

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

**BIOQUÍMICA E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS
PLASMÁTICO DE VACAS EM LACTAÇÃO INGERINDO
DIETAS CONTENDO COLORÍFICO DE URUCUM**

Autora: Clarissa Sampaio de Oliveira Lima
Orientador: Prof. Dr. Albericio Pereira de Andrade

GARANHUNS
Estado de Pernambuco
Janeiro – 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

**BIOQUÍMICA E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PLASMÁTICO DE
VACAS EM LACTAÇÃO INGERINDO DIETAS CONTENDO
COLORÍFICO DE URUCUM**

Autora: Clarissa Sampaio de Oliveira Lima
Orientador: Prof. Dr. Alberício Pereira de Andrade
Coorientadores: Prof. Dr. Omer Cavalcanti de Almeida
Dr. Inocêncio Sebastião Guido

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS, no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Área de Concentração: Produção de Ruminantes.

GARANHUNS
Estado de Pernambuco
Janeiro - 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

**BIOQUÍMICA E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS PLASMÁTICO DE
VACAS EM LACTAÇÃO INGERINDO DIETAS CONTENDO
COLORÍFICO DE URUCUM**

Autora: Clarissa Sampaio de Oliveira Lima
Orientador: Prof. Dr. Alberício Pereira de Andrade
Coorientadores: Prof. Dr. Omer Cavalcanti de Almeida
Dr. Inocêncio Sebastião Guido

TITULAÇÃO: Mestre em Ciência Animal e Pastagens
Área de Concentração: Produção Animal

APROVADA: ___/___/___.

Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Magalhães
PPGCAP/UFRPE

Prof. Dr. Ariosvaldo Nunes de Medeiros
DZ/CCA/UFPB

Prof. Dr. Alberício Pereira de Andrade
PPGCAP/UFRPE
(Orientador)

"Se os bons combates eu não combater, minha coroa não conquistarei. Se minha carreira eu não completar, de que vale a minha fé tanto guardar..."

Pe. Fábio de Melo

À minha mãe Cristina Sampaio,

pela doçura, sabedoria e dedicação diante da vida.

Ao meu pai Mavial Menezes de Oliveira,

pela persistência, entusiasmo e inteligência que carrega.

Ao meu companheiro e esposo Marcos Aurélio,

pelo incentivo, ajuda, força e amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela vida e oportunidade de estar aqui. Por ser bondoso e misericordioso com seus filhos, acalmando o coração em momentos tenebrosos e sendo luz diante da vida, para que os passos aqui deixados sejam reflexos apenas do seu infinito amor.

À minha mãe Cristina por ser única e exemplar, por acreditar e nunca desistir de mim, sendo um porto seguro, aconchego e refúgio nos momentos difíceis. E até pela saudade proporcionada, pois só assim pude enxergar a dimensão de um amor.

Ao meu pai Maviael pelo encorajamento e confiança depositada nos primeiros passos, pois neles me senti capaz para seguir a vida com autonomia, independência e confiança.

Ao meu esposo Marcos Aurélio pelo amor dedicado, companheirismo, ensinamentos e por me mostrar a realidade quando não fui capaz de enxergar. E acima de tudo, por ser minha maior felicidade.

A minha avó Socorro (*in memorian*), por ter sido minha alegria em família, meu aconchego, minha preciosidade para eu cuidar e amar até quando Deus me permitiu. Seu exemplo de garra e persistência nunca morrerá para mim.

Ao meu sogro Aneval (*in memorian*), por ser um espelho a se seguir, de humildade, honestidade e sabedoria. Por acreditar em mim, me confiando à companhia do seu filho com muito amor e sinceridade.

A toda minha nova família Lima, por ter sido enlace e companheirismo na transposição de filha para esposa. A minha sogra Cléria por nunca me fazer esquecer a importância da fé, a minha cunhada Ecia Mônica, por ser amiga e exemplo para mim. A Cristiane, Kleiton, Williton, João Gabriel e Cecília, por terem contribuído em melhorar minha personalidade e maturidade.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens, por abrir as portas e possibilitar a realização desse trabalho.

Ao Instituto Agronômico de Pernambuco – Estação Experimental de São Bento do Uma, pelo apoio a realização do projeto de pesquisa, em nome do Dr. Inocêncio Sebastião Guido.

Ao meu orientador, professor Albericio Pereira de Andrade, pela disponibilidade, compreensão e orientação no decorrer desse período.

Ao meu Coorientador, professor Omer Cavalcanti de Almeida pela imensa contribuição, dedicação e ajuda.

A todos os professores que contribuíram para meu crescimento profissional, especialmente, Kleber Régis Santoro, Willian Gonçalves do Nascimento e Jorge Eduardo Lucena.

Aos membros da banca examinadora, André Luiz Rodrigues Magalhães e Ariosvaldo Nunes de Medeiros pela disponibilidade e colaboração.

Aos colegas de mestrado pela troca de informações e conquistas divididas, em especial a Rayanne Thalita de Almeida e Cláudio Junior pelo apoio, ajuda e companheirismo.

MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA DA AUTORA

Clarissa Sampaio de Oliveira Lima, filha de Maviael Menezes de Oliveira e Maria Cristina Sampaio de Oliveira, nascida no município de Recife, Pernambuco, no dia 20 de outubro de 1989.

Em agosto de 2007, ingressou na Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, onde em agosto de 2012 obteve o título de Bacharel em Zootecnia. Em agosto de 2013, ingressou no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal e Pastagens na Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, concentrando seus estudos na área de Produção Animal.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
FIGURAS DO APÊNDICE.....	xi
I-INTRODUÇÃO GERAL.....	12
II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1. Carotenoides.....	14
2. Atividade antioxidante dos carotenoides.....	15
3. Bixina como agente antioxidante.....	16
4. Concentração de metabólitos sanguíneos em função da ingestão de bixina....	17
Referências bibliográficas.....	23
III-CAPÍTULO I.....	27
INCLUSÃO DE COLORÍFICO DE URUCUM EM DIETAS DE VACAS LEITEIRAS COMO AGENTE ANTIOXIDANTE DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	28
Resumo.....	28
Abstract.....	29
1. Introdução.....	29
2. Material e Métodos.....	30
3. Resultados e Discussão.....	33
3.1 Perfil lipídico sanguíneo.....	33
3.2 Perfil de ácidos graxos plasmáticos.....	36
4. Conclusões.....	37
Referências.....	38

Apêndice A	44
Apêndice B	48
Anexo.....	52

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Ingredientes e composição química das dietas (valores expressos em g/kg).....	41
TABELA 2. Concentração de colesterol total (CT), colesterol LDL, colesterol HDL e LDL oxidada (ox) (mg/dL) do plasma de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo colorífico de urucum.....	42
TABELA 3. Perfil de ácidos graxos plasmático de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo colorífico de urucum (mg/100g).....	43

FIGURAS DO APÊNDICE

	Páginas
FIGURA 1. Distribuição das vacas em baias individuais.....	45
FIGURA 2. Concentração do colesterol total plasmático (mg/dL) de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo colorífico de urucum.....	45
FIGURA 3. Concentração de colesterol LDL plasmático de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo colorífico de urucum	46
FIGURA 4. Concentração de colesterol HDL plasmático de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo colorífico de urucum.....	46
FIGURA 5. Concentração de LDL oxidada plasmática de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo colorífico de urucum	47
FIGURA 6. Comportamento do ácido palmitoleico no Perfil de ácido graxo plasmático de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo colorífico de urucum.....	47

I INTRODUÇÃO GERAL

A produção animal encontra-se em constantes transformações devido às pressões mercadológicas por alimentos benéficos à saúde, em especial com características funcionais, ou seja, que promovam o melhoramento das taxas metabólicas. Nesse contexto, a introdução de antioxidantes a dieta dos animais de produção se apresenta com potencial para atender à essa nova realidade.

Os carotenoides são pigmentos naturais muito utilizados pelas indústrias e possuem ações benéficas para saúde pública, uma vez que apresentam proteção contra a ação dos radicais livres, portanto capazes de retardar o envelhecimento e inibir a incidências de doenças da sociedade moderna, especialmente as cardiovasculares e os cânceres.

Destes compostos, a bixina, principal carotenoide encontrado nas sementes do urucunzeiro (*Bixa orellana* L.), tem se mostrado eficiente pela alta capacidade de inibir os processos oxidativos, devido a habilidade de compartilhar elétrons com esses radicais em decorrência do grande número de ligações conjugadas em sua cadeia. Compostos que apresentam capacidade de doar ou compartilhar elétrons têm se mostrado eficiente em combater o aparecimento de patologias da sociedade atual, como as doenças

cardiovasculares, por estarem intimamente ligadas à oxidação das LDL sanguíneas, uma vez que, quando em estado oxidado, são mais reativas e, portanto, responsáveis pela inicialização desses processos, bem como a diminuição da concentração do colesterol total sanguíneo.

Portanto, o objetivou-se do presente experimento foi avaliar o efeito da ingestão da bixina sobre a concentração sanguínea de colesterol total, HDL, LDL e LDL oxidada, bem como a qualidade do perfil de ácidos graxos sanguíneo de vacas em lactação.

II REVISÃO DE LITERATURA

1. Carotenoides

Os carotenoides são compostos sintetizados por plantas e microrganismos e se encontram presentes principalmente em frutas e vegetais. Estes são responsáveis pela coloração amarela, laranja e vermelha, além de participar em diversas funções vitais do metabolismo. Quimicamente são tetraterpenóides compostos por 40 carbonos ligados por unidades opostas no centro da molécula (Fraser & Bramley, 2004), já foram catalogadas mais de 600 estruturas. Os carotenoides mais comuns presentes nos alimentos de origem vegetal são o β -caroteno (cenoura), licopeno (tomate), xantofilas (manga e mamão) e bixina (urucum).

Em 1999, a legislação brasileira autorizou o uso de carotenoides na indústria alimentícia. Atualmente os dois compostos permitidos são o β -caroteno sintético e os naturais. Estes pigmentos apresentam um crescimento comercial e expansão na sua utilização por serem inócuos, atóxicos e apresentarem boa qualidade colorífica (Oliveira, 2005) dentre outras funções.

Os carotenoides apresentam propriedades antibacterianas, anti-inflamatória, antioxidante, antisséptica, cicatrizante, depurativa e purgativa (Taylor, 2002). Além do efeito estético, o uso de carotenoides em produtos alimentícios pode proporcionar benefícios à saúde do consumidor, uma vez que apresentam atividade de proteção contra o câncer e doenças cardiovasculares, decorrente, especialmente, de sua capacidade de neutralizar radicais livres (Maldonado et al., 2008). Ainda, os α , β e γ carotenos são capazes de se converter em vitamina A (Rao & Rao, 2007).

2. Atividade antioxidante dos carotenoides

Antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações, comparando a um substrato oxidável, que retarda ou inibe processos oxidativos. Dado os danos causados pelos radicais livres, os organismos vivos desenvolveram vários mecanismos de defesa, conforme aponta Shami & Moreira, (2004), o sistema antioxidante encontrado na célula animal, vegetal e circulação sanguínea e são constituído por complexos enzimáticos as quais participam superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, e não enzimáticos, constituído por vitamina A, ác. ascórbico, tocoferóis, ácido úrico, vitamina E, dentre outros.

As enzimas antioxidantes são importantes parâmetros para avaliar a eficácia do sistema de proteção, visto que sua alta atividade é benéfica para o organismo, pois demonstra que seu sistema de defesa endógena está sendo capaz de responder ao estresse oxidativo. Muitos compostos podem ser enquadrados na classe de antioxidantes. As dietas, por exemplo, são ricas não apenas em carotenoides, mas em vitamina C, vitamina E, polifenóis (flavonoides).

Devido a sua atividade antioxidante, os carotenoides são hábeis em sequestrar o oxigênio singlete e neutralizar os radicais livres, diminuindo o estresse oxidativo celular (Barreiros et al., 2006). Provavelmente, isto se deve ao fato de sua estrutura química possuir ligações duplas conjugadas que proporcionam distribuição eletrônica capaz de permitir a adição de radicais livres aos carbonos adjacentes às insaturações, assim promove maior reatividade dessas moléculas frente a agentes oxidantes e como consequência proporciona maior estabilidade e redução da concentração de oxigênio do meio. Dado isso, a formação de radical peróxido gerada é inibida da auto-oxidação (Kiokias & Gordon, 2003), além de todas essas funções vale ressaltar a importância da sua origem, tendo em vista os benefícios de produtos naturais.

A busca por antioxidantes não sintéticos para produtos alimentícios, cosméticos e farmacêuticos vem representando um importante desafio para a pesquisa industrial nos últimos anos (Laguerre et al., 2007). Além disso, alguns produtos naturais (como extrato de gengibre, urucum e de outros temperos) apresentaram, *in vitro*, maior atividade antioxidante que os produtos sintéticos (Murcia et al., 2004), associando mais um ponto positivo e promissor para este mercado.

3. Bixina como agente antioxidante

A semente do urucunzeiro (*Bixa orellana* L.), planta nativa do Brasil, é rica em carotenoides, sendo a bixina o predominante em sua semente cerca de 80% (Satyanarayana et al., 2003), apresentando-se de ampla utilidade na indústria de alimentos, rações, laticínios, entre outros. Esse carotenoide pode ser um substituinte ao

corante de origem sintética, pois agrega todas as atribuições coloríficas, bem como antioxidante, podendo ser caracterizado como um composto nutracêutico.

Além da bixina, as sementes de urucum apresentam outro importante carotenoide denominado norbixina, o que a caracteriza como um apocarotenóide, ou seja, a junção de dois carotenoides, sendo a bixina lipossolúvel e a norbixina hidrossolúvel (Giuliano et al., 2003). O teor de bixina das sementes do urucuzeiro pode oscilar de acordo com a variedade cultivada, o solo e clima, encontrando-se valores de 1% a 5% (Franco et al., 2002). A bixina apresenta funções bem específicas. O extrato das sementes de urucum tem sido relatado em exibir atividade quimiopreventiva, antioxidante e anti-inflamatória (Shilpi et al., 2006).

A bixina é um inibidor muito eficaz do oxigênio singlete, capaz de desativar o estado triplete animado de sensibilizadores e eliminar espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), como radical superóxido, ácido hipocloroso e óxido nítrico (Chiste et al., 2011). Provavelmente esta capacidade está ligada a sua estrutura peculiar contendo 25 átomos de carbono, nove duplas ligações conjugadas, e dois grupos carboxílicos, sendo um éster de metilo (Somacal et al., 2015), o que proporciona alta atividade, conforme observou Gomes et al., (2008) de 91,6% , Lemos et al., (2008), 63,6% e Moreira, (2013), 82,4 %.

4. Concentração de Metabólitos sanguíneos em função da ingestão de bixina

✓ Colesterol: HDL, LDL e LDL oxidada

A perda da propriedade vaso protetora do endotélio representa a etapa inicial da aterosclerose (Yamamoto et al., 1997), além disso, ocorre diminuição do relaxamento

endotelial vascular via acetilcolina, ocasionando vasoconstrição e declínio do fluxo sanguíneo. Esses sintomas foram observados em estudos de Sun et al., (2000), em coelhos recebendo 1% de suplementação de colesterol por 8-10 semanas, demonstrando redução da vaso dilatação do endotélio na artéria carótida, o que pode ser ocasionada pela presença de placas de lipídios na aorta.

Alguns mecanismos são responsáveis pela homeostase do colesterol, afetando sua concentração plasmática. Entre eles seria a expressão de receptores LDL, especialmente no fígado, onde boa parte deles está localizada, acarretando diminuição do colesterol plasmático e redução dos níveis de LDL (Dornas et al., 2009). Fato este de extrema importância para compreensão dos efeitos protetores dos antioxidantes, já que se identifica um efeito direto do aumento do colesterol HDL com a diminuição da oxidação da LDL.

Acredita-se que a ingestão de carotenoides, através de sua função antioxidante pode prevenir a aterosclerose. A lipoproteína LDL, quando em estado oxidado danifica o endotélio. A ação antioxidante dos carotenoides por sua vez, mitigaria o processo de oxidação da LDL (Fontana et al., 2000) e como consequência inibiria a inicialização das lesões ateroscleróticas. Este processo inicia-se quando a LDL é atacada pelos radicais livres, se tornando oxidada. A LDL oxidada (LDL-ox) por sua vez, libera fatores que iniciam o recrutamento de monócitos, transformando-os em macrófagos. As LDL-ox são reconhecidas por receptores “*scavengers*”, formando células “espumosas” que é exatamente o início da lesão (Yu et al., 2013).

Estes receptores “*scavengers*” não são regulados pelo conteúdo celular de colesterol. Dessa forma, ocorre o acúmulo de colesterol no sangue (Carmena, 2004), explicando que o aumento da concentração de LDL oxidada gera consequentemente um

aumento no nível de colesterol sanguíneo, justificando os resultados encontrados na literatura citados anteriormente.

Um estudo relacionando o nível de colesterol sanguíneo com a incidência de aterosclerose foi conduzido por Kritchevsky (1995), quando alimentou coelhos com dieta normal, e acrescidas com 25, 113, 253 ou 507 mg/dia de colesterol, observou que 71% dos coelhos que receberam a maior dose apresentaram aterosclerose. Ratifica-se essa relação com o estudo conduzido por Meeker & Kesten (1941), quando adicionaram 60 ou 250 mg de colesterol em óleo vegetal e introduziram à dietas de coelhos por três meses. Os animais demonstraram lesões ateroscleróticas, confirmando a teoria de que o colesterol é o precursor para o desenvolvimento de doença vascular aterosclerótica.

Em contrapartida Lima et al., (2001), em estudo com coelhos, recebendo dietas com alta quantidade de colesterol identificaram que a bixina foi capaz de reduzir o colesterol total em 44% e elevar os níveis de colesterol HDL, sendo isso uma vantagem, visto que o HDL transporta o colesterol da circulação sanguínea para o fígado, onde é metabolizado. Da mesma forma Carvalho et al., (2004), ao adicionar leite de cabra em pó e bixina a dieta de coelhos verificaram aumento de 40% na concentração de colesterol HDL no 31º dia. De Paula (2009), em estudo com ratos, avaliou também a atividade da bixina em relação às porções de colesterol, através de uma dieta hiperlipidêmica e concluiu que a bixina aumentou o HDL de 0,62 para 1,17 mmol/L e diminuiu o LDL de 5,07 para 2,78 mmol/L, bem como o colesterol total de 6,15 para 4,15 mmol/L.

Diante desses resultados identifica-se a relação direta entre inclusão de bixina na dieta e a diminuição do colesterol total e LDL sanguíneo, o que como citado anteriormente é alcançado através do mecanismo antioxidante deste carotenoide, capaz

de reduzir essas concentrações e conseqüentemente prevenir a aterosclerose, já que esta está intimamente relacionada com o aumento do colesterol LDL.

Muitas pesquisas foram realizadas no sentido de diminuir o colesterol circulante em cobaias, com o intuito de estudar seu efeito sobre parâmetros sanguíneos em humanos. Porém poucas avaliaram seu efeito sobre animais domésticos, que lançaria uma inovação dentro desse meio, visto que melhorias no metabolismo desses animais trariam benefícios à população. Por meio do consumo de carne, leite, ovos ou qualquer outro produto de origem animal que tivesse os produtos do seu metabolismo manipulado qualitativamente.

Dessa forma, os poucos estudos encontrados na literatura permitem observar resultados promissores como os obtidos por Harder et al., (2007), ao fornecer dietas contendo bixina (0,5 a 2% na MS) a galinhas poedeiras, verificaram redução de 60% (2% na MS) na concentração do colesterol das gemas dos ovos quando da adição do maior nível. Confirmando esses resultados promissores em animais de produção, Rocha, (2014) verificou redução em cerca de 70% do colesterol da carne de ovinos que receberam dietas contendo bixina.

Ratificando os resultados positivos da bixina sobre parâmetros bioquímicos sanguíneos, Somacal et al., (2015) verificaram que a ingestão do carotenoide bixina foi capaz prevenir a formação de placas ateroscleróticas. Quando submeteram coelhos a dietas hiperlipidêmicas verificaram que o carotenoide bixina preveniu o aumento do colesterol não HDL e triglicérides; e aumentou em mais de 150% o colesterol HDL, bem como, impediu a formação de placas aterosclerótica, agindo diretamente na capacidade antioxidante endógena através do aumento da enzima catalase. Ou seja, a

bixina melhorou o equilíbrio redox intracelular, protegendo-a do estresse oxidativo (catalase).

De acordo com esses estudos observa-se a estreita relação entre o carotenoide do urucum e a diminuição do colesterol total e LDL, como também o aumento do colesterol HDL, porém não se deixa claro ao certo qual seria o mecanismo de ação que leva a melhorias nos parâmetros bioquímicos sanguíneos, especialmente os relacionados à fração do colesterol. Uma justificativa plausível para tal fato pode ser hipotetizada através do estudo de Silva, (2013) onde se observou que a suplementação de urucum na dieta aumenta significativamente a expressão da CYP7A1, a principal enzima envolvida no catabolismo do colesterol.

Diante disso, pode-se concluir que o efeito hipocolesterolemiantes do urucum envolve a regulação também da CYP7A1 a qual aumenta a conversão do colesterol á ácidos biliares. Sendo isto, um fato positivo e relevante para este contexto, pois com a elevação da excreção de colesterol na bile apenas uma pequena parte do colesterol irá formar as LDL e ser direcionado para os tecidos, já que a maior parte dele será excretado como ácidos biliares, o que possibilita perdas via fezes (Silva et al., 2013).

Associada a essa hipótese, outra teoria coadjuvante a este mecanismo, seria a captação através de receptores da LDL oxidada, como dito anteriormente, onde tais receptores não são regulados pelo volume de colesterol, acarretando o aumento do colesterol no sangue, ou seja, a formação de LDL oxidada na corrente sanguínea será diretamente proporcional ao acúmulo de colesterol no sangue.

✓ **Perfil de ácidos graxos**

Paralela a ingestão de bixina, diversas mudanças no perfil lipídico podem ser observadas, como aumento do chamado colesterol “bom” e diminuição do colesterol “ruim”, porém, poucos estudos tiveram como objetivo avaliar alterações no perfil de ácido graxo através da inclusão desse carotenoide. Rocha, (2014) verificou que a adição de bixina a dietas de ovinos promoveu alteração no perfil de ácidos graxos da carne com diminuição na concentração de ácidos graxos de cadeia ímpar (C15:0 e C17:0). Este fenômeno foi associado a possíveis modificações no ambiente ruminal promovidas pelo carotenoide, visto que esses ácidos graxos são de origem exclusiva da síntese microbiana (Jenkins, 1993), o que pode ser confirmado pelos resultados obtidos por Braga et al., (2007) ao trabalhar com bixina verificou que este carotenoide foi efetivo ao inibir algumas espécies bacterianas presentes no rúmen, especialmente as gram-positivas o que levou a inibição da síntese de ácidos graxos dessa classe.

Além disso, Rocha, (2014) verificou redução na concentração de ácidos graxos insaturados (esteárico) da carne, o que pode ser associada à ação inibitória da bixina sobre a biohidrogenação, que compreende o mecanismo ruminal de adicionar hidrogênio na cadeia carbônica do ácido graxo, afim de não causar toxicidade ao animal, mas em contrapartida, torna-o mais saturado. Fato interessante visto que a oferta de uma carne menos saturada para sociedade moderna é de grande importância, uma vez que gorduras saturadas são promotoras de doenças crônicas advindas do excesso de gorduras contidas na dieta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.1, p.113-123, jan./fev. 2006

BRAGA, F. G., BOUZADA, M. L., FABRI, R. L., DE O MATOS, M., MOREIRA, F. O., SCIO, E., COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal Ethnopharmacology**, v.111, p.267-71, 2007.

CARMENA, R., DURIEZ, P. E FRUCHART, J. C. Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis. **Circulation**, Dallas, v. 109, [suppl III]:III-2-III-7, 2009.

CARVALHO, R. F., TOLEDO, T. O., NAGEM, T. J., STRINGHETA, P. C. , JUNIOR, D. B., Efeitos de naringenina e bixina associados com leite de cabra sobre o metabolismo lipídico de coelhos. **Revista Chilena Nutrición**, v.l. 21, Suplemento n. 1, Noviembre, p. 177-182, 2004.

CHISTE, R. C., MERCADANTE A. Z., GOMES A. et al. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v.127, p. 419–426, 2011.

DE PAULA, H., PEDROSA, M. L., ROSSONI JR, J.V., HARAGUCHI, F. K., SANTOS, R. C., SILVA, M. E. Effect of an aqueous extract of annatto (*Bixa orellana*) seeds on lipid profile and biochemical markers of renal and hepatic function in hypercholesterolemic rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1373-1378, 2009.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T.; AUGUSTO, L. E. F., NAGEM, T. J. Aterosclerose experimental em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia** [online]. v.95, n.2, 2010.

FONTANA, J. D., MENDES, S. V., PERSIKE, D. S., PERACETTA, L. F., PASSOS, M. Carotenóides. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 13, p. 40-45, 2000.

FRANCO, C. F. O., SILVA, F. C. P., FILHO, J. C., NETO, M. B., JOSÉ, A. R. S., REBOUÇAS, T. N. H., FONTINÉLLI, I. S. C. 2002). **Urucunzeiro: agronegócio de corantes naturais**. EMEPA/SAIA, João Pessoa, p.120

FRASER, P. D., BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**. v. 43, n. 3, p. 228-65, 2004.

GIULIANO, G., ROSATI, C. E., BRAMLEY, P. M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. **Trends Biotechnology**., v.21, n.12, p. 513-516, 2003.

GOMES, M. F., SILVA, V. T. B., LAVERDE JR, A., TAKEMURA, O. S. Avaliação da atividade antioxidante de extratos das folhas de *Bixa orellana* (Bixaceae) e *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). **Arquivos Ciências da Saúde Unipar**, Umuarama, v. 12, n. 3, p. 169-173, set./dez. 2008.

HARDER, M. N. C., CANNIATTI-BRAZACA, S. G., COELHO, A. A., SAVINO, V. J. M., FRANCO, C. F. O. Cholesterol and iron availability in yolk of laying hens feed with annatto (*Bixa orellana*). **Animal**., v.1, p.477-482, 2007.

LEMOS, A. R. **Atividade antioxidante em genótipos de urucueiros (*Bixa orellana* L.) Itapetinga-BA**. 65f. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Salvador, 2008.

JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. In: Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism. **Journal Dairy Science**., v.76, p.3863, 1993.

KIOKIAS, S., GORDON, M. H. Antioxidant properties of annatto carotenoids. **Food Chemistry**, v.83, p.523-529, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814603001481>>. Acesso em: 16 abr. 2015.

KRITCHEVSKY D. Dietary protein, cholesterol and atherosclerosis: a review of the early history. **Journal Nutrition**., v.125, n.3, p.587S-593S, 1995.

LAGUERRE, M., LECOMTE, J., VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Review. **Progress in Lipid Research**, v. 46, p. 244-282, 2007.

LIMA, L. R. P., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J., PINTO, A. S., STRINGHETA, P. C., TINOCO, A. L. A., SILVA, J. F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science.**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 196-200, 2001.

MALDONADE, I. R., RODRIGUEZ A. D. B., SCAMPARINI, A. R. P. **Food Chemycal.**, v.107, p.145, 2008.

MEEKER, D. R., KESTEN, H. D. Effect of high protein diets on experimental atherosclerosis of rabbits. **Archives of Pathology**, v.31, p. 147- 162, 1941.

MOREIRA, V. S. **Atividade antioxidante e caracterização físico-química de variedades de urucueiros in natura e encapsulado.** 87f. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Salvador, 2012.

MURCIA, M. A., EGEA, I., ROMOJARO, F., PARRAS, P., JIMÉNEZ, A. M., MARTÍNEZ T. M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives, influence of irradiation procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 1872-1881, 2004.

OLIVEIRA, J. S. **Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (Bixa Orellana L).** 215f. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

RAO, A.V., RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research.** v.55, p.207-216, 2007.

ROCHA, D. V. **Efeito da ingestão de bixina sobre a estabilidade oxidativa, concentração de colesterol e perfil de ácidos graxos da carne de ovinos.** 77f. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade acadêmica de Garanhuns, Garanhuns.

SATYANARAYANA, A.; RAO, P.G.P.; RAO, D.G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). **Journal Food Science Technology**, v.40, p.131-141, 2003.

SHAMI, N. I. MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista Nutrição.** v.17, p.227-236, 2004.

SHILPI, J. A., RAHMAN, T. U., UDDIN, S. J., SHAHANUR, A., SADHU, S. K., VÉRONIQUE, S. Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology** ., v.108, p. 264-271, 2006.

SILVA, L. S. **Efeitos do beta caroteno e do urucum sobre a expressão de genes hepáticos do metabolismo do colesterol em ratas hipercolesterolêmicas**. 97 f. 2013. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Ouro Prto 2013.

SOMACAL, S., FIGUEIREDO, C. G., QUATRIN, A., RUVIARO, A. R., CONTE, L., AUGUSTI, P. R., ROEHRS, M., DENARDIN, I. T., KASTEN, J., MARCELO, L. V., DUARTE, M. M. F., EMANUELLI, T. The antiatherogenic effect of bixin in hypercholesterolemic rabbits is associated to the improvement of lipid profile and to its antioxidant and anti-inflammatory effects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2015.

SUN, Y. P., LU, N. C., PARMLEY, W. W., HOLLENBECK, C. B. Effects of cholesterol diets on vascular function and atherogenesis in rabbits. **Experimental Biology and Medicine**., v.224, n.3, p. 166-71, 2000.

TAYLOR, L. **Herbal Secrets of the Rainsforest**. 2 Ed. Rocklin, Ca: Sage Press Inc., 2002. 315 p.

YAMAMOTO G. I., ALVES A. A., PICON P. D. Propriedades anti-aterogênicas do fator relaxante derivado do endotélio (óxido nítrico). **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**., v.69, n.5, p.349-57, 1997.

YU, X. H., FU, Y. C., ZHANG D. W. et al. Foam cells in atherosclerosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 424, p.245–252, 2013.

III CAPÍTULO I

Inclusão de colorífico de urucum em dietas de vacas leiteiras como agente antioxidante de parâmetros bioquímicos

(Normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira)

**Inclusão de colorífico de urucum em dietas de vacas leiteiras como agente antioxidante
de parâmetros bioquímicos**

RESUMO – Excesso de colesterol sanguíneo pode ser responsável pelo aparecimento das doenças cardiovasculares, especialmente a aterosclerose. A inclusão de carotenoides na dieta dos animais pode trazer benefícios à saúde humana, alterando a concentração de colesterol e perfil de ácido graxo, devido ação antioxidante. O urucunzeiro (*Bixa orellana* L.) apresenta um potente carotenoide natural. Objetivou-se avaliar o perfil lipídico plasmático e de ácidos graxos de vacas leiteiras que receberam dietas contendo urucum. Foram utilizadas 32 vacas Holandesas (550 kg), distribuídas em delineamento inteiramente casualizado alocadas em baias individuais submetidas aos seguintes tratamentos: (1) dieta sem inclusão de colorífico, (2) 0,08g de colorífico/kg de MS, (3) 0,12g de colorífico/kg de MS e (4) 0,16g de colorífico/kg de MS. A amostra de sangue foi coletada via punção da veia epigástrica, centrifugada e congelada para análise posterior. Os resultados mostraram que a inclusão do urucum não promove melhorias na qualidade do colesterol plasmático, aumento do HDL e diminuição do LDL ($P>0,05$). Os resultados indicam que a utilização de urucum na dieta de vacas não possibilita a melhoria na concentração de colesterol total, entretanto promove alteração no perfil de ácido graxo plasmático ($p<0,05$).

Termos para indexação: *Bixa orellana* L., colesterol, urucum.

Spice inclusion of annatto in dairy cows diets as antioxidant of biochemical parameters

ABSTRACT – Blood cholesterol excess can be responsible for the onset of cardiovascular disease, especially atherosclerosis. The inclusion of carotenoids in the diet of animals can benefit human health by changing the concentration of cholesterol and fatty acid profile, due antioxidant action. The urucunzeiro (*Bixa orellana* L.) features a powerful natural carotenoid. Aimed to evaluate plasma lipids and fatty acids in dairy cows fed diets containing annatto. 32 Holstein cows were used (550 kg), distributed in a completely randomized design allocated in individual pens submitted to the following treatments: (1) diet without spice, (2) 0.08 g of spice / kg DM, (3) 0.12 g of spice / kg DM and (4) 0.16 g of spice / kg DM. The blood sample was collected via the epigastric vein puncture, centrifuged and frozen for later analysis. The results showed that the inclusion of annatto not promote improvements in the quality of serum cholesterol, increase HDL and LDL decreased ($P > 0.05$). The results indicate that the use of annatto in cows diet does not allow improvements in total cholesterol concentration, however leads to changes in plasma fatty acid profile ($p < 0.05$)

Index terms: cholesterol, *Bixa orellana* L., urucum

1. Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) são uma das principais causas de mortalidade no mundo. Já se têm elucidado os efeitos negativos de uma alimentação rica em colesterol e gorduras saturadas e a estreita relação com o desenvolvimento das DCV (Leifert & Abeywardena, 2008). A fim de tentar minimizar os efeitos da hipercolesterolemia, interferências de origem dietética têm sido propostas com a finalidade de atingir uma

diminuição na concentração do colesterol circulante (Park et al., 2009), como por exemplo a ingestão de compostos que possuam efeitos antioxidantes.

Na indústria de alimentos, os carotenoides são frequentemente utilizados como corantes naturais com a finalidade de atrair a atenção do consumidor. Porém, sua função pode ser referenciada de forma muito mais nobre, benéfica e funcional à saúde. Dentre outras propriedades, os carotenoides são capazes de desempenhar função antioxidante, anticancerígena e preventiva de doenças crônicas não transmissíveis (Maiani et al., 2008). Diversos carotenoides podem ser encontrados na natureza, alguns com atividades reconhecidas, podendo se destacar nesse grupo a bixina, encontrada na semente do urucunzeiro (*Bixa Orellana* L.), planta nativa do Brasil.

A bixina é conhecida na prevenção de doenças, possuindo funções bioativas, em decorrência da sua atividade antioxidante, mais especificamente na regulação da produção de espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio (Rossoni Jr et al., 2011) e no efeito hipolipidêmico (Ferreira et al., 2012). Paula et al. (2009), observaram redução dos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), do colesterol total e elevação do HDL em ratos submetidos à dieta rica em colesterol (1% da MS) por 60 dias e suplementados com extrato de urucum.

Objetivou-se avaliar os efeitos da adição do carotenoide bixina, contido no colorífico de urucum à dieta de vacas em lactação sobre os parâmetros bioquímicos e perfil de ácido graxo sanguíneos.

2. Material e Métodos

O experimento foi realizado na Estação Experimental de São Bento do Una – PE pertencente ao Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA, no segundo semestre de 2014, localizado na mesorregião do Agreste Setentrional e microrregião do Vale do Ipojuca, a

8°31'16" de latitude sul e 36°33'0" de longitude oeste e 650 m de altitude. A precipitação pluvial média da região é de 601,6 mm por ano e concentrando-se nos meses de março a julho, quando corresponde a aproximadamente 60% do volume total anual. As temperaturas mais elevadas podem ser constatadas nos meses de novembro a janeiro, sendo superiores a 30°C. As análises foram realizadas no Laboratório de nutrição animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns.

Utilizou-se 32 vacas leiteiras da raça holandesa em lactação (3^o semana) com peso corporal médio de 550±70 kg e produção média de 20±7 kg de leite por dia, sendo 8 animais por tratamento e alocados em baias individuais (Figura 1). A dieta foi composta por silagem de cana, palma forrageira (*Opuntia ficus-indica Mill*) e concentrado comercial, a base de milho e soja. A ração foi elaborada conforme preconiza o NRC para vacas em lactação (2001) e ofertada 40% da dieta pela manhã, juntamente com o colorífico, e 60% da dieta à tarde (Tabela 1) permitindo sobras de 5 a 10% do total de matéria seca fornecida como forma de manter os níveis dos ingredientes das rações.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado composto por quatro dietas que caracterizavam os tratamentos: sem fonte de colorífico (controle – T1); com inclusão de colorífico a 0,08g /kg de MS da dieta (T2); com inclusão de colorífico a 0,12g /kg de MS da dieta (T3) e com inclusão de colorífico a 0,16g /kg de MS da dieta (T4). Como fonte de carotenoide foi utilizada o composto colorífico em pó a base de urucum, adquirido da fábrica Ouro Verde, situada na região de Garanhuns. Mensurou-se a concentração de bixina do material, encontrando um valor de 1,8% desse carotenoide. O composto de colorífico em pó foi fornecido aos animais uma vez ao dia diretamente no cocho sobre a dieta dos animais.

O período experimental foi de 51 dias por animal, dos quais os 21 primeiros foram destinados a adaptação e ao 30º dia foi realizada uma coletada de amostra de sangue, em tubo “vacutainer” de 40 mL contendo EDTA K₃, via punção da veia epigástrica, após a ordenha da manhã. Devido a indisponibilidade de baias para alocar os animais, a disposição dos animais foi feita com base em dez baias (quantidade de baias disponível), dessa forma, depois de passado o período de 51 dias de experimento, o animal era retirado e alocado um novo animal no espaço liberado, de modo que se esperava o término do período experimental de cada animal para introdução de outro, totalizando 204 dias corridos de experimento. O sangue foi centrifugado a 3200 rpm por 20 minutos e o plasma foi separado e armazenado a -20° C para análises posteriores.

A quantificação da bixina foi realizada segundo protocolo Yabiku & Takahashi (1991), com algumas modificações, conforme segue: primeiro foi feita uma solução de hidróxido de potássio (KOH) a 0,5%, onde se dissolveu sob agitação, 5g de hidróxido de potássio em aproximadamente 400 mL de água destilada. Após esfriar, aferiu-se em balão volumétrico de 1000 mL. Em seguida foi feita outra solução a 5%, repetindo o procedimento acima, pesando-se 50g de KOH. Em seguida, adicionou-se 150 mL da solução de KOH a 5% no Erlenmeyer de 500 mL e aqueceu até chegar à ebulição; Adicionou-se 25g da amostra e manteve por um minuto; Retirou-se o Erlenmeyer da chapa quente e resfriou em água corrente (sem agitar); Filtrou-se o extrato em papel de filtro (utilizando o funil) e recolheu-se em balão volumétrico de 1000 mL; Após a completa passagem do extrato, lavou-se e aferiu o balão com água destilada; Passando 1 mL do filtrado com pipeta volumétrica para outro balão de 100 mL e aferindo com solução de KOH a 0,5%.

Para determinação do perfil de ácidos graxos, a fração lipídica do sangue foi extraída conforme protocolo proposto por Folch et al., (1957), utilizando-se alíquotas de 3 ml de

plasma, 20 mL de clorofórmio e metanol solução de (2:1) e 4,4 mL de solução 1,5% de NaCl. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 2400 rpm, durante 10 min a 22° C, quando foram coletadas entre 300-350 mg da gordura, e posterior metilação em duas etapas, sendo a primeira com 3 mL de HCl metanólico a 10% e a segunda com a utilização de 1 ml de hexano e 10 mL de 6% de carbonato de potássio; as amostras foram centrifugadas a 500 x g por 5 min para separação das camadas (Kramer et al., 1997). A camada apolar foi transferida para um tubo de 13 x 100 mm contendo 1 g da mistura de sulfato de sódio e carvão ativado (1:1), tampado com tampa de rosca de teflon, centrifugado, transferido para frasco “*eppendorf*” para análise em aparelho de cromatografia gasosa.

Para determinação da LDL oxidada, colesterol total e HDL foram utilizados kits colorimétricos comerciais das marcas Elisa MBS738313, vida biotecnologia e labtest Ref. 13, respectivamente. Com a diferença entre colesterol total e HDL obteve-se a LDL.

As análises referentes à bioquímica e perfil de ácidos graxos foram realizadas por análise de variância de regressão, utilizando o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (2003).

3. Resultados e Discussão

3.1 Perfil lipídico sanguíneo

O efeito da adição do colorífico como fonte de carotenoide sobre o colesterol total, HDL, LDL e LDL oxidada pode ser observado na tabela 2. Em relação a todos os parâmetros citados anteriormente não se constatou efeito ($P>0,05$) da adição do colorífico, sem indução de hiperlipidemia, em nenhum dos tratamentos utilizados. Esses resultados estão de acordo com Oliveira et al., (2006) que embora suplementando dietas de codornas com colorífico, concluíram que a bixina do colorífico não apresenta atividade hipolipidêmica sobre o perfil lipídico no sangue de codornas sem indução de hiperlipidemia. Ratificando esse resultado

Luiggi (2015), alimentando frangos de corte hipolipidêmicos com urucum (0,05% de bixina) e o óleo de girassol, concluiu que a bixina não apresenta atividade hipolipidêmica sobre a qualidade do perfil lipídico sanguíneo de frangos sem indução de hiperlipidemia.

Resultados diferentes foram encontrados por Silva et al., (2011), avaliando a suplementação de extrato de urucum para ratos hipercolesterolêmicos e observaram a redução dos teores do colesterol não HDL e maiores teores de colesterol HDL. O autor induziu a hiperlipidemia e observou que o tratamento contendo bixina reduziu a concentração de colesterol total (24,52% após 16 dias).

Percebe-se, dessa forma, que diversos trabalhos foram realizados com a inclusão de urucum para redução dos teores de colesterol sanguíneo em animais de laboratórios induzidos a hiperlipidemia, porém são escassos os trabalhos utilizando como modelo experimental os animais domésticos comerciais, como vacas leiteiras, por exemplo, e sem a indução hiperlipidêmica, concluindo que a bixina apresenta propriedades hipolipidêmicas apenas em animais hiperlipidêmicos.

Os valores médios de colesterol encontrados para as vacas Holandesas estão dentro da literatura, onde Pogliani & Birgel Junior (2007), avaliaram a concentração de colesterol total em vacas holandesas e encontraram valores semelhantes. Entre 86,4 e 105,0 mg/dL para novilhas com 12 a 24 meses de idade e entre 116,0 e 147,9 mg/dL para vacas adultas com mais de 24 meses. Kappel et al., (1984) demonstraram que o colesterol está diminuído durante os primeiros 45 dias pós parto. Da mesma forma, Souza (2005), afirma que para o colesterol ser utilizado como um parâmetro do metabolismo lipídico deve-se utilizar na fase pós- puerperal – mais de 45 dias de paridas, com valores de referência entre 32,2 e 103,3 mg/dL.

Chama-se atenção para o fato que atualmente existe uma intensa procura da população, por produtos principalmente de origem vegetal, que contenham efetiva atividade antioxidante,

capaz de reduzir a fração LDL do colesterol. Contudo, extratos de plantas utilizados para esta finalidade, são misturas complexas de diferentes compostos, com polaridades distintas, propriedades antioxidantes e pró-oxidantes, algumas vezes apresentando ações sinérgicas entre os componentes individuais (Parejo et al., 2002).

Utilizando a análise dos dados por boxplot verifica-se nos gráficos 2, 3, 4 e 5 a variabilidade dos dados para o colesterol total, LDL, HDL e LDL oxidada. Observa-se que valores mais elevados e com maior dispersão foram observados no tratamento 1, já no tratamento 2 os valores se encontram menores, pouco dispersos e mais próximos da mediana, o que pode ter sido ocasionado exatamente pelo efeito antioxidante da bixina. Os dados do tratamento 4 se distribuem de forma assimétrica, característica essa, que também se destaca para o parâmetro de LDL. De forma geral, percebe-se para todas as variáveis que os dados se encontram fora da média, no terceiro quartil e bastante dispersos. Percebe-se também que os outliers encontrados são todos pertencentes ao grupo 2. Uma sugestão para estes acontecimentos é o baixo nível de inclusão da bixina, onde percebe-se a necessidade de uma inclusão maior para supostos resultados significantes.

Resultados semelhantes foram observados por Rodrigues (2003), com o objetivo de avaliar o efeito do flavonoide naringenina e bixina e suas associações com o leite em pó de vaca, cabra e o extrato hidrossolúvel de soja, sobre o metabolismo lipídico do coelho. Em relação à fração HDL não houve diferenças significativas entre os tratamentos utilizados. Uma possível explicação para este fato seria relacionar a maior concentração de colesterol total e das suas frações com uma não conversão do colesterol em sais biliares pela enzima 7- α -hidroxilase, ou seja, a bixina de alguma forma pode estar influenciando esta conversão. Bem como, uma inibição da acil-CoA-colesterol acil transferase (ACAT), deixando assim de ocorrer à esterificação do colesterol.

Com relação a LDL oxidada Huang et al. (2012), investigaram o valor de LDLox e razão de oxidação da LDL no diagnóstico de pacientes com Doença Arterial Coronariana (DAC). Os resultados demonstraram que o valor médio da LDLox e razão de oxidação das LDL foi significativamente maior no grupo com DAC do que os dois grupos controles. Esse grupo concluiu que a LDLox e a taxa de oxidação da LDL estão intimamente relacionados com a aterosclerose e eles são melhores biomarcadores para discriminar entre pacientes com DAC e indivíduos saudáveis. No presente experimento o colorífico adicionado a dieta não ocasionou efeito na LDLox plasmática das vacas sem indução de hiperlipidemia.

3.2 Perfil de ácidos graxos plasmático

Os perfis de ácidos graxos plasmático das vacas submetidas aos tratamentos experimentais estão apresentados na Tabela 3. Os ácidos graxos de cadeia ímpar C11:0 e C17:0 foram alterados pelo tratamento ($P < 0,05$) enquanto que os C13:0 e C15:0, não foram alterados pelo tratamentos ($P > 0,05$). Esses resultados podem ser explicados devido ao fato desses compostos não estarem presentes na alimentação fornecida, uma vez que ácidos graxos de cadeia ímpar são originários exclusivamente de microrganismos (Jenkins, 1993). Entretanto os que sofreram alteração provavelmente devem-se ao fato que a bixina possui atividade inibitória sobre várias espécies bacterianas, onde já foi comprovada maior atividade supressora deste carotenoide sobre as bactérias Gram-positivas (Braga et al., 2007; Majolo et al., 2013).

A concentração total dos ácidos graxos saturados e insaturados plasmáticos não sofreu influência da inclusão de bixina ($P < 0,05$), provavelmente devido a elevada queda do ácido mirístico e miristoléico. Isto deve ter sido proveniente de alterações nos padrões de biohidrogenação ruminal ocorridos pela adição da bixina. Tal hipótese pode ser confirmada por Majolo et al., (2013) que observaram atividade antibacteriana da bixina sobre culturas de

Escherichia coli (ATCC 11229), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19114), além de verificar que o potencial de ação foi dependente da quantidade do carotenoide adicionado.

O ácido palmitoleico (C16:1) pode ser oriundo da dieta ou síntese endógena a partir da atividade da $\Delta 9$ - desaturase sobre o C16:0, que adiciona uma dupla ligação no carbono 9 de sua cadeia. A concentração deste ácido foi alterada pela adição do urucum, reduzindo em 68,63%, do tratamento controle para o T3 (Figura 6), com adição de 0,012 g de bixina/ kg de MS. Pode-se afirmar que sua redução pode ser decorrente da inibição da atividade da $\Delta 9$ - desaturase, uma vez que a concentração do seu principal inibidor, o isômero C18:2, t10 c12, conforme aponta Almeida et al., (2013), foi alterada pela inclusão do carotenoide. O ácido oleico (C18:1) apresentou resultados parecidos dentro de todos os tratamentos. O que pode ter acontecido devido a não expressão de resultados entre os tratamentos. Este ácido pode ser de origem alimentar ou via biohidrogenação parcial do linoleico e linolênico e da desaturação do esteárico na mucosa intestinal, via $\Delta 9$ - desaturase.

O ácido linoleico (C18:2) foi influenciado pelos tratamentos, o que pode ser muito favorável devido as suas altas propriedades benéficas. Como, por exemplo, sua atividade anticarcinógena. Produtos de origem animal tem alta concentração desse ácido e o principal microrganismo responsável pela produção desse composto é o *Butyrivibrio fibrosolvens* (Khanal e Olson, 2004).

4. Conclusões

1. A quantidade de bixina contida no colorífico incluído em conformidade com os tratamentos utilizados na dieta das vacas leiteiras não foi suficiente para alterar ($P > 0,05$) o perfil lipídico plasmático.

2. O perfil de ácido graxo plasmático de vacas leiteiras, pelo contrário, é alterado ($P < 0,05$) pelos níveis de bixina contido no colorífico adicionado à dieta, a exceção dos ácidos vacênico, esteárico, pentadecanóico e tridecanóico.

5. Referências

ALMEIDA, O.C.; PIRES, A.V.; SUSIN, I.; GENTIL, R.S.; MENDES, C.Q.; QUEIROZ, M.A.A.; FERREIRA, E.M.; EASTRIDGE, M.L. Milk fatty acids profile and arterial blood milk fat precursors concentration of dairy goats fed increasing doses of soybean oil. **Small Ruminant Research**, v.114, p.152-160, 2013.

BRAGA, F.G.; BOUZADA, M.L.; FABRI, R. L.; DE O MATOS, M.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E.S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacol.**, v.111, p.267-71, 2007.

LUIGGI, F. G. **Extrato oleoso de urucum na alimentação de frangos de corte**. 154f. 2015. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Medicina veterinária e zootecnia, Jaboticabal-SP, 2015.

FERREIRA, J. M.; SOUSA, D. F.; DANTAS, M. B.; FONSECA, S. G. C.; MENEZES, D. B.; MARTINS, A. M. C.; QUEIROZ, M. G. R. Effects of *Bixa orellana* L. Seeds on Hyperlipidemia. **Phytotherapy Research**, 2012.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biological Chemistry**. v.226, p.497–509, 1957.

HUANG, H. et al. Oxidized low-density lipoprotein cholesterol and the ratio in the diagnosis and evaluation of therapeutic effect in patients with coronary artery disease. **Dis Markers**. 2012;33(6):295-302

JENKINS, T.C. Lipid metabolism in the rumen. In: Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3863, 1993.

KHANAL, R.C.; OLSON, K.C. Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat, and egg: a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, Lahore, v. 3, n. 2, p. 82-98, 2004

KAPPEL, L.C.; INGRAHAM, R.H.; MORGAN, E.B. et al. Relationship between fertility and blood glucose and cholesterol concentrations in Holstein cows. **Animal Journal Veterinary Research**, v.45, n.12, p.2607-2612, 1984.

KRAMER, J.K.G.; FELLNER, V.; DUGAN, M.E.R.; SAUER, F.D.; MOSSOBA, M.M.; YURAWECZ, M.P. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, v.32, p.1219–1228, 1997.

LEIFERT, W. R., ABEYWARDENA, E. M. Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. **Nutrition Research**., v.28, p.729-737, 2008.

MAIANI, G et al. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular Nutrition Food Research**, 2008.

MAJOLO, C.; CARVALHO, H.H; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana “*in vitro*” de diferentes acessos de urucum (*Bixa orellana* L.) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes. **B.CEPPA**, v.31, p.115-124, 2013

OLIVEIRA, N. T. E.; J. B. FONSECA, R. T. R. N; SOARES, K. S. FERREIRA. Triglicerídeos sanguíneos e composição química da carne de codornas alimentadas com bixina e niacina suplementar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**., v.41, n.8, p.1227-1233, 2006.

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA , J.; ROSAS-ROMERO, A.; FLERLAGE, N.; BURILLO, J.; CODINA, C. Comparison between the redical scavenging activity and antioxidante activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 6882-6890, 2002.

PARK, C. H.; CHO, E. J.; YOKOZAWA, T. Protection Against Hypercholesterolemia by corni fructus extract and its related protective mechanism. **Journal of Medicinal Food**, v.12, p.973-981, 2009.

PAULA, H.; PEDROSA, L. M.; ROSSONI JÚNIOR, J. V.; HARAGUCHI, K; SANTOS, R. C.; SILVA, M. E. Effect of an aqueous extract of annatto (*Bixa orellana*) seeds on lipid profile and biochemical markers of renal and hepatic function in hipercholesterolemic rats. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v.52, p.1373-1378, 2009

POGLIANI, F.C.; BIRGEL JÚNIOR, E. Valores de referência do lipidograma de bovinos da raça Holandesa, criados no estado de São Paulo. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 5, p. 373-383, 2007.

RODRIGUES, F. C. **Efeito de naringenina, bixina, leites de vaca e cabra e extrato hidrossolúvel de soja sobre o metabolismo lipídico de coelhos**. 2003. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) –Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

ROSSONI JR, J. V.; ARAÚJO, G. R.; PÁDUA, B. C.; CHAVES, M. M.; PEDROSA, M. L.; SILVA, M. E.; COSTA, D. C. Anatto extract and-carotene modulate the production of reactive oxygen species/nitric oxide in neutrophils from diabetic rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**., v.50, n.3, p. 177-183, 2011.

SILVA, L. S. J. V.; ROSSONI JUNIOR, M. O; SOUZA, AND M. E. SILVA. Suplementação com extrato de urucum reduz o colesterol total sem provocar efeitos hepatotóxicos em ratos hipercolesterolêmicos. In: CONGRESSO NACIONAL SOCIEDADE BRASILEIRA ALIMENTAÇÃO NUTRICIÇÃO. 11., 2011. Fortaleza. **Processing...** Fortaleza, 2011.

YABIKU, H. I.; TAKAHASHI, M.Y. Avaliação dos métodos analíticos para determinação de bixina em grãos de urucum e suas correlações. In: SEMINÁRIO DE CORANTES NATURAIS PARA ALIMENTOS, 2; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE URUCUM, 1991. Campinas-SP. **Anais...** Campinas-SP: ITAL, 1991. p. 275-279.

Tabela 1: Ingredientes e composição química das dietas.

Ingredientes (g/kgMS)	Tratamentos (Níveis de colorífico em g/kgMS)			
	0,00 (T1)	0,08 (T2)	0,12 (T3)	0,16 (T4)
Concentrado	361,6	427,1	375,6	396,8
Silagem de cana	482,2	428,3	467,8	450,1
Palma	156,2	140,5	151,6	146,4
Colorífico	0	4,0	5,0	6,7
Composição Química (g/kgMS)				
Matéria seca	307,1	329,9	313,2	323,6
Proteína bruta	114,3	129,2	117,4	122,2
FDN ¹	445,6	421,7	438,3	430,3
Extrato etéreo	40,8	42,7	41,1	41,7

¹FDN: Fibra em detergente neutro

Tabela 2: Concentração de colesterol total (CT), colesterol LDL, colesterol HDL e LDL oxidada (ox) (mg/dL) do plasma de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo colorífico de urucum.

	Tratamentos (Níveis de colorífico em g/kgMS)					
	(0,00) T1⁽¹⁾	(0,08) T2⁽¹⁾	(0,12) T3⁽¹⁾	(0,16) T4⁽¹⁾	PL⁽²⁾	PQ⁽³⁾
CT	118,3±39,7	116,9±36,1	101,3±25,6	116,3±34,1	0,7143 ^{ns}	0,5399 ^{ns}
LDL	30,8±27,0	21,4±23,3	21,0±12,2	37,8±25,0	0,5944 ^{ns}	0,1429 ^{ns}
HDL	87,3±18,2	97,5±17,5	80,3±19,8	78,4±26,7	0,2107 ^{ns}	0,4468 ^{ns}
LDL ox	0,84±0,10	0,74±0,16	0,84±0,11	0,81±0,12	0,9472 ^{ns}	0,4729 ^{ns}

⁽¹⁾ Médias ± Desvio Padrão

⁽²⁾ Probabilidade de efeito linear.

⁽³⁾ Probabilidade de efeito quadrático.

Tabela 3: Perfil de ácidos graxos plasmáticos de vacas em lactação ingerindo dietas contendo colorífico de urucum (mg/100g).

Perfil	0,00 (T1)	0,08g/kg (T2)	0,012g/kg (T3)	0,016g/kg (T4)	P ¹
C10:0 (cáprico)	66,15	91,31	93,78	57,85	0,002**
C11:0 (undecanoico)	17,12	19,63	27,08	27,27	<0,0001**
C12:0 (láurico)	3,53	7,44	7,33	2,51	<0,000**
C13:0 (tridecanoico)	1,74	1,26	1,79	1,44	0,294 ^{ns}
C14:0 (mirístico)	15,90	8,30	9,33	9,73	<0,0001**
C14:1 (miristoleico)	4,96	4,79	4,77	2,86	<0,0001**
C15:0 (pentadecanoico)	4,64	5,31	4,30	4,63	0,545 ^{ns}
C16:0 (palmitico)	155,46	137,36	131,58	151,02	0,004**
C16:1 (palmitoleico)	22,35	17,13	7,01	14,89	<0,0001**
C17:0 (heptadecanoico)	6,43	7,59	8,79	6,72	0,003**
C18:0 (esteárico)	149,86	145,65	135,52	151,34	0,381 ^{ns}
C18:1 trans (vacênico)	259,96	256,14	264,39	257,29	0,978 ^{ns}
C18:1 cis (oleico)	261,81	260,46	263,95	278,98	<0,0001**
C18:2 trans (rumênico)	5,6	6,03	5,75	3,98	<0,0001**
C18:2 cis (linoleico)	7,48	8,50	11,09	11,03	<0,0001**
C18:3 (linolênico)	0,54	0,60	1,36	1,31	0,003**
C20:0 (araquidônico)	1,03	1,12	7,58	5,74	<0,0001**
AGS ⁽²⁾	421,80	425	427,1	418,3	0,2936 ^{ns}
AGI ⁽³⁾	578,20	571,10	572,90	581,70	0,1164 ^{ns}

⁽¹⁾ Probabilidade de efeito linear, ⁽²⁾ ácidos graxos saturados, ⁽³⁾ ácidos graxos insaturados

** Efeito significativo <0,05

^{ns} Efeito não significativo >0,05

APÊNDICE A

APÊNDICE A - FIGURAS



Figura 1. Distribuição das vacas em baias individuais.

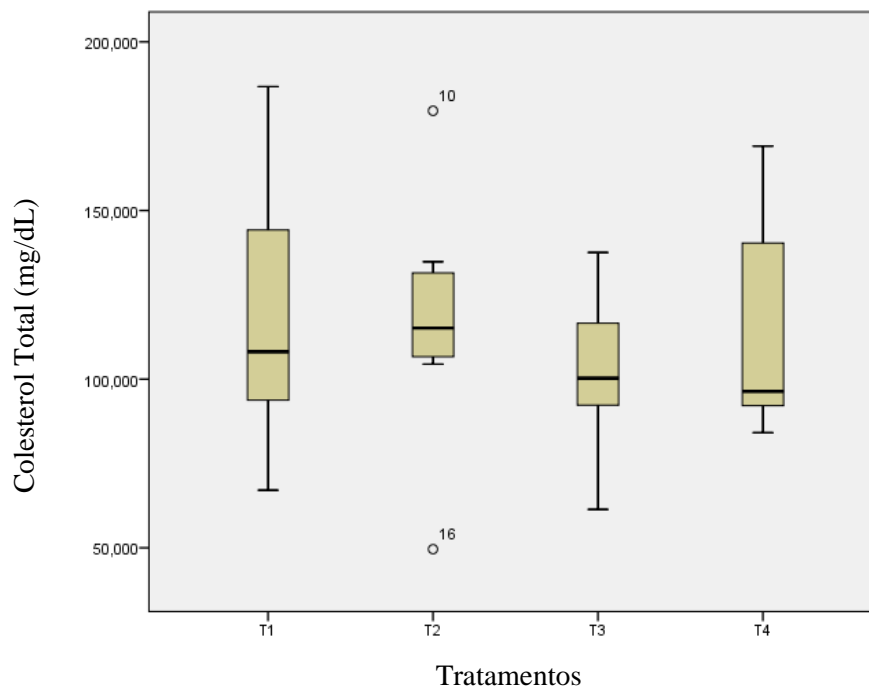


Figura 2. Gráfico boxplot para concentração de colesterol total plasmático de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo colorífico de urucum.

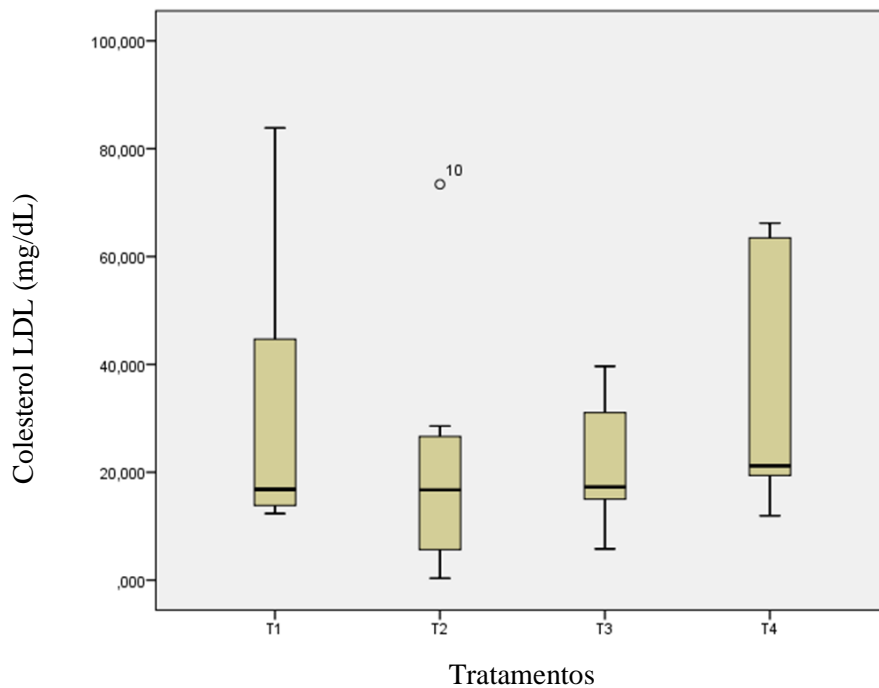


Figura 3. Gráfico boxplot para concentração de colesterol LDL plasmático de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo corante de urucum.

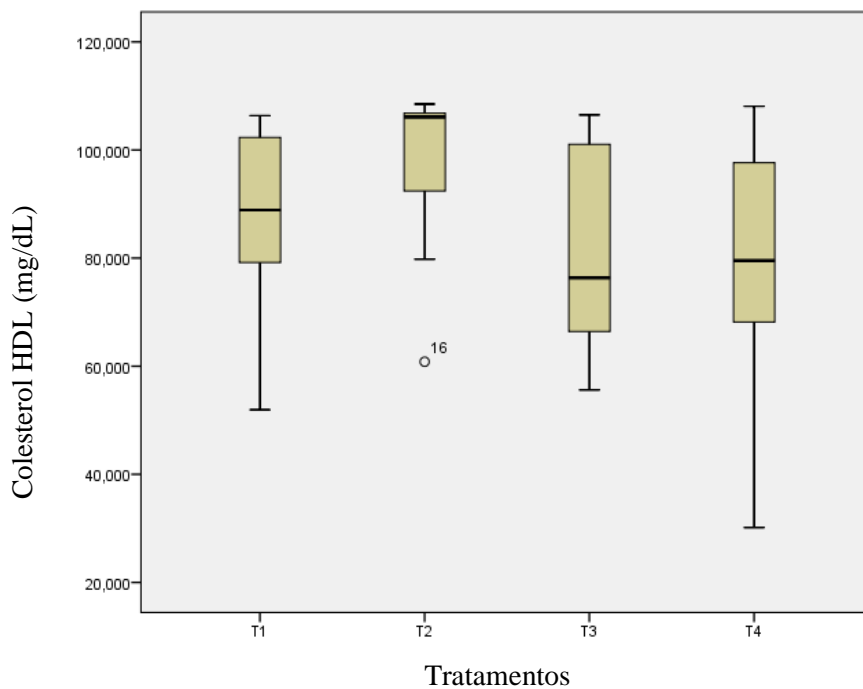


Figura 4. Gráfico boxplot para concentração de colesterol HDL plasmático de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo corante de urucum.

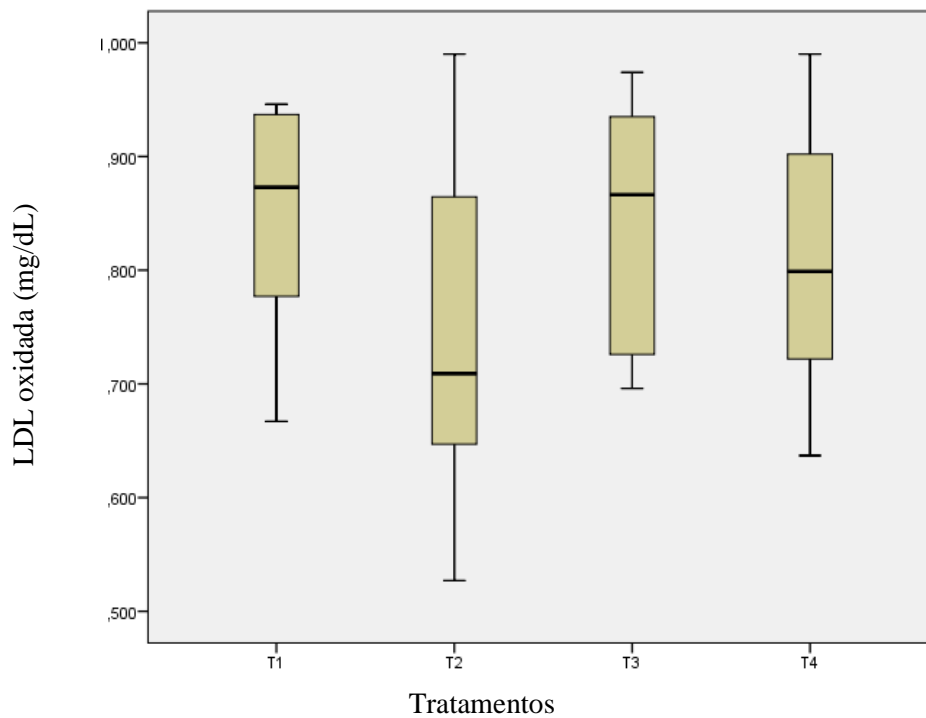


Figura 5. Gráfico box plot para concentração de LDL oxidada plasmática de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo colorífico de urucum.

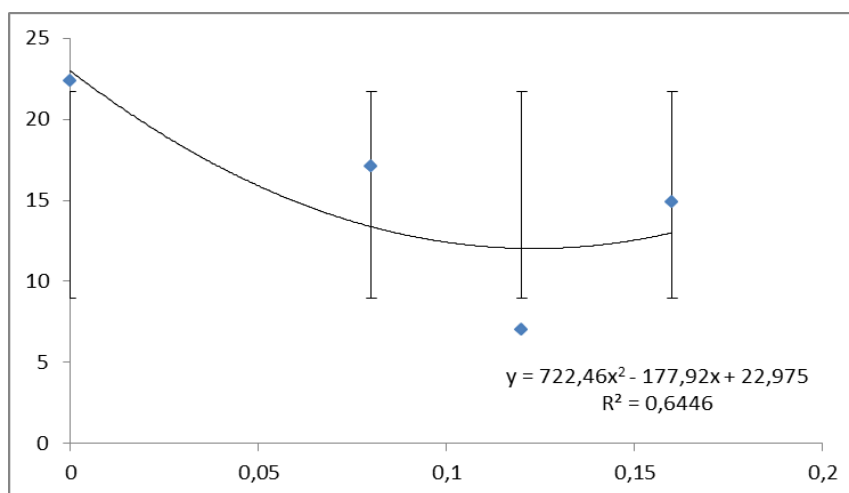


Figura 6. Comportamento do ácido palmitoléico no perfil de ácido graxo plasmático de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo colorífico de urucum.

APENDICE B

Tabela 1. Dados de absorvância e parâmetros analisados para vacas em lactação ingerindo dietas contendo colorífico de urucum (mg/dL).

Trat	Bixina	Vaca	Absorb. COL	COL_TOTAL	LDL	HDL	LDL_{ox}
T1	0	Alcalina	0,165	67,07	15,13	51,94	0,825
T1	0	Batizada	0,297	164,09	62,33	101,75	0,667
T1	0	Divinolândia	0,292	118,70	12,33	106,37	0,946
T1	0	Dourada	0,24	97,56	18,16	79,40	0,941
T1	0	Endira	0,229	93,09	12,57	80,52	0,933
T1	0	Endyá	0,171	94,48	15,48	79,00	0,777
T1	0	Estrela	0,225	124,31	27,03	97,28	0,777
T1	0	Fragata	0,338	186,74	83,85	102,89	0,921
T2	0,08	Ativa	0,232	128,18	22,11	106,07	0,63
T2	0,08	Bandeira	0,325	179,56	73,39	106,17	0,99
T2	0,08	Baronesa	0,197	108,84	0,34	108,50	0,686
T2	0,08	Diagonal	0,244	134,81	28,57	106,23	0,664
T2	0,08	Dualista	0,257	104,47	24,67	79,80	0,732
T2	0,08	Faceira	0,202	111,60	6,54	105,06	0,764
T2	0,08	Resposta	0,292	118,70	11,33	107,37	0,965
T2	0,08	Valiosa	0,122	49,59	4,80	60,83	0,527
T3	0,12	Duquesa	0,192	106,08	39,65	66,43	0,974
T3	0,12	Ecologia	0,211	116,57	15,52	101,05	0,726
T3	0,12	Elegância	0,171	94,48	15,02	79,46	0,889
T3	0,12	Esplêndida	0,151	61,38	5,78	55,60	0,935
T3	0,12	Flora	0,227	92,28	19,04	73,24	0,844
T3	0,12	Florata	0,249	137,57	31,07	106,50	0,696
T4	0,16	Campinas	0,237	96,34	66,20	30,14	0,932
T4	0,16	Elba	0,207	84,15	19,41	64,74	0,701
T4	0,16	Encantada	0,306	169,06	60,99	108,07	0,799
T4	0,16	Engenheira	0,282	155,80	65,94	89,86	0,743
T4	0,16	Enluarada	0,225	91,46	11,93	79,53	0,872
T4	0,16	Eva	0,168	92,82	21,19	71,63	0,99
T4	0,16	Fortaleza	0,226	124,86	19,43	105,43	0,637

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos plasmáticos de vacas ingerindo dietas contendo colorífico de urucum (mg/100g).

BIXINA	Trat.	C10_0	c11_0	C12_0	C13_0	C14_0	C14_1	C15_0	C16_0	C16_1	C17_0	C18_0	C18_1t	C18_1c	C18:2t	C18_2t	C20_0	C18_3
Alcalina	1	64,95	17,63	3,89	1,82	16,54	5,32	5,36	158,26	23,76	6,68	150,12	258,16	256,73	5,54	7,50	1,49	0,00
Batizada	1	66,33	17,94	3,70	1,82	15,56	5,04	0,00	159,36	23,63	6,44	150,62	262,66	257,42	5,55	7,50	0,00	0,00
Divinolandia	1	65,21	17,27	3,62	1,80	16,53	5,27	5,21	146,53	23,09	6,45	155,80	256,14	266,88	5,81	7,64	0,00	0,00
Dourada	1	66,81	16,49	3,18	1,79	15,06	4,85	5,23	157,78	20,69	6,30	154,68	263,98	258,25	5,33	7,32	1,43	0,00
Endira	1	67,33	16,47	3,18	1,62	15,79	4,35	5,32	153,85	20,02	6,31	145,67	265,87	263,18	5,84	7,44	1,39	1,45
Endya	1	66,65	17,19	3,68	1,84	16,00	4,91	5,10	158,32	22,27	6,42	144,68	257,14	264,02	5,68	7,56	1,19	1,48
Estrela	1	64,27	17,20	3,32	1,66	16,17	4,98	5,37	155,60	23,36	6,44	147,98	259,25	262,75	5,73	7,50	1,25	1,43
fragata	1	67,63	16,73	3,68	1,57	15,56	4,99	5,49	153,95	21,96	6,37	149,37	256,51	265,25	5,27	7,40	1,50	0,00
Ativa	2	89,45	19,64	7,26	1,30	7,75	4,53	5,20	131,74	17,28	7,04	140,03	251,13	253,52	5,69	8,86	0,98	0,64
Bandeira	2	90,84	19,94	7,30	1,56	7,82	4,48	5,47	137,34	16,96	7,65	149,80	257,02	259,86	6,71	8,68	1,29	0,00
Baronesa	2	97,41	18,99	7,41	0,44	9,09	5,00	5,18	133,16	17,63	7,73	141,40	265,82	258,68	5,77	8,60	1,09	0,00
Diagonal	2	97,85	18,41	7,88	1,48	8,16	4,89	5,00	132,16	16,53	7,49	147,93	257,40	260,50	6,61	8,30	1,36	0,98
Dualista	2	91,30	20,74	7,67	1,27	8,95	4,92	5,10	141,91	16,78	7,95	141,12	253,66	264,93	5,25	8,46	1,00	1,25
Faceira	2	91,53	20,21	7,62	1,40	7,72	4,98	5,50	137,98	17,33	7,27	147,29	257,56	260,47	5,41	8,12	1,45	0,63
Resposta	2	83,83	18,76	7,43	1,38	8,41	4,15	5,51	139,74	17,73	7,72	149,49	254,92	267,26	6,37	8,88	0,61	0,00
Valiosa	2	88,28	20,38	6,98	1,24	8,54	5,37	5,54	144,81	16,81	7,83	148,14	251,60	258,49	6,42	8,11	1,16	1,34
Duquesa	3	95,74	27,32	7,66	1,77	9,91	4,60	3,88	134,09	7,31	8,62	131,51	257,77	269,77	5,55	10,58	6,38	1,51
Ecologia	3	94,61	27,42	7,29	1,98	9,50	4,93	4,52	133,58	6,47	8,81	135,59	265,65	268,63	6,39	11,38	6,41	1,24
Elegancia	3	92,28	27,13	7,02	1,77	9,02	4,68	3,88	130,88	7,87	8,93	135,66	264,50	265,99	5,64	10,31	8,19	1,06
Explendida	3	96,00	29,49	7,51	1,64	9,24	4,63	3,80	129,20	6,23	9,12	137,97	258,21	266,33	4,36	10,00	8,55	1,56
Flora	3	92,81	25,42	6,92	1,59	8,51	4,67	4,56	131,89	7,85	8,78	138,45	269,04	255,97	6,88	11,63	7,50	1,77
Florata	3	90,38	25,43	7,10	1,80	8,99	4,94	4,81	128,49	7,38	8,58	138,09	268,81	261,70	5,38	11,85	8,77	1,64
Floresta	3	91,88	27,14	7,88	1,99	9,84	5,01	5,15	134,88	6,40	8,93	132,46	266,24	259,35	6,14	11,90	7,99	1,20
Ufologia	3	96,52	27,28	7,24	1,79	9,63	4,74	3,84	129,66	6,53	8,54	134,43	264,92	263,83	5,69	11,10	6,86	0,88
Campinas	4	44,70	23,63	1,85	1,29	8,35	2,55	4,27	156,98	14,68	7,33	156,53	258,67	283,48	4,04	10,86	7,08	1,80

Elba	4	56,62	28,04	2,44	1,42	9,37	2,67	4,48	151,22	14,77	6,29	150,01	247,65	288,62	3,58	11,59	7,03	1,81
Engenheira	4	58,35	28,90	2,41	1,58	10,55	2,80	5,39	151,06	15,67	6,67	155,45	259,19	267,53	4,17	10,89	6,92	1,50
Enluarada	4	60,88	27,16	2,55	1,53	10,08	2,84	4,67	149,69	14,47	5,40	147,50	259,17	281,85	3,79	10,58	6,87	1,43
Eva	4	60,55	27,93	2,76	1,65	9,74	3,23	4,75	152,32	14,85	6,73	150,80	250,17	282,72	3,28	10,89	5,69	1,31
Fortaleza	4	61,52	28,39	2,77	1,13	10,63	2,80	4,48	149,47	14,42	7,42	143,33	262,47	276,43	4,47	10,86	6,58	1,33
Vaidosa	4	62,33	26,85	2,81	1,46	9,41	3,16	4,41	146,39	15,35	7,18	155,77	263,69	272,23	4,50	11,54	0,00	0,00

ANEXO

**ANEXO – DIRETRIZES PARA AUTORES DA “REVISTA PESQUISA
AGROPECUÁRIA BARSILEIRA”**

Forma e preparação de manuscritos

- Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho;

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas, Novas Cultivares e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor. Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia. O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

Organização do Artigo Científico

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções;
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito;
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como "efeito" ou "influência". Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário;
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos. As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente;
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente;
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição;
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão;
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos;
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão;
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas;
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial;
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula;
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras;
- Não devem conter palavras que compoñham o título;

- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada;
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus (http://www.fao.org/aims/ag_intro.htm) ou no Índice de Assuntos da base SciELO (<http://www.scielo.br>).

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito;
- Deve ocupar, no máximo, duas páginas;
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto;
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais;
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica;
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental;
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis;
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas;

- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento;
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente;
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados;
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial;
- Deve ocupar quatro páginas, no máximo;
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos;
- As tabelas e figuras são citadas sequencialmente;
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores;
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados;
- Dados não apresentados não podem ser discutidos;
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados;
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada;
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras;
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial;
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo;
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho;
- Não podem consistir no resumo dos resultados;
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa;
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial;
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições);
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra Referências deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial;
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos;
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir;

- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração;
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra;
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito;
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação;
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada; - Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. Anais. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). O agronegócio da mamona no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: <<http://www.cpa0.embrapa.br/publicacoes/ficha.php?tipo=DOC&num=66&ano=2004>>. Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados;
- A autocitação deve ser evitada;
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir:

Redação das citações dentro de parênteses

- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação;
- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação;
- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação;
- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores;

- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula;
- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada;
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.

Redação das citações fora de parênteses

- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman;
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas sequencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências;
- Devem ser auto-explicativas;
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis;
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas;

- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes;
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé;
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades;
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo;
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa;
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade;
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais;
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

Notas de rodapé das tabelas

- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências;
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto;
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto;
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos;
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito;
- Devem ser autoexplicativas;
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título;
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses;
- Figuras não originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas;

- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração;
- As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios);
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante;
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico;
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis);
- Não usar negrito nas figuras;
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto. Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.