-204* (the 2 miRNA present only in MG) and all the 1,398 BP targeted by *miR-141*, *miR-223*, *miR-320a* or *miR-494* showed 185 common BP and 12 specific of the 2 MG miRNA

(Figure 2B). Among them, one is the adherents junction and cell-substrate adhesion process, which are involved in the structure of tissues and others were implicated in differentiation and regulation processes.

## DISCUSSION

Non-invasive access to mammary gene profile is crucial to investigate effects of different factors such as nutrition, genetics or physiology. In particular, the limit of MG sampling preclude the possibility to perform large-scale analyses of mammary transcriptome, including miRNA which regulate the expression of more than 60% of the genes so far identified in a mammalian genome (Friedman et al., 2009). The alternative use of mRNA isolated from MF globules was proposed in humans (Maningat et al., 2007; Maningat et al., 2009), goats (Brenaut et al., 2012) and cows (Canovas et al., 2014). Nevertheless, to our knowledge, the presence of miRNA in bovine MF has not been explored and demonstrated so far. In the present study, we detected 7 out of the 9 studied miRNA, in RNA extracted from MF (Figure 3).

The presence of miRNA in MF is in accordance with the detection of miRNA which were previously reported in whole bovine milk (Izumi et al., 2012) and in milk exosomes (Izumi et al., 2015; Sun et al., 2015). However, different human milk fractions were studied to assess the compartmental distribution of miRNA. The expression profile of milk miRNA differs significantly among the various fractions of milk, and it is unclear whether milk miRNA originate from the active secretion by epithelial cells or the by passive diffusion. It had been argued that other milk fraction were likely to harbor large quantities of miRNA.

Indeed, Munch et al. (2013) described the presence of miRNA in the lipid fraction of human milk, reporting 308 miRNA that are predicted to target 9,074 genes. They showed that the lipid fraction of human breast milk contained the highest quantity of

miRNA and yielded the purest miRNA fractions. More recently, Alsaweed et al. (2015) found the highest miRNA concentration in the cell and lipid fractions compared to skim milk.

We observed that 4 (*miR-141*, *miR-223*, *miR-320a*, and *miR-494*) among the 9 studied miRNA showed the same abundance in MG and MF globules RNA, whereas 3 (*miR-29a*, *miR-125b* and *miR-148a*) were more abundant in MG. The detection of *miR-148a* which is the more frequent miRNA in cow (Le Guillou et al., 2014) and goat (Mobuchon et al., 2015a) MG, in MF fraction is in agreement with its stable presence in milk reported through a systematic analysis of bovine milk miRNA throughout the lactation (Chen et al. (2010)). Moreover, this miRNA is common in human breast milk (Zhou et al., 2012), bovine colostrum and mature milk (Izumi et al., 2012), and bovine raw milk exosomes (Izumi et al., 2015).

The same applies to miR-223, which was found in various bovine milk fractions (Hata et al., 2010; Izumi et al., 2012, 2014; Sun et al., 2015) and human MF globules (Alsaweed et al., 2015). The detection of miR-320 and miR-494 in MF globules at the same level as in MG is in line with their previous detection at relatively high levels in human (Kosaka et al., 2010) and bovine (Izumi et al., 2012) milk.

We detected miR-125b and miR-141 in MF even though they were present at higher levels in colostrum whey compared to mature milk whey (Izumi et al. (2014)). Thus, we can concluded that our results are in line with the knowledge of miRNA constituents of whole milk in bovine and with MF miRNA composition in human milk, despite we have used different cows to obtain MF and MG. It is probably due to the fact that we have homogenized their physiological, nutritional and sanitary status.

In this study, we have identified 2 miRNA (*miR-126* and *miR-204*) in MG samples which were not detected in MF globules. In MG, the expression of *miR-126*

was upregulated by food deprivation in goats (Mobuchon et al., 2015b) and down regulated during mouse pregnancy and lactation (Cui et al. (2011). It was suggested that *miR-126* may play an important role in mouse MG development and lactation, in particular through the targeting of progesterone receptors mRNA (Cui et al., 2011). *MiR-126* was mainly detected in the top 30 of different epithelial tissues suggesting that it could be involved in physiological processes linked to epithelial cell functions (Le Guillou et al., 2014). Our results show that also miR-204 is not detectable in MF globules whereas it was expressed in ruminant MG (Le Guillou et al., 2014; Mobuchon et al., 2015a).

The expression in MG of these two miRNA (in particular for *miR-126* which very highly abundant in MG) which were not detected in MF, whereas others miRNA were detected in MF suggests that different mechanisms of miRNA transfer to milk occur depending of the miRNA. However, due to the cellular heterogeneity mammary tissue, we cannot exclude that the *miR-126* and *miR-204* were expressed in other cell type than the MEC. Lemay et al. (2013) report that RNA extracted from the MF during lactation accurately portrayed the RNA profile of milk-producing MEC in a non-human primate.

With the aim to provide arguments in favor of one or other hypothesis, we explored the mechanisms of miRNA secretion from MG to MF, and the potential effects of observed differences. We performed bioinformatics analyses of mRNA targeted by the two miRNA absents in MF but presents in MG (*miR-126* and *miR-204*). The 197 common BP were confronted to the whole BP influenced by the mRNA targeted by the 4 miRNA detected in the same proportions in both MG and MF (*miR-141*, *miR-223*, *miR-320a* and *miR-494*).

This analysis highlighted 12 BP with  $P$ -value  $< 0.01$ , targeted by miRNA exclusively detected in MG. One of them corresponds to adherent junction organization.



The cells junctions are crucial for MG integrity, and a disruption of this integrity is associated with a reduction of synthetic activity and apoptosis induction (Ben Chedly et al., 2009). Due to the epithelial nature of the MEC, the junctions are absent of the cellular apical pole. This position is in accordance with the fact that miRNA involved in this BP are not secreted with MF which is apocrine mechanism (Mather and Keenan, 1998; Heid and Keenan, 2005). This is in favor of the hypothesis of different mechanisms of miRNA secretion depending to the function of miRNA. Moreover, among the BP identified as common between the two miRNA detected only in MG, we identified those involved in differentiation and regulation which are in line with the intensive activity of MEC.

The origin of milk miRNA from the MG makes them an attractive target as potential biomarkers of the health status and performance of the lactating animal. The detection of *miR-148a*, *miR-125b* and *miR-29a* in bovine MF allowed the use of this source of miRNA to identify milk biomarkers. Indeed, a previous study reported that *miR-148a* and *miR-29a* are negative regulators of the innate immune response (Liu et al., 2010) and *miR-125b* was consistent with an anti-inflammatory role (Dilda et al., 2012). In addition, *miR-148a*, has been proposed as a biomarker for quality control of raw milk and infant formula (Chen et al., 2010). However, the lack of *miR-204* in MF globule, which was down regulated in MG challenged with *Staphylococcus aureus*, may preclude its use as biomarker of MG infection (Li et al., 2015). Nevertheless, our results support the possibility of using MF globules for the diagnostic of cow health, provided that the presence and the representativeness of the chosen biomarkers are validated.

## CONCLUSIONS

In the present study, we demonstrated that miRNAs are natural components of cow MF globule. By studying the expression of 9 miRNA in MG and MF globules we showed differences between MG and MF miRNA profiles. The miRNA exclusively present in MG are potentially involved in pathways important to MG biology. The better characterization of their expression profiles relative to the physiological status of the animals will enable a refinement of their function. It is unclear whether miRNA in MF globules originate from an active secretion or a passive leak by MG cells. The profile of miRNA differs between MG and MF, precluding the use of MF miRNA as an exact mirror of MG tissue. Further investigations are warranted on the identification of miRNA as cow health biomarkers. Our results, together with those of others, may serve as a starting point for future studies investigating the role miRNA, their transfer to milk and potentially to the consumer. The MF is particularly of interest as the action of milk miRNA could be modulated by their packaging within “transporting vehicles” which may play an important role for their transfer and action in the consumer (Alsaweed et al., 2015).

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank D. Roux and his team (UERT team, Theix, 63122 Saint Genes-Champanelle) for the management of the animals. This work was supported by the Department Phase of INRA, through a “Crédit Incitatif” project. Daiane Lago-Novais was awarded financial support from the Brazilian Ministry of Science and Technology “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES).

## **CONFLICT OF INTEREST**

Authors declared no conflict of interest in the present study.

## REFERENCES

- Alsaweed, M., A.R. Hepworth, C. Lefèvre, P.E. Hartmann, D.T. Geddes, and F. Hassiotou. 2015. Human Milk MicroRNA and Total RNA Differ Depending on Milk Fractionation. *Journal of cellular biochemistry* 116: 2397-2407.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297.
- Ben Chedly et al. 2009. Cell junction disruption after 36 h milk accumulation was associated with changes in mammary secretory tissue activity and dynamics in lactating dairy goats. *Journal of Physiology and Pharmacology* 3:105-111.
- Brenaut, P. et al. 2012. Validation of RNA isolated from milk fat globules to profile mammary epithelial cell expression during lactation and transcriptional response to a bacterial infection. *Journal of Dairy Science* 95: 6130-6144.
- Canovas, A. et al. 2014. Comparison of five different RNA sources to examine the lactating bovine mammary gland transcriptome using RNA-Sequencing. *Scientific Reports* 4: 5297.
- Chen, X. et al. 2010. Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell research* 20: 1128-1137.
- Cui, W., Q. Li, L. Feng, and W. Ding. 2011. MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland. *Molecular and cellular biochemistry* 355: 17-25.
- Dilda, F. et al. 2012. Escherichia coli lipopolysaccharides and Staphylococcus aureus enterotoxin B differentially modulate inflammatory microRNAs in bovine monocytes. *Veterinary journal (London, England : 1997)* 192: 514-516.
- Friedman, R. C., K. K. H. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research* 19: 92-105.
- Hata, T. et al. 2010. Isolation of bovine milk-derived microvesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochemical Biophysical Research Communications* 396: 528-533.
- Heid, H. W., and T. W. Keenan. 2005. Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *European Journal of Cell Biology* 84: 245-258.

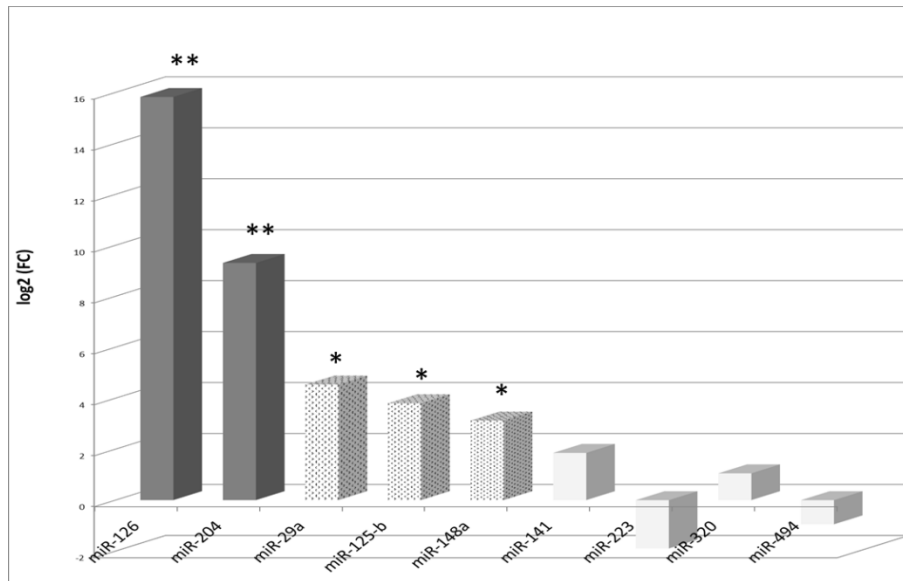
- Izumi, H. et al. 2012. Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *Journal Dairy Science* 95: 4831-4841.
- Izumi, H. et al. 2014. Time-dependent expression profiles of microRNAs and mRNAs in rat milk whey. *PloS one* 9: e88843.
- Izumi, H. et al. 2015. Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages. *Journal Dairy Science* 98: 2920-2933.
- Kosaka, N., H. Izumi, K. Sekine, and T. Ochiya. 2010. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence* 1: 7.
- Le Guillou, S. et al. 2014. Characterisation and Comparison of Lactating Mouse and Bovine Mammary Gland miRNomes. *PloS one* 9.
- Lemay, D. G. et al. 2013. RNA sequencing of the human milk fat layer transcriptome reveals distinct gene expression profiles at three stages of lactation. *PloS one* 8: e67531.
- Leroux, C. et al. 2016. Bovine mammary nutrigenomics and changes in the milk composition due to rapeseed or sunflower oil supplementation of high-forage or high-concentrate diets. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics* 9: 65-82.
- Li, R. et al. 2015. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences* 16: 4997-5013.
- Liu, X. et al. 2010. MicroRNA-148/152 impair innate response and antigen presentation of TLR-triggered dendritic cells by targeting CaMKIIalpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185: 7244-7251.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25: 402-408.
- Maningat, P. D. et al. 2009. Gene expression in the human mammary epithelium during lactation: the milk fat globule transcriptome. *Physiological genomics* 37: 12-22.
- Maningat, P. D., P. Sen, A. L. Sunehag, D. L. Hadsell, and M. W. Haymond. 2007. Regulation of gene expression in human mammary epithelium: effect of breast pumping. *The Journal of endocrinology* 195: 503-511.
- Mather, I. H., and T. W. Keenan. 1998. Origin and secretion of milk lipids. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 3: 259-273.

- Mobuchon, L. et al. 2015a. Annotation of the goat genome using next generation sequencing of microRNA expressed by the lactating mammary gland: comparison of three approaches. *BMC genomics* 16: 285.
- Mobuchon, L. et al. 2015b. Food Deprivation Affects the miRNome in the Lactating Goat Mammary Gland. *PloS one* 10: e0140111.
- Munch, E. M. et al. 2013. Transcriptome profiling of microRNA by Next-Gen deep sequencing reveals known and novel miRNA species in the lipid fraction of human breast milk. *PloS one* 8: e50564.
- Nikitin, A., S. Egorov, N. Daraselia, and I. Mazo. 2003. Pathway studio--the analysis and navigation of molecular networks. *Bioinformatics (Oxford, England)* 19: 2155-2157.
- Sun, J. et al. 2015. MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC genomics* 16.
- Zhou, S. J. et al. 2012. Fish-oil supplementation in pregnancy does not reduce the risk of gestational diabetes or preeclampsia. *The American journal of clinical nutrition* 95: 1378-1384.

**Table 1:** Biological process targeted exclusively by both *miR-126* and *miR-204*.

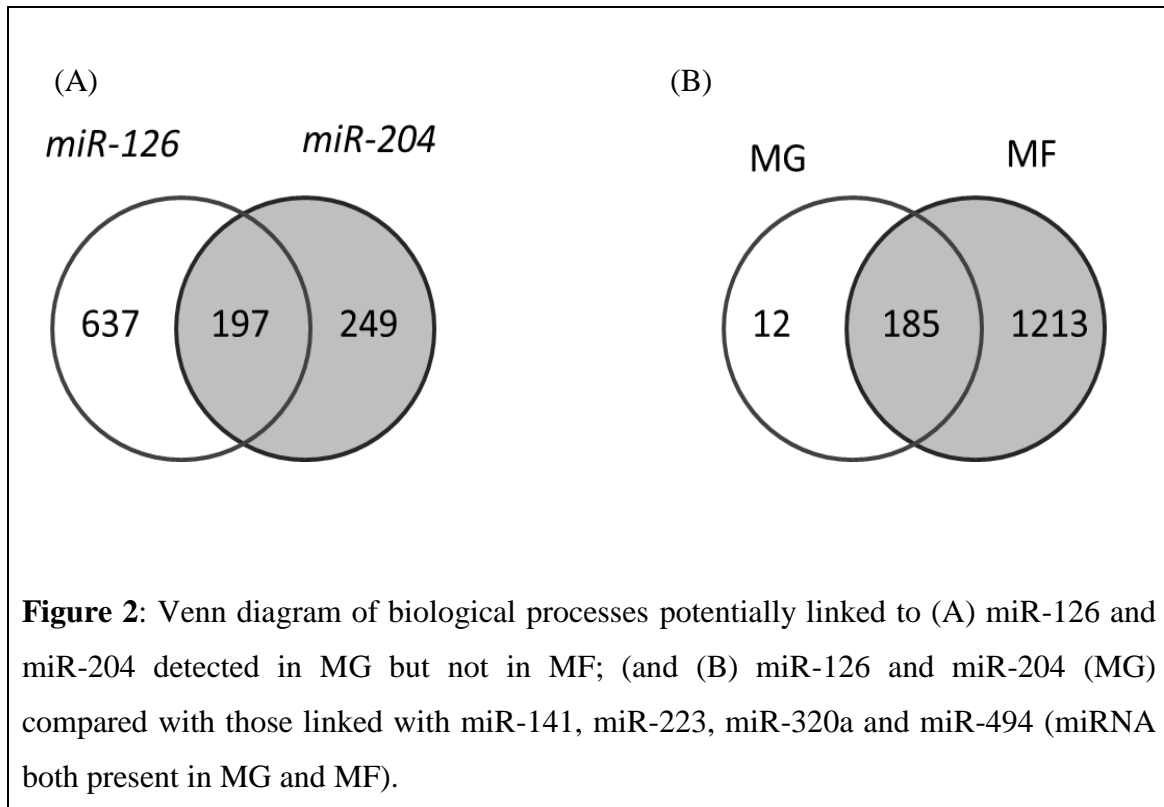
	<i>P</i> -values
Adherens Junction Organization	0,0007
Cell-Substrate Adhesion	0,0003
Inner Ear Development	0,0001
Neural Crest Cell Differentiation	0,0017
Neuroepithelial Cell Differentiation	0,0012
Positive Regulation of Nitric-Oxide Synthase Activity	0,0099
Response to Caffeine	0,0008
Regulation of Transforming Growth Factor Beta2 Production	0,0001
Regulation of Transmembrane Transporter Activity	0,0001
Regulation of Protein Stability	0,0071
Sympathetic Nervous System Development	0,0002
Uterus Development	4,3E-06

Analyses were performed using the Pathway Studio software.

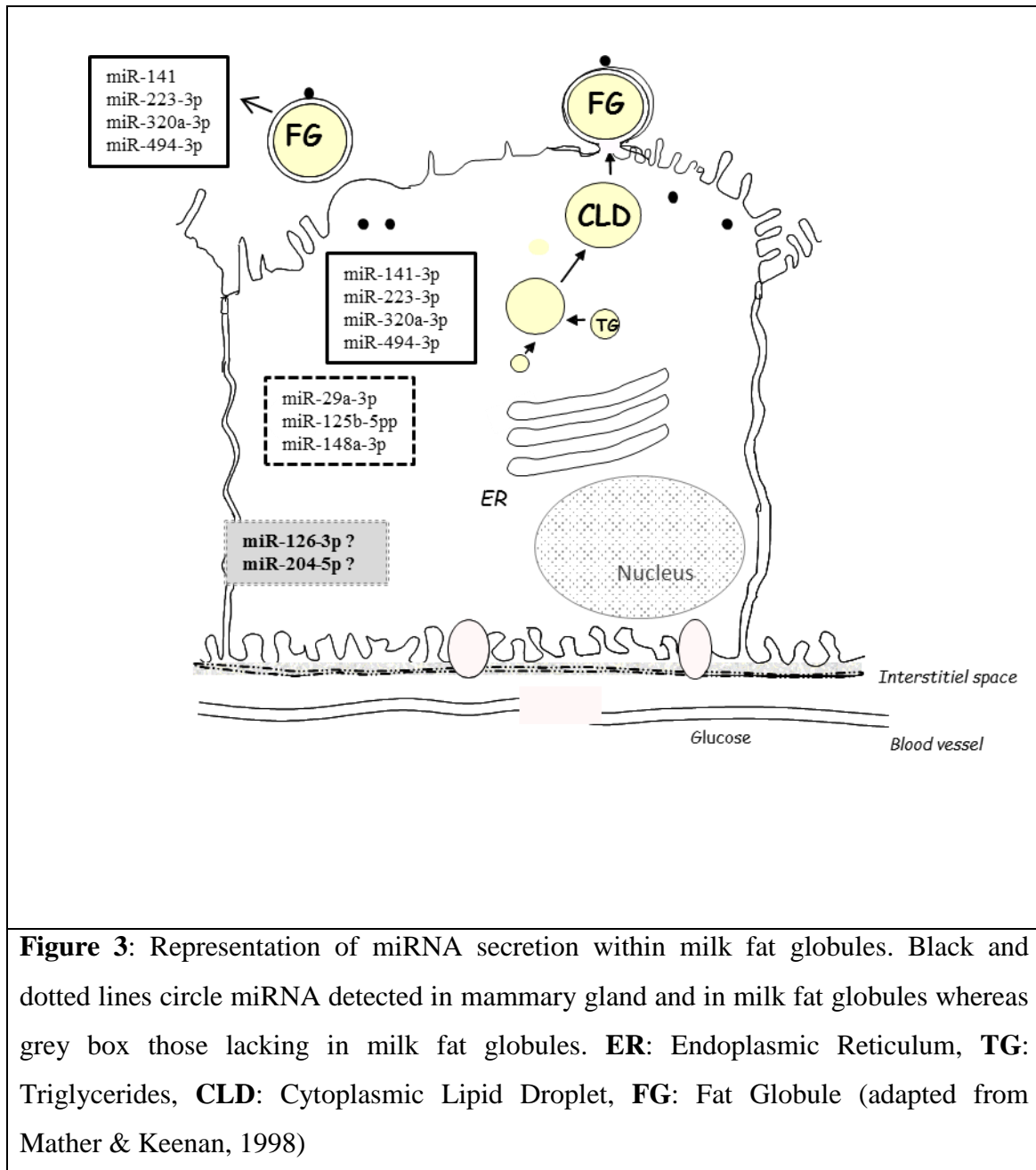


**Figure 1:** Analysis of the expression of nine miRNA in mammary gland compared with milk fat globule

(MF; n=6). Results are presented as log<sub>2</sub> of the fold change between MF and MG studied miRNA abundance. \*p<0.05, \*\*p<0.000001







## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na PARTE I da Tese, foi apresentado os resultados da inclusão de níveis de GB no suplemento de cabras em pastagem formada por *Panicum maximum* cv. Aruana. Os resultados do presente estudo mostraram que o uso da GB não limita o consumo de MS, reduz a excreção de N via urina, aumentando a sua retenção, além de reestabelecer os níveis de glicose após quatro horas do fornecimento do suplemento. Eleva o teor de gordura no leite e aumenta o teor de ácidos graxos poli-insaturados do leite. Podendo assim, ser uma estratégia adequada para melhorar as propriedades funcionais do leite de cabra. Com isso, a GB pode ser usada em até 105 g kg<sup>-1</sup> na formulação do suplemento para cabras em lactação.

Na PARTE II da Tese, foi apresentado os resultados do uso da gordura do leite (GG) como fonte não invasiva de microRNA (miRNA), e se estes são representativos da expressão de miRNA na glândula mamária (GM). Sendo demonstrado que os miRNAs são componentes naturais do GG de vacas lactantes. Ao estudar a expressão de 9 miRNA na GM e GG foram verificadas diferenças entre os perfis de miRNA da GM. Os miRNAs exclusivamente presentes na GM estão potencialmente envolvidos em vias importantes na biologia da GM. A melhor caracterização dos seus perfis de expressão em relação ao estado fisiológico dos animais permitirá um refinamento da sua função. Não está claro se miRNA do GG originam de uma secreção ativa por células da GM. O perfil de miRNA difere entre GM e GG, impedindo o uso de miRNA do GG como um reflexo exato do que se passa do tecido mamário. Outros estudos são sugeridos para a identificação de miRNA como biomarcadores de saúde de vacas lactantes. Os resultados do presente estudo adicionado a outras pesquisas, podem servir como ponto de partida para futuros estudos investigando o papel do miRNA, sua transferência para o leite e seu potencial para o consumidor.