



## Análise de atividade antioxidante no leite de vacas leiteiras suplementadas com astaxantina

### *Analysis of antioxidant activity in milk from dairy cows supplemented with astaxanthin*

Yuri Kauan Zulkowski\*, Flavia Regina Oliveira de Barros<sup>†</sup>,  
Paula Fernandes Montanher<sup>‡</sup>, Rafael Arcenio da Costa<sup>§</sup>, Matheus Luquirini Penteados dos Santos<sup>¶</sup>,  
Mariana Soares Rodrigues<sup>‡</sup>

#### RESUMO

A suplementação nutricional com antioxidantes, como a astaxantina pode ser uma via para minimizar os problemas ocasionados por diferentes tipos de estresse. Visando verificar a atividade antioxidante de amostras de leite de vacas leiteiras suplementadas com diferentes concentrações de astaxantina, 0, 0,25, ou 0,50 mg de astaxantina/kg de peso corporal/dia (n=15/grupo) foram realizados os testes de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), compostos fenólicos totais (CFT) e *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), após a preparação das amostras com ácido tricloroacético. Embora benéfico para a saúde do animal, os ensaios não sugerem uma melhora na atividade antioxidante do leite ordenhado em cada grupo de tratamento, não apresentando diferença estatística.

**Palavras-chave:** alimentação de ruminantes, carotenóides, estresse.

#### ABSTRACT

Nutrition supplementation with antioxidants, such as astaxanthin could minimize the problems caused by different types of stress. To assess the antioxidant activity in milk samples from dairy cows supplemented with different doses of astaxanthin, 0, 0.25, or 0.50 mg of astaxanthin/kg of body weight/day, we performed 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), total phenolic compounds and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) tests. Although beneficial to animal health, the trials did not suggest an improvement in the antioxidant activity of milk in each treatment.

**Keywords:** ruminant feeding, carotenoids, stress.

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos sobre o benefício de antioxidantes para a saúde e também alimentação são cada vez mais comuns. A ingestão destas substâncias está relacionada com a diminuição de acúmulo de radicais livres no organismo, e conseqüentemente um combate a doenças associadas a este distúrbio. (DIAS, 2020). A produção destes radicais se dá como resultado do processo de respiração celular ou de fontes externas relacionadas a estresse,

\*Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; [yurizulkowski@gmail.com](mailto:yurizulkowski@gmail.com)

<sup>†</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; [flaviabarros@utfpr.edu.br](mailto:flaviabarros@utfpr.edu.br)

<sup>‡</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; [paulamontanher@utfpr.edu.br](mailto:paulamontanher@utfpr.edu.br)

<sup>§</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; [rafaeldacostacenio@gmail.com](mailto:rafaeldacostacenio@gmail.com)

<sup>¶</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; [matheus.luquirini@gmail.com](mailto:matheus.luquirini@gmail.com)

<sup>‡</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; [mariisoares25@yahoo.com.br](mailto:mariisoares25@yahoo.com.br)



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um mundo em transformação

como por exemplo oriundos do calor, aplicação de medicamentos, de toxinas ingeridas na alimentação ou outros tipos de estresses físicos (ABDOLLAHI *et al.*, 2004). Nesse contexto, a suplementação de antioxidantes na dieta de bovinos leiteiros é interessante, visando a diminuição de radicais livres produzidos na exposição a algum tipo de estresse, e uma melhora na saúde dos animais, relacionada a uma maior produção de leite (SUMMER *et al.* 2019).

A astaxantina (3,3'-diidroxib- $\beta$ -caroteno-4,4'-diona-AST) é um antioxidante carotenoide xantofila (AMBATI *et al.*, 2014). Já foram demonstrados efeitos positivos da suplementação com astaxantina sobre o sistema imunológico de ratos (BARROS *et al.*, 2012) e até mesmo em humanos (MACEDO *et al.*, 2010). No entanto, pouco se sabe sobre seus efeitos em bovinos e, principalmente, sobre a atividade antioxidante de produtos oriundos de animais suplementados com este antioxidante, como o leite.

Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar a atividade antioxidante em amostras de leite de vacas leiteiras suplementadas com astaxantina.

## 2 MÉTODO

### 2.1 Animais, delineamento experimental e amostragem

Este estudo foi realizado em uma fazenda comercial, localizada no município de Verê, no sudoeste do Paraná. As condições experimentais e o manejo dos animais foram aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UTFPR (processo nº 23064.049435/2019-21). Quarenta e cinco vacas leiteiras holandesas (*Bos taurus taurus*) híbridas e em lactação, com peso inicial em média de 550 kg e idade inicial média de 5,22 anos foram suplementadas diariamente por via oral, através de cápsulas com diferentes concentrações de astaxantina, 0, 0,25, ou 0,50 mg de astaxantina/kg de peso corporal/dia (n= 15/ grupo) durante setenta dias, a partir de Janeiro de 2020. No final da suplementação, amostras de leite (50 mL) foram coletadas e armazenadas a -20 °C até análise. Para a coleta de amostras, foram desprezados os primeiros jatos no momento da ordenha.

### 2.2 Preparação da amostra

Para realização das análises de atividade antioxidante, as amostras de leite foram descongeladas em temperatura ambiente e foi realizado um tratamento para a precipitação de proteínas, como descrito por Zulueta, *et al.* 2009, por meio de diluição com ácido tricloroacético 20% (v/v), na proporção 1:1, em cada amostra de leite.

### 2.3 Análises de atividade antioxidante

Para as análises de atividade antioxidante, todas as vidrarias utilizadas foram cobertas com papel alumínio para minimizar a interação das soluções com a luz. Todos os testes, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), compostos fenólicos totais (CFT) e *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), foram realizados em triplicata. Utilizou-se o espectrofotômetro UV/VIS digital microprocessado Analyser® 850 MI para as leituras de absorvância de cada amostra.

Para o ensaio de DPPH, os tubos de ensaio foram preenchidos pela adição de 25  $\mu$ L de cada amostra e 2 mL da solução de DPPH (concentração de 62,5  $\mu$ mol). A reação ocorreu no escuro por 30 minutos e foi lida a absorvância no comprimento de onda de 517 nm. A curva de calibração foi realizada utilizando a solução padrão de Trolox®. Para fins de cálculo de porcentagem de inibição, utilizou-se a Eq. (1), onde  $A_0$  corresponde à absorvância inicial da solução e  $A_{amostra}$  a absorvância média das triplicatas de cada amostra.



$$\%inibição = (A_{amostra} \times 100) \div A_0 \quad (1)$$

Para realização do ensaio de ABTS, utilizou-se a metodologia estabelecida por Rufino *et al.* (2007). As amostras reagiram no escuro durante 6 minutos e os dados de absorbância foram submetidos a cálculos de porcentagem de inibição como demonstrado na Eq. (1).

O ensaio de CFT foi realizado adicionando 250 µL de amostra, 250 µL da solução 1:1 de Folin-Ciocalteu e água deionizada, 500 µL da solução de carbonato de sódio saturada (11 g/100 mL) e 4 mL de água deionizada em cada tubo. A reação ocorreu no escuro por 30 minutos e foi lida a absorbância no comprimento de onda de 725 nm. O branco foi definido utilizando água deionizada. A curva de calibração foi realizada utilizando diversos volumes de ácido gálico 250 mg/L ( $R^2=0,9979$ ) em água deionizada.

Para o ensaio FRAP utilizou-se a metodologia definida por Rufino *et al.* (2006) com adaptações. Após a reação, foi lida a absorbância sob o comprimento de onda de 593 nm. A curva de calibração foi realizada utilizando diferentes concentrações de sulfato de ferro II ( $R^2=0,9997$ ).

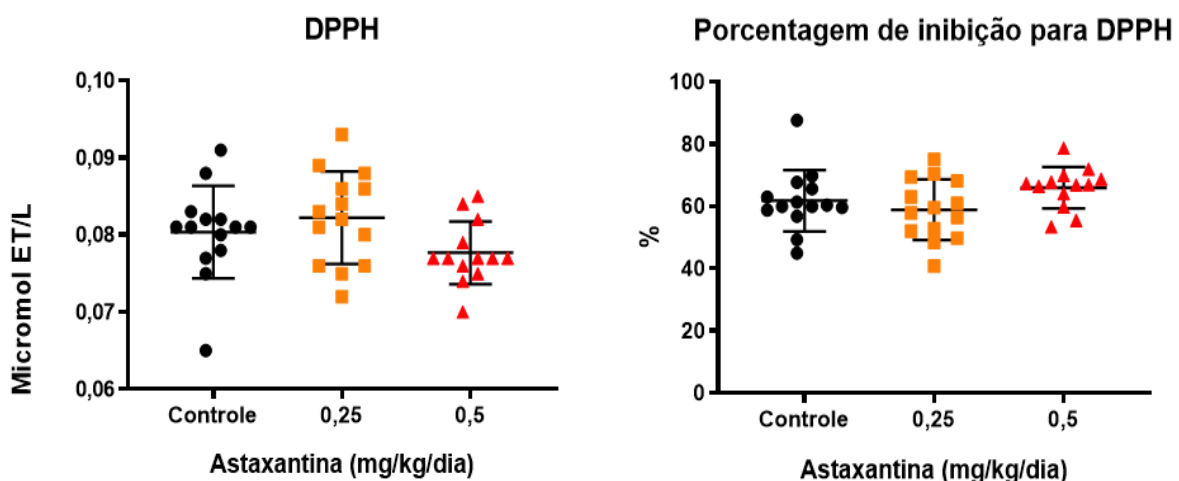
## 2.4 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 7. Para cada grupo de tratamento, obteve-se as médias das réplicas técnicas, que foram submetidas a remoção de outliers, testes de normalidade e checagem de coeficientes de variação. Para comparação das médias entre cada tratamento, realizou-se ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

## 3 RESULTADOS

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no ensaio de DPPH ( $p=0,116$ ). A análise da porcentagem de inibição para o mesmo teste também não demonstrou diferença significativa entre os tratamentos ( $p=0,3982$ ). Os dados obtidos das absorbâncias, demonstrados em equivalente ao Trolox® (ET) e da porcentagem de inibição, ambos com média  $\pm$  erro padrão da média, podem ser vistos da Fig. 1.

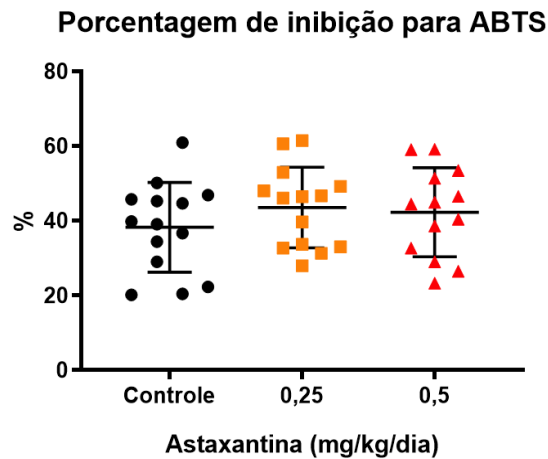
Figura 1 - Dados de micromol ET/L de leite e da porcentagem de inibição para cada tratamento





Para a análise de porcentagem de inibição para ABTS<sup>+</sup>, também não foi observada diferença significativa ( $p=0,458$ ) na comparação entre os grupos. A distribuição dos dados, com média  $\pm$  erro padrão da média, pode ser observada na Fig. 2.

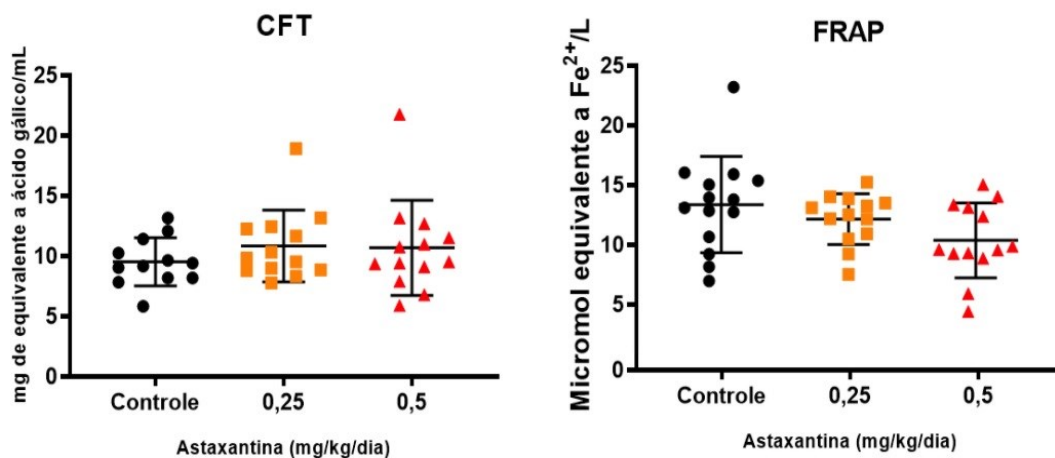
Figura 2 - Porcentagem de inibição para cada grupo de tratamento



Fonte: Autoria própria (2021)

Os protocolos de CFT e FRAP também não demonstraram diferença significativa entre os grupos de tratamento ( $p=0,5832$  e  $0,3364$ , respectivamente), como demonstrado na Fig. 3, com média  $\pm$  erro padrão da média.

Figura 3 - Dados de concentração equivalente a ácido gálico/mL de leite para o ensaio de CFT e equivalente a  $Fe^{2+}/L$  para análise FRAP, para cada grupo de tratamento



Fonte: Autoria própria (2021)



## 4 CONCLUSÃO

Diversos protocolos de atividade antioxidante já foram utilizados para a detecção de carotenóides, como a astaxantina (ROY, *et al.* 2010; LIU *et al.* 2021). Kotsampasi *et al.* (2018) não encontrou diferença estatística na análise de atividade antioxidante entre grupos de tratamento em amostras de leite de ovelhas suplementadas com óleo essencial de casca de laranja. A não detecção de melhora da atividade antioxidante com a suplementação de uma maior concentração de astaxantina sugere que as doses utilizadas não foram suficientes para afetar a composição do leite das vacas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Alimentos (LABIA) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Dois Vizinhos, pelo suporte analítico durante a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M. et al. Oxidative Stress and Cholinesterase Inhibition in Saliva and Plasma of Rats Following Subchronic Exposure to Malathion. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.137, p. 29-34, 2004.
- AMBATI, R.R., et al. Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. **Marine drugs**, v. 12, n. 1, p. 128-152, 2014.
- BARROS, M.P., et al. Combined astaxanthin and fish oil supplementation improves glutathione-based redox balance in rat plasma and neutrophils. **Chemico-Biological Interactions**, v. 197, n. 1, p. 58-67, 2012.
- DIAS, Hellen Ribeiro et al. Substâncias antioxidantes em alimentos e seus benefícios para a saúde: uma revisão bibliográfica. 2020.
- KOTSAMPASI, B. et al. Effects of dietary orange peel essential oil supplementation on milk yield and composition, and blood and milk antioxidant status of dairy ewes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 245, p. 20-31, 2018.
- LIU, Zhi-Wei et al. Multi-spectroscopies and molecular docking insights into the interaction mechanism and antioxidant activity of astaxanthin and  $\beta$ -lactoglobulin nanodispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 117, p. 106739, 2021.
- MACEDO, R.C., et al. Astaxanthin addition improves human neutrophils function: in vitro study. **European journal of nutrition**. v. 49, n. 8, p. 447-457, 2010.
- ROY, M. K. et al. ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content, **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 61, n. 2, p. 109-124, 2010.
- RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2006.



SEI-SICITE 2021

Pesquisa e Extensão para um  
mundo em transformação

XI Seminário de Extensão e Inovação  
XXVI Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica  
08 a 12 de Novembro - Guarapuava/PR



RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS +. **Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

SUMMER, A. et al. Impact of heat stress on milk and meat production. **Anim. Front.** 9, 39–46, 2019.

ZULUETA, A. et al. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 6-7, p. 380-385, 2009.