



UDESC

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EFEITOS DO USO DE CURCUMINA COMO
ADITIVO NA ALIMENTAÇÃO DE
OVELHAS LEITEIRAS NA SAÚDE ANIMAL,
PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE**

ANTONISE MARIELY JAGUEZESKI

CHAPECÓ, 2018

ANTONISE MARIELY JAGUEZESKI

EFEITOS DO USO DE CURCUMINA COMO ADITIVO NA ALIMENTAÇÃO DE OVELHAS LEITEIRAS NA SAÚDE ANIMAL, PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**

Orientador: Aleksandro Schafer da Silva

Chapecó, SC, Brasil

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com auxílio
do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC

Jaguezeski, Antonise Mariely Efeitos do uso de
curcumina como aditivo na alimentação de ovelhas
leiteiras na saúde animal, produção e qualidade
do leite / Antonise Mariely Jaguezeski. -
Chapecó, 2018.
107 p.

Orientador: Aleksandro Schafer da Silva

Co-orientadora: Aline Zampar Dissertação
(Mestrado) - Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste,
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó,
2018.

1. curcumina. 2. leite ovino. 3. nanotecnologia.
4. mastite subclínica. 5. antioxidante. I. da
Silva, Aleksandro Schafer. II. Zampar, Aline.
. III. Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

**Universidade do Estado de Santa Catarina
UDESC Oeste
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

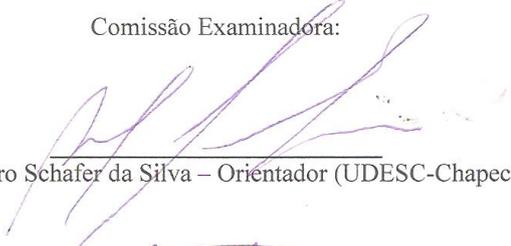
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DO USO DE CURCUMINA COMO ADITIVO NA
ALIMENTAÇÃO DE OVELHAS LEITEIRAS NA SAÚDE ANIMAL,
PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE**

Elaborada por
Antonise Mariely Jaguezeski

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

Comissão Examinadora:


Aleksandro Schafer da Silva – Orientador (UDESC-Chapecó)


Claiton André Zotti (UNOESC-Xanxerê)


Daniela Zanini (UFFS-Chapecó)

Chapecó, 23 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

À Deus e ao universo. Por disponibilizar as condições ideais a minha evolução profissional, pessoal e espiritual. Por me inspirar todos os dias na fé e anseio de poder ser melhor e fazer o mundo melhor.

Aos meus pais, Antonio e Nair. Não há palavras no mundo que descrevam a gratidão que sinto por não terem medido esforços para que eu chegasse até aqui. Sem vocês, seu amor, sua compreensão e seu apoio, não teria esse mérito. Essa conquista eu dedico especialmente a vocês!

Aos meus irmãos, Antonio Marcos e Antoniely. Ao meu irmão, pela motivação, e à minha irmã, que foi meu porto seguro, segurando minha mão e ajudando-me nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Ao meu cão, Panda. Por me acordar todos os dias com ânimo, e deixar meus dias cheios de amor. Por existir solidão na sua companhia, por ser companheiro de estudos e nas jornadas até altas horas no laboratório, e também secar minhas lágrimas nos momentos de cansaço.

Aos amigos que conheci nessa jornada de um ano, e aos que me acompanharam de longe. Aos de perto, que me animaram e deixaram meus dias mais leves e descontraídos, e aos que de longe, que por telefone ou recados torciam por mim e me incentivaram. Em especial, a Gessica, Maurício e Emerson.

Ao meu orientador, Aleksandro S. da Silva. Fostes mais que um orientador, um grande amigo! Deixará suas marcas nos que cruzaram teu caminho por seres exemplo de humildade, dedicação, esforço e paciência. Me sinto honrada por ter sido sua orientada! Também a minha coorientadora Aline Zampar, supercompetente, dedicada e amiga.

À Cabanha Chapecó, e em especial a Rosana e Suzana Viega. Agradeço de coração a oportunidade e o aprendizado. Vocês tornaram os dias de geada na Cabanha mais aconchegantes por sua amizade!

À Universidade do Estado de Santa Catarina, da qual tenho o imenso orgulho de ser fruto. Pública, e que além de investir no ensino de qualidade, dedica-se a formar pessoas melhores por meios de programas como o TJ Coaching, do qual tive a honra de desfrutar.

Aos colegas de laboratório, que de uma forma ou outra ajudaram neste projeto, compartilhando mates, deixando os dias de trabalho mais divertidos.

Aos amigos da Pró-Vida, que despertaram em mim a necessidade de ser melhor hoje e sempre, e por me apresentarem um Mundo Bem Melhor, de harmonia e amor.

Por fim, a todos que, com energias positivas emanadas, contagiaram e motivaram-me a seguir nessa caminhada.

Gratidão imensurável!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

EFEITOS DO USO DE CURCUMINA COMO ADITIVO NA ALIMENTAÇÃO DE OVELHAS LEITEIRAS NA SAÚDE ANIMAL, PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE

AUTOR: Antonise Mariely Jaguezeski

ORIENTADOR: Aleksandro Schafer Da Silva

Chapecó, 23 de março de 2018

Extraído da *Curcuma longa*, a curcumina é descrita na literatura atual com potencial de prevenção e cura de diversas doenças, assim como melhorar a resposta imune, aumentar os níveis de antioxidantes na defesa contra radicais livres e a ação antibacteriana. O objetivo deste estudo foi conhecer os efeitos da curcumina quando adicionado na dieta de ovelhas leiteiras sobre a saúde animal, performance leiteira e qualidade do leite (composição), consumo de alimento e mastite subclínica, além de produzir e testar nanocápsulas de curcumina de polímeros de absorção restrita em pH no trato gastrointestinal. Para atingir os objetivos, três experimentos foram conduzidos utilizando ovelhas lactantes da raça Lacaune. No Experimento I, 18 ovelhas foram divididas em dois grupos compostos por 9 animais cada, um deles suplementado com curcumina na dose de 100 mg/kg ração/dia durante 15 dias (cada ovelha consumiu 0,8kg/ração/dia). Com a suplementação obtivemos melhoria em indicadores de antioxidantes totais, efeito anti-inflamatório, aumento na produção de leite, diminuição de contagem de células somáticas (CCS) e gordura no leite, bem como, um leite com aumento de ácido graxo oleico e diminuição de ácido graxo hexadecanóico, associado a diminuição de oxidação proteica e aumento de antioxidantes no leite, o que torna o leite um produto com aumento dos benefícios ao consumidor. No Experimento II, buscamos desenvolver nanocápsulas de curcumina com dois polímeros distintos (poli ϵ -caprolactona e eudragite L-100), com objetivo de melhorar a absorção da curcumina no intestino e consequentemente potencializar seus efeitos medicinais e biológicos. Em um segundo momento foi realizado um estudo preliminar, fornecemos as nanocápsulas de curcumina na dieta de ovelhas em doses 10 vezes menores que curcumina livre durante 7 dias. Os grupos foram denominados de: controle (sem suplementação), curcumina livre (30 mg/kg ração), nanocápsulas de curcumina produzidas com polímero poli ϵ -caprolactona (3 mg/kg de ração) e nanocápsulas de curcumina produzidas com polímero eudragit (3 mg/kg de ração), sendo que o consumo de ração diariamente foi de 0,8kg. Níveis de antioxidantes no soro aumentaram drasticamente em animais tratados com nanocápsulas de curcumina do polímero Eudragit frente aos demais grupos, além de haver diminuição do indicador de lipoperoxidação. Neste mesmo grupo houve redução de leucócitos totais e globulinas que caracteriza ação anti-inflamatória. A produção e composição de leite não diferiu entre grupos nesse experimento. O experimento III teve por objetivo relatar o uso de curcumina livre no tratamento de ovelhas leiteiras apresentando quadro de mastite subclínica há 31 dias. Seis animais receberam curcumina na dieta (dose de 200 mg/kg de ração) durante 10 dias, sendo que a quantidade de concentrado consumido diariamente foi de 0,3kg. No fim dos 10 dias foram refeitos os testes CMT (*California mastitis test*), sendo negativo para cinco animais, e uma visível melhora de saúde, pois houve uma queda na contagem de leucócitos totais e globulinas que caracterizam uma resposta inflamatória exacerbada no início do experimento. De modo geral, podemos concluir que o uso de curcumina como aditivo na dieta de ovelhas leiteiras é benéfico a saúde dos animais e do úbere, qualidade e produção leiteira, aumenta antioxidante e a ação anti-inflamatória. Outra conclusão importante é que a nanotecnologia foi capaz de potencializar os

efeitos da curcumina na dieta de ovelhas, permitindo que doses baixas em nanocápsulas do polímero Eudragit promovam o aumento dos níveis de antioxidantes no sangue dos animais.

Palavras-chave: curcumina, leite ovino, nanotecnologia, mastite subclínica, antioxidante.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade do Estado de Santa Catarina

EFFECTS OF CURCUMIN AS AN ADDITIVE IN DAIRY EWES FEEDING ON ANIMAL HEALTH, MILK PRODUCTION AND QUALITY

AUTHOR: Antonise Mariely Jaguezeski

ADVISER: Aleksandro Schafer da Silva

Chapecó, March 23, 2018

Extracted of *Curcuma longa*, the curcumin is described in current literature with potential for prevention and cure of various diseases, as well as improving the immune response, increasing antioxidants in defense against free radicals and antibacterial action. The objective of this work was to know the effects of curcumin when added to the diet of dairy sheep on animal health, milk performance, feed consumption and subclinical mastitis, as well as to produce and test curcumin nanocapsules of restricted absorption polymers at pH in the gastrointestinal tract. For this, three experiments were conducted using lactating Lacaune sheep. In Experiment I, 18 sheep were divided into two groups of 9 animals each, one of them supplemented with curcumin at a dose of 100 mg/kg day, for 15 days (each sheep consumed 0.8 kg/concentrate/day). With supplementation we obtained improvement in indicators of total antioxidants, anti-inflammatory effect, increase in milk production, decrease of somatic cell count (CCS) and fat in milk, as well as, a milk with increased oleic fatty acid and decrease of hexadecanoic fatty acid, associated with decreased protein oxidation and increased antioxidants in milk, which makes milk a product with positive characteristics for the consumer. In Experiment II, we first search to develop curcumin nanocapsules with two distinct polymers (poly ϵ -caprolactona and eudragite L-100), with the aim of improving the absorption of curcumin in the intestine and consequently potentialize your medicinal and biological effects. In a second moment a preliminary study was carried out, we provided these nanocapsules of curcumin in the diet of sheep in doses 10 times lower than free curcumin for 7 days. Therefore, the groups were formed as follows: control (without supplementation), free curcumin (30 mg/kg concentrate), curcumin nanocapsules produced with poly- ϵ -caprolactona polymer (3 mg/kg concentrate) and curcumin nanocapsules produced with eudragit polymer (3 mg/kg of concentrate), and daily concentrate intake was 0.8 kg. Serum antioxidant levels increased dramatically in animals treated with curcumin nanocapsules of the polymer eudragites compared to the other groups, in addition to a decrease in the indicator of lipoperoxidation. In this same group there was reduction of total leukocytes and globulins that characterized anti-inflammatory action. Milk production and composition did not differ between groups in this experiment. In the third experiment (III), the objective was to report the use of free curcumin in the treatment of dairy sheep presenting with subclinical mastitis for 31 days (animals would be discarded from the herd). Six animals received curcumin in the diet (200 mg/kg concentrate) for 10 days, and the amount of concentrate consumed daily was 300 grams. After 10 days, the CMT (*California mastitis test*) tests were negative for five animals, as well as an increase in milk production numerically, as well as a visible improvement in health, since there was a decrease in total leukocyte and globulin counts which characterize an exacerbated inflammatory response at the beginning of the experiment. In general, we can conclude that the use of curcumin as an additive in dairy ewes is beneficial to animal health and udder, quality and milk production, active and increases antioxidant and anti-inflammatory action. Another important finding is that nanotechnology was able to potentiate the effects of curcumin on the sheep diet, allowing low doses in nanocapsules of

the eudragit polymer to dramatically increase the antioxidant levels in the animals' blood.

Keywords: curcumin, sheep milk, nanotechnology, subclinical mastitis, antioxidant.

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. CAPÍTULO I | 12 |
| REVISÃO DE LITERATURA..... | 12 |
| 1.1 PANORAMA DA OVINOCULTURA DE LEITE..... | 12 |
| 1.2 LEITE OVINO E SUBPRODUTOS | 13 |
| 1.3 MASTITE SUBCLÍNICA E IMPLICAÇÕES AO LEITE OVINO | 14 |
| 1.4 DIFICULDADES E ESTRATÉGIAS DE MERCADO..... | 15 |
| 1.5 USO DE COMPOSTOS NATURAIS | 16 |
| 1.6 PROPRIEDADES E USO DA CURCUMINA | 16 |
| 1.7 USO DA CURCUMINA EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.8 MECANISMOS DE AÇÃO DA CURCUMINA | 18 |
| 1.9 NOVAS TECNOLOGIAS NO USO DA CURCUMINA..... | 21 |
| 1.10 OBJETIVOS..... | 22 |
| 1.10.1 GERAL..... | 22 |
| 1.10.2 ESPECÍFICOS | 22 |
| 2 - CAPÍTULO II..... | 23 |
| 2 - MANUSCRITO I..... | 24 |
| Adição de curcumina na dieta de ovelhas leiteiras melhora a saúde animal e consequentemente a performance e qualidade do leite | 25 |
| Destques..... | 26 |
| Resumo gráfico..... | 26 |
| Resumo | 27 |
| Introdução..... | 28 |
| Material e Métodos..... | 28 |
| Resultados..... | 34 |
| Discussão | 36 |
| Conclusão | 40 |
| Referências | 40 |
| 2.2 – MANUSCRITO II | 57 |
| Nanocápsulas de curcumina como suplemento na dieta de ovelhas leiteiras..... | 57 |
| Resultados preliminares..... | 57 |
| INTRODUÇÃO..... | 60 |
| MATERIAL E MÉTODOS..... | 61 |
| RESULTADOS | 64 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| DISCUSSÃO | 66 |
| CONCLUSÃO..... | 68 |
| REFERÊNCIAS | 68 |
| 2.3 – MANUSCRITO III..... | 80 |
| Addition of Curcumin in Dairy Sheep Diet in the Control of Subclinical Mastitis | 81 |
| ABSTRACT | 81 |
| INTRODUCTION | 82 |
| CASE REPORT..... | 83 |
| DISCUSSION..... | 85 |
| REFERENCES | 88 |
| 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 95 |
| REFERÊNCIAS | 97 |

1. CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 PANORAMA DA OVINOCULTURA DE LEITE

Uma maior procura por lácteos derivados de ovinos é recente no Brasil, e dentre os países da América, a Argentina foi a pioneira na produção leiteira de ovinos, sendo que o interesse comercial se consolidou apenas por volta da década de 90 (BAIN, 2004; SUAREZ, 2004). A importação de sêmen de animais da raça francesa como a Lacaune começou a ser praticada em maior proporção a partir de 2012, o que contribuiu para se ampliar a variedade de material genético de ovinos leiteiros no Brasil, até então muito restrita, ao mesmo tempo em que elevou o custo com animais puros e dificultou a entrada de novos criadores no mercado (BIANCHI et al., 2016).

Neste breve histórico, é possível notar que a atividade de ovinocultura de leite é bastante recente, mas apresenta claramente seus primeiros sinais de crescimento. Atualmente no Brasil, o setor é representado por vinte e oito ovinocultores de leite, estando nove no Sudeste, seis no Centro-Oeste e treze no Sul (sete no Rio Grande do Sul, quatro em Santa Catarina e dois no Paraná), de acordo com dados da ARCO (BIANCHI et al., 2016).

Quando consideramos a produção de leite e o maior rebanho na região sul, tem-se o estado de Santa Catarina como o primeiro colocado, correspondendo respectivamente a 315mil litros/ano e em torno de 2400 matrizes, na frente do Rio Grande do Sul, que apesar de possuir maior número de produtores engajados, contribuem com uma menor produção (BIANCHI et al., 2016). Em escala mundial, o leite de ovelhas corresponde por menos de 2% dentre as principais espécies produtoras (FAOSTAT, 2011). Entre as raças com aptidão e de maiores destaques na produção estão East Friesian (milchschaf), Awassi, Assaf e a Lacaune (BIANCHI et al., 2016).

A principal raça utilizada na ovinocultura de leite no Brasil é a Lacaune (Figura 1), originária da região homônima na França e ideal para produção leiteira, além de alguns rebanhos da raça East Friesian (SANTOS, 2016). A fêmea Lacaune chega a produzir 4,5L de leite por dia no pico da lactação que corresponde ao 30º dia pós-parto; mas a média da lactação para os rebanhos do RS está em 1,3L/dia (BRITO et al., 2006). A distribuição da raça Lacaune no Brasil se dá principalmente nos estados do Sul e Sudeste (Rossi, 2009).

1.2 LEITE OVINO E SUBPRODUTOS

O sabor do leite ovino é considerado suave e adocicado; os iogurtes derivados são bastante consistentes e de sabor delicado, e os queijos curados tendem a ser fortes (LUQUET, 1991). A produção apresenta um bom rendimento no seu beneficiamento, sendo que com cinco litros de leite de ovelha é possível fazer um quilograma de queijo, enquanto que em bovinos, para a mesma quantia de queijo seriam necessários 10 litros de leite (CASA DA OVELHA, 2018). Isto se deve a alta concentração de sólidos totais e ao leite ser, especialmente, rico em gordura e proteínas como a caseína, características estas mais valorizadas pela indústria (RIBEIRO et al., 2007), além de ser rico em ácidos graxos de cadeias curta e média e ácidos graxos insaturados como C18:1 e C18:2, que são benéficos à saúde (BERGAMINI et al., 2010). Dentre os fatores que influenciam a composição do leite de ovelha destaca-se a raça, a alimentação, a estação do ano, o estágio de lactação e o estado sanitário (HASSAN, 1995; CARLONI et al., 2010). A Tabela 1 traz um comparativo dentre espécies da composição do leite, onde chama atenção os da espécie ovina.

Tabela 1. Composição de sólidos do leite ovino comparado com outras espécies (caprinos, bovinos e humanos).

| Componente | Cabra | Ovelha | Vaca | Humano |
|------------------------------------|--------------|---------------|-------------|---------------|
| Gordura (%) | 3,8 | 7,9 | 3,6 | 4,0 |
| Sólidos não gordurosos (%) | 8,9 | 12,0 | 9,0 | 8,9 |
| Lactose (%) | 4,1 | 4,9 | 4,7 | 6,9 |
| Proteína (%) | 3,4 | 6,2 | 3,2 | 1,2 |
| Caseína (%) | 2,4 | 4,2 | 2,6 | 0,4 |
| Albumina/Globulina (%) | 0,6 | 0,8 | 0,2 | 0,5 |
| Nitrogênio não proteico (%) | 0,4 | 0,8 | 0,2 | 0,5 |
| Cinzas (%) | 0,8 | 0,9 | 0,7 | 0,3 |
| Energia (Kcal/100mL) | 70 | 105 | 69 | 68 |

Fonte: Park et al., 2007.

O pH do leite de ovelha é semelhante ao leite de vaca, em torno de 6,65, sendo que para a raça Lacaune foi descrita variação de 6,60 a 6,68 (ASSENAT, 1985). Diferentemente do leite bovino, este apresenta baixa estabilidade coloidal, precipitando a caseína no teste em etanol $63,17 \pm 3,64\%$ (Fava, 2012), ou seja, com estabilidade térmica inferior ao leite bovino.

No Brasil, as prateleiras de produtos ovinos são compostas por produtos nacionais e importados, representados por queijos tipo Feta, Roquefort, Pecorino, Boursin, Labneh e frescais, além de iogurtes com polpas, integrais e desnatados, doce de leite, sorvetes e até mesmo cosméticos (CASA DA OVELHA, 2018). A cadeia de produção de leite pode ser

considerada ‘curta’, pois a relação entre o produtor e o consumidor é bastante próxima, sendo representado principalmente pelo comércio do queijo, uma vez que o leite de ovelha para consumo *in natura* não é apreciado por ser muito mais gorduroso (e conseqüentemente cremoso) comparado ao leite de vaca (SANTOS, 2016). O leite ovino também tem sido uma opção para pessoas com alergia alimentar, patologia que tem crescido na população mundial, uma vez que cada paciente pode exibir uma sensibilização única para um leite específico (PAZHERI et al., 2014).

1.3 MASTITE SUBCLÍNICA E IMPLICAÇÕES AO LEITE OVINO

Na glândula mamária do animal saudável, o leite mantém uma baixa carga microbiana e baixa contagem de células somáticas (CCS). Já no processo de inflamação ou infecção subclínica (mastite subclínica), há um aumento de CCS, redução na produção de leite, redução da lactose (LEITNER et al., 2011; ROVAI et al., 2015), diminuição de ureia, alteração do perfil de ácidos graxos e níveis mais altos de proteínas, caseína e gordura (CABONI et al., 2017). A prevalência de mastite subclínica em ovinos varia de 9,23 a 28,1% (BEHESHTI et al., 2010; GEBREWAHID et al., 2012) sendo a *Streptococcus* coagulase-negativa, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* os principais agentes causadores de mastites (GEBREWAHID et al., 2012).

Rovai et al., (2015) afirmam que as maiores perdas ocorrem pela inflamação, mas mais comumente a infecção subclínica, devido à queda na produção de leite e pelo baixo rendimento de subprodutos. A qualidade do leite de ovelha está ligada às suas características sanitárias, nutricionais e decorrentes do processamento (MORAND-FEHR et al., 2007).

Ovelhas sadias apresentam CCS muito mais elevada (200.000-400.000 cel./ml) do que vacas sadias (70.000 cel./ml) (OLECHNOWICZ e JASKOWSKI 2014; RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2007). Testes indiretos, como o *California mastitis test* (CMT) (HAWARI et al., 2014) e a contagem de células somáticas (CCS) (SPANU et al., 2011) estão entre os métodos mais utilizados para o diagnóstico de mastite subclínica. Porém, de acordo com Raynal-Ljutovac (2007), o CMT apresenta limitações quando aplicado a ovelhas, uma vez que foi originalmente desenvolvido para a detecção de CCS em vacas, tendo um padrão mais baixo de contagem. A CCS, por outro lado, é um indicador da saúde das glândulas mamárias (SPANU et al., 2011), e nada mais é do que a contagem de células epiteliais e inflamatórias (BLAGITZ et al., 2013), porém, também ainda não se tem um limiar de CCS bem definido

para a espécie ovina, uma vez que a contagem e variação dos padrões celulares ocorre fisiologicamente durante o período de lactação (PISANU et al., 2015). Como descrito por Chiaradia et al. (2013), o aumento de CCS nem sempre está associado a proteínas que caracterizam a infecção da glândula mamária. Portanto, a CCS pode deixar dúvidas quanto ao verdadeiro estado da glândula mamária das ovelhas (CHIARADIA et al., 2013).

Países europeus já incluem a resistência a mastite como um fator de seleção de ovinos, utilizando as estimativas experimentais de CCS e estudos genéticos para redução de novas gerações com mastites subclínicas (BERGONIER et al., 2003). O objetivo de criação (leite/carne) também interfere na determinação de um limiar de CCS para animais com mastite subclínica (ZAFALON et al., 2016). De qualquer forma, melhorar o estado de saúde do úbere é necessário para manter a produção e a qualidade do leite durante a lactação (DE OLIVES et al., 2013).

1.4 DIFICULDADES E ESTRATÉGIAS DE MERCADO

A ovinocultura de leite, apesar de ser recente no Brasil, vem apresentando expressivo crescimento impulsionado pela procura por atividades rentáveis por parte do produtor e a busca por alimentos saudáveis pelos consumidores (BIANCHI et al., 2016). A estratégia, segundo Rossi (2009) para a formação e manutenção de mercado para os lácteos de ovelha tem sido expor seus produtos em estabelecimentos comerciais com público de maior poder aquisitivo.

Pesquisas quanto as melhorias produtivas e zootécnicas na ovinocultura têm ficado restrita às universidades (ROSSI, 2009). Outra dificuldade na ovinocultura de leite é a restrição no uso de antibióticos (ATB) em animais, imposta por vários países, principalmente europeus, devido a preocupações de resistência bacteriana (LOLLA et al., 2016) devido ao consumo humano de derivados lácteos com resíduos de ATB (BHATT et al., 2014). Em consequência disso, resta aos produtores o descarte dos animais acometidos por doenças, entre elas a mastite subclínica persistente. Em virtude disso, tem-se buscado tratamentos alternativos como os aditivos fitoterápicos, por seus benefícios comprovados com inúmeras finalidades.

Estudos técnicos-científicos que visam melhorias do setor implantados para a nossa realidade de produção são de extrema importância para auxiliar os produtores a agregar valor ao produto e até mesmo, produzir com maior eficiência. Estes estudos podem focar no manejo, nutrição, melhoramento genético ou sanidade dos ovinos, ou ainda na geração de

produtos e subprodutos com qualidades melhoradas, chamados de nutracêuticos, que acabam por agregar valor na comercialização.

1.5 USO DE COMPOSTOS NATURAIS

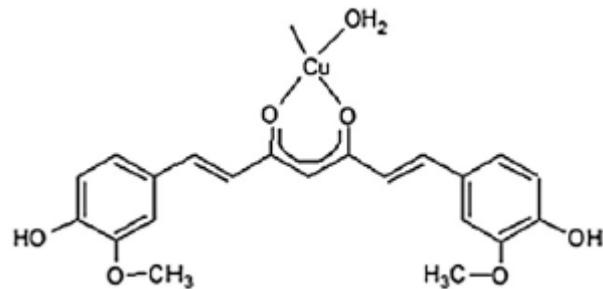
Produtos naturais são aqueles presentes na natureza e que não contenham aditivos químicos, ou tenham sido submetidos a processamento, tais como ervas, nutrientes e suplementos dietéticos (CHAMBERLIN et al., 2014). Estes fitoterápicos são utilizados como métodos complementares e alternativos na prevenção e tratamento de doenças (SMITH E LOGAN, 2002), além de estarem sendo aplicados na produção animal para melhoria da saúde e consequente desempenho dos animais. Porém, estudos devem ser feitos a fim de definir indicações, mecanismo e dosagens, evitando-se reações adversas (XIONG et al., 2017).

Nutracêuticos são ingredientes alimentares que têm benefícios fisiológicos comprovados ou protegem contra doenças, por meio de processos bioquímicos em nível celular, sendo que as planta compostas por fitoquímicos são importantes nesses processos (SHAILAJA et al., 2017). Também pode-se dizer que são produtos que uma vez melhoradas as suas qualidades ou composição podem ser usados na alimentação com intuito de tratar doenças humanas (CHAMBERLIN et al., 2014), onde nessa dissertação destacamos a curcumina.

1.6 PROPRIEDADES E USO DA CURCUMINA

A *Curcuma longa* (Figura 2), popularmente chamado de açafrão-da-terra, é um rizoma da família do gengibre usado há séculos por indianos e chineses na culinária como corante e com finalidade medicinal (CHATTOPADHYAY et al., 2004). Dentre seus componentes ou princípios ativos, a curcumina (1,7-bi (4-hidroxi-3metoxifenil) -1,6-hepadiene-3,5-diona) é a mais importante (MILOBEDZKA et al., 1910) e representa de 2 a 5% do tempero (ANAMIKA, 2012) e aproximadamente 77% quando na forma de extrato (CHUTIMA, 2012). A fórmula da curcumina está representada na Figura 1.

Figura 1. Fórmula estrutural do princípio ativo curcumina, derivado da *Curcuma longa* após purificação.



Fonte: García-Niño e Pedraza-Chaverri, 2014.

As utilidades da curcumina, também chamada diferulometano, vem sendo ampliadas no uso medicinal a cada ano. Na literatura há comprovação das propriedades anticancerígenas (AGGARWAL, et al. 2003; SHEHZAD et al., 2013), antienvhecimento (LIMA et al., 2011), agente curativo de feridas (ANAMIKA et al., 2012), anti-inflamatório (JOE et al., 2004), radioprotetor celular contra radiação γ induzido (SEBASTIÀ et al., 2011), antioxidante (IMLAY, 2003), entre outros. A curcumina foi capaz de eliminar os radicais livres, atuar como quelante e induzir enzimas desintoxicantes pela regulação da vias de transcrição na intoxicação por metais pesados (GARCÍA-NIÑO E PEDRAZA-CHAVERRÍ, 2014). Portanto, tem despertado interesse também na alimentação animal.

Figura 2. Imagem ilustra a planta *Curcuma longa*. O seu rizoma (raiz) é moído, processado e purificado, dando origem a curcumina.



Fonte: Jaques, 2010.

1.7 USO DA CURCUMINA EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO

Aditivos são utilizados na alimentação animal como forma de atender aos requisitos nutricionais dos animais, melhorar a saúde e rendimentos, enriquecimento de nutrientes, entre outros (FLACHOWSKY E MEYER, 2015), e são portanto, vastamente utilizados na produção. Em frangos de corte quando utilizado o aditivo curcumina na dieta, obteve-se efeito hepatoprotetor em intoxicação por aflatoxina (GOWDA et al., 2009) e efeito antibacteriano

contra salmonelose (VARMUZOVA et al., 2015). Em bovinos é descrito o uso eficaz da curcumina em tratamento de mastite subclínica (BHATT et al., 2014) e na replicação e invasão celular por *Neospora caninum in vitro* (QIAN et al., 2015). Em peixes, a melhoria na saúde e composição por inibição de oxidação e peroxidação lipídica (MANJU et al., 2012) além de efeito antiparasitário e anti-inflamatório (MALLO et al., 2017).

O primeiro estudo com curcumina na espécie ovina é recente. Os autores observaram efeito anticoccidial contra *Eimeria* spp., atingindo 100% de eficácia nos tratados, além de aumentar o ganho de peso diário (CERVANTES-VALENCIA et al., 2016). Outros efeitos obtidos neste mesmo estudo foi o aumento de IL-10 nos cordeiros suplementados, e a diminuição da peroxidação lipídica e a geração de nitritos, isto é, efeito anti-inflamatório e antioxidante. Em outras espécies animais, obteve-se efeito antihelmíntico (ULLAH et al., 2017) e anticoccidiostático contra vários protozoários, como *Giardia* spp. (SAID et al., 2012), *Trypanosoma* spp. (NAGAJYOTHI et al., 2012) e *Eimeria tenella* (KIM et al., 2013), pois a curcumina é capaz de afetar a morfologia e viabilidade do parasito (CHATTOPADHYAY et al., 2004).

1.8 MECANISMOS DE AÇÃO DA CURCUMINA

A curcumina mostrou ser capaz de inibir a atividade de NF- κ B (fator nuclear kappa - potenciador de células B ativadas), um fator de transcrição que regula muitos genes implicados na iniciação de respostas inflamatórias (JOE et al., 2004). Desta forma, houve inibição da produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) (LIU et al., 2015), citocinas estas liberadas de monócitos e macrófagos com papéis importantes na regulação das respostas inflamatórias. Por outro lado, a curcumina evita o comportamento inflamatório relacionado a dor causado pela superestimulação de citocinas pró-inflamatórias, por aumentar a produção de interleucina-10 (IL-10), uma citocina antiinflamatória (FATTORI et al., 2015; KIM et al., 2013), assim como a curcumina está relacionada com a inibição da cicloxigenase 2 (COX-2) (LEV-ARI, 2005).

Extrato de *C. longa* aplicada em cultivo de neutrófilos de ovelha teve atividade anti-inflamatória ao aumentar a apoptose espontânea e inibir as expressões de interleucina 8 (IL-8) (FARINACCI et al., 2009). Os neutrófilos apoptóticos exibem uma regulação negativa funcional (WHITE et al., 1993) pelo reconhecimento e remoção por células fagocíticas (SAVILL, 1997). O efeito hepato e renoprotetor da curcumina se dá ao regular a expressão da matriz metaloproteinase-8 (MMP-8), IL-1 β , IL-8, TNF- α e proteínas de fase aguda (PFA)

(SOLIMAN et al., 2014). Nota-se, dessa forma, que a inibição da inflamação por *C. longa* atua em diversas enzimas celulares, afetando a angiogênese, a adesão celular, a transcrição gênica e a indução da apoptose celular (SHARMA et al., 2005).

Uma das principais causas da inflamação é a oxidação celular, ou seja, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), estes são naturalmente produzidos na respiração aeróbia e são necessários em processos celulares e bioquímicos, incluindo mensagens intracelulares, diferenciação, progressão celular, apoptose, imunidade (IMLAY, 2003; MATÉS et al., 1999), e defesa do sistema imune contra microorganismos (THANGAPAZHAM et al., 2013), porém, presença prolongada e exacerbada de EROs gera estresse oxidativo, o que é prejudicial a muitas células e suas funções (PANCHATCHARAM et al., 2006; ROY et al., 2006).

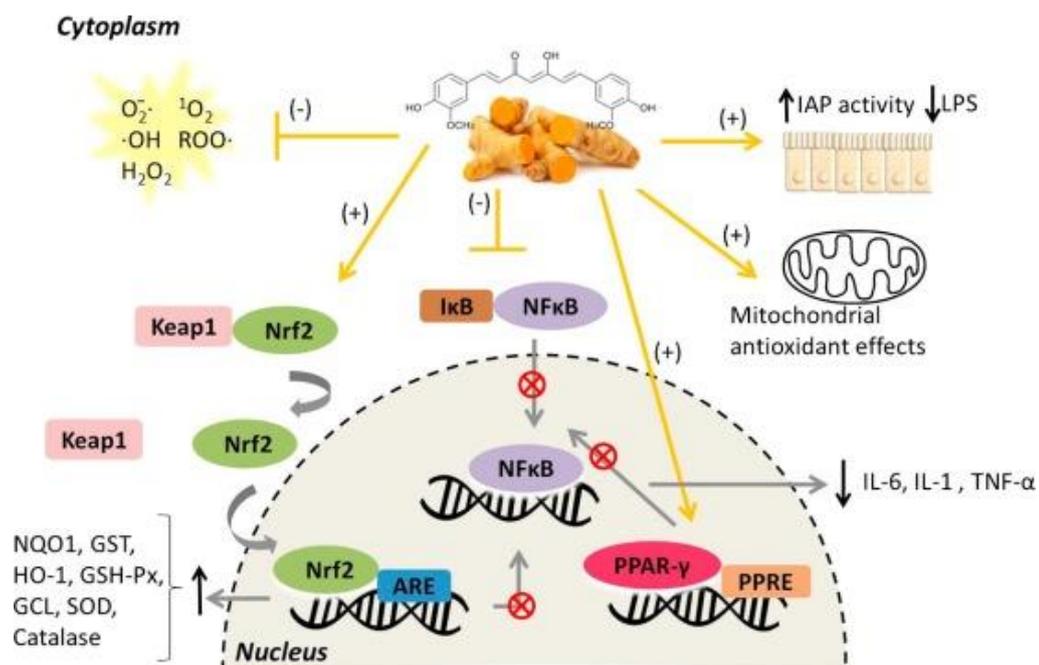
Os radicais livres ocasionam tanto a peroxidação lipídica, ruptura do DNA e de proteínas dos tecidos e a inativação de enzimas, com consequentes danos teciduais (MOHANTY et al., 2012; KAPOOR E PRIYADARSINI, 2001). A presença do estresse oxidativo pode inibir a remodelação do tecido e cicatrização de feridas (THANGAPAZHAM et al., 2013). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O_2^-) são espécies reativas a oxigênio que podem ser utilizados como marcadores de estresse oxidativo no indivíduo (IMLAY, 2003).

O termo antioxidante é usado para os compostos capazes de doar elétrons e neutralizar os radicais livres (SAEIDNIA E ABDOLLAHI, 2013). As enzimas antioxidantes endógenas (sintetizadas pelo próprio indivíduo) como a glutatona redutase (GSH) (EL-BAHR, 2015; GARCÍA-NIÑO et al., 2015), superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) protegem as células contra as EROs (MATÉS et al., 1999), portanto são muito importantes ao organismos de humanos, plantas e animais. De acordo com a literatura, a curcumina utilizada por via oral e tópica mostrou efeito potencial no aumento dessas enzimas (SUBUDHI E CHAINY, 2010; PANCHATCHARAM et al., 2006), efeito esse direto e indireto de acordo com os autores conforme representado na Figura 3. Pesquisadores relataram que a curcumina é antioxidante bifuncional, devido a sua capacidade de reagir diretamente com EROs, além de induzir uma regulação positiva de várias proteínas protetoras e antioxidantes por vias de ativação Keap1 / Nrf2 / ARE (GONZÁLEZ-REYES et al., 2013; GARCÍA-NIÑO e PEDRAZA-CHAVERRÍ, 2014).

Outro mecanismo relatado no uso de curcumina foi a inibição da atividade da adenosina deaminase (ADA), assim como redução dos níveis de malondialdeído (AKINYEMI

et al., 2017). O aumento de adenosina (ADO) devido a inibição da atividade de ADA eleva as ligações aos receptores P1 (purinérgicos) e conseqüentemente aumenta a liberação de mediadores anti-inflamatórios (BOROWIEC et al., 2006). O aumento dos níveis de malondialdeído (MDA) é uma indicação de excesso de peróxidos lipídicos no tecido, causando o consumo e a perda de grupos funcionais de tiol (-SH) em várias enzimas antioxidantes (AKINYEMI et al., 2017). O curcuminóide também é capaz de aumentar a hidrólise de ATP e ADP agindo na NTPDase, e evitar o aumento da atividade de acetilcolinesterase (AChE) em pulmão de ratos expostos a fumaça de cigarro (JAQUES et al., 2011). O aumento do ATP em linfócitos e no endotélio estão associados à indução de respostas em grande parte pró-inflamatórias, como a liberação de IL-1 (IMAI et al., 2000; LA SALA et al., 2003). A atividade elevada de AChE diminui níveis de acetilcolina (ACh), sendo um efeito danoso, uma vez que a ACh é capaz de atenuar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-18 (IL-18), sem afetar a produção de interleucina-10 (IL-10), sendo esta uma citocina anti-inflamatória (PAVLOV E TRACEY, 2004), assim como, a ACh é um importante neurotransmissor de sinalização colinérgica (ÖZBEY et al., 2016). Portanto, nota-se que a curcumina tem efeito anti-inflamatório por diversas vias alternativas.

Figura 3. Mecanismo de ação da curcumina, mostrando a ação direta em radicais livres, devido à propriedade antioxidante e anti-inflamatória pela via NF- κ B.



Fonte: Almeida Alvarenga et al., 2018.

Estudos sugerem que doses baixas de curcumina mostram-se protetoras contra EROs e danos no DNA induzido por EROs, enquanto doses elevadas podem ser prejudiciais (KELLY et al., 2001; TANWAR et al., 2010). É importante ressaltar que não há até o momento uma concordância ou unificação de dose a ser utilizadas em humanos e animais. Farinacci et al. (2009) sugeriu o uso terapêutico com curcumina na clínica de inflamações em ruminantes, uma vez que *in vitro*, a curcumina foi efetiva ao limitar as fases iniciais de infiltrações de neutrófilos e promover a apoptose de neutrófilos.

1.9 NOVAS TECNOLOGIAS NO USO DA CURCUMINA

Vistos os efeitos benéficos da curcumina, autores sugerem associar tecnologias para o uso, tais como as nanopartículas, uma vez que *in natura* a curcumina tem baixa biodisponibilidade e solubilidade, o metabolismo é rápido e o produto é sensível à luz (AKBIK et al., 2014). A bioacessibilidade e disponibilidade da curcumina em microcápsulas mostrou-se mais efetiva que a formulação convencional adicionada e avaliada em alimentos (GÓMEZ-ESTACA et al., 2015), pois com a nanotecnologia os problemas de volatilidade, viscosidade ou baixa solubilidade em água diminuem, assim como a liberação do composto ocorre em taxas controladas ou em condições específicas (FANG E BHANDARI, 2010). Esse processo também minimiza a perda de funcionalidade devido aos efeitos da luz, oxigênio, pH, umidade ou interação com outros componentes da matriz de alimentos (VOS et al., 2010).

Nanoemulsões são mistura heterogênea transparente de óleo em água e estabilizada por emulsionantes, que demonstraram maiores vantagens em comparação com as emulsões convencionais por serem termodinamicamente estáveis (ANTON et al., 2008). Esta nanotecnologia também demonstra estabilidade, evitando a agregação de partículas e separação de fases, potencializando seus efeitos (CHANG, 2014). Testes farmacocinéticos em camundongos confirmaram que a biodisponibilidade oral da curcumina na nanoemulsão é aumentada em 9 vezes em comparação com a curcumina livre (YU E HUANG, 2012).

A adição de nanoemulsão de curcumina em óleo de soja apresentou estabilidade oxidativa do produto durante o armazenamento (TOYOSAKI et al., 2008), assim como a adição em biodiesel, também evitando a oxidação e aumentando a durabilidade (SOUSA et al., 2014); o mesmo foi observado em leite *in natura* e em sorvete (JOUNG, et al., 2016; KUMAR et al., 2016).

Estudos buscando melhorias nos lácteos de ovelhas leiteiras suplementadas com curcumina não foram até então relatados, no entanto, um crescente interesse por antioxidantes

alimentares surgiu nas últimas duas décadas devido à crescente evidência de seus efeitos favoráveis à saúde (JOUNG et al., 2016; SOCCIO et al., 2018).

1.10 OBJETIVOS

1.10.1 GERAL

Verificar se a suplementação de ovelhas leiteiras com curcumina altera positivamente os parâmetros de saúde, produtividade e composição do leite, assim como, favorece a qualidade e durabilidade do mesmo.

1.10.2 ESPECÍFICOS

- Testar se curcumina na dieta de ovelhas eleva a produção de leite e altera positivamente a composição e qualidade de leite e durabilidade do leite.
- Avaliar se a adição de curcumina na dieta de ovelhas leiteiras promove efeito anti-inflamatório.
- Analisar alterações antioxidantes usando curcumina como aditivo na dieta.
- Verificar se curcumina na dieta altera o catabolismo proteico, metabolismo lipídico e de carboidratos.
- Investigar se curcumina na dieta interfere no consumo de alimento.
- Produzir nanocápsulas de curcumina.
- Testar se adição de nanocápsulas de curcumina na dieta das ovelhas potencializa ação antioxidantes e anti-inflamatória.
- Testar a eficácia curativa de mastite subclínica em ovelhas que receberam curcumina na dieta.

2 - CAPÍTULO II

MANUSCRITO

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de três manuscrito, com sua formatação de acordo com as orientações da revista ao qual foi submetido.

2 – MANUSCRITO I

Adição de curcumina na dieta de ovelhas leiteiras melhora a saúde animal, performance e qualidade do leite

Antonise M. Jaguezeski^a, Gessica Perin^a, Nathieli B. Bottari^c, Roger Wagner^c, Mariana B. Fagundes^c, Maria Rosa C. Schetinger^c, Vera M. Morsch^c, Carolina dos S. Stein^d, Rafael N. Moresco^d, Ana Luiza Schogor^b, Aleksandro S. Da Silva^{bc}

De acordo com normas para publicação em:

Pesquisa Veterinária Brasileira

Adição de curcumina na dieta de ovelhas leiteiras melhora a saúde animal, performance e qualidade do leite

Antonise M. Jaguezeski^a, Gessica Perin^a, Nathieli B. Bottari^c, Roger Wagner^c, Mariana B. Fagundes^c, Maria Rosa C. Schetinger^c, Vera M. Morsch^c, Carolina dos S. Stein^d, Rafael N. Moresco^d, Ana Luiza Schogor^b, Aleksandro S. Da Silva^{bc}

^a Programa de Pós-graduação em Zootecnia pela Universidade do Estado de Santa Catarina - CEO, Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

^b Departamento de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina – CEO, Chapecó, SC, Brasil.

^c Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

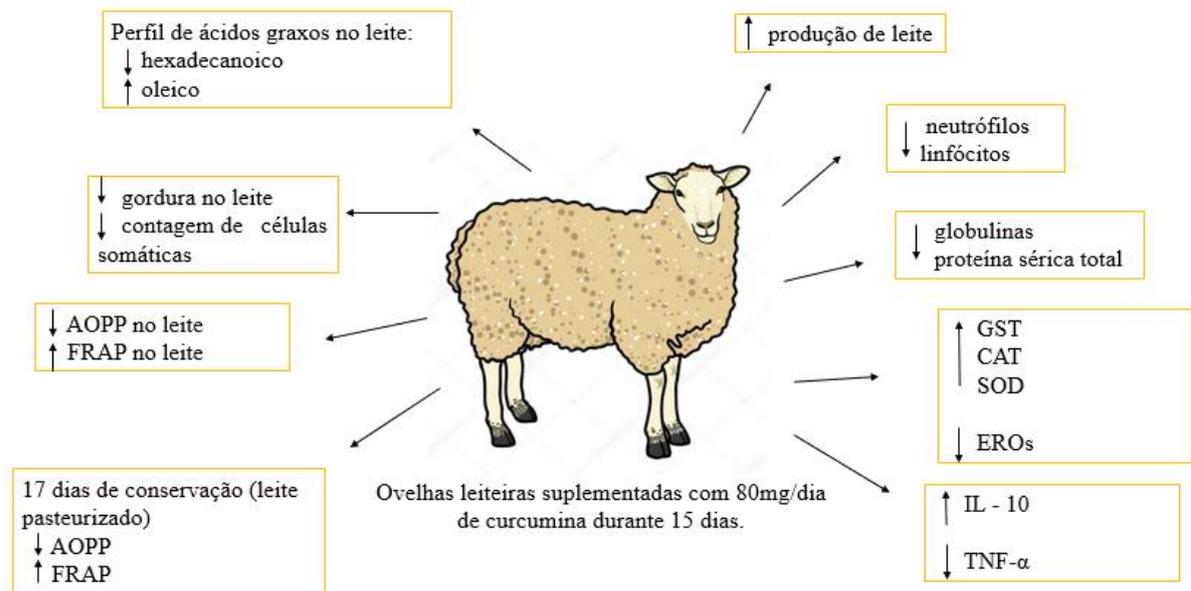
^d Departamento de Clínica e Análises Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

Autor para correspondência: Rua Beloni Trombeta Zanin, 680E, Bairro Santo Antônio, Chapecó, SC. CEP: 89.815-630. Tel: (49) 2049 – 9524. Email: aleksandro_ss@yahoo.com.br

Destaques:

- Curcumina na dieta de ovelhas leiteiras tem efeito anti-inflamatório e antioxidante.
- Adição de curcumina na dieta de ovelhas aumenta a produção de leite.
- Dieta com curcumina causa redução no teor de gorduras totais e ácido graxo saturado (hexadecanoico) no leite, mas aumento do ácido graxo oleico.
- Contagem de células somáticas no leite reduziu em ovelhas suplementadas com curcumina
- O leite de ovelhas suplementadas apresentou aumento na capacidade antioxidante total e diminuição da oxidação proteica.

Resumo gráfico



RESUMO. A ovinocultura de leite carece de estudos e pesquisas que visem aumentar a lucratividade e a valorização dos seus produtos. Portanto, objetivamos avaliar os efeitos da adição de curcumina na dieta de ovelhas lactantes sobre a saúde animal, performance produtiva e qualidade do leite. Foram utilizadas 18 fêmeas da raça Lacaune, multíparas, com 30 dias de lactação, com produção de leite entre 0,9-1,1L/ovelha/dia. Os animais foram divididos em dois grupos: Controle (grupo C), formado por ovelhas que receberam dieta base; e Tratado (grupo T), animais que receberam dieta base suplementada com curcumina 100mg/kg de ração durante 15 dias. Nos dias 0, 10 e 15 foram realizadas coletas de amostras de sangue e de leite. No sangue foi realizada as análises de bioquímica sérica, oxidantes e antioxidantes, hemograma completo e citocinas (interleucina 10, (IL-10), interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α)). No leite foi efetuada análise de composição de sólidos, contagem de células somáticas (CCS), oxidação proteica (produtos de oxidação protéica avançada), capacidade antioxidante total (poder antioxidante de redução do ferro) e perfil de ácidos graxos. No eritrograma não houve diferença entre grupos ($P > 0.05$), mas leucócitos totais reduziram nos dias 10 e 15 de tratamento, em consequência da redução do número de neutrófilos e linfócitos no grupo T ($P < 0.05$). O valor de proteína sérica total também reduziu devido a diminuição de globulinas ($P < 0,05$) no grupo T, assim como os níveis de TNF- α . Já os níveis de IL-10 aumentaram nos animais do grupo T ($P < 0,05$). Espécies reativas ao oxigênio reduziram e enzimas antioxidantes (GST, CAT e SOD) aumentaram significativamente no sangue das ovelhas do grupo T ($P < 0,05$). A produção de leite aumentou gradativamente nas ovelhas do grupo T ($P < 0,05$), assim como houve redução de CCS e oxidação proteica. Ainda no leite observamos aumento dos níveis de antioxidantes totais nas ovelhas grupo T ($P < 0,05$). No leite das ovelhas do grupo T verificamos que o ácido graxo oleico aumentou enquanto o ácido graxo hexadecanóico reduziu ($P < 0,05$). Concluimos que adição de curcumina na dieta das ovelhas tem efeito antioxidante e anti-inflamatório, o que favoreceu a performance produtiva dos animais, assim como melhorou a qualidade do leite.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: curcumina, perfil oxidativo, imunidade, composição do leite, leite ovino.

INTRODUÇÃO

A produção de leite ovino e seus subprodutos representa uma fonte de renda expressivo na ovinocultura, pois é o quarto leite mais consumido em todo o mundo, com um aumento de 22% na sua produção entre os anos 2003 e 2013 (FAOSTAT 2016). Por ser rico em sólidos, o leite de ovelhas desperta interesse de laticínios para a produção de queijos e iogurtes, além de ácidos graxos de cadeia curta e média, que são importantes em uma dieta saudável (Sinanoglou et al. 2015). Alguns fatores podem determinar a composição do leite, tais como a raça, a alimentação, a estação do ano, o estágio de lactação e o estado sanitário dos animais (Carloni et al. 2010; Sinanoglou et al. 2015). Em consequência disso, pesquisas com aditivos tem buscado melhorar as características do leite, agregando mais valor e qualidade nutritiva aos produtos.

De acordo com a literatura, o uso de fitoterápicos na produção animal vem se acentuando por proporcionar benefícios na melhoria da saúde e desempenho dos animais, isso porque, auxiliam na promoção do crescimento, na modulação do sistema imune e atividade nociva contra organismos patogênicos (Citarasu 2010). A curcumina já é conhecida pelas suas propriedades antibacteriana (Varmuzova et al. 2015), anticoccidiostático (Cervantes-Valencia et al. 2016), antiparasitário (Liu et al. 2017) antioxidante (Gazal et al. 2014), assim como, preventivo e curativo de doenças (Epstein 2010).

A curcumina é capaz de interagir com uma grande variedade de moléculas envolvidas na resposta inflamatória inibindo-as e minimizando o evento patológico (Tizabi et al. 2014). Com o aumento da atividade de enzimas antioxidantes, geralmente ocorre uma redução de reações oxidativas, assim como diminuição do estresse oxidativo e redução dos danos celulares (Al-Rubaei et al. 2014). Pesquisas mostram que a curcumina, quando adicionada a produtos lácteos, proporciona um aumento do potencial antioxidante e consequentemente melhora a estabilidade durante o armazenamento (Joung et al. 2016; Kumar et al. 2016). Pensando nisso, pesquisadores estão criando pequenos ruminantes geneticamente modificados para produzir leite nutracêutico (de Sá Carneiro et al. 2018), obtendo um produto mais saudável e sendo uma ferramenta na abertura de novos mercados. Objetivamos, em virtude disso, estudo foi avaliar se adição de curcumina na dieta de ovelhas lactantes tem efeitos benéficos sobre a saúde animal, bem como sobre a produtividade e qualidade do leite

MATERIAL E MÉTODOS

Produto

Curcumina pura foi usada nesse experimento (produto comercial com concentração de 99%, empresa chinesa Shanxii Jiahe Phytochem Co. Ltda), componente extraído do extrato seco de *Curcuma longa* (açafraão-da-terra). Como esse é o primeiro estudo com ovelhas ingerindo curcumina na dieta, a dose usada foi baseada em estudos com frangos que tiveram aumento de peso e atividade antioxidante sérica e tecidual (100mg/kg de concentrado; Zhang et al. 2015). Os animais consumiram 0,8kg de concentrado/ovelha/dia, fornecido individualmente, resultando em uma dose diária de 80mg/animal. Em virtude da pequena quantidade de aditivo, utilizamos um misturador ‘tipo Y’ para a homogeneização da curcumina primeiramente ao milho moído, e posteriormente ao demais ingredientes da dieta.

Animais e delineamento experimental

Foram utilizadas 18 ovelhas híginas ao exame físico geral, livres de parasitose gastrointestinal, da raça Lacaune de segunda e terceira parição, lactantes com 30 dias pós-parto, com produção de leite de $1,0 \pm 0,1$ L/ovelha/dia. Os animais foram divididos em dois grupos: Tratado (grupo T), formado por animais que receberam a dieta base suplementada com a curcumina (100 mg/kg de concentrado); e Controle (grupo C), formado por ovelhas que receberam apenas dieta base (Tabela 1). O experimento teve duração de 15 dias, sendo os primeiros 10 dias de adaptação à dieta.

Os animais foram alojados separadamente por grupo em duas baias de 4 x 6 metros, com água disponível *ad libitum*. Os comedouros foram individuais e mediram 46 cm x 30 cm x 22 cm de profundidade. As ovelhas foram ordenhadas duas vezes ao dia, isto é, 6:00 e 16:00 horas. Após cada ordenha, foram fornecidos 400g concentrado/ovelha, e finalizado o consumo deste, 1,8kg de silagem de milho para cada animal, totalizando 4,4 kg de matéria verde por dia. A descrição detalhada dos ingredientes da dieta está representada na Tabela 1.

Consumo de alimentos

Entre os dias 11 – 15 de experimento, a ingestão de alimento foi mensurada pela pesagem do alimento oferecido e das sobras. Foi mensurado diariamente a sobra de alimentos, assim como feita a coletada de 10% da amostra fornecidas e sobras, e mantido congelado (-20°C) até análise.

Análise bromatológica dos alimentos

A análise bromatológica das dietas fornecidas de silagem e concentrado estão representadas na Tabela 1. As amostras passaram por processo de secagem em estufa de

ventilação forçada por 72 horas em temperatura de 55°C, sendo posteriormente moídas em moinho de faca em tamanho de 1mm e submetidos a análises para determinação do teor de matéria seca (MS%), proteína bruta (PB% MS), fibra em detergente neutro (FDN% MS), fibra em detergente ácido (FDA% MS) e resíduo mineral (RM% MS) segundo metodologia de Van Soest (1994).

Mensuração da produção e coleta de leite

A produção do leite foi mensurada individualmente nos dias 0, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 do experimento, durante a ordenha da manhã e da tarde com o uso de medidores do tipo Milk Meter®. Do copo medidor, foi coletado a quantia de 40mL de leite em tubos contendo bronopol, refrigeradas a 4°C para análise de composição centesimal e contagem de células somáticas (CCS). Do mesmo copo foram coletados 2mL das amostras de leite de cada ovelha, alocadas em microtubos, em seguida congeladas (-20°C) para análise da oxidação proteica (AOPP) e antioxidantes totais (FRAP).

Análise do leite

Composição centesimal

Para as análises de gordura, proteína, lactose, estrato seco desengordurado (ESD), estrato seco total (EST) foram utilizadas metodologias definidas por IDF Standard por método infravermelho; CCS seguiu a mesma metodologia, sendo obtida por citometria de fluxo (Bianchi et al. 2014).

Níveis oxidantes e antioxidantes

A oxidação de proteínas (AOPP) foi medida através da técnica de Hanasand et al. (2012), e os níveis de antioxidantes foram medidos pela técnica de poder de redução férrica (FRAP) (Benzie e Strain 1996). Essas metodologias foram padronizadas para soro de leite, conforme descrito por Radavelli et al. (2016). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol} / \text{L}^{-1}$.

Perfil de ácidos graxos

As amostras de leite *in natura* (2 mL) para o perfil lipídico foram coletadas individuais, no 15º dia do experimento. A extração lipídica foi realizada de acordo com o método de Bligh e Dyer (1959) com algumas modificações. Um volume de 4 mL de amostras de leite, 2,4 mL de água, 16 mL de metanol e 8 mL de clorofórmio foram adicionados em tubo de polipropileno e agitados por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 8 mL de

clorofórmio e NaSO₄ 1,5%, para promover um sistema bifásico, agitado durante 2 minutos e centrifugado durante 5 min (3000 rpm). Uma alíquota de 5 mL de fase de clorofórmio foi transferida para análise lipídica. A outra fase de clorofórmio de 5 mL foi retirada para metilação.

A metilação de ácidos graxos (AG) foi realizada por um método de transesterificação proposto por Hartman e Lago (1973). O solvente de extrato lipídico (aproximadamente 20 mg de gordura) foi evaporado em uma bomba de vácuo a 40°C. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de KOH 0,4M, agitado em vortex e colocado em banho-maria em temperatura de ebulição durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 3 mL de H₂SO₄ 1,0M e agitou-se em vortex e foi novamente ao banho-maria por 10 minutos. Após a adição de 2 mL de hexano, foi realizada centrifugação (5000 rpm durante 5 min), retirado o hexano com os ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) e submetido a análise de cromatografia. Para a determinação FAME, empregou-se um modelo de cromatografia de gás 3400CX equipado com um detector de ionização de chama (Varian, Palo Alto, CA) e sistema de injeção automatizada (Autosampler, Varian 8200). 1µL de amostras foi colocado em um injetor duplo, operado em modo dividido com uma proporção de 50:1 a 230°C. O hidrogênio foi usado como gás transportador a uma pressão constante de 15 psi e taxa de fluxo inicial de 2,17 mL/min. As análises foram realizadas utilizando uma coluna de cromatografia DB-WAX (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, J & W, Folsom, CA, EUA). A temperatura inicial do forno foi programada a partir de 60°C (mantida por 1 min) a 180°C, a uma velocidade de 20°C/min, a 220°C, a uma taxa de 2 °C/min, até 230°C, aumentando 10°C/min, e depois mantida durante 10 minutos em isotermia. A temperatura do detector foi de 230°C e o tempo de retenção de compostos FAME foi identificado por comparação com os padrões (FAME Mix-37, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Os resultados foram apresentados como porcentagem de cada AG identificada na fração lipídica.

Teste de durabilidade

No último dia de experimento (dia 15), foi coletado um pool homogêneo do leite das 9 ovelhas de cada grupo (500mL/grupo), armazenados separadamente em recipientes identificados como controle (Grupo C) e tratado (Grupo T). Em seguida, as amostras de leite foram pasteurizadas manualmente a 63°C durante 30 minutos, subdivididas em amostras de 30mL em frascos estéreis e submetidas a refrigeração (4°C). Testes foram realizados nos dias 0, 3, 9 e 17 após a pasteurização, isto é, mensuração do pH (medidor Testo 205, Phmetro®), teste do alizarol 72°, teste de fervura e composição de sólidos pelo analisador de leite

infravermelho (LactoStar Funke Gerber®). Além disso, no dia 17 foi retirado 2mL de cada amostra para mensuração dos níveis de AOPP e FRAP, de acordo com metodologia descrita anteriormente.

Coleta de sangue

As amostras de sangue foram coletadas dos animais em jejum no dia 0, 10 e 15 por venopunção da jugular usando tubos de coleta a vácuo. Foram coletadas amostras em tubos com ativador de coágulo (4mL), anticoagulante EDTA 10% (4mL) e citrato de sódio (2mL) de cada animal. O material foi conservado em caixa térmica até o processamento.

Bioquímica sérica

A amostra colhida em tubo sem anticoagulante foi centrifugada (3500 giros por 10 min), separado o soro em eppendorf e armazenados a -20°C até o processamento. As análises bioquímicas foram realizadas no aparelho Bioplus 2000, usando-se kits comerciais e seguindo a metodologia preconizada para cada um dos exames: proteína total (PT), albumina, triglicérides, glicose, colesterol, ureia e aspartato aminotransferase (AST). Os níveis de globulina foram obtidos por cálculo matemático de subtração (PT - albumina).

Hemograma

As amostras coletadas em EDTA foram utilizadas para realização de hemograma completo. A contagem de leucócitos totais, eritrócitos e concentração de hemoglobina foram obtidos por contador eletrônico CELM modelo CC 530. O volume globular (VG) foi obtido por centrifugação de tubos capilares de acordo com metodologia de Feldman et al. (2000). Para o diferencial de leucócitos, esfregaços sanguíneos foram corados com Panótico rápido e a contagem relativa seguiu descrição de Thrall et al. (2015). Os esfregaços também foram utilizados para a contagem plaquetária em campos homogêneos, utilizando-se a média de 5 campos corrigido ao fator de correção do microscópio, segundo Thrall et al. (2015).

Níveis de oxidantes e antioxidantes no plasma

Das amostras coletadas em tubos contendo citrato de sódio uma alíquota de 0,5 mL de sangue total foi congelada a -20°C até análises. Nessas amostras foram obtidas a atividade das enzimas antioxidantes SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase). A atividade de SOD foi determinada por espectrofotometria através da inibição da taxa de adrenocromo de formação autocatalítica (McCords e Fridovich 1969), e o resultado foi expresso em U SOD/mg de

proteína. A atividade de CAT foi medida de acordo com Aebi et al. (1984) que determina a taxa de decomposição de H₂O₂ na água e no oxigênio. A atividade CAT específica foi expressa em U CAT/mg de proteína.

O restante da amostra de sangue foi centrifugado para obtenção do plasma, armazenado a -20°C até as análises. Desta amostra os níveis de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foram mensurados para verificação de grau de peroxidação lipídica, de acordo com o método descrito por Jentzsch et al. (1996). Os resultados TBARS foram obtidos por espectrofotômetro a 535 nm, sendo os resultados expressos em η mol MDA/mL. Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) no plasma foram analisadas pelo método descrito por Ali et al. (1992). O volume de 10 μ L de soro foram incubados com 12 μ L de diclorofluoresceína por 1 mm a 37°C durante 1h no escuro. A fluorescência foi determinada utilizando 488 nm para excitação e 520 nm para emissão. Os resultados são expressos em U DCF/mL. A atividade da glutathione S-transferase (GST) no plasma foi analisada por espectrofotometria (340 nm) pelo método modificado de Habig et al. (1974), usando 20 μ L de soro misturado a 0,1 M de tampão de fosfato de potássio, 100mM de glutathione (GSH) e 100 nM de 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB), usado como substrato. Os resultados foram expressos em μ mol cdnb/min/mL.

Níveis de citocinas

A interleucina-10, interleucina-1 e TNF- α no soro foram quantificadas utilizando o imunoensaio comercial Quantikine® para ovinos, de acordo com as recomendações do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA). A concentração de citocinas foi determinada por espectrofotometria em micro leitor de ELISA (Tecan, Sunrise, Melbourne, Austrália).

Análise estatística

Os dados tabulados foram submetidos ao delineamento inteiramente casualizado, e em seguida ao teste de normalidade (Shapiro Wilk). Os dados que não apresentaram normalidade foram transformados para logaritmo, com a finalidade de normalização. Em seguida foi feita a comparação dos parâmetros entre os grupos C e T utilizando o teste de Student (Teste t), sendo considerado significativo quando $P \leq 0,05$. Análise de variância para medidas repetidas foi utilizado para comparação ao longo do tempo (dia 0 a 10 e 0 a 15) e considerado significativo quando $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Consumo de alimentos

Não observamos diferença entre grupos no consumo de alimentos ($P > 0,05$; Fig. 2) durante os 5 dias (dia 11-15 de experimento). Os animais de ambos os grupos consumiram mais de 95% da dieta fornecida diariamente, sendo que o consumo de concentrado ocorreu na sua totalidade, isto é, sem sobras.

Alterações no leite

Produção de leite

A produção do leite aumentou nos animais do grupo tratado ($P \leq 0,05$), sendo uma diferença numérica de até 0,3L por ovelha/dia (Fig. 1). Ao longo do tempo, obtivemos para produção de leite uma diferença estatística no grupo T do dia 0 para 15 ($P \leq 0,001$).

Composição e qualidade de leite in natura

Os resultados da composição e qualidade de leite *in natura* estão apresentados na Quadro 2. A composição do leite das ovelhas que receberam curcumina na dieta tiveram redução para os níveis de gordura no dia 15 ($P \leq 0,05$), assim como redução de CCS nos dias 10 e 15 de experimento ($P \leq 0,05$). Houve redução nos níveis de AOPP nos dias 10 e 15, o que caracteriza uma redução nas reações de oxidação proteica ($P \leq 0,01$) no grupo T. Já os níveis de FRAP, um potente antioxidante total aumentou no leite das ovelhas do grupo T comparado ao grupo C ($P \leq 0,05$).

A análise estatística ao longo do período de armazenamento referente a composição do leite não diferiu em ambos os grupos ($P > 0,05$). Porém, análise dos níveis de AOPP no último dia de conservação demonstrou manter-se mais baixo do grupo T, assim como manteve-se elevado o FRAP neste mesmo grupo. Os resultados estão expressos na Tabela 4.

Perfil de ácidos graxos no leite in natura

O perfil de ácidos graxos no leite das ovelhas colhido no dia 15 de experimento foi apresentado na Quadro 3. O ácido hexadecanoico (C16:0) sofreu redução no leite das ovelhas do grupo T ($P \leq 0,05$), ao mesmo tempo em que o ácido oleico (C18:1n9c) aumentou neste mesmo grupo comparado ao grupo C ($P \leq 0,05$).

Composição e qualidade do leite pasteurizado ao longo do tempo – teste de prateleira

Níveis de gordura no leite e pH não diferiram entre grupos ($P > 0,05$). Com a pasteurização observou-se diferença entre grupos para níveis de proteína, lactose e ESD em todos os momentos avaliados, isto é, leite dos animais do grupo T apresentaram esses componentes em níveis superiores (Quadro 4) do que o controle ($P \leq 0,05$). Os níveis de AOPP foram menores após 17 dias de conservação em refrigeração no grupo T, assim como os níveis de FRAP foi mais elevado neste mesmo grupo ($P \leq 0,05$) comparado ao controle. Para os testes de alizarol e de fervura não foi observado diferença entre grupos, ambos mostravam que o leite estava apropriado para consumo. Ao longo do tempo, não foi observado diferença para variáveis de composição no leite após pasteurização em ambos os grupos ($P > 0,05$).

Hematologia, bioquímica e imunologia

Hemograma

O eritrograma e leucograma, assim como a contagem plaquetária estão apresentados na Quadro 5. Contagem de eritrócitos totais, VG, concentração de hemoglobina, CHCM, VGM e contagem de plaquetas não diferiram entre grupos ($P > 0,05$), assim como não diferiram ao longo do tempo em ambos os grupos ($P > 0,05$). No entanto, houve uma diminuição na contagem total de leucócitos, decorrentes da diminuição de neutrófilos e linfócitos no grupo T ($P \leq 0,05$) nos dias 10 e 15 de experimento. Contagem de monócitos e eosinófilos não diferiu entre grupos ($P > 0,05$). Ao longo do tempo, não foi observado em ambos os grupos diferença para variáveis de leucograma ($P > 0,05$).

Bioquímica sérica

Resultados referentes a bioquímica sérica foram demonstrados na Quadro 6. Estatisticamente, os níveis de proteína total reduziram em consequência da diminuição de globulinas nas ovelhas do grupo T no dia 15 ($P \leq 0,05$). Os níveis de albumina, ureia, AST, triglicérides, colesterol e glicose não diferiram entre grupos ($P > 0,05$). Ao longo do tempo (dados não amostrados) observamos redução dos níveis de proteínas totais e globulinas nos animais do grupo T do dia 0 para 15 ($P \leq 0,05$). Em ambos os grupos, verificou-se que com o passar do tempo aumento nos níveis de ureia sérica do dia 0 para 10 e 15 de experimento ($P \leq 0,001$). As demais variáveis bioquímicas não diferiram ao longo do tempo em ambos os grupos ($P > 0,05$).

Status oxidante e antioxidante

A atividade da CAT não diferiu ao longo do tempo em ambos os grupos ($P > 0,05$). No entanto, nos animais grupo T verificamos ao longo do tempo uma redução nos níveis de ROS do dia 0 para 10 e do dia 0 para 15 de experimento ($P \leq 0,05$). Também nas ovelhas do grupo T verificamos um aumento na atividade das enzimas GST e SOD do dia 0 para 15 ($P \leq 0,05$). A atividade da CAT foi superior no grupo T no dia 15 ($P \leq 0,05$). Níveis de oxidantes e antioxidantes séricos em ovelhas estão representados na Quadro 7.

Níveis de citocinas

Níveis de IL-1, IL-10 e TNF- α são descritos na Quadro 8. Houve diminuição nos níveis de TNF- α ($P \leq 0,05$) no soro das ovelhas do grupo T no dia 15, diferente dos níveis de IL-10 que aumentaram ($P \leq 0,05$) nos dias 10 e 15 de experimento neste mesmo grupo. Os níveis de IL-1 não diferiram entre grupos ($P > 0,05$).

DISCUSSÃO

A suplementação de curcumina na dieta de ovelhas mostrou efeitos benéficos na saúde dos animais e conseqüentemente aumento da performance produtiva leiteira e qualidade do leite. Os resultados desse estudo colaboram para o desenvolvimento da ovinocultura leiteira, seja nos aspectos produtivos e de qualidade, assim como no aspecto humano e ambiental, uma vez que produtos naturais não geram resíduos em alimentos e tendem a não ser problema quanto a resistência antibacteriana. Melhorar o estado de saúde das ovelhas leiteiras e da glândula mamária, é necessário para uma boa produção e qualidade do leite durante a lactação (Martí et al. 2013), o que acreditamos ser potencializado nesse estudo pelos efeitos anti-inflamatório e antibacteriano da curcumina (Jungbauer e Medjakovic 2012; Fu et al. 2014). Obtivemos aumento na produção de leite nas ovelhas suplementadas com curcumina, acompanhado de uma diminuição de CCS, resultados similar ao estudo com vacas suplementadas com um conjunto de ervas contendo *Curcuma longa* (Hashemzadeh-Cigari et al. 2014). De acordo com esses autores, o aumento da produção de leite das vacas não estaria relacionado com mudanças na digestibilidade.

Caboni et al. (2017) relataram uma relação inversamente proporcional entre produção de leite e CCS e diretamente proporcional de CCS com o teor de gordura do leite, portanto a redução de gordura no leite das ovelhas que ingeriram curcumina pode estar relacionada a maior produção de leite e diminuição de CCS. De acordo com literatura, a curcumina apresenta atividade anti-inflamatória (Jungbauer e Medjakovic 2012), atuando tanto no

organismo do animal, como na glândula mamária, sendo assim capaz de modular resposta inflamatória como ocorreu em um modelo experimental (ratos) com mastite (Fu et al. 2014); o que poderia explicar a redução de CCS no leite (células inflamatórias) em nosso estudo. Isto porque a curcumina atua na inibição da expressão das citocinas e através da inibição direta da quimiotaxia dos neutrófilos e das quimiocinas (Larmonier et al. 2011), assim como na diminuição das citocinas pró-inflamatórias e mediadores como TNF- α , IL-1 β , responsáveis pela migração de leucócitos ao local da infecção (Lu et al. 2008). Além deste mecanismo de ação da curcumina, pesquisadores reportam efeitos apoptótico (Hu et al. 2005) e citotóxico direto (Antoine et al. 2013), que podem levar a diminuição da contagem leucocitária total no sangue, a diminuição de interleucinas pró-inflamatórias e consequentemente a diminuição da CCS no leite. Portanto, a redução de CCS no leite sugere uma melhoria da saúde do úbere e qualidade do leite (Hashemzadeh-Cigari et al. 2014), conforme observamos no presente estudo no grupo T.

Pesquisadores observaram aumento da produção de leite em vacas suplementadas com composto de ervas contendo *C. longa*, e sugeriram que a produção alterada se deve a fermentação ruminal, pelo aumento da produção de propionato e redução do acetato (Hashemzadeh-Cigari et al. 2014), assim como relatado por Tekippe et al. (2013) quando utilizados óleos essenciais na dieta. De acordo com a literatura, com o aumento de propionato no rúmen, convertido em glicose via gliconeogênese hepática, serve como principal fonte de energia no úbere para a síntese do leite (Aschenbach et al. 2010), o que poderia explicar o aumento na produção de leite nas ovelhas desse estudo. Pesquisa sugere que elevado valor de CCS está relacionada a uma menor produção de leite pela glândula (Martí et al. 2013; Caboni et al. 2017). Não observamos diferença entre grupos para o consumo de alimentos das ovelhas, assim como descrito por Hashemzadeh-Cigari et al. (2014) para vacas leiteiras que ingeriram extrato de *C. longa* na dieta, e com base nisso, uma hipótese é que a curcumina tenha aumentado a digestibilidade dos alimentos, e consequente maior absorção e aproveitamento de nutrientes para produção leiteira.

Nesse estudo, houve alterações discretas no perfil lipídico do leite, sendo que ovelhas que receberam curcumina produziram leite com percentagem maior de ácido graxo oleico e menor do ácido graxo hexadecanoico, tornando o leite mais saudável ao consumidor, pois trata-se da diminuição da proporção de um ácido graxo saturado e aumento de um ácido graxo insaturado. De acordo com a literatura, a colônia de bactéria iniciadora (cultura standart) utilizada na produção do queijo de ovelha influencia na composição protéica e de ácidos graxos devido a ação enzimática distinta entre elas (Bergamini et al. 2010). De posse dessa

informação, e sabendo que a curcumina tem ação antibacteriana (Gunes et al. 2013; Fu et al. 2014), mas diferente grau de inibição entre cepa (Paim 2010; Ay et al. 2018), acreditamos que a ação da curcumina sobre determinadas bactérias pode alterar a composição de ácidos graxos no leite. Isto porque, a curcumina demonstra maior interação com bactérias de parede celular mais lipofílica, o que segundo autores pode ser explicada pela ligação da curcumina à parede celular bacteriana, e assim refletir na composição de aminoácidos e lipídeos (Singh et al. 2010), ou ainda, as que possuíam parede mais hidrofóbicas (Ay et al. 2018). Uma maior síntese de propionato também poderia justificar as alterações no perfil lipídico do leite, assim como a performance produtiva superior dos animais suplementados com curcumina. Em estudo de Caboni et al. (2017) analisando leite com elevada CCS, os níveis de ácidos graxos saturados foram aumentados, enquanto AG de cadeia longa (C16, C18) e oleico foram diminuídos. Os autores sugerem que essas diferenças podem estar relacionados não a diferença na composição de microorganismos entre as amostras, mas sim com a liberação de metabólitos por células somáticas e alteração da permeabilidade no úbere com alta CCS (Caboni et al. 2017).

A curcumina na dieta altera comprovadamente a transcrição gênica de alguns genes (Balogun et al. 2003; Erlank et al. 2011), o que pode também justificar a diferença de síntese e composição do leite. De acordo com a literatura, a suplementação de vitamina E, que tem propriedades antioxidante, esta envolvida na regulação do metabolismo da glutathiona no fígado e influencia a deposição de ácidos graxos nos produtos oriundos de ruminantes (Pegolo et al. 2016). Em virtude disso, e sabendo que a curcumina esta relacionada ao aumento de GSH (Subudhi e Chainy 2012) e diminuição da peroxidação lipídica sérica e hepática (Lavoie et al. 2009; Varatharajulu et al. 2016), acreditamos que essa enzima, assim como outras aumentadas no sangue das ovelhas pode estar relacionado ao aumento de antioxidante no leite e consequente redução de reações oxidativas.

O uso de curcumina na dieta das ovelhas nesse estudo ocasionou o aumento de antioxidante totais e redução de oxidantes no leite, similar ao observado por Biazus et al. (2018) quando suplementou ovelhas leiteiras com disseleneto de difenila, uma forma de selênio com potente ação antioxidante. A suplementação de dietas com micronutrientes de propriedades antioxidantes e imunitárias, como a vitamina E, Se, Zn e Cu são relacionadas a melhor saúde do úbere (Scaletti et al. 2003; Politis 2012). Gobert et al. (2009) afirmaram que a combinação de antioxidante hidrofóbico pode interagir sinergicamente com antioxidantes lipofílicos como a vitamina E (presente naturalmente no leite) e resultar em um estado antioxidante aprimorado, o que pode ter ocorrido com a curcumina em nosso estudo. De

acordo com literatura, níveis de antioxidantes diminuem em leite com CCS elevada (Colakoglu et al. 2017), ou seja, a saúde do úbere vai refletir em um leite de melhor qualidade para consumidor.

A diminuição da contagem total de leucócitos decorrentes da diminuição de neutrófilos e linfócitos reforçam a ideia de que a dieta com curcumina teve efeito anti-inflamatório já conhecida. De acordo com a literatura, a curcumina *in vitro* inibiu a IL-1, estimuladora da proliferação de linfócitos, com consequente redução na secreção de IgG (Sharma et al. 2007; Colotta et al. 1998), mecanismo determinante na queda de globulinas séricas (fração gama) e consequentemente de proteínas totais observado no presente estudo. A diminuição de citocinas TNF- α e IL-1 no uso de curcumina é explicado por haver a atenuação da atividade de NF- κ B e consequente supressão da expressão de genes dessas citocinas pró-inflamatórias (Khan et al. 2017; Witko-Sarsat 2011). Pesquisadores descrevem o efeito pró-apoptótico da curcumina sobre neutrófilos (Colotta et al. 1998; Hu et al. 2005) e inibição do recrutamento e quimiotaxia de neutrófilos e monócitos para os locais da infecção (Larmonier et al. 2011), portanto, sugerimos que a diminuição de TNF- α nas ovelhas tratadas com curcumina pode estar associado a diminuição de neutrófilos e linfócitos circulantes, o que consequentemente refletiu em um menor CCS no leite.

A curcumina é um antioxidante bifuncional, pois é capaz de reagir diretamente com EROs, eliminando-os ou elevando a capacidade antioxidante total (Trujillo et al. 2013; Alvarenga et al. 2018; Aparicio-Trejo et al. 2017). Os níveis de SOD, CAT e GST foram superiores nas ovelhas tratadas com curcumina em nosso estudo, portanto esse aditivo atua diretamente ou indiretamente a via antioxidante enzimática, uma das maior importantes do organismo. De acordo com pesquisadores, a curcumina demonstrou capacidade de induzir a expressão de Nrf2, regulador antioxidante (Tapia et al. 2012), que ativa a expressão de genes da glutathione S-transferase (GST), CAT e SOD (Cardozo et al., 2013). Portanto, podemos dizer que as ovelhas que consumiram curcumina obtiveram melhoria no sistema antioxidante, o que pode ter contribuído na redução de radicais livres, e demonstra uma melhora na condição de saúde desses animais. Assim, algumas das vias mais importantes para as atividades anti-inflamatórias e antioxidantes da curcumina é através da alteração da transcrição gênica, onde destacamos as vias por NF- κ B e Nrf-2 (Alvarenga et al. 2018), e assim, a melhora na resposta imune.

CONCLUSÃO

Em resumo, o uso de curcumina na dieta de ovelhas leiteiras teve ação antioxidante e anti-inflamatória, minimizando o estresse oxidativo, comum em animais em lactação. Conseqüentemente, com benefícios indiretos da suplementação a saúde das ovelhas houve um aumento na produção de leite. O efeito antioxidante e anti-inflamatório da curcumina foi observado na qualidade do leite, isto é, reduziu a oxidação protéica e CCS, aumentando antioxidante totais que são benéficos a saúde dos consumidores. O aumento de um ácido graxo insaturado no leite associado a redução saturado, mostra que curcumina pode modular positivamente o perfil de ácido graxos. Portanto, concluímos que a adição de curcumina na dieta de ovelhas leiteiras na dose de 80 mg/animal/dia pode ser uma estratégia eficaz para aumentar a performance leiteira e melhorar a qualidade do leite, assim como tem um produto final com características nutracêuticas.

COMITÊ DE ÉTICA

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina, sob o número de protocolo nº 3468070617.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a CAPES e a FAPESC pelo apoio a este estudo e pela concessão de bolsa de estudos ao primeiro autor. Também agradecemos a Cabanha Chapecó por disponibilizar os animais de estudo. Agradecemos a empresa Dpharma por disponibilizar a curcumina utilizada nesse estudo.

REFERÊNCIAS

- Aebi H. 1984. Catalase in vitro, Meth. Enzymol. 105, 121-126.
- Ali S.F., Lebe C.P. & Bondy, S.C. 1992. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. Neurotoxicol. 113, 637-648.
- Al-Rubaei Z.M., Mohammad, T.U., & Ali, L.K. 2014. Effects of local curcumin on oxidative stress and total antioxidant capacity in vivo study. Pak. J. Biol. Sci. 17, 1237-1241.
- Alvarenga de A.L., de Oliveira Leal, V., Borges, N.A., de Aguiar, A. S., Faxén-Irving, G., Stenvinkel, P. & Mafra, D. 2018. Curcumin - A promising nutritional strategy for chronic kidney disease patients. Journal of Functional Foods. 40, 715-721.

- Antoine F., Simard J.C. & Girard D. 2013. Curcumin inhibits agent-induced human neutrophil functions in vitro and lipopolysaccharide-induced neutrophilic infiltration in vivo. *Int Immunopharmacol.* 17, 1101-1107.
- Aparicio-Trejo O.E., Tapia E., Molina-Jijón E., Medina-Campos O.N., Macías-Ruvalcaba N.A., León-Contreras J.C. & Pedraza-Chaverri, J. 2017. Curcumin prevents mitochondrial dynamics disturbances in early 5/6 nephrectomy: Relation to oxidative stress and mitochondrial bioenergetics. *BioFactors.* 43, 293-310.
- Aschenbach J.R., Kristensen N.B., Donkin S.S., Hammon H.M. & Penner G.B. 2010. Gluconeogenesis in dairy cows: The secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB Life.* 62, 869-877.
- Ay N., Khanjia F.M., Salameh D., Rizk T., Banona S. & Jasniewski J. 2018. The study of curcumin interaction with micellar casein and lactic acid bacteria cell envelope. *LWT.* In press.
- Balogun E., Hoque M., Gong P., Killeen E. & Green C.J. 2003. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J.* 371, 887–895.
- Benzie I.F.F. & Strain J.J., 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method. Enzym.* 299, 15–27.
- Bergamini C.V., Wolf I.V., Perotti M.C. & Zalazar C.A. 2010. Characterisation of biochemical changes during ripening in Argentinean sheep cheeses. *Small ruminan res.* 94, 79-89.
- Bianchi A.E., Macedo V.P., França R.T., Lopes S.T.A., Lopes L.S., Stefani L.M., Volpato A., Lima H.L., Paiano D., Machado G. & da Silva A.S. 2014. Effect of adding palm oil to the diet of dairy sheep on milk production and composition, function of liver and kidney, and the concentration of cholesterol, triglycerides and progesterone in blood serum. *Small Rumin Res.* 117, 78-83.
- Biazus A., Cazarotto C., Machado G., Bottari N., Alves M. & da Silva A. 2018. Diphenyl diselenide subcutaneous supplementation of dairy sheep: effects on oxidant/antioxidant status, inflammatory response and milk composition. *Animal Prod Sci.* In press.
- Bligh E.G. & Dyer W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology.* 37, 911-917.

- Caboni P., Manis C., Ibba I., Contu M., Coroneo V. & Scano P. 2017. Compositional profile of ovine milk with a high somatic cell count: A metabolomics approach. *Int Dairy J.* 69, 33-39.
- Cardozo L.F., Pedruzzi L.M., Stenvinkel P., Stockler-Pinto M. B., Daleprane J. B., Leite Jr, M. & Mafra D. 2013. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie.* 95, 1525-1533.
- Carlioni M.; Fedeli D.; Roscioni T.; Gabbianelli R. & Falcioni G. 2010. Seasonal variation of fat composition in sheep's milk from areas of central Italy. *Mediterr. J. Nutr. Metab.* 3, 55–60.
- Cervantes-Valencia M.E., Alcalá-Canto Y., Sumano-Lopez H., Ducoing-Watty A.M. & Gutierrez-Olvera L. 2016. Effects of *Curcuma longa* dietary inclusion against *Eimeria* spp. in naturally-infected lambs. *Small Rumin. Res.* 136, 27-35.
- Citarasu T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquac. Int.* 18, 403-414.
- Colakoglu H. E., Kuplulu O., Vural M. R., Kuplulu S., Yazlik M.O., Polat I.M., Oz B., Kaya U. & Bayramoglu R. 2017. Evaluation of the relationship between milk glutathione peroxidase activity, milk composition and various parameters of subclinical mastitis under seasonal variations. *Vet. Arhiv.* 87, 557-570.
- Colotta F., Ghezzi P. & Mantovani A. 1998. Interleukin 1. In: Mire-Sluis, A. R., Thorpe, R. Cytokines, 1. Ed. San Diego: Academic Press, 1-18.
- de Sá Carneiro I., de Menezes J. N. R., Maia J. A., Miranda A. M., de Oliveira V. B. S., Murray J. D. & Bertolini L. R. 2018. Milk from transgenic goat expressing human lysozyme for recovery and treatment of gastrointestinal pathogens. *Eur. J. Pharm. Sci.* 112, 79-86.
- Epstein J., Sanderson I. R. & MacDonald T. T. 2010. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies. *Br. J. Nutr.* 103, 1545-1557.
- Erlank H., Elmann A., Kohen R. & Kanner J. 2011. Polyphenols activate Nrf2 in astrocytes via H₂O₂, semiquinones, and quinones. *Free Radic Biol Med.* 51, 2319-2327.
- FAOSTAT. Statistical database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2016.
- Feldman B.F., Zinkl J.G. & Jain N.C. 2000. Schalm's veterinary hematology. 5.ed. Lippincott Williams & Wilkins, 787p.
- Fu Y., Gao R., Cao Y., Guo M., Wei Z., Zhou E. & Zhang N. 2014. Curcumin attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4-mediated NF-κB signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. *Int. Immunopharmacol.* 20, 54-58.

- Gazal M., Valente M.R., Acosta B.A., Kaufmann F.N., Braganhol E., Lencina C.L. & Kaster M.P. 2014. Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 724, 132-139.
- Gobert M., Martin B., Ferlay A., Chilliard Y., Graulet B., Pradel P., Bauchart D. & Durand D. 2009. Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Dairy Sci.* 92, 6095-6104.
- Gunes H., Gulen D., Mutlu R., Gumus A., Tas T. & Topkaya A.E. 2016. Antibacterial effects of curcumin: An in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicol Ind Health.* 32, 246 – 250.
- Habig W.H., Pabst M.J. & Jakob, W.B., 1974. Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hanasand M., Omdal R., Norheim K.B., Gøransson L.G., Brede C. & Jonsson G. 2012. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clin Chim Acta.* 413, 901-906.
- Hartman L. & Lago R.C.A. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, London, v. 22, p. 475-476.
- Hashemzadeh-Cigari F., Khorvash M., Ghorbani G.R., Kadivar M., Riasi A. & Zebeli Q. 2014. Effects of supplementation with a phytobiotics-rich herbal mixture on performance, udder health, and metabolic status of Holstein cows with various levels of milk somatic cell counts. *J Dairy Sci.* 97, 7487-7497.
- Hu M., Du Q., Vancurova I., Lin X., Miller E.J., Simms H. H. & Wang P. 2005. Proapoptotic effect of curcumin on human neutrophils: activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Critical care medicine.* 33, 2571-2578.
- Jentzsch M., Bachmann H., Furts P. & Biesalski N.K. 1996. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med.* 20, 251–256
- Joung H.J., Choi M.J., Kim J.T., Park S.H., Park H.J. & Shin, G.H. 2016. Development of food-grade curcumin nanoemulsion and its potential application to food beverage system: antioxidant property and *in vitro* digestion. *J. Food Sci.* 81, N745–N753.
- Jungbauer A. & Medjakovic S. 2012. Anti-inflammatory properties of culinary herbs and spices that ameliorate the effects of metabolic syndrome. *Maturitas.* 71, 227-239.
- Khan J., Noboru N., Young A. & Thomas D. 2017. Pro and anti-inflammatory cytokine levels (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10) in rat model of neuroma. *Pathophysiology.* 24, 155-159.

- Kononoff P.J., Heinrich, A.J. & Buckmaster D.R. 2003. Modification of the *Penn State* forage and total mixed ration particle separator and the effects of moisture content on its measurements. *J. Dairy Sci.* 86, 1858–1863.
- Kumar D.D., Mann B., Pothuraju R., Sharma R. & Bajaj R. 2016. Formulation and characterization of nanoencapsulated curcumin using sodium caseinate and its incorporation in ice cream. *Food Funct.* 7, 417-424.
- Larmonier C.B., Midura-Kiela M.T., Ramalingam R., Laubitz D., Janikashvili N., Larmonier N., Ghishan F.K. & Kiela P.R. 2011. Modulation of neutrophil motility by curcumin: Implications for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 17, 503–515.
- Lavoie S., Chen Y., Dalton T.P., Gysin R. & Cuenod M. 2009. Curcumin, quercetin, and tBHQ modulate glutathione levels in astrocytes and neurons: importance of the glutamate cysteine ligase modifier subunit. *J Neurochem.* 108, 1410-1422.
- Liu Y.M., Zhang Q.Z., Xu D.H., Fu Y.W., Lin D.J., Zhou S.Y. & Li J.P. 2017. Antiparasitic efficacy of curcumin from *Curcuma longa* against *Ichthyophthirius multifiliis* in grass carp. *Vet. Parasitol.* 236, 128-136.
- Lu Y.C., Yeh W.C. & Ohashi P.S. 2008 LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 42, 145-151.
- Martí A.D.O., Díaz J.R., Molina M.P. & Peris C. 2013. Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. *J Dairy Sci.* 96, 7698-7708.
- Paim M.P. 2010. Avaliação antibacteriana in vitro de extratos etanólicos de açafrão-da-terra (*Curcuma longa* L.) frente a microorganismos transmissíveis por alimentos. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. P. 47.
- Pegolo S., Cecchinato A., Mach N., Babbucci M., Pauletto M., Bargelloni L. & Bittante G. 2016. Transcriptomic Changes in Liver of Young Bulls Caused by Diets Low in Mineral and Protein Contents and Supplemented with n-3 Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acid. *PLoS one*, 11, e0167747.
- Politis I. 2012. Reevaluation of vitamin E supplementation of dairy cows: bioavailability, animal health and milk quality. *Animal.* 6, 1427-1434.
- Radavelli W.M., Campigotto G., Machado G., Bottari N.B., Bochi G., Moresco R.N., Morsch V.M., Schetinger M.R.C., Bianchi A., Baldissera M.D., Ferreira R. & Da Silva A.S., 2016. Effect of lactation induction on milk production and composition, oxidative and antioxidant status, and biochemical variables. *Comp. Clin. Path.* 25, 639-64.

- Scaletti R.W., Trammell D.S., Smith B.A. & Harmon R.J. 2003. Role of dietary copper in enhancing resistance to *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Sci.* 86, 1240–1249.
- Sharma S., Chopra K., Kulkarni S.K. & Agrewal J.N. 2007. Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clin. Exp. Immunol.* 147, 155-163.
- Sinanoglou V.J., Koutsouli P., Fotakis C., Sotiropoulou G., Cavouras D. & Bizelis I. 2015. Assessment of lactation stage and breed effect on sheep milk fatty acid profile and lipid quality indices. *Dairy Science & Technology.* 95, 509-531.
- Singh R.K., Rai D., Yadav D., Bhargava A., Balzarini J. & Clercq E. 2010. Synthesis, antibacterial and antiviral properties of curcumin bioconjugates bearing dipeptide, fatty acids and folic acid. *Eur J Med Chem.* 45, 1078-1086.
- Subudhi U. & Chain G.B.N. 2012. Curcumin and vitamin E modulate hepatic antioxidant gene expression in PTU-induced hypothyroid rats. *Mol Biol Rep.* 39, 9849-9861.
- Tapia E., Soto V., Ortiz-Veja K.M., Zarco-Márquez G., Molina-Jijón E., Cristóbal-García M. & Pedraza-Chaverri J. 2012. Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2012, 1-14.
- Tekippe J.A., Tacoma R., Hristov A.N., Lee C. Oh J., Heyler K.S., Cassidy T.W., Varga G.A. & Bravo D. 2013. Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96, 7892-7903.
- Thrall M.A., Weiser G., Alisson R.W. & Campbell T.W. *Hematología e Bioquímica Clínica Veterinária*, editora Roca, 2ª edição, 2015.
- Tizabi Y., Hurley L.L., Qualls Z. & Akinfiresoye L. 2014. Relevance of the anti-inflammatory properties of curcumin in neurodegenerative diseases and depression. *Molecules.* 19, 20864-20879.
- Trujillo J., Chirino Y.I., Molina-Jijón E., Andérica-Romero A.C., Tapia E., & Pedraza-Chaverri J. 2013. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox biology.* 1, 448-456.
- Van Soest P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Ithaca: Cornell University Press. 2ed. 476p.
- Varmuzova K., Matulova M.E., Gerzova L., Cejkova D., Gardan-Salmon D., Panhéleux M. & Rychlik I. 2015. Curcuma and Scutellaria plant extracts protect chickens against inflammation and *Salmonella enteritidis* infection. *J. Poult. Sci.* 94, 2049-2058.

- Witko-Sarsat V., Pederzoli-Ribeil M., Hirsh E., Sozzani S. & Cassatella M.A. 2011. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends Immunol.* 32, 117–124.
- Zhang J., Hu Z., Lu C., Bai K., Zhang L. & Wang T. 2015. Effect of various levels of dietary curcumin on meat quality and antioxidant profile of breast muscle in broilers. *J Agric Food Chem.* 63, 3880-3886.

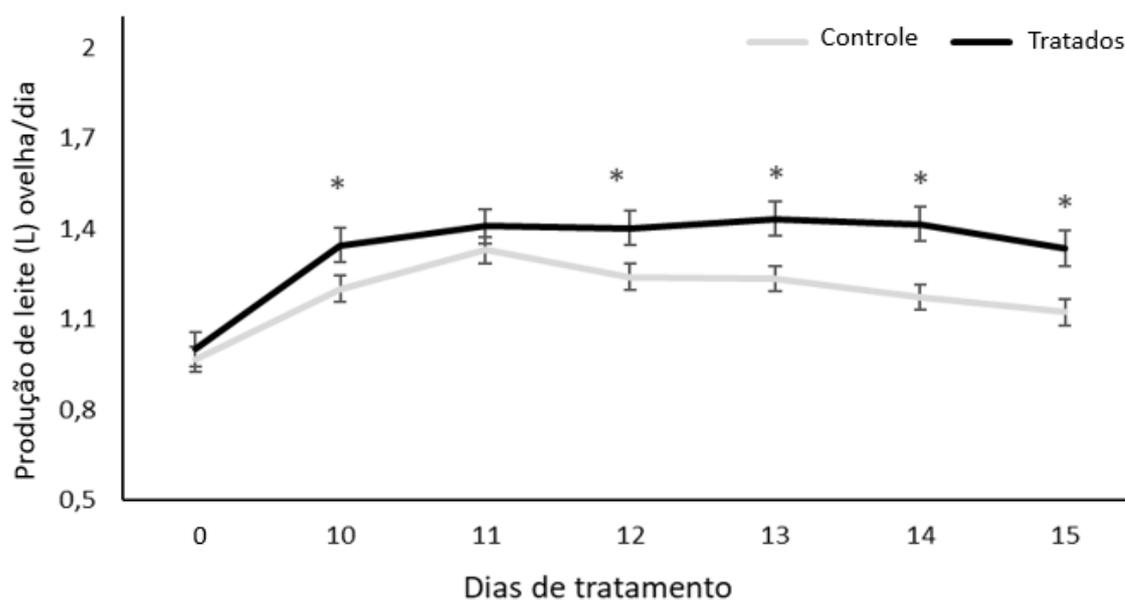


Fig. 1. Produção de leite média expressa em litros do grupo tratado com curcumina (80mg/ovelha/dia) e grupo controle mensurados no dia 0, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 do experimento (asterisco representa diferença estatística entre grupos – $P \leq 0,05$).

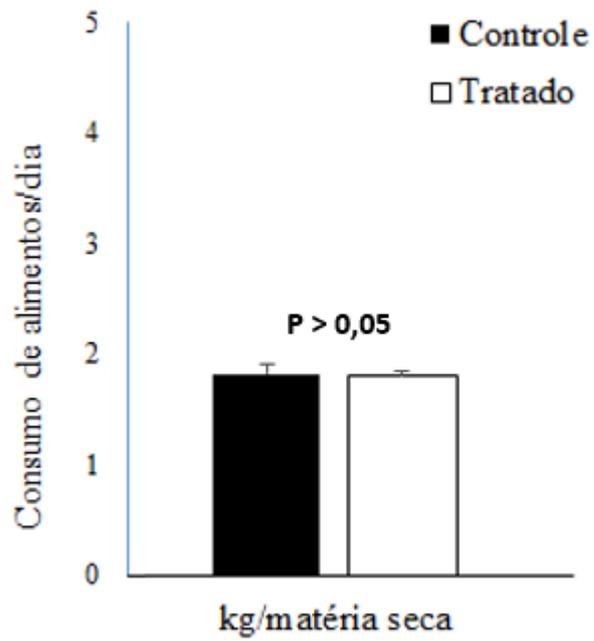


Fig. 2. Gráfico apresenta a média de consumo de alimentos por dia das ovelhas dos grupos controle e tratado. Não houve diferença entre grupos para o consumo ($P > 0,05$).

Quadro 1. Ingredientes e composição dieta fornecida às ovelhas durante o experimento de 15 dias do grupo controle e tratado com curcumina.

| Ingredientes | Kg MV/dia | Kg MS/dia |
|-------------------------------|------------------|--------------------------|
| Silagem (kg) | 3,6 | 1,3 |
| Concentrado ¹ (kg) | 0,8 | 0,7 |
| Composição química | Silagem de milho | Concentrado ¹ |
| Matéria seca, % | 33,03 | 88,71 |
| Matéria mineral, % da MS | 4,22 | 7,74 |
| Matéria orgânica, % da MS | 95,78 | 92,26 |
| Proteína bruta, % da MS | 7,18 | 16,14 |
| FDN, % da MS | 55,66 | 19,17 |
| FDA, % da MS | 21,77 | 3,48 |

¹Ingredientes presentes em 100kg de concentrado: milho moído (67.13%), farelo de soja (27.78%), calcário calcítico (0.93%), bicarbonato de sódio (0.46%) e 3.7% de núcleo (cálcio 195-220g, fósforo mín. 39g, sódio mín. 75g, enxofre mín. 18g, magnésio mín. 12g, cobalto mín. 45mg, iodo mín. 65g, manganês mín. 1300mg, selênio mín. 15mg, zinco mín. 3500mg, niacina mín. 500 mg, vit. A mín. 316000mg, vit D3 mín. 63000 UI, vit. E mín. 650 UI, flúor máx. 390mg em 1kg do produto).

MV (matéria verde), MS (matéria seca), FDN (fibra em detergente neutro), FDA (fibra em detergente ácido).

Quadro 2. Análise centesimal da composição do leite e níveis de oxidante (AOPP) e antioxidante (FRAP) de ovelhas leiteiras tratadas com curcumina (80mg/ovelha/dia) e do grupo controle nos dias 0, 10 e 15 do experimento.

| Variável | Dia | Controle | Tratados | P |
|-------------------|-----|------------------|------------------|-------------|
| Gordura (g/100g) | 0 | 8,12 ± 0,90 | 7,59 ± 1,33 | 0,77 |
| | 10 | 7,93 ± 0,98 | 7,41 ± 0,96 | 0,47 |
| | 15 | 7,78 ± 0,88 | 6,78 ± 0,83 | 0,02 |
| Proteína (g/100g) | 0 | 4,45 ± 0,35 | 4,30 ± 0,36 | 0,90 |
| | 10 | 4,73 ± 0,23 | 4,78 ± 0,43 | 0,93 |
| | 15 | 4,70 ± 0,29 | 4,63 ± 0,29 | 0,89 |
| Lactose (g/100g) | 0 | 4,47 ± 0,18 | 4,59 ± 0,22 | 0,94 |
| | 10 | 4,50 ± 0,21 | 4,69 ± 0,16 | 0,97 |
| | 15 | 4,62 ± 0,17 | 4,87 ± 0,15 | 0,82 |
| EST (g/100g) | 0 | 18,19 ± 1,20 | 17,3 ± 1,28 | 0,24 |
| | 10 | 18,30 ± 1,38 | 18,38 ± 1,62 | 0,79 |
| | 15 | 17,80 ± 1,33 | 17,3 ± 0,91 | 0,94 |
| ESD (g/100g) | 0 | 9,80 ± 0,31 | 9,77 ± 0,53 | 0,82 |
| | 10 | 10,10 ± 0,32 | 10,37 ± 0,68 | 0,91 |
| | 15 | 10,20 ± 0,38 | 10,41 ± 0,34 | 0,92 |
| CCS (CSx1000mL) | 0 | 273,70 ± 121,50 | 310,80 ± 182,60 | 0,84 |
| | 10 | 401,20 ± 222,00 | 114,10 ± 32,40 | 0,04 |
| | 15 | 311,00 ± 172,40 | 134,10 ± 61,50 | 0,05 |
| AOPP (µmol/L) | 0 | 244,40 ± 72,40 | 256,00 ± 36,70 | 0,94 |
| | 10 | 316,50 ± 44,70 | 186,10 ± 56,00 | 0,01 |
| | 15 | 302,60 ± 74,30 | 187,50 ± 29,40 | 0,00 |
| FRAP (µmol/L) | 0 | 1508,20 ± 400,20 | 1624,00 ± 628,00 | 0,83 |
| | 10 | 1324,10 ± 324,4 | 1574,60 ± 182,50 | 0,12 |
| | 15 | 1157,70 ± 209,7 | 1526,20 ± 374,00 | 0,04 |

EST (extrato seco total), ESD (extrato seco desengordurado), CCS (contagem de células somáticas), AOPP (níveis de produtos da oxidação proteica), FRAP (poder antioxidante de redução do ferro).

Valores de média e desvio padrão.

Quadro 3. Perfil de ácidos graxos do leite de ovelhas tratadas com curcumina (80mg/ovelha/dia) e grupo controle coletado no 15º dia de experimento.

| Variável (%) | Controle | Tratado | P |
|--------------|--------------|--------------|-------------|
| C6:0 | 0,84 ± 0,05 | 0,77 ± 0,05 | 0,87 |
| C8:0 | 1,16 ± 0,08 | 1,10 ± 0,14 | 0,79 |
| C10:0 | 5,01 ± 0,40 | 4,91 ± 0,82 | 0,89 |
| C11:0 | 0,11 ± 0,05 | 0,12 ± 0,04 | 0,94 |
| C12:0 | 3,85 ± 0,46 | 4,07 ± 0,86 | 0,76 |
| C13:0 | 0,13 ± 0,03 | 0,14 ± 0,03 | 0,97 |
| C14:0 | 11,09 ± 0,73 | 10,34 ± 1,40 | 0,84 |
| C14:1 | 0,12 ± 0,03 | 0,13 ± 0,03 | 0,950 |
| C15:0 | 1,12 ± 0,15 | 1,13 ± 0,26 | 0,96 |
| C15:1 | 0,29 ± 0,06 | 0,28 ± 0,09 | 0,97 |
| C16:0 | 32,90 ± 2,48 | 29,41 ± 1,50 | 0,04 |
| C16:1 | 1,12 ± 0,11 | 1,14 ± 0,15 | 0,85 |
| C17:0 | 0,70 ± 0,05 | 0,81 ± 0,25 | 0,26 |
| C17:1 | 0,26 ± 0,04 | 0,34 ± 0,15 | 0,48 |
| C18:0 | 13,42 ± 1,08 | 12,93 ± 2,54 | 0,84 |
| C18:1n9c | 24,12 ± 1,72 | 27,64 ± 1,57 | 0,02 |
| C18:2n6c | 2,82 ± 0,99 | 3,47 ± 1,05 | 0,72 |
| C18:3n6 | 0,13 ± 0,06 | 0,16 ± 0,06 | 0,57 |
| C18:3n3 | 0,14 ± 0,03 | 0,17 ± 0,05 | 0,38 |
| C20:0 | 0,30 ± 0,02 | 0,29 ± 0,04 | 0,89 |
| C20:1 | 0,08 ± 0,03 | 0,09 ± 0,08 | 0,90 |
| C20:2 | 0,09 ± 0,04 | 0,11 ± 0,04 | 0,76 |
| C20:4n6 | 0,24 ± 0,04 | 0,26 ± 0,06 | 0,85 |
| C22:0 | 0,07 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | 0,99 |
| C22:2 | 0,08 ± 0,02 | 0,10 ± 0,03 | 0,66 |

*Valores de média e desvio padrão. Note: ácido graxo capríco (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), undecílico (C11:0), láurico (C12:0), tridecílico (C13:0), mirístico (C14:0), miristoléico (C14:1), pentadecanóico (C15:0), pentadecenóico (C15:1), palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1), malgárico (C17:0), heptadecenóico (C17:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n9c), linoleico (C18:2n6c), γ -linolênico (C18:3n6), linolênico (C18:3n3), araquídico (C20:0), gondoico (C20:1), 11,14-eicosadienóico (C20:2), araquidônico (C20:4n6), behênico (C22:0), 13,16-docosadienóico (C22:2).

Quadro 4. Alterações na composição e níveis de oxidante (AOPP) e antioxidante (FRAP) do leite pasteurizado de ovelhas tratadas com curcumina (80mg/ovelha/dia) e grupo controle, nos dias 0, 3, 9 e 17 em refrigeração.

| Variável | Dia | Controle | Tratado | P |
|-------------------|-----|--------------|---------------|-------------|
| Gordura (g/100g) | 0 | 6,60 ± 0,90 | 6,68 ± 0,70 | 0,90 |
| | 3 | 6,53 ± 0,02 | 6,58 ± 0,30 | 0,74 |
| | 9 | 5,78 ± 0,50 | 6,33 ± 0,60 | 0,54 |
| | 17 | 6,13 ± 0,20 | 6,09 ± 0,10 | 0,92 |
| Proteína (g/100g) | 0 | 3,83 ± 0,20 | 4,58 ± 0,19 | 0,00 |
| | 3 | 3,83 ± 0,17 | 4,42 ± 0,22 | 0,00 |
| | 9 | 3,66 ± 0,17 | 4,45 ± 0,18 | 0,00 |
| | 17 | 3,88 ± 0,20 | 4,43 ± 0,11 | 0,00 |
| Lactose (g/100g) | 0 | 5,61 ± 0,14 | 6,75 ± 0,17 | 0,00 |
| | 3 | 5,61 ± 0,40 | 6,48 ± 0,20 | 0,00 |
| | 9 | 5,36 ± 0,15 | 6,53 ± 0,09 | 0,00 |
| | 17 | 5,60 ± 0,13 | 6,49 ± 0,21 | 0,00 |
| ESD (g/100g) | 0 | 10,38 ± 0,61 | 12,27 ± 0,51 | 0,00 |
| | 3 | 10,37 ± 0,60 | 11,87 ± 0,48 | 0,00 |
| | 9 | 9,91 ± 0,20 | 11,93 ± 0,28 | 0,00 |
| | 17 | 10,4 ± 0,17 | 11,93 ± 0,24 | 0,00 |
| pH | 0 | 6,62 ± 0,14 | 6,66 ± 0,24 | 0,87 |
| | 3 | 6,64 ± 0,20 | 6,68 ± 0,32 | 0,74 |
| | 9 | 6,61 ± 0,32 | 6,64 ± 0,28 | 0,82 |
| | 17 | 6,6 ± 0,20 | 6,6 ± 0,15 | 0,94 |
| AOPP (µmol/L) | 17 | 245,31 | 137,3 ± 27,40 | 0,00 |
| FRAP (µmol/L) | 17 | 1473 ± 420 | 1948 ± 210 | 0,00 |

ESD (extrato seco desengordurado), pH (potencial hidrogeniônico), AOPP (níveis de produtos da oxidação protéica), FRAP (poder antioxidante de redução do ferro).

Valores de média e desvio padrão.

Quadro 5. Hemograma completo de ovelhas leiteiras do grupo tratado com curcumina (80mg/ovelha/dia) e grupo controle nos dias 0, 10 e 15 do experimento.

| Variável | Dia | Controle | Tratados | P |
|------------------------------------------|-----|--------------|--------------|-------------|
| VG (%) | 0 | 28,5 ± 6,1 | 30,5 ± 4,6 | 0,82 |
| | 10 | 29,1 ± 4,7 | 27,7 ± 3,3 | 0,81 |
| | 15 | 30,4 ± 4,6 | 29,7 ± 2,5 | 0,92 |
| Eritrócitos (x10 ⁶ /μL) | 0 | 7,6 ± 3,1 | 7,4 ± 2,3 | 0,75 |
| | 10 | 8,7 ± 2,1 | 8,6 ± 1,2 | 0,93 |
| | 15 | 9,0 ± 0,5 | 9,3 ± 0,6 | 0,23 |
| Hemoglobina (g/dL) | 0 | 9,2 ± 1,8 | 9,0 ± 1,2 | 0,89 |
| | 10 | 9,2 ± 1,4 | 8,9 ± 0,9 | 0,88 |
| | 15 | 9,9 ± 1,6 | 9,5 ± 0,7 | 0,44 |
| VGM (fL) | 0 | 41,4 ± 11,8 | 43,8 ± 12,4 | 0,94 |
| | 10 | 30,9 ± 6,3 | 29,3 ± 4,3 | 0,88 |
| | 15 | 33,9 ± 6,3 | 32,0 ± 2,9 | 0,83 |
| CHGM (%) | 0 | 32,2 ± 1,3 | 29,8 ± 3,0 | 0,70 |
| | 10 | 31,6 ± 1,3 | 32,1 ± 1,5 | 0,90 |
| | 15 | 32,4 ± 1,6 | 32,0 ± 1,0 | 0,97 |
| Plaquetas (x10 ³ /μL) | 0 | 266,1 ± 56,5 | 218,0 ± 57,8 | 0,73 |
| | 10 | 279,2 ± 43,0 | 283,1 ± 72,1 | 0,87 |
| | 15 | 291,5 ± 50,8 | 289,4 ± 41,2 | 0,95 |
| Leucócitos Totais (x10 ³ /μL) | 0 | 7,9 ± 1,9 | 7,6 ± 1,4 | 0,93 |
| | 10 | 8,5 ± 2,3 | 6,6 ± 1,9 | 0,05 |
| | 15 | 9,2 ± 1,8 | 6,9 ± 0,8 | 0,01 |
| Neutrófilos (x10 ³ /μL) | 0 | 3,4 ± 1,0 | 3,4 ± 0,5 | 0,84 |
| | 10 | 3,1 ± 1,0 | 2,8 ± 1,0 | 0,18 |
| | 15 | 3,9 ± 0,8 | 2,7 ± 0,4 | 0,04 |
| Linfócitos (x10 ³ /μL) | 0 | 3,8 ± 1,5 | 3,6 ± 1,3 | 0,74 |
| | 10 | 4,3 ± 1,3 | 2,9 ± 1,2 | 0,03 |
| | 15 | 4,2 ± 1,2 | 3,3 ± 0,5 | 0,04 |
| Monócitos (x10 ³ /μL) | 0 | 0,3 ± 0,2 | 0,2 ± 0,2 | 0,93 |
| | 10 | 0,4 ± 0,3 | 0,4 ± 0,2 | 0,98 |
| | 15 | 0,5 ± 0,2 | 0,4 ± 0,1 | 0,87 |
| Eosinófilos (x10 ³ /μL) | 0 | 0,4 ± 0,4 | 0,4 ± 0,4 | 0,95 |
| | 10 | 0,7 ± 0,4 | 0,5 ± 0,3 | 0,90 |
| | 15 | 0,7 ± 0,6 | 0,6 ± 0,3 | 0,86 |

VG (volume globular), VGM (volume globular médio) e CHGM (concentração de hemoglobina globular média).

*Valores de média e desvio padrão.

Quadro 6. Bioquímica sérica de ovelhas leiteiras tratadas com curcumina (80mg/ovelha/dia) e grupo controle nos dias 0, 10 e 15 do experimento.

| Variável | Dia | Controle | Tratado | P |
|------------------------|-----|-------------|-------------|-------------|
| PST (g/dL) | 0 | 7,14 ± 0,80 | 6,87 ± 0,51 | 0,78 |
| | 10 | 6,43 ± 0,75 | 6,43 ± 0,50 | 0,87 |
| | 15 | 6,73 ± 1,20 | 5,62 ± 0,62 | 0,05 |
| Albumina (g/dL) | 0 | 2,22 ± 0,51 | 2,02 ± 0,24 | 0,92 |
| | 10 | 2,24 ± 0,40 | 2,01 ± 0,16 | 0,88 |
| | 15 | 2,22 ± 0,35 | 2,02 ± 0,28 | 0,92 |
| Globulinas (g/dL) | 0 | 4,92 ± 0,54 | 4,85 ± 0,55 | 0,94 |
| | 10 | 4,78 ± 0,52 | 4,42 ± 0,50 | 0,79 |
| | 15 | 4,51 ± 1,10 | 3,42 ± 0,76 | 0,04 |
| Glicose (mg/dL) | 0 | 88,4 ± 13,2 | 87,6 ± 18,2 | 0,95 |
| | 10 | 90,1 ± 13,7 | 82,7 ± 6,1 | 0,64 |
| | 15 | 73,1 ± 9,6 | 71,2 ± 13,5 | 0,87 |
| Triglicerídeos (mg/dL) | 0 | 35,1 ± 10,0 | 38,8 ± 9,4 | 0,92 |
| | 10 | 21,1 ± 9,0 | 23,3 ± 9,6 | 0,90 |
| | 15 | 44,5 ± 13,8 | 41,2 ± 18,1 | 0,86 |
| Colesterol (mg/dL) | 0 | 66,0 ± 8,8 | 67,6 ± 7,4 | 0,94 |
| | 10 | 60,4 ± 6,3 | 65,5 ± 14,2 | 0,86 |
| | 15 | 73,6 ± 9,6 | 71,2 ± 13,9 | 0,89 |
| AST (UI/L) | 0 | 74,1 ± 20,5 | 69,3 ± 9,2 | 0,77 |
| | 10 | 71,1 ± 21,6 | 82,6 ± 15,2 | 0,86 |
| | 15 | 73,0 ± 15,2 | 83,5 ± 25,0 | 0,89 |
| Ureia (UI/dL) | 0 | 15,8 ± 6,4 | 19,1 ± 7,9 | 0,74 |
| | 10 | 27,3 ± 8,5 | 25,3 ± 3,1 | 0,80 |
| | 15 | 32,6 ± 6,3 | 27,0 ± 7,0 | 0,43 |

PST (proteína sérica total), AST (aspartato aminotransferase).

Valores de média e desvio padrão.

Quadro 7. Níveis séricos de oxidantes (TBARS e ROS) e antioxidantes (GST, CAT e SOD) de ovelhas leiteiras suplementadas com curcumina (80mg/ovelha/dia) e grupo controle nos dias 0, 10 e 15 do experimento.

| Variável | Dia | Controle | Tratados | P |
|----------------------------------|-----|--------------|--------------|-------------|
| ROS no plasma (U DCF/mL) | 0 | 7,70 ± 1,80 | 7,72 ± 2,50 | 0,87 |
| | 10 | 10,59 ± 2,60 | 5,00 ± 0,70 | 0,00 |
| | 15 | 8,51 ± 0,81 | 5,82 ± 1,0 | 0,00 |
| GST no plasma (µmol cdnb/min/mL) | 0 | 8,65 ± 3,17 | 7,77 ± 5,0 | 0,86 |
| | 10 | 6,52 ± 1,50 | 10,18 ± 2,10 | 0,02 |
| | 15 | 9,81 ± 1,59 | 15,66 ± 2,80 | 0,00 |
| CAT no sangue total (U CAT/mL) | 0 | 5,99 ± 1,08 | 5,51 ± 0,84 | 0,75 |
| | 10 | 5,12 ± 0,52 | 5,84 ± 0,93 | 0,09 |
| | 15 | 5,01 ± 0,61 | 6,10 ± 0,89 | 0,05 |
| SOD no sangue total (U SOD/mL) | 0 | 3,01 ± 0,54 | 2,77 ± 0,42 | 0,80 |
| | 10 | 2,46 ± 0,26 | 3,09 ± 0,26 | 0,01 |
| | 15 | 2,72 ± 0,34 | 3,36 ± 0,52 | 0,03 |

TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), ROS (espécies reativas ao oxigênio), GST (glutathione S-transferase), CAT (catalase), SOD (superóxido desmutase).

Valores de média e desvio padrão.

Quadro 8. Desvio médio e padrão de citocinas (TNF- α , IL-1 e IL-10) nos dias 0, 10 e 15 dias de ovelhas leiteiras suplementadas com curcumina na dieta.

| Variável | Dia | Controle | Tratados | P |
|-----------------------|-----|------------------|------------------|--------------|
| TNF- α (pg/mL) | 0 | 110,0 \pm 9,6 | 108,7 \pm 7,1 | 0,74 |
| | 10 | 114,9 \pm 11,7 | 101,2 \pm 6,9 | 0,08 |
| | 15 | 104,6 \pm 5,5 | 91,7 \pm 7,8 | 0,001 |
| IL-1 (pg/mL) | 0 | 63,7 \pm 4,8 | 69,3 \pm 8,9 | 0,56 |
| | 10 | 61,5 \pm 7,1 | 60,4 \pm 6,4 | 0,79 |
| | 15 | 61,6 \pm 5,7 | 54,7 \pm 7,5 | 0,06 |
| IL-10 (pg/mL) | 0 | 115,7 \pm 14,6 | 121,3 \pm 11,7 | 0,72 |
| | 10 | 118,6 \pm 9,5 | 135,6 \pm 10,8 | 0,02 |
| | 15 | 116,1 \pm 6,7 | 136,0 \pm 3,4 | 0,001 |

Diferença estatística ($P < 0.05$) com teste t-Student. TNF- α (fator de necrose tumoral); IL-1 (interleucina 1); IL-10 (interleucina 10).

2.2 – MANUSCRITO II

Nanocápsulas de curcumina como suplemento na dieta de ovelhas leiteiras

Resultados preliminares

Antonise M. Jaguezeski^a, Samanta Da S. Gundel^b, Aline F. Ourique^b, Carine F. Souza^c,
Matheus D. Baldissera^c, Chrystian C. Cazarotto^a, Andreia Volpato^a, Bruno F. Fortuoso^a,
Aleksandro S. Da Silva^{a,d}

De acordo com normas para publicação em:

Anais da Academia Brasileira de Ciências

Nanocápsulas de curcumina como suplemento na dieta de ovelhas leiteiras

Resultados preliminares

ANTONISE M. JAGUEZESKI^A, SAMANTA DA S. GUNDEL^B, ALINE F. OURIQUE^B,
CARINE F. SOUZA^C, MATHEUS D. BALDISSERA^C, CHRYSYTIAN C. CAZAROTTO^A,
ANDREIA VOLPATO^A, BRUNO F. FORTUOSO^A, ALEKSANDRO S. DA SILVA^{A,D}

^A Programa de Pós-graduação em Zootecnia pela Universidade do Estado de Santa Catarina - CEO, Chapecó, Santa Catarina, Brasil.

^B Centro Universitario Franciscano, Santa Maria, RS, Brasil.

^C Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

^D Departamento de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC, Brasil.

Autor para correspondência: Rua Beloni Trombeta Zanin, 680E, Bairro Santo Antônio, Chapecó, SC. CEP: 89.815-630. Tel: (49) 2049 – 9524. Email: aleksandro_ss@yahoo.com.br

RESUMO

Curcumina tem potente ação antioxidante e anti-inflamatória, assim como outras propriedades medicinais. Apesar da curcumina ser um aditivo na alimentação animal, raros são os trabalhos com ruminantes. Nossa hipótese é de a curcumina disponibilizada na dieta não seja aproveitada em sua totalidade devido ao processo de fermentação no rúmen. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi primeiramente produzir nanocápsulas contendo curcumina e posteriormente avaliar se a adição dessas formulações na dieta de ovelhas leiteiras mantém ou potencializa os efeitos antioxidante e anti-inflamatórios. As nanocápsulas foram preparadas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado, empregando dois polímeros conhecidos como Poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e Eudragit L-100. O polímero de Eudragit tende a sofrer a influência do pH intestinal (jejuno), onde as nanocápsulas rompem-se e liberam a curcumina para ser absorvida. Já o polímero PCL pode liberar a curcumina em qualquer parte do sistema digestivo dos animais, mas lentamente. De posse das formulações, um estudo preliminar foi conduzido utilizando 12 ovelhas leiteiras divididas em quatro grupos (três animais cada), que receberam a suplementação homogeneizada no concentrado. O grupo A foi usado como controle (sem suplementação); o grupo B consumiu curcumina livre na dieta (30 mg/kg de concentrado); o grupo C consumiu nanocápsulas de PCL contendo curcumina (3 mg/kg de concentrado); e o grupo D consumiu Eudragit L-100 contendo curcumina (3mg/kg de concentrado). Individualmente, as ovelhas consumiram 0,8 kg de concentrado ao dia durante 7 dias. No leite não houve diferença na produção e composição entre grupos ($P > 0,05$). Verificamos que o número de leucócitos totais reduz devido a diminuição de linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos no sangue dos animais do grupo D, assim como níveis de globulinas no soro também reduziram ($P < 0,05$) comparado ao demais grupos. A capacidade antioxidante total e enzimas antioxidante no soro foi elevada nas ovelhas do grupo D, o que conseqüentemente reduziu a lipoperoxidação ($P < 0,05$). Concluimos que as nanocápsulas de curcumina produzidas a partir do polímero Eudragit L-100 potencializam a ação anti-inflamatória e antioxidante em ovelhas leiteiras quando usada na dieta diariamente, em uma dose 10 vezes menor que curcumina livre.

Palavras-chave: nanotecnologia, antioxidantes, ovelhas leiteiras, lipoperoxidase, leucócitos totais.

INTRODUÇÃO

O uso de curcumina, derivada da *Curcuma longa* vem sendo utilizado na terapêutica de humanos e animais por inúmeros benefícios, tais como o seu efeito antibiótico (Sarkar et al., 2016), antioxidante e protetor de peroxidação lipídica (Akinyemi et al., 2017; Momeni e Eskandari, 2017), além de promotor de crescimento e desempenho dos animais com grande margem de segurança no seu uso (Dono, 2013). Apesar da curcumina ser considerado um aditivo e liberado para uso na alimentação animal, estudo com ruminantes são raros, diferente do que acontece com aves (Rajput et al., 2013).

Todavia, a curcumina na sua apresentação natural (livre) possui algumas desvantagens, como a sua baixa solubilidade em água, instabilidade em pH neutros e alcalinos, baixa biodisponibilidade e eliminação rápida (Wang et al., 2009; Memvanga et al., 2013). Uma forma de melhorar a eficácia e as propriedades biofarmacêuticas da curcumina é utilizando nanotecnologia para obter nanopartículas (Ruenraroengsak et al., 2010; Arshad et al., 2014), que de acordo com a literatura, potencializam as propriedades dos compostos, drogas e fármacos (Singh e Lillard, 2009). A nanotecnologia com poli ϵ -caprolactona (PCL) seria uma forma de potencializar a curcumina, pois prolongaria a eficácia terapêutica e tempo de circulação (Dash e Konkimalla, 2012; Manjili et al., 2017). Outra forma de produzir nanocápsulas é usando o polímero de Eudragit, que também tem liberação do princípio ativo lenta, assim como em pH específico do sistema digestivo (Beloqui et al., 2014; Sasidharan et al., 2016), melhorando a disponibilidade local contra estresse oxidativo e absorção a nível intestinal (Catalan-Latorre et al., 2016; Yao et al., 2017). Estas metodologias podem ser úteis para aplicação em alimentos funcionais, suplementos ou produtos farmacêuticos (Liu et al., 2018) como é o caso da curcumina. Além disso, a curcumina pode não chegar ao intestino para ser absorvida, e dessa forma, suas propriedades medicinais não seriam detectadas. Nossa hipótese é de a curcumina disponibilizada na dieta não seja aproveitada em sua totalidade devido ao processo de fermentação no rúmen, e quando na formulação de nanocápsulas, poderia ocorrer maior biodisponibilidade de curcumina, potencializando a ação antioxidante e anti-inflamatória.

A ovinocultura de leite é um dos setores que mais carece e pesquisas aplicadas para melhoria produtiva. A produção de leite em ovelhas causa diversos distúrbios metabólicos, e conseqüentemente ocorre uma exaustão de sistemas antioxidantes, assim como aumento de mediadores inflamatórios em animais saudáveis, contribuindo para ocorrência de estresse

oxidativo (Pietro, 2011) que tem efeitos destrutivos quando exacerbado na saúde e produção animal. Portanto, o objetivo deste estudo foi produzir nanocápsulas dispendo de dois polímeros distintos e avaliar se a adição dessas formulações na dieta de ovelhas leiteiras mantém ou potencializa os efeitos antioxidante e anti-inflamatórios, assim como, se interfere na performance produtiva.

MATERIAL E MÉTODOS

PRODUTO

A curcumina usada nesse estudo na forma livre na alimentação das ovelhas, assim como a usada para produção das nanocápsulas de curcumina foi comprada da empresa Sigma®.

PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS

As nanocápsulas foram preparadas através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado, empregando dois polímeros: Poli (ϵ -caprolactona) e Eudragit L-100. A fase orgânica da formulação contendo o polímero poli (ϵ -caprolactona) (PCL) (1%), crodamol (1,65%), Curcumina (0,2%) e monoestearato de sorbitano (0,38%) foi dissolvida em acetona (67 mL) durante 1 hora à 40 °C. Enquanto a fase orgânica da formulação contendo o polímero Eudragit L-100 (1%), crodamol (1,65%), Curcumina (0,025%) e monoestearato de sorbitano (0,38%) foi dissolvida em álcool etílico (67 mL) durante 15 min à 40 °C. As fases orgânicas foram vertidas nas fases aquosas correspondentes contendo Polisorbato 80 (0,76%) e água ultrapura (134 mL). Após agitação durante 15 min foi realizada a evaporação do solvente orgânico sob pressão reduzida, com o auxílio de um evaporador rotatório, até o volume de formulação desejado (25 mL) com controle de temperatura (40 °C) (CORADINI et al., 2014).

CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS

Após o preparo, as formulações foram caracterizadas de acordo com tamanho médio das partículas, índice de polidispersão, potencial zeta e pH. As análises de tamanho da partícula, índice de polidispersão e potencial zeta foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer (Zetasizer® nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern). Para a determinação do tamanho e do índice de polidispersão empregou-se a técnica de espalhamento de luz dinâmico, enquanto o potencial zeta foi determinado através da técnica de mobilidade eletroforética. O pH foi determinado diretamente nas formulações com auxílio de um potenciômetro (DM-22,

Digimed[®]) previamente calibrado com solução padrão. Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão a partir da leitura em triplicata (ROSSI et al., 2017).

PRODUÇÃO DAS RAÇÕES

Primeiramente, a curcumina livre e nano-encapsulada foram misturadas a 0,5 kg de milho moído em homogeneizador do tipo ‘Y’ durante 5 minutos, para então serem misturadas aos demais ingredientes do concentrado a ser utilizado durante o experimento.

Todos os animais foram alimentados em comedouros individuais, recebendo após a ordenha da manhã e da tarde a quantidade de 400g de concentrado (Tabela 1) e 1,8kg de silagem de milho, totalizando 0,8kg de concentrado e 3,6kg de silagem/dia. Água foi disponibilizada *ad libitum*.

ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas 12 ovelhas da raça Lacaune com período de lactação de 60 dias, animais escolhidos ao acaso dentre um grupo de animais hígidos. Os animais foram divididos em quatro grupos, com três animais cada, sorteados ao acaso em delineamento inteiramente casualizado. Os animais do Grupo A foram usados como controle (sem curcumina na dieta); as ovelhas do grupo B consumiram concentrado contendo 30 mg/kg de curcumina pura; as ovelhas do grupo C consumiram ração contendo nanocápsula de (ϵ -caprolactona) (PCL) contendo curcumina na dose de 3mg/kg de concentrado; e por fim, os animais do grupo D receberam no concentrado suplementação com Eudragit L-100 contendo curcumina na dose de 3 mg/kg de concentrado. De acordo com a literatura, a nanotecnologia potencializa em até 9 vezes o efeito de uma molécula, droga ou fármaco (Yu E Huang, 2012), motivo que usamos a dose de 10x menor nesse estudo preliminar. Também não é possível incluir grande quantidade de nano partículas de curcumina nas nanocápsulas, o que faz com que a dose seja baixa. Os animais receberam as dietas experimentais por sete dias consecutivos.

COLETA DE SANGUE

Nos dias 0 e 8 de experimento foi realizada a coleta de amostra de 4mL de sangue por venopunção jugular em tubos contendo anticoagulante EDTA para exame de leucograma, assim como 4mL de sangue em tubos com ativador de coágulo para obtenção do soro destinados a mensuração bioquímica e antioxidantes. O sangue total foi centrifugado durante

10 minutos a 3000rpm, e o soro separado em microtubos, mantidos congelados (-20°C) até análises.

LEUCOGRAMA

A contagem total de leucócitos foi obtida por contador semiautomático (CELM CC-550), e para o diferencial de leucócitos foi realizado esfregaço sanguíneo corado com Panótipo rápido para identificação e contagem relativa de 100 células (Thrall et al., 2015).

BIOQUÍMICO

Níveis de proteínas totais (PT) e albumina foram obtidas por analisador semiautomático (Bioplus 2000), usando kits comercial (Analiza) seguindo as instruções técnicas do fabricante. O valor de globulinas foi obtido matematicamente pela diferença de PT e albumina.

ANTIOXIDANTES

No soro, a atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi medida indiretamente através da taxa de oxidação de NADPH a 340 nm usando hidroperóxido de cobre (CuOOH), de acordo com Wendel (1981). A atividade da superóxido dismutase foi determinada de acordo com o princípio da auto-oxidação do pirogalol, inibido na presença de SOD. A variação da densidade óptica foi determinada cineticamente durante dois minutos a 420 nm, em intervalos de dez segundos de acordo com a metodologia descrita por Beutler (1984). A atividade enzimática da GPx e SOD foi expressa como U mg⁻¹ de proteína. Já a atividade no soro foi testada por espectrofotometria ultravioleta (Shimadzu-UV1800). A alteração da absorvência de H₂O₂ após 60 s foi medida a 240 nm; e a atividade da catalase (CAT) foi calculada e expressa em U mg⁻¹ de proteína usando o método descrito por Nelson & Kiesow (1972).

A capacidade antioxidante total (TAC) contra radicais de peróxido foi determinado de acordo com o método descrito por Amado et al. (2009) com modificação para mamíferos. Este método consiste em encontrar a capacidade antioxidante dos tecidos usando um substrato fluorescente (2', 7' diclorofluoresceíndiacetate - H₂DCF-DA) e a produção de radicais peróxidos por decomposição térmica de ABAP (2,2'-azobis 2 methylpropionamidedihydrochloride). A fluorescência foi determinada através de um leitor de microplacas (Spectramax I3), a 37 ° C (excitação: 485 nm; emissão: 530 nm) com leituras a cada 5 min, durante 30 min. A concentração de proteína no soro foi determinada pelo

método de Coomassie Blue segundo Read e Northcote (1981), utilizando albumina de soro bovino como padrão. Os resultados da TAC foram expressos U.F. mg de proteína.

LIPOPEROXIDAÇÃO

A metodologia foi baseada em Hermes-Lima et al. (1995) com algumas modificações por autores, denominadas Fox com base na oxidação de Fe (II) em condições ácidas. O método Fox mede os peróxidos lipídicos, um dos principais produtos de peroxidação lipídica. Para medições de lipoperoxidação (LPO) foram adicionados sequencialmente FeSO₄ (1 mM), H₂SO₄ (0,25 M), laranja xilenol (1 mM, Sigma) e água Milli Q. Amostras ou metanol (espaços em branco) foram adicionados e incubados durante 30 min. Posteriormente, determinou-se a absorvência (550 nm) e o hidroperóxido de cumeno (CHP; Sigma) foi utilizado como padrão. A LPO foi expressa em equivalentes de hidroperóxido de cumeno (CHP) por nmol por mL.

MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO E ANÁLISE DO LEITE

O leite das 12 ovelhas foi mensurado no dia 0 e 8 do experimento durante a ordenha, por meio de medidor Milk Meter®. Do tubo coletor, após a ordenha, foi coletado 40mL do leite individual para análise centesimal (lactose, gordura, proteína e extrato seco desengordurado). As amostras individuais do leite foram processadas em analisador automatizado de leite Funke Gerber® (Labortechnik, Berlin, Alemanha) para obtenção dos dados de gordura total, proteína, extrato seco desengordurado e lactose nos dias 0 e 8 do experimento.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, sendo que os dados que não apresem distribuição normal (variáveis do leucograma) foram transformados para logaritmo. Na sequência, uma análise de variância de duas vias foi realizada com a finalidade de comparação entre grupos nos dois momentos (dias 0 e 8) e ao longo do tempo (dia 0 para 8). Considerou-se significativo quando $P \leq 0,05$. Resultados foram apresentados em média e desvio padrão.

RESULTADOS

NANOCÁPSULAS DE CURCUMINA

As nanocápsulas apresentaram tamanho médio de partícula entre 160 e 200 nm, para as formulações contendo 0,25 mg/mL (Eudragit L-100) e 2 mg/mL (PCL) de curcumina, respectivamente (Tabela 2). Além disso, as duas formulações apresentaram índice de polidispersão em torno de 0,1, indicando a uniformidade no tamanho das partículas. Ainda, pode-se observar que as nanocápsulas apresentaram potencial zeta negativo e pH ácido, de acordo com os constituintes da formulação.

LEUCOGRAMA

A contagem de leucócitos totais diminuiu apenas no grupo D no dia 8 do experimento quando comparado aos demais grupos ($P \leq 0,05$), o que ocorreu em consequência da diminuição do número de linfócitos, eosinófilos e monócitos comparado ao grupo controle ($P \leq 0,05$). Ao longo do tempo, verificamos uma redução de leucócitos totais do dia 0 para 8 de experimento, devido a redução significativa de neutrófilos e monócitos para o grupo D ($P \leq 0,05$) (Tabela 3).

BIOQUÍMICO SÉRICO

Os níveis de proteínas totais e albumina não diferiram entre grupos, ao contrário dos níveis de globulinas que reduziram nos animais do grupo D comparado ao grupo A (Tabela 4). Da mesma forma, ao longo do tempo observou-se redução dos níveis de globulinas nas ovelhas do grupo D do dia 0 para 8 desse estudo ($P \leq 0,05$).

RELAÇÃO OXIDANTES E ANTIOXIDANTES TOTAIS

A capacidade antioxidante total no soro aumentou expressivamente nos animais do grupo D no dia 8 do experimento ($P \leq 0,0001$) comparado aos demais grupos. Um aumento discreto da TAC também foi verificado no soro das ovelhas do grupo B ($P \leq 0,05$). Já a lipoperoxidação foi menor nos três grupos testes (grupos B, C e D) no soro comparado ao grupo controle (grupo A), sendo mais acentuada a redução no grupo D (Figura 1). Ao longo do tempo verificamos que a lipoperoxidação reduziu nas ovelhas do grupo que recebeu na dieta curcumina na forma de nanocápsula de Eudragit ($P \leq 0,05$). Já a capacidade antioxidante total nos animais desse grupo aumentou drasticamente do dia 0 para o dia 8 de experimento.

ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Não observamos diferença na atividade da SOD e GPx entre grupos nos dois momentos ($P > 0,05$), diferente a atividade da CAT que aumentou no soro das ovelhas do

grupo D no dia 8 comparado aos grupos A e B (Tabela 3). Ao longo do tempo, as três enzimas (SOD, CAT e GPx) aumentaram significativamente sua atividade no soro das ovelhas do grupo D do dia 0 para 8 de experimento.

PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

A produção de leite, assim como a composição centesimal no leite (gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado) não diferiu entre grupos nos dois momentos ($P \leq 0,05$) (Tabela 4) e ao longo do tempo ($P > 0,05$).

DISCUSSÃO

O tamanho nano permite que as partículas penetrem através dos tecidos de forma eficiente e atravessem barreiras biológicas (Singh e Lillard, 2009), pensando nisso esse estudo foi planejado. A biofabricação da droga com seleção cuidadosa e radical do polímero é outro fator a ser considerado para a correta absorção e funcionalidade (Chowdhury et al., 2017), pensando-se em ruminantes, com o pH alcalino ruminal, é ainda mais desafiador a administração de princípio ativo sem a inativação pelo pH ou microrganismos locais. Portanto, o tamanho, a carga e o tipo de revestimento na superfície da nanoestrutura têm uma forte influência sobre como eles serão reconhecidos pelas células (Moros et al., 2012). As características físico-químicas das nanoestruturas podem afetar a forma como o sistema imunológico detecta e reage (Martins et al., 2015), sendo importante, portanto, determinar a aceitação entre espécies e estruturas poliméricas. Os avanços dos estudos em nanotecnologias, e neste caso, pela primeira vez aplicado em pequenos ruminantes, fornece contribuição para o desenvolvimento de biomateriais a serem aplicados em medicamentos ou alimentos à espécie (Buehler e Cranford, 2010), visando fortalecer a saúde animal e consequentemente a performance produtiva. Além disso, a aceitação dessas nanoestruturas em produtos alimentares oriundos de animais tratados depende fortemente da garantia de que esta nova tecnologia seja benéfica e saudável também ao consumo humano (Martins et al., 2015). No presente estudo verificamos maior potencial da nanotecnologia quando usado polímero eudragit, no entanto trata-se de um estudo preliminar, pois usamos apenas uma dose, por um período curto de tempo, assim como apenas uma espécie animal. No entanto, cabe ressaltar que os resultados preliminares foram satisfatórios e surpreendentes.

A atividade anti-inflamatória e antioxidante da curcumina já é bem documentada (Gómez-Estaca et al., 2017; Mary et al., 2018; Zhang et al., 2018; Rauf et al., 2018), sendo reportado alterações nos níveis de citocinas pró-inflamatória, inibição da proliferação e

apoptose de células de defesa, assim como aumento de antioxidantes totais enzimáticos e não enzimáticos. Consequentemente, pesquisadores reportam que relacionado ao aumento de antioxidantes ocorre uma diminuição da peroxidação lipídica e a expressão SIRT2 (Keskin-Aktan et al., 2018), proteína esta que envolve a regulação das respostas ao estresse oxidativo (Wang et al., 2007). De acordo com a literatura, a expressão de SIRT2 tem correlação positiva com o nível de malondialdeído, estando relacionado com a peroxidação lipídica e a diminuição da expressão induzida por curcumina (Keskin-Aktan et al., 2018) diminuiu significativamente a apoptose induzida por radicais livres (Nie et al., 2014).

Tentativas foram realizadas para elevar a atividade de compostos antioxidantes, como curcumina através do encapsulamento em nanopartículas. A nanoencapsulação de curcumina potencializou a eficiência antioxidante e antibacteriana (Hussain et al., 2017). Nanocápsulas de poli (ϵ -caprolactona) (PCL) contendo curcumina contribuíram para melhorar a ação antioxidantes e antibacterianas, segundo os autores, pois possibilitam a liberação lenta e prolongada do princípio ativo (Mohammadi et al., 2016). No entanto, no caso do Eudragites de curcumina, pesquisadores observaram perfil de liberação bifásica e em pH intestinal (Khatik et al. 2013), e portanto, acreditamos que a curcumina foi liberada apenas no intestino das ovelhas, onde foi absorvida em praticamente sua totalidade, o que refletiu em uma forte ação antioxidante e anti-inflamatória no sangue. Em outro estudo, pesquisadores verificaram que nanocápsulas de curcumina produzidas com polímero eudragite foram liberadas de forma contínua durante um período prolongado de tempo e a biodisponibilidade sistêmica foi aumentada (Khatik et al. 2013). Da mesma forma, curcumina protegida por nanocápsulas de Eudragite também forneceu função de proteção para o princípio ativo até atingir seu local alvo, isto é, o intestino (Li et al. 2015).

Pesquisadores que estudaram a cinética de absorção verificaram um aumento da absorção de nanocápsulas de curcumina em comparação com a curcumina livre, com efeitos potencializado sobre a diminuição de EROs, danos ao DNA e peroxidação lipídica (Soltani et al., 2016), além dos efeitos que já se sabiam referente a expressão de Nrf2 (Tapia et al., 2012). Estas alterações influenciam na expressão do gene alvo na regulação positiva de enzimas antioxidantes como glutathione S-transferase (GST), GPx, CAT e SOD (Cardozo et al., 2013), potentes antioxidantes endógenos. Em nosso estudo obtivemos resultados bastante semelhantes, ou seja, houve potencialização do efeito antioxidante quando usado nanocápsulas feitas com polímero de eudragit. No entanto, avaliamos o efeito em ruminantes, animais que tem estômago dividido em compartimento com função distintas, isto é, fermentativa (rúmex, retículo e omaso) e digestivo (abomaso), e por esse motivo a

nanocápsula de curcumina de PCL pode ter sido aberta nos compartimentos fermentativos, e devido a baixa dose (2 mg/ovelha/dia), não se observaram efeitos séricos antioxidante neste grupo.

Em nosso estudo, a produção de leite e componentes do leite (gordura, lactose, extrato seco desengordurado e proteína) não foi afetada pela suplementação com curcumina livre ou nano-encapsulada, o que era esperado, e acreditamos estar relacionada ao curto período experimental, pois não houve tempo suficiente para adaptação da dieta nas ovelhas. Porém, os benefícios mesmo em curto espaço de tempo são perceptíveis na saúde das ovelhas, e possivelmente na saúde do úbere.

Com isso, foi possível demonstrar que nanocápsulas de eudragites contendo curcumina em baixíssima dose potencializam efeito antioxidante e anti-inflamatório e tem efeito potencializado frente ao observado por curcumina livre no organismo de ovelhas. Estudos futuros objetivarão avaliar a estabilidade e características das nano produzidas, assim como transformar a suspensão em pó, possibilitando ser utilizado como na dieta animal como um aditivo de alta qualidade, com finalidade de aumentar produção de leite, modular composição centesimal e melhorar a qualidade do leite.

CONCLUSÃO

Este trabalho foi o primeiro a utilizar nanocápsulas de curcumina na dieta de pequenos ruminantes. Concluimos que as nanocápsulas de curcumina produzidas apresentam partículas são de tamanho uniforme, potencial zeta negativo e pH ácido. O uso nanocápsulas, produzidas a partir do polímero eudragit, contendo curcumina na dieta de ovelhas potencializa a ação antioxidante e anti-inflamatória no sangue e reduz a lipoperoxidação.

REFERÊNCIAS

AKINYEMI AJ, ONYEBUEKE N, OPEYEMI AYODEJI F, SUNDAY AMOS O, FADAKA A, OLAYIDE I. 2017. Curcumin inhibits adenosine deaminase and arginase activities in cadmium-induced renal toxicity in rat kidney. *J Food Drug Anal* 25: 438-447.

AMADO LL, GARCIA ML, RAMOS PB, FREITAS RF, ZAFALON B, FERREIRA JLR, YUNES JS, MONSERRAT JM. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ* 407: 2115–2123.

BELOQUI A, COCO R, MEMVANGA PB, UCAKAR B, DES RIEUX A, PRÉAT V. 2014. pH-sensitive nanoparticles for colonic delivery of curcumin in inflammatory bowel disease. *Int. J. Pharm* 473: 203-212.

BEUTLER E. 1984. Superoxide dismutase. In: Beutler E (Editor), *Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods*. Grune & Stratton, Philadelphia, PA, 83-85.

BUEHLER MJ, CRANFORD S. 2010. Materiomics: biological protein materials, from nano to macro. *Nanotechnol Sci Appl* 3: 127-147.

CARDOZO LF, PEDRUZZI LM, STENVINKEL P, STOCKLER-PINTO MB, DALEPRANE JB, LEITE JR M, MAFRA D. 2013. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie* 95: 1525-1533.

CARDOZO LF, PEDRUZZI LM, STENVINKEL P, STOCKLER-PINTO MB, DALEPRANE JB, LEITE JR M, MAFRA D. 2013. Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. *Biochimie* 95: 1525-1533.

CATALAN-LATORRE A, RAVAGHI M, MANCA ML, CADDEO C, MARONGIU F, ENNAS G, MANCONI, M. 2016. Freeze-dried eudragit-hyaluronan multicompartement liposomes to improve the intestinal bioavailability of curcumin. *Eur J Pharm Biopharm* 107: 49-55.

CHOWDHURY A, KUNJIAPPAN S, PANNEERSELVAM T, SOMASUNDARAM B, BHATTACHARJEE B. 2017. Nanotechnology and nanocarrier-based approaches on treatment of degenerative diseases. *Int Nano Lett* 7: 91-122.

CORADINI K, LIMA FO, OLIVEIRA CM, CHAVES PS, ATHAYDE ML, CARVALHO LM, BECK RCR. 2014. Co-encapsulation of resveratrol and curcumin in lipid-core nanocapsules improves their in vitro antioxidant effects. *Eur J Pharm Biopharm* 88: 178-185.

DASH TK, KONKIMALLA VB. 2012. Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: a review. *J Contr Release* 158: 15-33.

DONO ND. 2013. Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) Supplementation As An Alternative To Antibiotics In Poultry Diets. *Wartazoa*. V.23. 2013.

GÓMEZ-ESTACA J, BALAGUER MP, LÓPEZ-CARBALLO G, GAVARA R., HERNÁNDEZ-MUÑOZ P. 2017. Improving antioxidant and antimicrobial properties of

curcumin by means of encapsulation in gelatin through electrohydrodynamic atomization. *Food Hydrocoll* 70: 313-320.

HERMES-LIMA M, WILLIAM G, STOREY K. 1995. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xilenol orange complex formation. *Free Rad Biol Med* 19: 271–280.

HUSSAIN Z, THU HE, AMJAD MW, HUSSAIN F, AHMED TA, KHAN S. 2017. Exploring recent developments to improve antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial efficacy of curcumin: A review of new trends and future perspectives. *Mater Sci Eng* 77: 1316-1326.

KESKIN-AKTAN A, AKBULUT KG, YAZICI-MUTLU Ç, SONUGUR G, OCAL M, AKBULUT H. 2018. The effects of melatonin and curcumin on the expression of SIRT2, Bcl-2 and Bax in the hippocampus of adult rats. *Brain Res Bull* 137: 306-310.

KHATIK R, MISHRA R, VERMA A, DWIVEDI P, KUMAR V, GUPTA V, DWIVEDI AK. 2013. Colon-specific delivery of curcumin by exploiting Eudragit-decorated chitosan nanoparticles in vitro and in vivo. *J Nanopart Res* 15: 1893.

LI J, LEE IW, SHIN GH, CHEN X, PARK HJ. 2015. Curcumin-Eudragit® E PO solid dispersion: a simple and potent method to solve the problems of curcumin. *Eur J Pharm Biopharm* 94: 322-332.

LIU F, MA D, LUO X, ZHANG Z, HE L, GAO Y, MCCLEMENTS DJ. 2018. Fabrication and characterization of protein-phenolic conjugate nanoparticles for co-delivery of curcumin and resveratrol. *Food Hydrocoll* In press. 2018.

MANJILI HK, GHASEMI P, MALVANDI H, MOUSAVI MS, ATTARI E, DANAFAR H. 2017. Pharmacokinetics and in vivo delivery of curcumin by copolymeric mPEG-PCL micelles. *Eur J Pharm Biopharm* 116: 17-30.

MARTINS JT, RAMOS OL, PINHEIRO AC, BOURBON AI, SILVA HD, RIVERA MC, VICENTE AA. 2015. Edible bio-based nanostructures: delivery, absorption and potential toxicity. *Food Engineering Reviews* 7: 491-513.

MARY CPV, VIJAYAKUMAR S, SHANKAR R. 2018. Metal chelating ability and antioxidant properties of Curcumin-metal complexes-A DFT approach. *J Mol Graph Model* 79, 1-14.

- MEMVANGA PB, COCO R, PRÉAT V. 2013. An oral malaria therapy: curcumin-loaded lipid-based drug delivery systems combined with ϵ -arteether. *J Control Release* 172: 904-913.
- MOHAMMADI R, RABBANI S, BAHRAMI SH, JOGHATAEI MT, MOAYER F. 2016. Antibacterial performance and in vivo diabetic wound healing of curcumin loaded gum tragacanth/poly(ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers. *Mater Sci Eng C* 69: 1183-1191.
- MOMENI HR, ESKANDARI N. 2017. Effect of curcumin on kidney histopathological changes, lipid peroxidation and total antioxidant capacity of serum in sodium arsenite-treated mice. *Exp Toxicol Pathol* 69: 93-97.
- MOROS M, HERNÁEZ B, GARET E, DIAS JT, SÁEZ B, GRAZÚ V, GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ A, ALONSO C, DE LA FUENTE JM. 2012. Monosaccharides versus PEG-functionalized NPs: influence in the cellular uptake. *ACS Nano* 6: 1565-1577.
- NELSON DP, KIESOW LA. 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solution in the UV). *Anal Biochem* 49: 474-478.
- NIE H, HONG Y, LU X, ZHANG J, CHEN H, LI Y, YING W. 2014. SIRT2 mediates oxidative stress-induced apoptosis of differentiated PC12 cells. *Neuroreport* 25: 838-842.
- OKE OE. 2018. Evaluation of physiological response and performance by supplementation of *Curcuma longa* in broiler feed under hot humid tropical climate. *Trop Anim Health Prod*. In press.
- PIETRO C. 2011. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 33: 233-240.
- RAJPUT N, MUHAMMAD N, YAN R, ZHONG X, WANG T. 2013. Effect of dietary supplementation of curcumin on growth performance, intestinal morphology and nutrients utilization of broiler chicks. *Int J Poult Sci* 50: 44-52.
- RAUF A, IMRAN M, ORHAN IE, BAWAZEER S. 2018. Health perspectives of a bioactive compound curcumin: A review. *Trends Food Sci Technol* 74: 33-45.
- READ SM, NORTHCOTE DH. 1981. *Anal Biochem* 116: 53.
- ROSSI GG, GUTERRES KB, BONEZ PC, GÜNDEL SS, AGGERTT VA, SIQUEIRA FS, OURIQUE AF, WAGNER R, KLEIN B, SANTOS RCV, CAMPOS MMA. 2017.

Antibiofilm activity of nanoemulsions of *Cymbopogon flexuosus* against rapidly growing mycobacteria. *Microb Pathog* 113: 335-341.

RUENRAROENGSACK P, COOK JM, FLORENCE AT. 2010. Nanosystem drug targeting: facing up to complex realities. *J Control Release* 141: 265-276

SARKAR A, DE R, MUKHOPADHYAY AK. 2016. Curcumin as a potential therapeutic candidate for *Helicobacter pylori* associated diseases. *World J Gastroenterol* 22: 2736-2748.

SASIDHARAN T, SABITHA M, S.C. NAIR. Chitosan-eudragit magnetic microspheres of sulfasalazine for colon drug delivery. *IJPSRR*, 41 (2016), pp. 125-131

SINGH R, LILLARD JW. 2009. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Exp Mol Pathol* 86: 215–223.

SOLTANI B, GHAEMI N, SADEGHIZADEH M, NAJAFI F. 2016. Redox maintenance and concerted modulation of gene expression and signaling pathways by a nanoformulation of curcumin protects peripheral blood mononuclear cells against gamma radiation. *Chem Biol Interact* 257: 81-93.

TAPIA E, SOTO V, ORTIZ-VEJA KM, ZARCO-MÁRQUEZ G, MOLINA-JIJÓN E, CRISTÓBAL-GARCÍA M, PEDRAZA-CHAVERRI J. 2012. Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. *Oxid Med Cell Longev* 2012, 1-14.

TAPIA E, SOTO V, ORTIZ-VEJA KM, ZARCO-MÁRQUEZ G, MOLINA-JIJÓN E, CRISTÓBAL-GARCÍA M, PEDRAZA-CHAVERRI J. 2012. Curcumin induces Nrf2 nuclear translocation and prevents glomerular hypertension, hyperfiltration, oxidant stress, and the decrease in antioxidant enzymes in 5/6 nephrectomized rats. *Oxid Med Cell Longev* 2012, 1-14.

THRALL MA, WEISER G, ALISSON RW, CAMPBELL TW. 2015. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*, editora Roca, 2ª edição.

WANG F, NGUYEN M, QIN F, TONG Q. 2007. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell* 6: 505-514.

WANG Y, LU ZJ, LV FX, BIE XM. 2009. Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. *Eur Food Res Tech* 229: 391-396

WENDEL A. 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77: 325-33.

YAO K, CHEN W, SONG F, MCCLEMENTS DJ, HU K. 2017. Tailoring zein nanoparticle functionality using biopolymer coatings: Impact on curcumin bioaccessibility and antioxidant capacity under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids* 79: 262-272.

YU H, HUANG Q. 2012. Improving the oral bioavailability of curcumin using novel organogel-based nanoemulsions. *J Agric Food Chem* 60: 5373-5379.

ZHANG Y, LIU Z, WU J, BAI B, CHEN H, XIAO Z, CHEN L, ZHAO Y, LUM H, WANG Y, ZHANG H, LIANG G. 2018. New MD2 inhibitors derived from curcumin with improved anti-inflammatory activity. *Eur J Med Chem* 148: 291-305.

Tabela 1. Ingredientes e composição da dieta fornecida aos ovinos do experimento na quantidade de 800g/ovelha/dia.

| Ingredientes | Porcentagem em 100kg de ração |
|----------------------|--------------------------------------|
| Milho moído | 67,13% |
| Farelo de soja | 27,78% |
| Núcleo* | 3,7% |
| Calcário calcítico | 0,93% |
| Bicarbonato de sódio | 0,46% |

* Composição: cálcio 195-220g, fósforo mín. 39g, sódio mín. 75g, enxofre mín. 18g, magnésio mín. 12g, cobalto mín. 45mg, iodo mín. 65g, manganês mín. 1300mg, selênio mín. 15mg, zinco mín. 3500mg, niacina mín. 500 mg, vit. A mín. 316000mg, vit D3 mín. 63000 UI, vit. E mín. 650 UI, flúor máx. 390mg (em 1kg do produto).

Tabela 2. Caracterização físico-química das nanocápsulas de curcumina produzidas de polímeros de poli (ϵ -caprolactona) e Eudragit L-100.

| Formulações | Tamanho (nm) | Índice de polidispersão | Potencial zeta (mV) | pH |
|----------------------------------------|----------------|-------------------------|---------------------|-----------------|
| NC 0,2% Curcumina (2 mg/mL) | 198 \pm 1,06 | 0,09 \pm 0,02 | - 17 \pm 0,78 | 4,57 \pm 0,11 |
| NC 0,025% Curcumina (0,25 mg/mL) | 160 \pm 0,78 | 0,12 \pm 0,02 | - 18,7 \pm 0,37 | 4,03 \pm 0,08 |

NC: nanocápsulas.

Tabela 3 – Leucograma e análise bioquímica de ovelhas suplementadas com curcumina em três diferentes formulações na dieta durante.

| Variável | Dia | Grupo A: controle | Grupo B: curcumina livre 30 mg/kg | Grupo C: nanocápsula PCL 3 mg/kg | Grupo D: nanocápsula eudragit 3 mg/kg | Valor P* |
|------------------------------------------------|-----|--------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------|----------|
| Leucócitos totais (x10 ³ /μL) | 0 | 5867 ± 1380 | 5600 ± 529 | 5100 ± 458 | 5000 ± 854 | 0,455 |
| | 8 | 5467 ± 1094 ^a | 5100 ± 849 ^a | 5233 ± 666 ^a | 4100 ± 608 ^b | 0,014 |
| Valor P ⁺ | | 0,568 | 0,412 | 0,698 | 0,001 | |
| Linfócitos (x10 ³ /μL) | 0 | 3069 ± 834 | 2910 ± 807 | 2735 ± 833 | 2513 ± 725 | 0,564 |
| | 8 | 3840 ± 1424 ^a | 2816 ± 1500 ^{ab} | 3013 ± 578 ^{ab} | 2301 ± 447 ^b | 0,001 |
| Valor P ⁺ | | 0,258 | 0,798 | 0,594 | 0,098 | |
| Neutrófilos (x10 ³ /μL) | 0 | 2469 ± 1139 | 2130 ± 287 | 2078 ± 492 | 2110 ± 294 | 0,540 |
| | 8 | 1470 ± 851 | 1860 ± 615 | 1918 ± 335 | 1575 ± 235 | 0,123 |
| Valor P ⁺ | | 0,235 | 0,462 | 0,781 | 0,042 | |
| Eosinófilos (x10 ³ /μL) | 0 | 92 ± 159 | 201 ± 9 | 99 ± 118 | 202 ± 244 | 0,652 |
| | 8 | 206 ± 51 ^{ab} | 294 ± 93 ^a | 153 ± 76 ^b | 164 ± 24 ^b | 0,002 |
| Valor P ⁺ | | 0,158 | 0,436 | 0,241 | 0,547 | |
| Monócitos (x10 ³ /μL) | 0 | 236 ± 95 | 279 ± 160 | 173 ± 186 | 175 ± 136 | 0,430 |
| | 8 | 194 ± 51 ^a | 131 ± 47 ^b | 149 ± 77 ^{ab} | 60 ± 69 ^c | 0,001 |
| Valor P ⁺ | | 0,369 | 0,241 | 0,693 | 0,001 | |
| Proteínas totais (g/dL) | 0 | 7 ± 0,5 | 6,8 ± 0,3 | 7,1 ± 0,5 | 7,1 ± 0,4 | 0,369 |
| | 8 | 6,9 ± 0,2 | 6,5 ± 0,3 | 6,7 ± 0,6 | 6,7 ± 0,3 | 0,541 |
| Valor P ⁺ | | 0,841 | 0,745 | 0,236 | 0,136 | |
| Albumina (g/dL) | 0 | 2,7 ± 0,1 | 2,4 ± 0,1 | 2,3 ± 0,6 | 2,6 ± 0,1 | 0,156 |
| | 8 | 2,5 ± 0,1 | 2,4 ± 0,1 | 2,5 ± 0,3 | 2,7 ± 0,3 | 0,087 |
| Valor P ⁺ | | 0,387 | 0,803 | 0,687 | 0,547 | |
| Globulinas (g/dL) | 0 | 4,3 ± 0,4 | 4,4 ± 0,3 | 4,8 ± 0,7 | 4,5 ± 0,4 | 0,257 |
| | 8 | 4,4 ± 0,2 ^a | 4,1 ± 0,3 ^{ab} | 4,2 ± 0,4 ^{ab} | 4,0 ± 0,1 ^b | 0,024 |
| Valor P ⁺ | | 0,287 | 0,368 | 0,075 | 0,001 | |

*P ≤ 0,05 difere entre grupos na mesma linha (letras diferentes na mesma linha mostra diferença entre grupos); +

P ≤ 0,05 mostra diferença ao longo do tempo (entre os momentos de coleta, do dia 0 para 8) em cada grupo.

Tabela 4 – Antioxidantes (SOD, CAT e GPx) mensurados em soro de ovelhas suplementadas com curcumina em três formulações distintas durante 7 dias.

| Variável | dia | Grupo A: controle | Grupo B: curcumina 30 mg/kg | Grupo C: nanocápsula PCL 3 mg/kg | Grupo D: nanocápsula Eudragit 3 mg/kg | Valor P* |
|-----------------------------------------|-----|------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------|-------------|
| SOD (U mg ⁻¹ de proteína) | 0 | 7,1 ± 1,0 | 7,1 ± 0,8 | 6,6 ± 1,7 | 6,0 ± 1,1 | 0,124 |
| | 8 | 6,9 ± 0,4 | 7,5 ± 1,0 | 7,4 ± 0,4 | 7,2 ± 0,7 | 0,769 |
| Valor P ⁺ | | 0,489 | 0,651 | 0,094 | 0,050 | |
| CAT (U mg ⁻¹ de proteína) | 0 | 0,8 ± 0,1 | 1,0 ± 0,2 | 1,1 ± 0,6 | 0,7 ± 0,2 | 0,258 |
| | 8 | 1,0 ± 0,7 ^c | 1,1 ± 0,2 ^{bc} | 4,4 ± 3,4 ^{ab} | 3,1 ± 0,9 ^a | 0,001 |
| Valor P ⁺ | | 0,568 | 0,854 | 0,065 | 0,001 | |
| GPx (U mg ⁻¹ de proteína) | 0 | 28,8 ± 11,3 | 22,9 ± 9,5 | 22,5 ± 8,4 | 19,2 ± 9,8 | 0,074 |
| | 8 | 28,8 ± 8,1 | 24,5 ± 8,6 | 24,2 ± 6,6 | 29,2 ± 6,4 | 0,254 |
| Valor P ⁺ | | 0,854 | 0,745 | 0,843 | 0,024 | |

*P ≤ 0,05 difere entre grupos na mesma linha (letras diferentes na mesma linha mostra diferença entre grupos);

⁺ P ≤ 0,05 mostra diferença ao longo do tempo, isto é, do dia 0 para 8 em cada grupo. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathiona peroxidase.

Tabela 5 – Análise centesimal do leite e produção total de ovelhas tratadas com três formulações contendo curcumina durante 7 dias.

| Variável | Dia | Grupo A: controle | Grupo B: curcumina 30 mg/kg | Grupo C: nanocápsula PCL 3 mg/kg | Grupo D: nanocápsula eudragit 3 mg/kg | Valor P* |
|----------------------|-----|----------------------|-----------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------|-------------|
| Produção (L) | 0 | 0,8 ± 0,2 | 1,0 ± 0,2 | 0,9 ± 0,1 | 0,8 ± 0,1 | 0,125 |
| | 8 | 1,1 ± 0,4 | 1,2 ± 0,1 | 1,0 ± 0,1 | 0,9 ± 0,1 | 0,072 |
| Valor P ⁺ | | 0,245 | 0,138 | 0,472 | 0,091 | |
| Gordura (g/100g) | 0 | 8,0 ± 0,4 | 7,2 ± 2,1 | 7,4 ± 2,5 | 8,1 ± 1,2 | 0,568 |
| | 8 | 7,2 ± 1,2 | 6,4 ± 0,2 | 6,6 ± 0,8 | 7,3 ± 1,5 | 0,187 |
| Valor P ⁺ | | 0,387 | 0,465 | 0,320 | 0,214 | |
| Proteína (g/100g) | 0 | 5,1 ± 0,4 | 5,5 ± 0,5 | 5,2 ± 0,5 | 4,7 ± 0,7 | 0,235 |
| | 8 | 5,1 ± 0,4 | 5,6 ± 0,2 | 5,4 ± 0,2 | 5,5 ± 0,3 | 0,745 |
| Valor P ⁺ | | 0,654 | 0,879 | 0,356 | 0,745 | |
| Lactose (g/100g) | 0 | 7,2 ± 1,0 | 6,6 ± 1,2 | 6,9 ± 1,1 | 7,4 ± 1,4 | 0,412 |
| | 8 | 7,1 ± 0,8 | 6,6 ± 0,40 | 6,4 ± 0,5 | 6,55 ± 0,61 | 0,354 |
| Valor P ⁺ | | 0,457 | 0,674 | 0,249 | 0,089 | |
| ESD (g/100g) | 0 | 13,5 ± 1,8 | 11,7 ± 2,1 | 12,2 ± 2,1 | 13,8 ± 3,4 | 0,198 |
| | 8 | 13,1 ± 1,5 | 11,3 ± 0,8 | 11,9 ± 0,8 | 12,1 ± 1,3 | 0,094 |
| Valor P ⁺ | | 0,845 | 0,896 | 0,745 | 0,814 | |

*P ≤ 0,05 difere entre grupos na mesma linha (letras diferentes na mesma linha mostra diferença entre grupos); + P ≤ 0,05 mostra diferença ao longo do tempo, isto é, do dia 0 para 8 em cada grupo. ESD: extrato seco desengordurado.

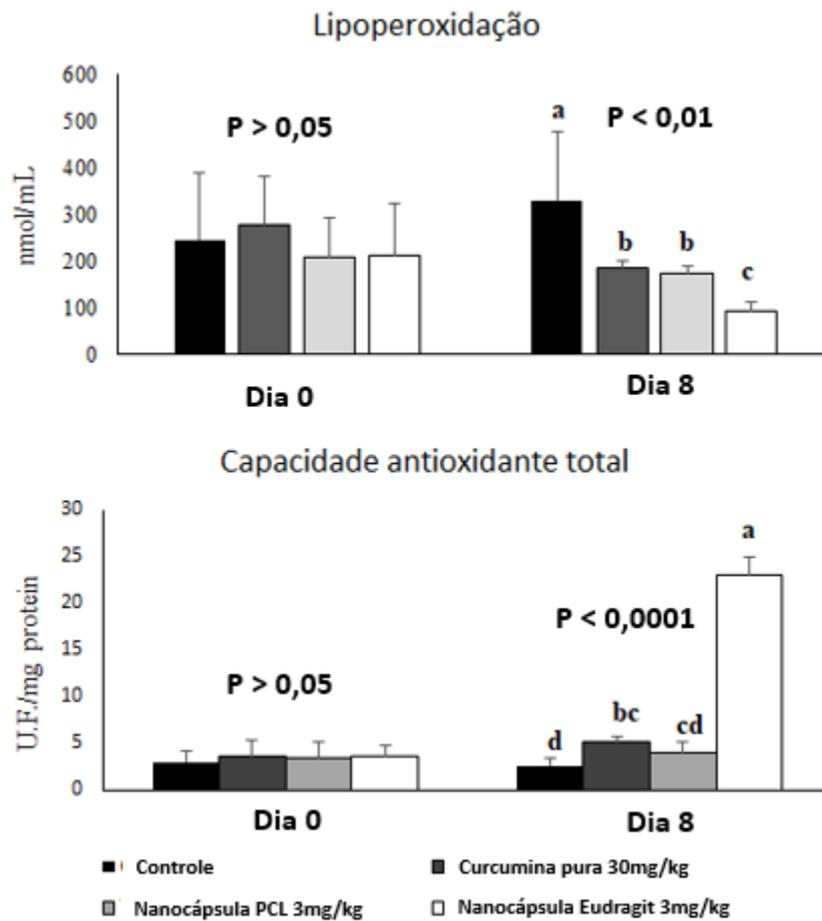


Figura 1. Lipoperoxidação (A) e capacidade antioxidante total – TAC (B) no soro de ovelhas leiteiras do grupo controle e suplementadas com: curcumina livre, nanocápsulas PCL e nanocápsulas de Eudragit L-100, durante 8 dias. Letras diferentes no mesmo dia de coleta diferem estatisticamente entre grupos.

2.3 – MANUSCRITO III

Addition of Curcumin in Dairy Sheep Diet in the Control of Subclinical Mastitis

Antonise Mariely Jaguezeski¹, Gessica Perin¹, Regiane Boaretto Crecencio¹, Matheus Dallamea Baldissera², Lenita Moura Stefani¹ & Aleksandro Schafer da Silva¹

De acordo com as normas para publicação em:

Acta Scientiae Veterinariae

Addition of Curcumin in Dairy Sheep Diet in the Control of Subclinical Mastitis

Antonise Mariely Jaguezeski¹, Gessica Perin¹, Regiane Boaretto Crecencio¹, Matheus Dallamea Baldissera², Lenita Moura Stefani^{1,3} & Aleksandro Schafer da Silva^{1,3}

¹ Graduate Program in Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC, Brazil. ² Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. ³ Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC, Brazil. CORRESPONDENCE: A.S. Da Silva [aleksandro.silva@udesc.br - Tel +55 (49) 2049-9560]. Departamento de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Rua Beloni Trombeta Zanini, 680E. Bairro Santo Antônio. CEP 89805-030, Chapecó, SC, Brazil.

ABSTRACT

Background: Curcumin, a polyphenol derived from rhizome of *Curcuma longa*, has been successfully used in animals and humans due to its antibacterial and anti-inflammatory properties. Recently, a study demonstrated that curcumin ointment reduced pain, mammary tension and erythema in humans with mastitis 72 h after the treatment. Mastitis in sheep is an important problem due to restrictions associated to the use of antibiotics, affecting milk production and becoming a public health issue. Thus, the aim of this study was to verify whether the addition of curcumin in the diet of six female sheep with subclinical mastitis could have curative efficacy and benefits to animal health.

Case: Six Lacaune sheep with subclinical mastitis that persisted for more than thirty days after the parturition were used. The animals received concentrate containing the curcumin (60 mg/animal/day) during 10 days. On days 0 and 10 of the experiment, total blood was collected to perform the hemogram and serum biochemistry (triglycerides, cholesterol, glucose, total protein (TP), albumin, globulin, aspartate aminotransferase (AST) and urea), as well as individual milk samples for centesimal composition, somatic cell count (SCC) and total bacterial count (TBC). Total leukocytes and erythrocytes, as well as hemoglobin content, were obtained using the hematological counter CELM-CC-550. Blood smears were stained by the Romanowsky method and used for leukocytes differentiation. After ten days of treatment, five sheep were negative in the *California mastitis test* (CMT). Total erythrocytes increased,

while total leukocytes decreased after the treatment. Seric levels of AST, triglycerides, cholesterol and globulins decreased, while seric levels of albumin and urea increased after ten days of treatment. No differences were observed regarding milk production and composition, as well as for SCC and TBC on days 0 and 10 post-treatment.

Discussion: The use curcumin to prevent or to delay the occurrence of subclinical mastitis in ewes is reported here for the first time. In an experiment of lipopolysaccharide-induced mastitis in rats, researchers identified receptors type Toll 4 which are related with the induction of the synthesis of pro-inflammatory cytokines, as tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and 1β , molecules involved in the migration of leukocytes to the site of inflammation. According to literature, curcumin was able to reduce the activity of myeloperoxidase in the mammary gland, an enzyme used as indicator of neutrophil infiltration, demonstrating the potent anti-inflammatory effect of curcumin. This effect can be associated to the release of interleukin-8, a cytokine that promotes the migration of neutrophils, lymphocytes and eosinophils into the site of infection, i.e., the mammary gland. It is important to highlight that neutrophils, due to its capacity to release inflammatory mediators and to delay apoptosis, has the potential to maintain a permanent inflammatory process, effects that were prevented or reduced by curcumin, specially the apoptotic and cytotoxic effects. It is important to emphasize the direct effect of curcumin on bacteria present in the mammary gland, since it exerts potent bactericidal effect. In summary, the use of curcumin in sheep with subclinical mastitis exerted beneficial effects in the dose of 60 mg/sheep/day, since it showed 83.3 % of curative efficacy. This effect of curcumin can be direct or indirect, since the curcumin provided in the diet showed anti-inflammatory properties by reducing oxidation reactions and cell damage. Overall, the addition of curcumin in sheep diet improved the hematological and biochemical variables after only ten days of treatment. Future studies should be performed to clarify and determine whether the curcumin provided in diet can be an alternative to treat clinical or subclinical mastitis.

Keywords: curcumin, mammary infection, immunity, biochemistry parameters, ovine.

INTRODUCTION

The production of sheep milk and milk products represent a significant source of income in the sheep industry. However, subclinical mastitis is the main issue associated with decreased milk quantity and quality [15], loss of cheese yield and rennet firmness, resulting in economic losses to farmers and dairy industries [18]. The prevalence of subclinical mastitis in

sheep varies from 9.23 to 28.1 % [8,15], being the coagulase-negative [15]. According to literature [21], tetracycline and aminoglycosides are the most commonly used antibiotics to combat mammary infections in sheep. However, the use of antibiotics in animals is restricted in several countries due to concerns regarding microbial resistance in animals and humans [9,19], leaving the euthanasia of sick animals as the only alternative. As a consequence, the use of natural compounds in the diet of these animals has gained importance due to their beneficial effects associated to the improvement of animal health and disease resistance, as the use of curcumin [7].

Curcumin, a polyphenol derived from rhizome of *Curcuma longa*, has been successfully used in animals and humans due to its antibacterial and anti-inflammatory properties [14, 27, 33]. Recently, a study demonstrated that curcumin ointment reduced pain, mammary tension and erythema in humans with mastitis 72 h after the treatment [1]. Also, in experimental procedures, the use of curcumin reduced the inflammatory process in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice [14]. Therefore, the aim of this study was to evaluate the addition of curcumin in the diet of six female sheep with subclinical mastitis regarding its curative effect and benefits to animal health.

CASE REPORT

Six Lacaune sheep (multiparous with two to four gestations) diagnosed with subclinical mastitis of a dairy farm located in Southern Brazil were used in this study. Subclinical mastitis was diagnosed using the *California Mastitis Test* (CMT) in the first days after parturition before milking, and the animals remained positives for 31 days. The animals were not treated with antibiotics, since in this farm positive animals are discarded to avoid milk drug residue. After the diagnosis, the animals were transferred to isolated stalls (4 m x 10 m) with straw bedding, water *ad libitum* and individual feeding based on corn silage twice a day. In the beginning of the experiment, the animals were fed with a concentrate (300 g/sheep) containing curcumin (200 mg/kg of ration = 60 mg/curcumin/day) once a day during 10 consecutive days in individual feeders. The concentrate was based on corn and wheat bran in order to obtain 16 % of crude protein, while the curcumin¹ (99 % of purity) was purchased from China. Physical examination with special attention to the mammary glands, was performed in the beginning of the experiment (day 0) and on day 10. None of the animals showed hyperthermia, swelling or deformities in the mammary gland, which characterize the occurrence of subclinical mastitis when associated to positive CMT test. On days 0 and 10,

the CMT was performed based on the protocol established by two authors [28], being considered positive if any gelatinous formation was observed after reagent addition.

The quantity of milk produced per sheep was evaluated on days 0 and 10 of the experiment using the Milk Meter² coupled to a mechanical milking pipe. Teats were cleaned and disinfected with alcohol (70 %), and the first three milk jets were discarded, followed by manual collection of milk (50 mL) in sterile and individual bottles for bacterial total count (TBC). For the centesimal analysis and somatic cell count (SCC), 40 mL of milk was collected and stored in tubes containing bronopol. Blood sampling was performed on days 0 and 10 of the experiment right before feeding by jugular venipuncture in tubes containing EDTA as anticoagulant (4 mL) and in tubes without anticoagulant (4 mL). The total blood collected in tubes without anticoagulant was centrifuged at 5600 g during 10 min, and serum was stored in microtubes at – 20 °C.

The content of fat, protein, lactose, defatted dry extract (DDE), total dry extract (TDE) and SCC was performed by an accredited laboratory using the infrared method according the methodologies defined by the International Dairy Federation (IDF), while the SCC was performed using flow cytometry. For TBC analyses, 1 mL of each milk sample was serially diluted using buffered peptone water (1 %) and 1 mL of each dilution was *pour plated* using Plate Count Agar (PCA), followed by incubation at 37 °C for 48 h. The result was expressed as the number of bacterial colony forming unit (CFU).

Total leukocytes and erythrocytes, as well as hemoglobin content, were obtained using the hematological counter³. Blood smears were stained by the Romanowsky method and used for leukocytes differentiation. The globular volume (GV), as well as the mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin (MCH), were calculated based on the count of erythrocytes and hemoglobin content, as follows: ($MCV = GV \times 10 / \text{erythrocytes}$); ($MCH = \text{hemoglobin} \times 100 / GV$). The seric levels of triglycerides, cholesterol, glucose, total protein (TP), albumin, aspartate aminotransferase (AST) and urea were measured in a semi-automatic analyzer⁴ using specific kits⁵ and following the manufacturer's recommendations. Globulin values were obtained by the difference between TP and albumin.

Milk production, composition and quality, as well as hematological and biochemical data were submitted to normality test, and when were not normally distributed, were transformed to logarithm. The Student *t*-test was used to compare the difference between days 0 and 10, considering the probability of $P \leq 0.05$. The results were shown as mean and standard deviation.

Milk volume of treated animals increased approximately 0.1-0.4 L/sheep/day (Figure 1), as well as observed for fat, protein, lactose, DDE, TDE, SCC and TBC (Table 1). After ten days of treatment, five sheep were negative in the CMT test, thus, only 1 sheep remained positive for subclinical mastitis.

In the beginning of study (day 0), total leukocytes was higher compared to reference values, but reduced after curcumin ingestion, which can be directly linked with a reduction on the total count of segmented neutrophils, lymphocytes and eosinophils. On the day 0, total erythrocytes was lower compared to reference value, but increased on day 10. The MCH index increased, while the MCV index reduced after the addition of curcumin in the diet (Table 2). Seric levels of AST, globulins, albumin, cholesterol, triglycerides and urea changed in curcumin treated animals (Table 2). Seric AST activity, as well as globulin and triglycerides levels decreased, while seric levels of albumin and urea increased on day 10 compared to day 0 (Table 2).

DISCUSSION

In an experiment of lipopolysaccharide-induced mastitis in rats, researchers identified receptors type Toll 4 (TLR4), which are related with the induction of the synthesis of pro-inflammatory cytokines, as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and IL-1 β , molecules involved in the migration of leukocytes to the site of inflammation [20]. The curcumin was able to reduce the activity of myeloperoxidase (MPO) in the mammary gland [35], an enzyme used as indicator of neutrophil infiltration, demonstrating the potent anti-inflammatory effect of curcumin [14]. This effect can be associated to the release of IL-8, a cytokine that promotes the migration of neutrophils, lymphocytes and eosinophils into the site of infection, i.e., the mammary gland [12, 32]. Also, other studies have demonstrated that curcumin is able to block the activation of enzymes linked to the release and proliferation of neutrophils, as cyclooxygenase and phospholipases [16, 29]. It is important to highlight that neutrophils, due to its capacity to release inflammatory mediators and to delay apoptosis, has the potential to maintain a permanent inflammatory process [10, 34], effects that were prevented or reduced by curcumin, especially the apoptotic and cytotoxic effects [3]. These mechanisms can explain the decrease on total leukocyte counts, as well as the numeric decrease on SCC in most animals (n=4). Moreover, it is important to emphasize the direct effect of curcumin on bacteria present in the mammary gland, since it exerts potent

bactericidal effect [7, 33], contributing to the reduction of the inflammatory process, as occurred in this present study.

Due to the improvement of sheep health, all animals showed a numerical increase on milk volume (Figure 1). This result is important and reinforces the possibility to use curcumin to prevent or to delay the occurrence of subclinical mastitis, since affected animals showed a reduction on performance and consequently important economic losses to milk farms [15]. However, according to researchers [1], increased of milk TBC may not coincide with the clinical manifestation of subclinical mastitis. In this sense, the use of curcumin associated to other natural products may cause a reduction on TBC in milk of cows with subclinical mastitis [9], and in higher doses curcumin improved immunological response [26] and showed anticoccidian effect in lambs [11]. In summary, higher doses or a more prolonged period of treatment with curcumin may reduce TBC and SCC.

The use of curcumin caused a reduction on seric levels of triglycerides and cholesterol, in agreement with literature [5, 26]. Recently, the use of curcumin was associated with positive effects due to its hypocholesterolemic effects by a reduction on total cholesterol and low-density lipoprotein (LDL) levels, and increase on high-density lipoprotein (HDL) levels, being these results related to the inhibition of enzyme 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA reductase (HMG-CoA reductase) activity [31]. The use of curcumin in rats with renal damage exerted effect on the reduction of urea and creatinine levels [6], in disagreement to what was observed in this present study. This data may not be linked with curcumin, but with the addition of 300 g of concentrate in the diet (feed not present in the diet before the beginning of experiment), which caused an increase in the synthesis and degradation of proteins, and consequently, increased on albumin and urea levels by metabolic pathways, respectively. Moreover, it is important to emphasize that curcumin avoids the augmentation of AST and alanine aminotransferase (ALT) seric levels in rats intoxicated with lead, demonstrating its hepatoprotective properties. In our study, the seric ASAT levels decreased, and remained within the reference values in both sampling times [13].

The consumption of a diet supplemented with curcumin was able to decrease seric globulin levels, as well as observed for total leukocyte count. A study verified that curcumin reduced seric levels of C-reactive protein (CRP) [31], an important inflammatory biomarker produced during acute inflammation [23], infection and tissue damage [25], which may explain the reduction on seric globulin levels in sheep with subclinical mastitis that received curcumin. Moreover, *in vitro* studies proved the inhibitory effects of curcumin on the

proliferation of T helper lymphocytes and immunoglobulin IgG [30], which also explain the reduction on seric globulin levels.

The increase on erythrocyte count and MCH index, and the decrease on MCV index, can be linked with indirect effects of curcumin and/or due to the improvement of immune response and inflammatory process. It is important to emphasize that antioxidant enzymes, as catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST) were increased in erythrocytes of in animals treated with curcumin [22]. These antioxidants enhance cellular protection and avoid oxidative damage in cell membranes [22, 24], which can contribute to augmentation on erythrocyte counts observed in this present study.

The use of curcumin in sheep with subclinical mastitis exerted beneficial effects in the dose of 60 mg/sheep/day, since it showed 83.3 % of curative efficacy. This effect of curcumin can be direct or indirect, since the curcumin provided in the diet showed anti-inflammatory properties by reducing oxidation reactions and cell damage [2, 4]. Overall, the addition of curcumin in sheep diet improved the hematological and biochemical variables after only ten days of treatment. Future studies should be performed to clarify and determine whether the curcumin provided in diet can be an alternative to treat clinical or subclinical mastitis.

MANUFACTURERS

¹ Shanxii Jiahe Phytochem. Co. Ltda. Xangain, China.

² Openway Ordenhadeiras. Caxias do Sul, RS, Brazil.

³ Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos. Barueri, SP, Brazil.

⁴ Bioplus Produtos para Laboratórios Ltda. Barueri, SP, Brazil.

⁵ Gold Analisa Diagnóstica Ltda. Belo Horizonte, MG, Brazil.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Acknowledgements. We thank The Scientific and Technological Research Support Foundation of Santa Catarina State (FAPESC) for supporting this study and for granting a scholarship to the first author.

REFERENCES

- 1 Afshariani R., Farhadi P., Ghaffarpassand F. & Roozbeh J. 2014.** Effectiveness of topical curcumin for treatment of mastitis in breastfeeding women: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Oman Medical Journal*. 29(5): 330-334.
- 2 Alvarenga L.A., Leal V.O., Borges N.A., Aguiar A.S., Faxén-Irving G., Stenvinkel P. & Mafra D. 2018.** Curcumin - A promising nutritional strategy for chronic kidney disease patients. *The Journal of Functional Foods*. 40(4): 715-721.
- 3 Antoine F., Simard J.C. & Girard D. 2013.** Curcumin inhibits agent-induced human neutrophil functions in vitro and lipopolysaccharide-induced neutrophilic infiltration in vivo. *International Immunopharmacology*. 17(4): 1101-1107.
- 4 Aparicio-Trejo O.E., Tapia E., Molina-Jijón E., Medina-Campos O. N., Macías-Ruvalcaba N. A., León-Contreras J. C., Hernández-Pando R., García-Arroyo F.E., Cristóbal M., Sánchez-Lozada L.G. & Pedraza-Chaverri J. 2017.** Curcumin prevents mitochondrial dynamics disturbances in early 5/6 nephrectomy: Relation to oxidative stress and mitochondrial bioenergetics. *Biofactors*. 43(2): 293-310.
- 5 Arshami J., Pilevar M., Azghadi M.A. & Raji A.R. 2013.** Hypolipidemic and antioxidative effects of curcumin on blood parameters, humoral immunity, and jejunum histology in Hy-line hens. *Avicenna Journal of Phytomedicine*. 3(2): 178-185.
- 6 Bahram A.T., Daryoush M., Yousef D. & Saeid S. 2011.** Protective effect of turmeric (*Curcuma longa* linn.) Powder on early diabetic nephropathy in rats. *Advances in Environmental Biology*. 5(7): 946-951.
- 7 Baldissera M.D., Souza C.F., Zeppenfeld C.C., Descovi S., Machado V.S., Santos R.C.V. & Baldisserotto B. 2018.** Efficacy of dietary curcumin supplementation as bactericidal for silver catfish against *Streptococcus agalactiae*. *Microbial Pathogenesis*. 116(2): 237-240.
- 8 Beheshti R., Shaieghi J., Eshratkhah B., Ghalehkandi J.G. & Maheri-Sis N. 2010.** Prevalence and etiology of subclinical mastitis in ewes of the Tabriz region, Iran. *Global veterinaria*. 4(3): 299-302.
- 9 Bhatt V., Shah T., Nauriyal D., Kunjadia A. & Joshi C. 2014.** Evaluation of a topical herbal drug for its *in-vivo* immunomodulatory effect on cytokines production and antibacterial

activity in bovine subclinical mastitis. *An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda*. 35(2): 198-206.

10 Cascao R., Rosário H.S., & Fonseca J.E. 2009. Neutrophils: warriors and commanders in immune mediated inflammatory diseases. *Acta Reumatológica Portuguesa*. 34(2): 313–326.

11 Cervantes-Valencia M.E., Alcalá-Canto Y., Sumano-Lopez H., Ducoing-Watty A.M. & Gutierrez-Olvera L. 2016. Effects of *Curcuma longa* dietary inclusion against *Eimeria* spp. in naturally-infected lambs. *Small Ruminant Research*. 136(1): 27-35.

12 Erger R.A. & Casale T.B. 1995. Interleukin-8 is a potent mediator of eosinophil chemotaxis through endothelium and epithelium. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 268(1): 117-122.

13 Feldman B.F., Zinkl J.G. & Jain C.N. 2000. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed. San Diego: Academic Press, pp. 932.

14 Fu Y., Gao R., Cao Y., Guo M., Wei Z., Zhou E. & Zhang N. 2014. Curcumin attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4-mediated NF-κB signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. *International Immunopharmacology*. 20(1): 54-58.

15 Gebrewahid T.T., Abera B.H. & Menghistu H.T. 2012. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in small ruminants of Tigray regional State, north Ethiopia. *Veterinary World*. 5(2): 103-109.

16 Huang M.T., Ghai G. & Ho C.T. 2004. Inflammatory process and molecular targets for antiinflammatory nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3(4): 127-139.

17 Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press. pp. 974.

18 Leitner G., Merin U. & Silanikove N. 2011. Effects of glandular bacterial infection and stage of lactation on milk clotting parameters: Comparison among cows, goats and sheep. *International Dairy Journal*. 21(4): 279-285.

19 Lollai S.A., Ziccheddu M., Duprè I. & Piras D. 2016. Characterization of resistance to tetracyclines and aminoglycosides of sheep mastitis pathogens: study of the effect of gene content on resistance. *Journal of Applied Microbiology*. 121(4): 941-951.

- 20 Lu Y.C., Yeh W.C. & Ohashi P.S. 2008.** LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 42(1): 145-151.
- 21 Marogna G., Rolesu S., Lollai S., Tola S. & Leori G. 2010.** Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. *Small Ruminant Research*. 88(2): 119-125.
- 22 Messarah M., Amamra W., Boumendjel A., Barkat L., Bouasla I., Abdennour C., Boulakoud M.S. & Feki A.E. 2013.** Ameliorating effects of curcumin and vitamin E on diazinon-induced oxidative damage in rat liver and erythrocytes. *Toxicology and Industrial Health*. 29(1): 77-88.
- 23 Mold C., Gewurz H. & Du Clos T.W. 1999.** Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology*. 42: 23-30.
- 24 Morabito R., Romano O., La Spada G. & Marino A. 2016.** H₂O₂-induced oxidative stress affects SO₄⁼ transport in human erythrocytes. *PLoS one*. 11(1): e0146485.
- 25 Pepys M.B. & Hirschfield G.M. 2003.** C-reactive protein: a critical update. *The Journal of Clinical Investigation*. 111(12): 1805-1812.
- 26 Pungcharoenkul K. & Thongnoppua P. 2011.** Effect of different curcuminoid supplement dosages on total *in vivo* antioxidant capacity and cholesterol levels of healthy human subjects. *Phytotherapy Research*. 25(10): 1721–1726.
- 27 Sarkar A., De R. & Mukhopadhyay A.K. 2016.** Curcumin as a potential therapeutic candidate for Helicobacter pylori associated diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 22(9): 2736.
- 28 Schalm O.W. & Noorlander D.O. 1957.** Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 130(5): 199-204.
- 29 Sharma R.A., Gescher A.J. & Steward W.P. 2005.** Curcumin: the story so far. *European Journal of Cancer*. 41(13): 1955-1968.
- 30 Sharma S., Chopra K., Kulkarni S.K. & Agrewala J.N. 2007.** Resveratrol and curcumin suppress immune response through CD28/CTLA-4 and CD80 co-stimulatory pathway. *Clinical & Experimental Immunology*. 147(1): 155-163.

- 31 Shin S.K., Ha T.Y., McGregor R.A. & Choi M.S. 2011.** Long-term curcumin administration protects against atherosclerosis via hepatic regulation of lipoprotein cholesterol metabolism. *Molecular Nutrition & Food Research*. 55(12): 1829-1840.
- 32 Taub D.D., Anver M., Oppenheim J.J., Longo D.L. & Murphy W.J. 1996.** T lymphocyte recruitment by interleukin-8 (IL-8). IL-8-induced degranulation of neutrophils releases potent chemoattractants for human T lymphocytes both in vitro and in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*. 97(8): 1931-1941.
- 33 Teow S.Y., Liew K., Ali S.A., Khoo A.S.B. & Peh S.C. 2016.** Antibacterial action of curcumin against *Staphylococcus aureus*: a brief review. *Journal of Tropical Medicine*. 2853045.
- 34 Wright H.L., Moots R.J., Bucknall R.C. & Edwards S.W. 2010.** Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology*. 49(10): 1618–1631.
- 35 Zhu W., Gu B., Miao J., Lu J. & Zou S. 2011.** Dectin1 activation of β -(1-3)/(1-6)-d-glucan produces an anti-mastitis effect in rats. *Inflammation Research*. 60(10): 937.

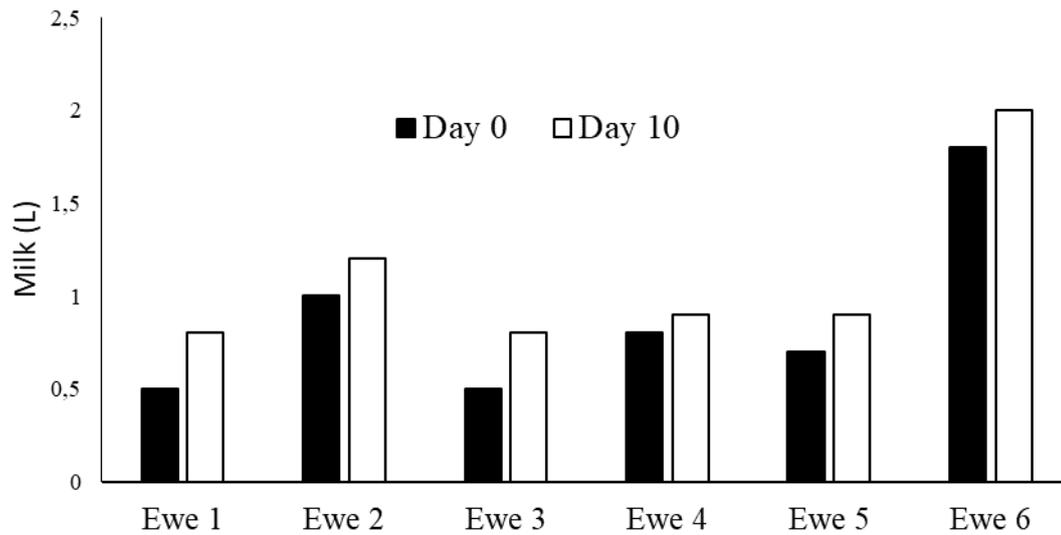


Figure 1: Individual milk production of six ewes with subclinical mastitis supplemented with curcumin during ten consecutive days. No significant difference was observed between day 0 and 10); however, numerically it is possible to verify that milk production increased with the addition of concentrate and curcumin in the diet. Sheep 6 was positive in the *California mastitis test* (CMT) after ten days of treatment.

Table 1: Sheep milk production, composition and bacterial count after 0 and 10 days of curcumin dietary supplementation (60 mg/animal/day).

| Variable | Day 0 | Day 10 | P |
|--------------------|----------------|---------------|-------|
| Production (L/day) | 0.88 ± 0.33 | 1.08 ± 0.47 | >0.05 |
| Fat (g/100g) | 7.32 ± 1.69 | 7.81 ± 1.19 | >0.05 |
| Protein (g/100g) | 4.70 ± 0.40 | 4.88 ± 0.33 | >0.05 |
| Lactose (g/100g) | 4.35 ± 0.24 | 4.38 ± 0.17 | >0.05 |
| TDE (g/100g) | 17.36 ± 1.77 | 17.95 ± 1.11 | >0.05 |
| DDE (g/100g) | 10.04 ± 0.32 | 10.11 ± 0.34 | >0.05 |
| SCC (x1000/mL) | 1094.1 ± 779.4 | 836.0 ± 601.3 | >0.05 |
| TBC (CFU/mL) | 449.1 ± 685.1 | 396.1 ± 664.3 | >0.05 |

Results are shown as mean and standard deviation. Note: TTE (total dry extract), DDE (defatted dry extract), SCC (somatic cell count) and TBT (total bacterial count).

Table 2: Hemogram and serum biochemistry of sheep with mastitis after 0 and 10 days of curcumin dietary supplementation (60 mg/animal/day).

| Variable | Reference values | Day 0 | Day 10 | P |
|--------------------------------------------------|------------------|---------------|--------------|-------|
| GV (%) ¹ | 27 - 45 | 30.6 ± 4.1 | 31.6 ± 3.8 | >0.05 |
| Erythrocytes (x10 ⁶ /μL) ¹ | 9.0 – 15.0 | 8.6 ± 1.7 | 11.5 ± 0.9 | <0.05 |
| Hemoglobin (g/dL) ¹ | 9.0 – 15.0 | 9.23 ± 1.21 | 10.4 ± 1.8 | >0.05 |
| MCV (fl) ¹ | 28 - 40 | 33.07 ± 4.7 | 27.4 ± 1.7 | <0.05 |
| MCH (%) ¹ | 31 - 34 | 29.9 ± 0.89 | 32.8 ± 2.14 | <0.05 |
| Total leukocytes (μL) ¹ | 4000 – 12000 | 39116 ± 24499 | 10341 ± 3791 | <0.05 |
| Rods (μL) ¹ | Rare | 0.0 ± 0.0 | 67.5 ± 80.7 | >0.05 |
| Segmented neutrophils (μL) ¹ | 700 - 6000 | 19147 ± 12687 | 4734 ± 1654 | <0.05 |
| Lymphocytes (μL) ¹ | 2000 - 9000 | 14101 ± 7108 | 4167 ± 1850 | <0.05 |
| Monocytes (μL) ¹ | 0 - 750 | 2818 ± 2597 | 947 ± 320 | >0.05 |
| Eosinophils (μL) ¹ | 0 - 1000 | 3100 ± 2416 | 425 ± 478 | <0.05 |
| Basophiles (μL) ¹ | 0 - 300 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | >0.05 |
| AST (UI/L) ² | 0 - 90 | 47.4 ± 7.8 | 36.8 ± 2.7 | <0.05 |
| Total protein (g/dL) ² | 6.0 – 7.9 | 7.66 ± 0.36 | 7.26 ± 0.64 | >0.05 |
| Albumin (g/dL) ² | 2.4 – 3.0 | 1.93 ± 0.41 | 2.4 ± 0.4 | <0.05 |
| Globulins (g/dL) ² | 3.5 – 5.7 | 5.73 ± 0.56 | 4.86 ± 0.67 | <0.05 |
| Cholesterol (mg/dL) ² | 52 – 76 | 70.6 ± 19.3 | 68.6 ± 19.1 | >0.05 |
| Triglycerides (mg/dL) | w/d | 25.1 ± 6.4 | 17.6 ± 3.6 | <0.05 |
| Glucose (mg/dL) ² | 50 – 80 | 82.3 ± 15.3 | 70.8 ± 10.8 | >0.05 |
| Urea (mg/dL) ² | 17.12 – 42.8 | 22.0 ± 5.38 | 29.3 ± 6.4 | <0.05 |

Results are shown as mean and standard deviation. Note: GV (globular volume), MCV (mean corpuscular volume), MCH (mean corpuscular hemoglobin), and AST (Aspartate aminotransferase). ¹ Feldman et al. [13];

²Kaneko et al. [17]; w/d = without data in the literature.

3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ovinocultura de leite detém um potencial grande de exploração e melhorias zootécnicas, uma vez que se trata de um setor onde predominam pequenas e médias propriedades, e que carece de legislação e padronização das atividades. Além disso, todos os estudos que busquem melhorar a saúde dos animais, cura de patologias de alto impacto econômico tais como a mastite subclínica, ou ainda a melhoria dos produtos ovinos, agregando valor nutricional e econômico podem ser alvos de interesse.

A curcumina, produto fitoterápico, demonstrou ser benéfico na saúde e performance do leite ovino, e por ser um nutracêutico natural, além disso, diversos estudos sugerem que o consumo humano diário de curcumina possa prevenir doenças. Utilizada em dose baixa, de maneira prática pela aplicação via oral junto ao concentrado, pode facilmente ser implementado nas dietas de ovelhas leiteiras, conforme verificamos nesse estudo.

O uso de curcumina na forma de nanocápsulas é alvo de estudo na medicina humana, veterinária e produção animal, visto que melhora em grandes proporções o aproveitamento e utilização do princípio ativo pelos tecidos. O uso em ruminantes torna-se mais desafiador ainda perante outras espécies, uma vez que as peculiaridades anatômicas e fisiológicas tornam facilmente inativas ou modificam substâncias e fármacos por via oral. Nesse estudo, as vantagens do uso de nanotecnologia na produção animal podem ir além do esperado no tangente de benefícios e potencializar de ganhos produtivos, pois a sanidade é, assim como a nutrição e melhoramento genético, um pilar essencial no sucesso da produção animal.

O uso de curcumina, eficiente antibiótico, antioxidante e anti-inflamatório no tratamento de patologias inflamatórias e infecciosas acarreta em impacto altamente positivo, uma vez que a produção animal restringe amplamente os antibióticos a serem utilizados, por ser crescente a resistência a estes por microorganismos patogênicos. Estudos futuros deverão buscar avaliar a taxa de partículas de Eudragites que ultrapassam os compartimentos estomacais dos ruminantes, além de verificar se estes seriam alterados pela flora ruminal, ocasionando em não aumento produtivo por alteração da digestibilidade ou ácidos graxos voláteis, mas sim pela melhor absorção e biodisponibilidade na circulação. Estudos que avaliem a toxicidade de super dosagens também devem ser feitas, uma vez que se tem relatos de que ocorrem em elevada ingestão por determinado período de curcumina.

Por fim, o ganho científico desses dados poderá ser vastamente explorado para novos

estudos de âmbito científico bem como na aplicação prática à ovinocultura leiteira, seja melhorando a saúde dos rebanhos, seja contribuindo na performance produtiva, além de oferecer lácteos com propriedades melhoradas ao consumo humano.

De modo geral podemos concluir que o uso de curcumina como aditivo na dieta de ovelhas leiteiras é benéfico a saúde dos animais e do úbere, qualidade e produção leiteira, ativa e aumenta antioxidante e ação anti-inflamatória. Outra conclusão importante é que a nanotecnologia foi capaz de potencializar os efeitos da curcumina na dieta de ovelhas, permitindo que doses baixas em nanocápsulas do polímero eudragit aumentem drasticamente os níveis de antioxidantes no sangue dos animais.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, B. B., KUMAR, A., BHARTI, A. C. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. **Anticancer research**, v. 23, n. 1/A, p. 363-398, 2003.
- AKBIK, D., GHADIRI, M., CHRZANOWSKI, W., ROHANIZADEH, R. Curcumin as a wound healing agent. **Life sciences**, v. 116, n. 1, p. 1-7, 2014.
- AKINYEMI, A. J., ONYEBUEKE, N., FABOYA, O. A., ONIKANNI, S. A., FADAKA, A., OLAYIDE, I. Curcumin inhibits adenosine deaminase and arginase activities in cadmium-induced renal toxicity in rat kidney. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 2, p. 438-446, 2017.
- ALMEIDA AVARENGA, L. DE, LEAL, V. DE O., BORGES, N. A., AGUIAR, A. S. DE, FARÉX-IRVING, G., STENVINKEL, P., LINDHOLM, B., MAFRA, D. Curcumin - A promising nutritional strategy for chronic kidney disease patients. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 715-721, 2018.
- ANTON, N., BENOIT, J. P., SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—a review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185-199, 2008.
- BAGCHI, A. Extraction of curcumin. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology** v. 1., n. 3., p. 01-16, 2012.
- BAIN, I. **Elaboración de quesos artesanales con leche de oveja**. IDIA XXI – Ovinos. Año IV, No. 7. Ed. INTA. p. 208-211, 2004.
- BEHESHTI, R., SHAIKHI, J., ESHRATKHAH, B., GHALEHKANDI, J. G., MAHERI-SIS, N. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in ewes of the Tabriz region, Iran. **Global veterinaria**, v.4, n. 3, p. 299-302, 2010.
- BERGONIER, D., DE CRÉMOUX, R., RUPP, R., LAGRIFFOUL, G., BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Reseach**. v. 34, n. 5, p. 689-716, 2003.
- BHATT, V., SHAH, T., NAURIYAL, D., KUNJADIA, A., JOSHI, C. Evaluation of a topical herbal drug for its in-vivo immunomodulatory effect on cytokines production and

antibacterial activity in bovine subclinical mastitis. **Journal of Research in Ayurveda**. v. 35, p. 198-206, 2014.

BHATT, V., SHAH, T., NAURIYAL, D., KUNJADIA, A., JOSHI, C. Evaluation of a topical herbal drug for its in-vivo immunomodulatory effect on cytokines production and antibacterial activity in bovine subclinical mastitis. **AYU**, v. 35, n. 2, p.198, 2014.

BIANCHI, A. E., MONTEIRO, A. L. G. MORAIS, O. R., BATISTA, R., DEBORTOLI, E. C. **Caracterização dos sistemas produtivos de ovinos de leite no Brasil**. Dados prévios de tese de doutorado. Radar Técnico - Ovinos e Caprinos – MilkPoint, 2016.

BLAGITZ, M. G., BATISTA, C. F., GOMES, V., SOUZA, F. N., LIBERA, A. M. M. P. D. Características físico-químicas e celularidade do leite de ovelhas Santa Inês em diferentes estágios de lactação. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, p. 454-461, 2013.

BOROWIEC, A., LECHWARD, K., TKACZ-STACHOWSKA, K., SKLADANOWSKI, A. C. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta Biochimica Polonica-English Edition-**, v. 53, n. 2, p. 269, 2006.

BRITO, M. A.; GONZÁLEZ, F. D.; RIBEIRO, L. A.; CAMPOS, R.; LACERDA, L.; BARBOSA, P. R.; BERGMANN, R. Composição do sangue e do leite em ovinos leiteiros do sul do Brasil: variações na gestação e na lactação. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 942-948, 2006.

CABONI, P., MANIS, C., IBBA, I., CONTU, M., CORONEO, V., SCANO, P. Compositional profile of ovine milk with a high somatic cell count: A metabolomics approach. **International Dairy Journal**, v. 69, p. 33-39, 2017.

CASA DA OVELHA. Disponível em <<https://www.casadaovelha.com.br/>>. Acesso em: 06 de janeiro de 2018.

CERVANTES-VALENCIA, M. E., ALCALÁ-CANTO, Y., SUMANO-LOPEZ, H., DUCOING-WATTY, A. M., GUTIERREZ-OLVERA, L. Effects of *Curcuma longa* dietary inclusion against *Eimeria* spp. in naturally-infected lambs. **Small Ruminant Research**, v. 136, p. 27-35, 2016.

CHAMBERLIN, S. R., OBERG, E., HANES, D. A., & CALABRESE, C. Naturopathic Practice at North American Academic Institutions: description of 300,483 visits and comparison to conventional primary care. **Integrative medicine insights**, v. 9, p. 7, 2014.

CHANG, Y., MCCLEMENTS, D. J. Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 10, p. 2306-2312, 2014.

CHATTOPADHYAY, I., BISWAS, K., BANDYOPADHYAY, U., BANERJEE, R. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. **Current Science**. V. 87, n. 1., p. 44–53, 2004.

CHIARADIA, E., VALIANI, A., TARTAGLIA, M., SCOPPETTA, F., RENZONE, G., ARENA, S., SCALONI, A. et al. Ovine subclinical mastitis: Proteomic analysis of whey and milk fat globules unveils putative diagnostic biomarkers in milk. **Journal Genomics Proteomics**, v. 83, p. 144-159, 2013.

DE OLIVES, A. M., DÍAZ, J. R., MOLINA, M. P., PERIS, C. Quantification of milk yield and composition changes as affected by subclinical mastitis during the current lactation in sheep. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 12, p. 7698-7708, 2013.

EL-BAHR, S.M. Effect of curcumin on hepatic antioxidant enzymes activities and gene expressions in rats intoxicated with aflatoxin B1. **Phytotherapy research**, v. 29, n. 1, p. 134-140, 2015.

FANG, Z., BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols — A review. **Trends in Food Science and Technology**. v. 21, n. 10, p. 510-523, 2010.

FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2011. Disponível em: <[http:// www.fao.org/faostat/en/](http://www.fao.org/faostat/en/)>. Acesso em: 06 de janeiro de 2018.

FARINACCI, M., COLITTI, M., STEFANON, B. Modulation of ovine neutrophil function and apoptosis by standardized extracts of *Echinacea angustifolia*, *Butea frondosa* and *Curcuma longa*. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 366-373, 2009.

FATTORI, V., PINHO-RIBEIRO, F.A., BORGHI, S.M., ALVES-FILHO, J.C., CUNHA, T.M., CUNHA, F.Q., CASAGRANDE, R., VERRI, W.A. Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by increasing Nrf2 expression and reducing NF- κ B activation. **Inflammation Research**, v. 64, n. 12, p. 993-1003, 2015.

FLACHOWSKY, G., MEYER, U. Challenges for plant breeders from the view of animal nutrition. **Agriculture**, v. 5, n. 4, p. 1252-1276, 2015.

GARCÍA-NIÑO, W. R., PEDRAZA-CHAVERRÍ, J. Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. **Food and chemical toxicology**, v. 69, p. 182-201, 2014.

GARCÍA-NIÑO, W. R., PEDRAZA-CHAVERRÍ, J. Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. **Food and chemical toxicology**, v. 69, p. 182-201, 2014.

GARCÍA-NIÑO, W. R., ZATARAIN-BARRÓN, Z. L., HERNÁNDEZ-PANDO, R., VEGA-GARCÍA, C. C., TAPIA, E., PEDRAZA-CHAVERRI, J. Oxidative stress markers and histological analysis in diverse organs from rats treated with a hepatotoxic dose of Cr (VI): effect of curcumin. **Biological trace element research**, v. 167, n. 1, p. 130-145, 2015.

GEBREWAHID, T. T., ABERA, B. H., MENGHISTU, H. T. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in small ruminants of Tigray regional State, north Ethiopia. **Veterinary World**, v. 5, n. 2, p. 103-109, 2012.

GÓMEZ-ESTACA, J., GAVARA, R., HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. Encapsulation of curcumin in electrosprayed gelatin microspheres enhances its bioaccessibility and widens its uses in food applications. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, p. 302-307, 2015.

GONZÁLEZ-REYES, S., GUZMÁN-BELTRÁN, S., MEDINA-CAMPOS, O. N., PEDRAZA-CHAVERRI, J. Curcumin pretreatment induces Nrf2 and an antioxidant response and prevents hemin-induced toxicity in primary cultures of cerebellar granule neurons of rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

GOWDA, N. K., LEDOUX, D. R., ROTTINGHAUS, G. E., BERMUDEZ, A. J., CHEN, Y. C. Antioxidant efficacy of curcuminoids from turmeric (*Curcuma longa* L.) powder in broiler chickens fed diets containing aflatoxin B1. **British journal of nutrition**, v. 102, n. 11, p. 1629-1634, 2009.

HAWARI, A.D., OBEIDAT, M., AWAISHEH, S.S., AL-DAGHISTANI, H.I., AL-ABBADI, A.A., OMAR, S.S., QRUNFLEH, I.M., AL-DMOOR, H.M., EL-QUDAH, J. Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in Awassi sheep in Al-Balqa province of Jordan. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 9, p. 116-121, 2014.

IMAI, M., GOEPFERT, C., KACZMAREK, E., ROBSON, S.C. CD39 modulates IL-1 release from activated endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 270, n. 1, p. 272-278, 2000.

IMLAY, J. Al. Pathways of oxidative damage. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 395-418, 2003.

JANTARAT, C. Bioavailability enhancement techniques of herbal medicine: A case example of curcumin. **International Journal Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 5, p. 493-500, 2013.

JQUES, J.A.S. **Efeito da curcumina sob a atividade das enzimas NTPDase e acetilcolinesterase em linfócitos de ratos expostos à fumaça do cigarro**. 2010. 120p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

JOE, B., VIJAYKUMAR, M., LOKESH, B. R. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, n. 2, p. 97-111, 2004.

JOUNG, H. J., CHOI, M. J., KIM, J. T., PARK, S. H., PARK, H. J., SHIN, G. H. Development of Food-Grade Curcumin Nanoemulsion and its Potential Application to Food Beverage System: Antioxidant Property and In Vitro Digestion. **Journal of food science**, v. 81, n. 3, 2016.

KAPOOR, S., PRIYADARSINI, K. I. Protection of radiation-induced protein damage by curcumin. **Biophysical chemistry**, v. 92, n. 1, p. 119-126, 2001.

KELLY, M. R., XU, J., ALEXANDER, K. E., LOO, G. Disparate effects of similar phenolic phytochemicals as inhibitors of oxidative damage to cellular DNA. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 485, n. 4, p. 309-318, 2001.

KIM, D. K., LILLEHOJ, H. S., LEE, S. H., JANG, S. I., LILLEHOJ, E. P., BRAVO, D. Dietary Curcuma longa enhances resistance against *Eimeria maxima* and *Eimeria tenella* infections in chickens. **Poultry science**, v. 92, n. 10, p. 2635-2643, 2013.

KUMAR, D. D., MANN, B., POTHURAJU, R., SHARMA, R., BAJAJ, R. Formulation and characterization of nanoencapsulated curcumin using sodium caseinate and its incorporation in ice cream. **Food & function**, v. 7, n. 1, p. 417-424, 2016.

LA SALA, A., FERRARI, D., DI VIRGILIO, F., IDZKO, M., NORGAUER, J., GIROLOMONI, G. Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 3, p. 339-343, 2003.

LEITNER, G.; MERIN, U.; SILANIKOVE, N. Effects of glandular bacterial infection and stage of lactation on milk clotting parameters: Comparison among cows, goats and sheep. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 4, p. 279-285, 2011.

LEV-ARI, S., STRIER, L., KAZANOV, D., MADAR-SHAPIRO, L., DVORY-SOBOL, H., PINCHUK, I., ARBER, N. (...). Celecoxib and curcumin synergistically inhibit the growth of colorectal cancer cells. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 18, p. 6738-6744, 2005.

LIMA, C. F., PEREIRA-WILSON, C., RATTAN, S. I. Curcumin induces heme oxygenase-1 in normal human skin fibroblasts through redox signaling: Relevance for anti-aging intervention. **Molecular nutrition & food research**, v. 55, n. 3, p. 430-442, 2011.

LIU, L., SHANG, Y., LI, M., HAN, X., WANG, J., WANG, J. Curcumin ameliorates asthmatic airway inflammation by activating nuclear factor-E2-related factor 2/haem oxygenase (HO)-1 signalling pathway. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 42, n. 5, p. 520-529, 2015.

LOLLA, S.A., ZICCHEDDU, M., DUPRÈ, I., PIRAS, D. Characterization of resistance to tetracyc lines and aminoglycosides of sheep mastitis pathogens: study of the effect of gene content on resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 941-951, 2016.

LUQUET, F.M. La leche: de la mama a la lechería. Zaragoza: **Acribia**, 195p, 1991.

MALLO, N., DEFELIPE, A., FOLGUEIRA, I., SUEIRO, R., LAMAS, J., LEIRO, J. Combined antiparasitic and anti-inflammatory effects of the natural polyphenol curcumin on turbot scuticociliatosis. **Journal of Fish Diseases**. v. 40, n. 2, p. 205-217, 2017.

MANJU, M., AKBARSHA, M. A., OOMMEN, O. V. In vivo protective effect of dietary curcumin in fish *Anabas testudineus* (Bloch). **Fish physiology and biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 309-318, 2012.

MATÉS, J. M., PÉREZ-GÓMEZ, C., DE CASTRO, I. N. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.

MILOBEDZKA, J., KOSTANECKI, S., LAMPE, V. Zur Kenntnis des Curcumins. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 2163-2170, 1910.

MOHANTY, C., DAS, M., SAHOO, S. K. Sustained wound healing activity of curcumin loaded oleic acid based polymeric bandage in a rat model. **Molecular pharmaceutics**, v. 9, n. 10, p. 2801-2811, 2012.

MORAND-FEHR, P.; FEDELE, V.; DECANDIA, M.; LE FRILEUX, Y. Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p. 20–34, 2007.

NAGAJYOTHI, F., ZHAO, D., WEISS, L. M., TANOWITZ, H. B. Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology research**, v. 110, n. 6, p. 2491-2499, 2012.

OLECHNOWICZ, J., JASKOWSKI J. M. Mastitis in small ruminants. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 70, p. 67-72, 2014.

ÖZBEY, F., TASLIMI, P., GÜLÇİN, I., MARAŞ, A., GÖKSU, S., SUPURAN, C.T. Synthesis of diaryl ethers with acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitory actions. **Journal Enzyme Inhibition Medicine Chemical**, v. 31, p. 79-85, 2016.

PANCHATCHARAM, M., MIRIYALA, S., GAYATHRI, V. S., SUGUNA, L. MANIKANDAN, E. (...). Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 290, n. 1, p. 87-96, 2006.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p. 88–113, 2007.

PAVLOV, V. A., TRACEY, K. J. Neural regulators of innate immune responses and inflammation. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 61, p. 2322–2331, 2004.

PEELER, E. J., M. J. GREEN, J. L. FITZPATRICK, L. E. GREEN. The association between quarter somatic-cell counts and clinical mastitis in three British dairy herds. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 59, p. 169-180, 2003.

PISANU, S., CUBEDDU, T., PAGNOZZI, D., ROCCA, S., CACCIOTTO, C., ALBERTI, A., ADDIS, M. F. Neutrophil extracellular traps in sheep mastitis. **Veterinary Research**, v. 46, n. 1, p. 59, 2015.

QIAN, W., WANG, H., SHAN, D., LI, B., LIU, J., LIU, Q. Activity of several kinds of drugs against *Neospora caninum*. **Parasitology International**, v. 64, n. 6, p. 597-602, 2015.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; PIRISI, A.; CRÉMOUX, R.; GONZALO, C. Somatic cells of goat and sheep milk: Analytical, sanitary, productive and technological aspects. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p. 126–144, 2007.

RIBEIRO, L. C.; PÉREZ, J. R. O.; CARVALHO, P. H. A.; SILVA, F. F.; MUNIZ, J. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, G. M.; SOUZA, N. V. Produção, composição e rendimento em queijo do leite de ovelhas Santa Inês tratadas com ocitocina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 438-444, 2007.

ROSSI, O. M. **Produção de leite de ovelha no brasil**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Dados apresentados no '2nd International Symposium of Dairy Cattle', 2009.

ROVAI, M., CAJA, G., QUEVEDO, J. M., MANUELIAN, C. L., SALDO, J., SALAMA, A. A., LEITNER, G. et al. Effect of subclinical intramammary infection on milk quality in dairy sheep: II. Matured-pressed cheese (Manchego) produced from milk of uninfected and infected glands and from their blends. **Small Ruminant Research**, v. 126, p. 59-67, 2015.

ROY, S., KHANNA, S., NALLU, K., HUNT, T. K., SEN, C. K. Dermal wound healing is subject to redox control. **Molecular Therapy**, v. 13, n. 1, p. 211-220, 2006.

SAEIDNIA, S., ABDOLLAHI, M. Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 271, n. 1, p. 49-63, 2013.

SAID, D. E., ELSAMAD, L. M., GOHAR, Y. M. Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-Giardia agents. **Parasitology research**, v. 111, n. 2, p. 545-554, 2012.

SANTOS, F. F. **Sistema agroindustrial do leite de ovelha no Brasil: proposta metodológica para estudo de cadeias curtas**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga. 143p., 2016.

SAVILL, J. Apoptosis in resolution of inflammation. **Journal of leukocyte biology**, v. 61, n. 4, p. 375-380, 1997.

SEBASTIÀ, N., MONTORO, A., MONTORO, A., ALMONACID, M., VILLAESCUSA, J. I., CERVERA, J., SORIANO, J. M. (...). Assessment in vitro of radioprotective efficacy of curcumin and resveratrol. **Radiation Measurements**, v. 46, n. 9, p. 962-966, 2011.

SHAILAJA, M., GOWDA, K. D., VISHAKH, K., KUMARI, N. S. Anti-aging Role of Curcumin by Modulating the Inflammatory Markers in Albino Wistar Rats. **Journal of the National Medical Association**, v. 109, n. 1, p. 9-13, 2017.

SHARMA, R. A., GESCHER, A. J., STEWARD, W. P. Curcumin: the story so far. **European journal of cancer**, v. 41, n. 13, p. 1955-1968, 2005.

SHEHZAD, A., LEE, J., & LEE, Y. S. Curcumin in various cancers. **Biofactors**, v. 39, n. 1, p. 56-68, 2013.

SMITH, M. J., LOGAN, A. C. Naturopathy. **Medical Clinics of North America**. v. 86, p. 173–184, 2002.

SOCCIO, M., LAUS, M. N., ALFARANO, M., DALFINO, G., PANUNZIO, M. F., PASTORE, D. Antioxidant/Oxidant Balance as a novel approach to evaluate the effect on serum of long-term intake of plant antioxidant-rich foods. **Journal of Functional Foods**. v. 40, p. 778-784, 2018.

SOLIMAN, M. M., NASSAN, M. A., ISMAIL, T. A. Immunohistochemical and molecular study on the protective effect of curcumin against hepatic toxicity induced by paracetamol in Wistar rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 457, 2014.

SOUSA, L. S. de, MOURA, C. V. R. de, OLIVEIRA, J. E. de, MOURA, E. D. de. Use of natural antioxidants in soybean biodiesel. **Fuel**. v. 134, p. 420-428, 2014.

SPANU, C., BERGER, Y.M., THOMAS, D.L., RUEGG, P.L. Impact of intramammary antimicrobial dry treatment and teat sanitation on somatic cell count and intramammary infection in dairy ewes. **Small Ruminant Research**, v. 97, p. 139—145, 2011.

SUÁREZ, V. **Lechería Ovina y Raza Pampinta**. IDIA XXI – Ovinos. No. 7. Ed. INTA. p. 194 - 200, 2004.

SUBUDHI, U., CHAINY, G. B. Expression of hepatic antioxidant genes in l-thyroxine-induced hyperthyroid rats: regulation by vitamin E and curcumin. **Chemico-biological interactions**, v. 183, n. 2, p. 304-316, 2010.

TANWAR, V., SACHDEVA, J., KISHORE, K., MITTAL, R., NAG, T. C., RAY, R., ARYA, D. S. (...). Dose-dependent actions of curcumin in experimentally induced myocardial necrosis: a biochemical, histopathological, and electron microscopic evidence. **Cell biochemistry and function**, v. 28, n. 1, p. 74-82, 2010.

- THANGAPAZHAM, R. L., SHARAD, S., MAHESHWARI, R. K. Skin regenerative potentials of curcumin. **Biofactors**, v. 39, n. 1, p. 141-149, 2013.
- TOYOSAKI, T., SAKANE, Y., KASAI, M. Oxidative stability, trans, trans-2,4-decadienals, and tocopherol contents during storage of dough fried in soybean oil with added medium-chain triacylglycerols (MCT). **Food Research International**. v. 41, n. 3, p. 318–324, 2008.
- ULLAH, R., REHMAN, A., ZAFEER, M. F., REHMAN, L., KHAN, Y. A., KHAN, M. H., ABIDI, S. M. A. (...). Anthelmintic Potential of Thymoquinone and Curcumin on *Fasciola gigantica*. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0171267, 2017.
- VARMUZOVA, K., MATULOVA, M. E., GERZOVA, L., CEJKOVA, D., GARDAN-SALMON, D., PANHÉLEUX, M., RYCHLIK, I. (...). Curcuma and Scutellaria plant extracts protect chickens against inflammation and *Salmonella enteritidis* infection. **Poultry science**, v. 94, n. 9, p. 2049-2058, 2015.
- VOS, P. FAAS, M.M., SPASOJEVIC, M., SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**. v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010.
- WHYTE, M. K., MEAGHER, L. C., MACDERMOT, J., HASLETT, C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 11, p. 5124-5134, 1993.
- XIONG, F., GUAN, Y. S. Cautiously using natural medicine to treat liver problems. **World Journal of Gastroenterology**. v. 23, n. 19., p. 3388-3395, 2017.
- YU, H., HUANG, Q. Improving the oral bioavailability of curcumin using novel organogel-based nanoemulsions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 21, p. 5373-5379, 2012.
- ZAFALON, L. F., SANTANA, R. C. M., PILON, L. E., FIM J. R., G. A. Diagnosis of subclinical mastitis in Santa Inês and Morada Nova sheep in southeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 48, p. 967, 2016.



LAGES
CENTRO DE CIÊNCIAS
AGROVETERINÁRIAS

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Suplementação de ovelhas leiteiras com curcumina: investigação dos benefícios sobre produção e qualidade do leite, parâmetros bioquímicos e hematológicos, resposta imune, perfil oxidativo e ação coccidiostática.", protocolada sob o CEUA nº 3468070617, sob a responsabilidade de **Aleksandro Schafer da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 19/06/2017.

We certify that the proposal "Supplementation of dairy sheep with curcumin: investigation of the benefits on milk production and quality, biochemical and hematological parameters, immune response, oxidative profile and coccidiostatic action.", utilizing 20 Ovines (20 females), protocol number CEUA 3468070617, under the responsibility of **Aleksandro Schafer da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 06/19/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **06/2017** a **10/2017** Área: **Zootecnia**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Ovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **1 a 2 anos**

N: **20**

Linhagem: **lacaune**

Peso: **50 a 60 kg**

Resumo: O trabalho terá como objetivo avaliar o efeito da suplementação com curcumina (Curcuma longa) em ovelhas lactantes da raça lacaune. Serão utilizadas 20 fêmeas ovinas primíparas subdivididas aleatoriamente no grupo S (suplementada) e grupo C (controle, não suplementadas). A curcumina será administrada via oral misturada na ração padrão da propriedade na dose de 100 mg/kg ração/ovelha/dia durante o período de 10 dias. Nos dias 0, 5 e 10 será realizada a coleta de amostras sanguíneas, fecais e de leite imediatamente após ordenha, e encaminhadas ao laboratório para análises. Do sangue serão realizados os exames que visam avaliar a saúde dos animais, como bioquímico sérico e hemograma completo, além de resposta imunológica (mensuração de IL-10). Também serão coletadas amostras de sangue destinadas à mensuração de enzimas antioxidantes SOD (Superóxido Dismutase) e CAT (Catalase), GST (Glutathione S-Transferase) e GpX (Glutathione Peroxidase) e agentes oxidantes como ROS (Espécies Reativas de Oxigênio) e TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico). Das fezes será feito contagem de ovos pela técnica de McMaster (OPG) bem como técnica de centrifugo-flutuação (Faust). O leite será encaminhado para análise de composição de sólidos, contagem de células somáticas (CCS), Produtos de Oxidação Protéica (AOPP) e antioxidantes (FRAP - Poder Antioxidante de Redução do Ferro).

Local do experimento: cabanha chapecó; conveniada com udesc oeste

Lages, 11 de janeiro de 2018

Marcia Regina Pfuetszenreiter
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Estado de Santa Catarina