UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MICHELE FERREIRA RIBEIRO

**Avaliação do potencial antioxidante do capim-limão (*Cymbopogon*
citratatus (D.C.) Stapf) sobre a apoptose do tecido mamário e
qualidade do leite de cabras Saanen**

Pirassununga

2011

MICHELE FERREIRA RIBEIRO

Avaliação do potencial antioxidante do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) sobre a apoptose do tecido mamário e qualidade do leite de cabras Saanen

Versão Corrigida

Dissertação apresentada a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. João Alberto Negrão

Pirassununga

2011

DEDICATÓRIA

Ao meu marido **Gustavo**, amado companheiro,
sempre presente em TODOS OS MOMENTOS e
por participar dos meus sonhos, das minhas
conquistas e da minha vida.

OFERECIMENTO

À minha mãe **Clara** (*in memoriam*), exemplo
de luta, força e coragem e a quem devo o que
sou hoje.

Ao meu pai **Arnaldo** e minhas irmãs **Évelyn** e
Emily por darem sentido à minha vida e me
lembrarem sempre de que, se tudo der errado,
tenho para onde voltar.

À minha **família** (vovó, tios, tias, primas) pelas
infinitas orações, ajuda financeira em diversos
momentos e torcida para mais esta realização
pessoal e profissional.

Aos meus sogros, **Adalberto** e **Lucila**, exemplos
de vida, por me acolherem na família e por me
ajudarem de todas as formas possíveis.

AMO TODOS VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelas infinitas oportunidades, por estar sempre ao meu lado e me dar forças para continuar quando achei que não seria possível.

À **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP)** pela minha formação e à professora **Dr^a. Ivanete Susin** pela amizade e por me ensinar os primeiros passos da vida acadêmica. Serei eternamente grata!

À **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP)** pela oportunidade na realização deste trabalho.

À **FAPESP** pela concessão de bolsa para a realização desta pesquisa.

Ao professor **Dr. João Alberto Negrão** pela oportunidade de orientação, pelas correções, ensinamentos e paciência. Muito obrigada por aceitar me orientar sem me conhecer!

À professora **Dr^a. Mariza Pires de Melo** pelo respeito, pela generosidade, amizade e permissão para utilização do Laboratório de Química Biológica sob sua responsabilidade.

À Especialista em Laboratório **Silvana Marina Piccoli Pugine** literalmente um anjo, pela ajuda nas análises experimentais, pela paciência e generosidade. Tenha certeza que sem sua ajuda não teria conseguido. Muito obrigada!

Ao Técnico de Laboratório **Nilton Pedro dos Santos** pela permissão para utilização do Laboratório de Histologia sob sua responsabilidade.

Ao professor **Dr. Antonio Augusto Mendes Maia** pela permissão para utilização do Laboratório de Imunologia de Parasitas e Parasitologia sob sua responsabilidade e ao pós-graduando **Mateus Maldonado Carriero** pelo auxílio no uso do micrótomo.

Ao professor **Dr. César Gonçalves de Lima** e ao pós-graduando e amigo **Evandro Maia Ferreira** pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos Técnicos de Laboratório **Antonio Fernandes dos Santos Júnior (China)** e **Sandra Aparecida de Oliveira** pela amizade, agradável convivência, ensinamentos e auxílio na condução do experimento e à Técnica Especialista em Laboratório **Giovana Krempel Fonseca Merighe** pelas sugestões e correções relacionadas às análises de DNA, RNA e TUNEL.

Aos funcionários da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), em especial ao médico veterinário **Fernando Schalch**, **José Roberto Balduino**, **Valmir Murarolli**, **Gonçalo Monteiro da Silva Junior**, **José Roberto Pereira**, **Silmar Ferreira de Camargo**, **Carlos Alberto Schmidt** e **Ademilson Bagatine**, que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Ao meu marido **Gustavo Henrique Rodrigues** pela ajuda durante todo o período experimental (ordenha, análises laboratoriais e análises estatísticas) e por ser o MELHOR MARIDO DO MUNDO. Obrigada por estar sempre ao meu lado!

À pós-graduanda e amiga **Monalissa de Melo Stradiotto** pela ajuda nas análises experimentais, pelas infinitas caronas (inclusive quando estava tirando minha carteira de habilitação), pela boa hospedagem nos momentos finais deste trabalho e por fazer meus dias em Pirassununga muito mais agradáveis e inesquecíveis. Também não teria conseguido sem sua ajuda! Obrigada!

À pós-graduanda **Taissa de Souza Canaes** e à estagiária **Susana Nori de Macedo** pelo auxílio na organização e condução do experimento.

Às pós-graduandas **Alice Deléo Rodrigues** pela ajuda em diversos momentos do período experimental e pelos bons momentos de descontração e **Cristiane Gonçalves Titto** pelo auxílio durante a biópsia.

Às pós-graduandas **Gabriela Facholi Bomfim** pela amizade e pelos bons momentos de descontração e **Ana Paula Rodrigues Gaiato** pela agradável convivência.

Às pós-graduandas **Liliane Maria Romualdo** e **Fernanda de Fátima da Silva** pela amizade e agradável convivência desde o início do mestrado.

À estagiária **Innaê Vivian Borges da Silva** pela amizade e auxílio na condução do experimento e análises experimentais. Também não teria conseguido sem sua ajuda! Obrigada!

Ao estagiário **André Soligo Vizeu Palma** pela amizade e auxílio na condução do experimento.

Às estagiárias **Paula Parra Alves de Oliveira** e **Bárbara Rossi** pelo auxílio na condução do experimento.

Às **cabras**, pois sem elas este trabalho jamais seria possível.

À minha nova “cãopanheira” **Dominique**, que com sua graciosidade e inocência de filhote, inspirou-me a terminar este trabalho.

A todos, que de alguma forma participaram e contribuíram para a execução e conclusão deste trabalho. Muito obrigada!

“A cada dia que vivo, mais me convenceo de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade.”

(Carlos Drummond de Andrade)

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Composição do leite de cabra.....	18
2.2 Qualidade do leite de cabra.....	23
2.3 Oxidação do leite de cabra	25
2.4 Antioxidantes e estabilidade oxidativa do leite de cabra	27
2.5 Influência do estresse na produção do leite de cabra	28
2.6 Apoptose do tecido mamário	30
2.7 Capim-limão	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Primeira fase (Fase 1)	35
3.1.1 Animais, instalações experimentais e manejo da ordenha	35
3.1.2 Período experimental e tratamentos.....	36
3.1.3 Produção, análises físico-químicas e perfil de ácidos graxos do leite de cabra	39
3.1.4 Contagem de células somáticas e contagem bacteriana total.....	41
3.1.5 Oxidação lipídica do leite de cabra	42
3.1.6 Análises estatísticas	44

3.2 Segunda Fase (Fase 2)	46
3.2.1 Animais e período experimental	46
3.2.2 Tratamentos	47
3.2.3 Análises estatísticas	48
3.3 Terceira Fase (Fase 3)	49
3.3.1 Período experimental, animais e tratamentos	49
3.3.2 Biópsia do tecido mamário	49
3.3.3 TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling)	50
3.3.4 Quantificação e fragmentação de DNA por eletroforese	52
3.3.5 Quantificação de RNA	53
3.3.6 Análises estatísticas	54
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Primeira fase do período experimental (Fase 1)	55
4.1.1 Desempenho, produção, composição e características físico-químicas do leite de cabra	55
4.1.2 Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) no leite de cabra	61
4.1.3 Perfil de ácidos graxos do leite de cabra	63
4.1.4 Oxidação lipídica do leite de cabra	69
4.2 Segunda fase do período experimental (Fase 2)	75
4.2.1 Concentrações plasmáticas de cortisol	75
4.2.2 Desempenho, produção, composição e características físico-químicas do leite de cabra	80

4.2.3 Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite de cabra.....	87
4.2.4 Perfil de ácidos graxos do leite de cabra.....	91
4.3 Terceira fase do período experimental (Fase 3)	102
4.3.1 Concentração de DNA e RNA e contagem de células apoptóticas (TUNEL, Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) no tecido mamário	102
4.3.2 Fragmentação do DNA em gel de poliacrilamida 8%	107
5 CONCLUSÃO GERAL.....	110
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

RESUMO

Avaliação do potencial antioxidante do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) sobre a apoptose do tecido mamário e qualidade do leite de cabras Saanen

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antioxidante do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) sobre a qualidade do leite de cabra (produção, composição, características físico-químicas, contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e oxidação lipídica) antes (Fase 1) e após a administração pontual de ACTH (Fase 2), bem como a apoptose do tecido mamário (Fase 3) de cabras leiteiras da raça Saanen em lactação. Nas Fases 1 e 2, 44 cabras foram alimentadas com ração composta por 53,2% de silagem de milho na matéria seca (MS) (T1), sendo a silagem de milho substituída em 33,5% (T2), 66,5% (T3) e 100% (T4) pelo feno de capim-limão peletizado, sendo que na Fase 3, doze cabras ao final do período de lactação ($264,67 \pm 31,86$ dias) foram submetidas à biópsia de glândula mamária. Houve aumento numérico do consumo de matéria seca (CMS) com o aumento da inclusão de capim-limão nas duas fases experimentais (Fase 1 e 2) sem, no entanto, afetar a produção de leite. Os teores de gordura e sólidos totais na Fase 2 foram maiores nos tratamentos T1 e T3 após a indução de estresse via ACTH e reduziram linearmente com a inclusão de teores crescentes de capim-limão. Não houve diferença na contagem bacteriana total do leite nas duas fases experimentais. Já a contagem de células somáticas foi menor no tratamento T2 após a indução de estresse via ACTH e reduziu linearmente com a inclusão de níveis crescentes de capim-limão na Fase 2. A oxidação lipídica na Fase 1 não foi influenciada pelo capim-limão, mas na Fase 2 houve redução linear com a inclusão de capim-limão. A administração de ACTH não influenciou a oxidação lipídica do leite (Fase 2). Não houve efeito da inclusão de capim-limão sobre as concentrações de DNA e RNA, bem como na fragmentação do DNA (Fase 3) em gel de poliacrilamida 8%, no entanto, foi verificado efeito quadrático na contagem de células apoptóticas, com maior valor para o tratamento T2. A inclusão de níveis crescentes de capim-limão na alimentação de cabras leiteiras não reduziu a apoptose da glândula mamária, no entanto, aumentou a estabilidade oxidativa do leite, comprovando seu efeito antioxidante.

Palavras-chave: caprino; oxidação; cortisol; estresse; biópsia

ABSTRACT

Evaluation of antioxidant potential of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) on mammary gland apoptosis and milk quality of Saanen goats

The objective of this study was to evaluate the antioxidant potential of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) on the quality of goat's milk (production, composition, physical-chemical characteristics, somatic cell count, total bacterial count and lipid oxidation) before (Phase 1) and after punctual administration of ACTH (Phase 2), as well as mammary gland apoptosis (Phase 3) of milk goats of Saanen breed in lactation. In phases 1 and 2, 44 goats were fed ration composed by 53.2% of corn silage in dry matter (DM) (T1), where corn silage was substituted in 33.5% (T2), 66.5% (T3) and 100% (T4) by lemongrass pelletized hay. In phase 3, twelve goats at the end of lactation period (264.67 ± 31.86 days) were submitted to mammary gland biopsy. It was observed a numeric increase in dry matter intake (DMI) with the increase of lemongrass inclusion in two experimental phases (Phase 1 and 2) without, however, affecting milk production. The contents of fat and total solid in Phase 2 were higher in treatments T1 and T3 after stress induction through ACTH and were linearly reduced with increasing levels of lemongrass. There was no difference in total bacteria counts in milk in two experimental phases. Somatic cell counts were lower in treatment T2 after stress induction through ACTH and linearly reduced with the inclusion of increasing levels of lemongrass in Phase 2. Lipid oxidation in Phase 1 was not influenced by lemongrass inclusion but in Phase 2 there was linear reduction with lemongrass inclusion. The administration of ACTH did not influence milk lipid oxidation (Phase 2). There was no effect of lemongrass inclusion on DNA and RNA concentration, as well as in DNA fragmentation (Phase 3) in polyacrylamide gel 8%. However, it was observed quadratic effect in apoptotic cells counts with higher value for treatment T2. The inclusion of increasing levels of lemongrass in the feeding of dairy goats did not reduce the apoptosis of mammary gland, however, increased the oxidative stability of milk, proving its antioxidant effect.

Key words: biopsy; cortisol; goat; oxidation; stress

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química dos leites caprino, bovino e humano	19
Tabela 2 – Composição de ácidos graxos (gramas/100 g AG) na gordura do leite de várias espécies.....	20
Tabela 3 – Composição química dos ingredientes das rações experimentais.....	37
Tabela 4 – Proporção dos ingredientes e composição química das rações experimentais (% na MS)	38
Tabela 5 – Peso, variação corporal e consumo de matéria seca de cabras Saanen alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho	55
Tabela 6 – Produção e composição do leite de cabras Saanen alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho	57
Tabela 7 – Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite de cabras Saanen alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho.....	61
Tabela 8 – Perfil geral dos ácidos graxos (mg/g de lipídeo) do leite de cabras Saanen alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho	63
Tabela 9 – Valores de índice de peróxido (IP) e TBARS do leite de cabras Saanen alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho	73
Tabela 10 – Concentrações plasmáticas médias de cortisol (ng/mL) de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo 0% de capim-limão em substituição à silagem de milho (T1) e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo.....	75
Tabela 11 – Concentrações plasmáticas médias de cortisol (ng/mL) de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo 33,5% de capim-limão em substituição à silagem de milho (T2) e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo.....	76
Tabela 12 – Concentrações plasmáticas médias de cortisol (ng/mL) de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo 66,5% de capim-limão em substituição à silagem de milho (T3) e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo.....	77

Tabela 13 – Concentrações plasmáticas médias de cortisol (ng/mL) de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo 100% de capim-limão em substituição à silagem de milho (T4) e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo.....	78
Tabela 14 – Peso, variação corporal e consumo de matéria seca de cabras Saanen submetidas à aplicação pontual de ACTH alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho	81
Tabela 15 – Produção e composição do leite de cabras Saanen submetidas à aplicação pontual de ACTH alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho ...	83
Tabela 16 – Teor de gordura (%) do leite de cabras Saanen resultante do desdobramento da interação entre tratamento e aplicação de ACTH ou Placebo	84
Tabela 17 – Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite de cabras Saanen submetidas à aplicação pontual de ACTH alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho	88
Tabela 18 – Contagem de células somáticas (CCS) (Log células/mL) do leite de cabras Saanen resultante do desdobramento da interação entre tratamento e aplicação de ACTH ou Placebo.....	89
Tabela 19 – Perfil geral dos ácidos graxos (mg/g de lipídeo) no leite de cabras Saanen submetidas à aplicação pontual de ACTH alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho	92
Tabela 20 – Valores de índice de peróxido (IP) e TBARS do leite de cabras Saanen submetidas à aplicação pontual de ACTH alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho.....	100
Tabela 21 – Concentrações médias de DNA e RNA e número de células apoptóticas do tecido mamário de cabras Saanen alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho	102

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).58
- Figura 2** – Concentração de ácidos graxos poliinsaturados no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).64
- Figura 3** – Concentração de ácido linolênico no leite de cabra Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).65
- Figura 4** – Concentração de CLA *cis*-9 *trans*-11 no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).66
- Figura 5** – Concentração de ácido linoléico no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).67
- Figura 6** – Valores médios de TBARS no leite de cabras Saanen logo após a ordenha e após 48 horas de armazenamento alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).69

Figura 7 – Teor médio de gordura do leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).....**85**

Figura 8 – Concentração de ácido linolênico no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).....**93**

Figura 9 – Concentração de CLA *cis*-9 *trans*-11 no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).....**94**

Figura 10 – Concentração de ácido linoléico no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).....**95**

Figura 11 – Valores médios de IP no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).....**96**

Figura 12 – Valores médios de TBARS no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).....**97**

Figura 13 – Valores médios de IP no leite de cabras Saanen logo após a ordenha e após 48 horas de armazenamento alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).....**98**

Figura 14 – Valores médios de TBARS no leite de cabras Saanen logo após a ordenha e após 48 horas de armazenamento alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).....**98**

Figura 15 – Número de células apoptóticas/campo de acordo com os tratamentos experimentais: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão.....**103**

Figura 16 – Corte histológico de tecido mamário do animal 6049 (tratamento T1) corado através da técnica de TUNEL e fotografado através de microscopia de epifluorescência em aumento de 40 vezes (T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta).....**104**

Figura 17 – Corte histológico de tecido mamário do animal 3027 (tratamento T2) corado através da técnica de TUNEL e fotografado através de microscopia de epifluorescência em aumento de 40 vezes (T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão).....**104**

Figura 18 – Corte histológico de tecido mamário do animal 6047 (tratamento T3) corado através da técnica de TUNEL e fotografado através de microscopia de epifluorescência em aumento de 40 vezes (T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão).....**105**

Figura 19 – Corte histológico de tecido mamário do animal 6058 (tratamento T4) corado através da técnica de TUNEL e fotografado através de microscopia de epifluorescência em aumento de 40 vezes (T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).
.....**105**

Figura 20 – Análise eletroforética de DNA de tecido mamário em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata 0,2%. P: padrão com 10.000 pares de base (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker, SIGMA®). Amostras: 1 (T2), 2 (T3), 3 (T4), 4 (T3), 5 (T1) e 6 (T3) Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão.**108**

Figura 21 – Análise eletroforética de DNA de tecido mamário em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata 0,2%. P: padrão com 10.000 pares de base (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker, SIGMA®). Amostras: 7 (T4), 8 (T1), 9 (T2), 10 (T1), 11 (T4) e 12 (T2). Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão.**109**

1 INTRODUÇÃO

A participação da caprinocultura leiteira no cenário agropecuário brasileiro tem apresentado crescimento significativo nos últimos anos, favorecendo a conquista de novos mercados para o leite de cabra e seus derivados (BORGES; BRESSLAU, 2002). O leite de cabra é um alimento que apresenta em sua composição gordura com maior proporção de ácidos graxos de cadeia curta e média (6 a 14 carbonos) e menor proporção de proteína do tipo α_1 -caseína, resultando em melhor digestibilidade quando comparado ao leite de vaca (JENNESS, 1980).

Adicionalmente, a qualidade do leite também está relacionada ao seu teor de gordura, componente de maior valor comercial, entretanto, os lipídeos estão sujeitos a uma série de reações que podem levar a modificações de suas estruturas, afetando o valor nutricional do leite e seus derivados (DONNELLY; ROBINSON, 1995; HAVEMOSE et al., 2006). Essas alterações reduzem a vida útil destes alimentos, favorecendo o aparecimento de odores e sabores desagradáveis, levando, conseqüentemente, a prejuízos da qualidade nutricional (HAVEMOSE et al., 2006).

Os lipídeos são protegidos contra a oxidação por antioxidantes naturais presentes no leite *in natura*. Os antioxidantes hidrofóbicos α -tocoferol (vitamina E) e β -caroteno, localizados na fase lipídica, e o ácido ascórbico (vitamina C), localizado na fase aquosa, agem contra os radicais livres e protegem os ácidos graxos poliinsaturados (KRISTENSEN et al., 2004; LINDMARK-MANSSON; AKESSON, 2000).

Nesse sentido, alguns estudos comprovam que os compostos antioxidantes podem ser transferidos para o leite através da alimentação, melhorando assim sua estabilidade oxidativa (BARREFORS et al., 1995; FOCANT et al., 1998; GRANELLI et al., 1998; HAVEMOSE et al., 2004).

Além disso, a excessiva geração de espécies reativas de oxigênio, ou a redução na atividade dos mecanismos antioxidantes celulares pode aumentar a susceptibilidade dos tecidos à apoptose (KRUTMANN; GREWE, 1995; WILGUS et al., 2002).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) sobre a apoptose do tecido mamário e sobre a produção e composição, características físico-químicas, celulares e microbiológicas do leite de cabras da raça Saanen em lactação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Composição do leite de cabra

A espécie caprina é uma das principais fornecedoras de produtos lácteos e carne para a população de baixa renda e o aumento no consumo de leite de cabra é justificado não só pelo crescimento populacional, mas pelo maior interesse por produtos derivados desse leite, em especial queijos e iogurtes (RIBEIRO, 1997). Além disso, o uso do leite de cabra por pessoas alérgicas e com doenças gastrointestinais também contribui para o aumento da procura por produtos lácteos derivados do leite dessa espécie (HAENLEIN, 2004; PELLERIN, 2001).

O mercado brasileiro é predominantemente voltado para a comercialização do leite de cabra para consumo *in natura*, principalmente por crianças que apresentam alergia ao leite de vaca, o que tem sido um dos carros-chefes que promovem a caprinocultura leiteira (RIBEIRO, 1997). Por outro lado, na Europa o principal objetivo da produção é a obtenção de leite com teor elevado de proteína, visando maior rendimento na fabricação de queijos (BARBOSA, 1993; DUMOULIN; PERETZ, 1993; FURTADO, 1985; JORDANA et al., 1996; RAMOS; JUAREZ, 1993).

Em relação à composição química (Tabela 1), o leite de cabra apresenta algumas características diferentes quando comparado ao leite de vaca, principalmente em relação à sua composição. Segundo Attaie e Richter (2000), o leite de cabra apresenta glóbulos de gordura menores (0,73 μm a 8,58 μm de diâmetro) quando comparado ao leite de vaca (0,92 μm a 15,75 μm).

De acordo com Jenness (1980), o total de gordura, o tamanho dos glóbulos e sua relativa abundância influenciam na viscosidade do leite e isso tem aplicação no processamento e fabricação de produtos lácteos. Glóbulos de gorduras menores são, geralmente, mais dispersos e promovem maior homogeneidade da gordura no leite, o que pode explicar parcialmente a melhor digestibilidade do leite de cabra em relação ao leite de vaca (LE JAQUEN, 1981).

Tabela 1 – Composição química dos leites caprino, bovino e humano

COMPONENTE	CAPRINO	BOVINO	HUMANO
Gordura (%)	3,80	3,60	4,00
Sólidos não gordurosos (%)	8,90	9,00	8,00
Lactose (%)	4,10	4,70	6,90
Proteína (%)	3,00	3,00	1,10
Caseína (%)	2,40	2,60	0,40
Proteína do soro (%)	0,60	0,60	0,70
Cálcio (%)	0,19	0,18	0,04
Fósforo (%)	0,27	0,23	0,06
Cloro (%)	0,15	0,10	0,06
Vitamina A (UI/g de gordura)	39,00	21,00	32,00
Vitamina B (mg/100 mL)	68,00	45,00	17,00
Vitamina B ₁₂ (mg/100 mL)	210,00	159,00	26,00
Vitamina C (mg/100 mL)	2,00	2,00	3,00
Vitamina D (UI/g de gordura)	0,70	0,70	0,30
Energia (Cal/100 mL)	70,00	69,00	68,00

Fonte: Haeinlein e Caccese (2003).

Adicionalmente, vários estudos comprovam que a gordura é o componente que mais sofre influência da alimentação, não somente em relação à sua concentração, mas também em relação ao perfil de ácidos graxos, no que se refere ao comprimento da cadeia carbônica (curta ou longa), ao grau de saturação (saturado ou poliinsaturado) e à isomeria geométrica (*cis* ou *trans*) desses ácidos (AL-MABRUK; BECK; DEWHURST, 2004; BAER et al., 1996; DHIMAN et al., 1999; HAVEMOSE et al., 2004; KRISTENSEN et al., 2004).

De acordo com Jenness (1980), o leite de cabra apresenta maior quantidade de ácidos graxos de cadeia curta (4 a 10 carbonos) em relação ao leite de vaca (Tabela 2), característica associada ao desenvolvimento do aroma e sabor característicos nos produtos elaborados com o leite desta espécie (PARK, 2001).

Tabela 2 – Composição de ácidos graxos (gramas/100 g AG) na gordura do leite de várias espécies

Ácidos graxos		Vaca	Cabra	Ovelha	Camela	Égua	Porca	Mulher
Butírico	C _{4:0}	4,5	2,6	4,7	0,7	-	-	-
Capróico	C _{6:0}	2,3	2,6	3,3	0,4	-	-	-
Caprílico	C _{8:0}	1,3	3,1	3,4	0,2	6,9	-	-
Cáprico	C _{10:0}	2,7	9,8	9,2	0,9	19,0	<1	1,4
Láurico	C _{12:0}	3,0	5,2	5,4	0,8	8,3	<1	5,7
Mirístico	C _{14:0}	10,6	9,9	11,6	12,5	4,3	4,0	6,4
Miristoléico	C _{14:1}	0,9	-	0,4	1,1	-	-	-
Palmítico	C _{16:0}	28,2	27,6	22,8	31,5	18,3	32,9	18,9
Palmitoléico	C _{16:1}	1,8	2,2	1,9	9,4	5,0	11,3	-
Esteárico	C _{18:0}	12,6	8,0	11,0	12,5	1,3	3,5	6,7
Oléico	C _{18:1}	21,4	22,2	23,5	19,1	10,7	35,2	32,5
Linoléico	C _{18:2}	2,9	3,3	2,0	3,4	7,7	11,9	16,2
Linolênico	C _{18:3}	0,3	0,9	1,1	1,4	4,7	<1	0,3

Fonte: Palmquist e Mattos (2006)

Um ácido graxo poliinsaturado em particular, o ácido linoléico conjugado (CLA), está sendo alvo de muitas pesquisas por serem atribuídas a ele propriedades benéficas para a saúde humana. A redução na incidência e no crescimento de tumores, combate à obesidade, fortalecimento do sistema imune e prevenção de diabetes são algumas dessas propriedades (BELURY, 2002; McLEOD et al., 2004; PARODI, 1997; SHINGFIELD et al., 2008). Esse ácido graxo pode representar de 0,4 a 0,9% do total dos ácidos graxos presentes no leite de cabra (ALONSO et al., 1999; GULATI et al., 2000).

Entretanto, o grau de insaturação da gordura tem influência significativa sobre a estabilidade oxidativa do leite, assim o aumento no perfil de ácidos graxos poliinsaturados através da alimentação pode aumentar a oxidação lipídica e favorecer o aparecimento de sabores e odores desagradáveis, reduzindo a vida útil do leite e seus derivados (BARREFORS et al., 1995; FOCANT et al., 1998; GRANELLI et al., 1998; HAVEMOSE et al., 2004).

Em relação ao teor de proteína, sua distribuição é diferente no leite de cabra quando comparado ao leite de vaca (Tabela 1). As proteínas de ambos os leites são formadas principalmente pela α -lactoalbumina, β -lactoglobulina, β -caseína, k-caseína, α_{s1} -caseína e α_{s2} -caseína. Com exceção da albumina e das imunoglobulinas, que são transferidas diretamente do sangue para o leite, as proteínas do leite são sintetizadas nas células alveolares a partir de aminoácidos do sangue (SWENSON; REECE, 1996).

Dentre as proteínas, a α_{s1} -caseína representa 15% da proteína do leite de cabra, enquanto que no leite de vaca essa fração representa 38%. Já a fração β -caseína representa 67,4% da proteína do leite de cabra e 43,3% do leite de vaca (CLARK; SHERBON, 2000; MORGAN et al., 2000). Essa menor quantidade de α_{s1} -caseína encontrada no leite de cabra faz com que o coágulo formado por ação da renina seja menor e com granulação mais fina do que os formados no leite de vaca, o que também contribui para a melhor digestibilidade do leite de cabra (AMBROSOLI; DI STASIO; MAZZOCCO, 1988; FAO, 1987).

A lactose é um dissacarídeo formado por glicose e galactose e é o principal carboidrato presente no leite, apresentando características semelhantes tanto no leite de cabra como no leite de vaca, sendo um dos principais responsáveis pela manutenção da osmolaridade, favorecendo a absorção de cálcio (SWAISGOOD, 1996). Além disso, a lactose estimula o crescimento das bactérias intestinais (bifidobactérias) e atua como reservatório de galactose, nutriente essencial para a formação dos galactolipídeos cerebrais (MALDONADO et al., 1998). De acordo com Jenness (1980), o teor de lactose no leite de cabra varia de 3,9 a 4,9%.

Um dos grandes problemas fisiológicos relacionados à lactose é a deficiência da enzima lactase no organismo de algumas pessoas, o que provoca desordem gastrointestinal pela não digestão de lactose no intestino, denominada intolerância à lactose (RIBEIRO; RIBEIRO, 2001). A intolerância à lactose ocorre principalmente em adolescentes e adultos, com maior susceptibilidade em povos asiáticos, índios americanos, esquimós e negros (70 a 90%) e não tem cura (MALDONADO et al., 1998; RIBEIRO; RIBEIRO, 2001). Os principais sintomas são a formação de gases, diarreia, náuseas e cólicas abdominais e, nestes casos, o leite deve ser excluído da dieta (MALDONADO et al., 1998; RIBEIRO; RIBEIRO, 2001).

Os minerais são considerados nutrientes fundamentais, pois participam de inúmeras funções no metabolismo animal. Os sais encontrados no leite, além do papel nutricional, são responsáveis pelas características físicas e estabilidade dos constituintes do leite, principalmente caseína, e alguns minerais como o ferro, catalisam reações oxidativas da gordura do leite (FONSECA; SANTOS, 2000).

Outros micronutrientes, como o cobre, o zinco e o selênio, contribuem para o aumento da resistência a doenças como a mastite, pois atuam no sistema imune, melhorando a resposta imunológica do organismo animal e diminuindo a formação de radicais livres (peróxidos e superóxidos) decorrentes do processo inflamatório (CORTINHAS et al., 2009).

A maior parte dos minerais presentes no leite está na forma coloidal, sendo que 67% do cálcio e mais da metade do fósforo fazem parte do complexo caseína, formando as micelas de caseína (LE JAQUEN, 1981). Tanto o leite de cabra como o leite de vaca apresentam teores satisfatórios de cálcio e fósforo (JARDIM, 1984), mas baixos teores de ferro e cobre (JENNESS, 1980). Segundo Cortinhas et al. (2009), os teores de selênio são mais elevados no leite de cabra do que no leite de vaca. Em função da presença de fosfatos e proteínas, o leite de cabra apresenta capacidade tampão superior ao leite de vaca, sendo recomendado para o tratamento de úlceras gástricas (FAO, 1987).

Em relação às vitaminas, Jenness (1980) afirma que o leite de cabra supre adequadamente a necessidade humana em vitamina A (retinol), vitaminas B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), B₃ (niacina) e B₅ (ácido pantotênico), sendo deficiente em vitaminas C (ácido ascórbico) e D (calciferol), e vitaminas B₆ (piridoxina), B₁₂ (cobalamina) e B₉ (ácido fólico).

Entretanto, estes valores divergem dos teores apresentados por outros autores. Segundo Haeinlein e Caccese (2003), o leite de cabra apresenta maiores teores de vitamina A, vitaminas do complexo B e vitamina B₁₂ em relação ao leite de vaca (Tabela 1). Por outro lado, Ribeiro e Ribeiro (2001) afirmam que o leite de cabra apresenta teores inferiores de vitamina B₆, B₉, B₁₂ e vitamina C em relação ao leite de vaca, além de ser muito pobre em vitamina E (α -tocoferol).

As vitaminas estão envolvidas em numerosos processos fisiológicos, incluindo a diferenciação celular e a apoptose (MUINDI, 1996) e inibem o crescimento de células malignas, atuando como seqüestradoras de espécies reativas de oxigênio, protegendo as células contra os danos oxidativos (MUINDI, 1996). A deficiência dessas vitaminas, principalmente as vitaminas A, E e C, provoca danos celulares causados pela produção de espécies reativas, resultando em peroxidação lipídica e destruição celular (LAMSONL; BRIGNALL, 1999).

2.2 Qualidade do leite de cabra

A crescente procura por alimentos saudáveis tem contribuído consideravelmente para a melhoria do processo produtivo, principalmente para os alimentos de origem animal, os quais estão cada vez mais elaborados para atender às exigências do mercado consumidor (RAYNAL-LJUTOVAC et al., 2008).

O termo qualidade do leite é atualmente muito utilizado em função da importância da indústria de laticínios no contexto econômico do país. O leite de alta qualidade pode ser caracterizado como um alimento livre de agentes patogênicos e outros contaminantes, apresentando reduzida contaminação microbiana, sabor agradável, adequada composição e baixa contagem de células somáticas (SANTOS, 2004).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa N° 37 de 31 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000), os parâmetros físicos estabelecidos para o leite de cabra destinado ao consumo humano são: acidez entre 13 a 18°D, densidade a 15°C entre 1,028 a 1,034 g/L e ponto de congelamento médio de -0,58°C.

A produção e a qualidade do leite de cabra estão diretamente relacionadas a diversos fatores, como tipo e qualidade da dieta fornecida aos animais, raça, período de lactação e condições climáticas (ZAMBOM et al., 2005), sendo a alimentação considerada um fator determinante na produção e composição do leite (PARK, 2001; QUEIROGA; COSTA, 2004).

Além das células de descamação do epitélio mamário, as células somáticas do leite incluem as células de defesa que o organismo animal remete ao úbere em resposta a uma injúria de natureza física, química ou infecciosa, representando uma ferramenta indicativa da saúde do rebanho e, conseqüentemente, da qualidade do leite (MAGALHÃES, 2005).

A contagem de células somáticas também é utilizada como indicador de qualidade do leite em animais sadios (HAENLEIN, 1996; HAENLEIN, 2002). Para vacas sadias, a contagem de células somáticas é, em geral, inferior a 200.000 células/mL de leite (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1996) e para o leite de cabra é inferior a 400.000 células/mL (McDOUGALL et al., 2001).

Essa maior quantidade de células somáticas no leite de cabra é atribuída à maneira como o leite é secretado pela glândula mamária e, na espécie caprina, o leite é secretado com pequenas porções celulares provenientes da descamação do tecido alveolar (BOUTINAUD; JAMMES, 2002; POUTREL; LERONDELLE, 1983).

Além disso, o conhecimento do conteúdo microbiano, assim como do tipo de bactéria presente no leite, é de grande importância no controle de qualidade, uma vez que o conteúdo microbiano elevado pode indicar falhas no processo de obtenção e armazenamento do produto (MAGALHÃES, 2005).

A saúde da glândula mamária está diretamente relacionada com a quantidade e qualidade do leite produzido. No Brasil, em decorrência da alta prevalência de mastite nos rebanhos, as perdas em produção podem chegar a 15% (SANTOS; FONSECA, 2006). Essas perdas causam prejuízos ao produtor e à indústria de laticínios, em função da redução no rendimento para a fabricação de queijos, diminuição da qualidade e da vida útil dos derivados lácteos (CORTINHAS et al., 2009).

Assim, a utilização de plantas com propriedades antioxidantes (CHEEL et al., 2005) e antibacterianas (BASKARAN et al., 2009; CIMANGA et al., 2002; MAYAUD et al., 2008; PEREIRA et al., 2004; SCHUCK et al., 2001; WANNISSORN et al., 2005), como o capim-limão, podem reduzir a contaminação microbiana e a incidência de mastite, com vantagens do ponto de vista econômico, evitando gastos com medicamentos, redução da qualidade do leite e até morte do animal (NATZKE, 1981).

Outro aspecto positivo do uso de produtos naturais no controle de mastite está relacionado à saúde, pois muitos antibióticos utilizados nos tratamentos, além de terem baixos índices de cura (DINGWELL et al., 2003), podem levar ao surgimento de resistência das bactérias (BERGHASH et al., 1983) e ainda deixar resíduos no leite, prejudicando a saúde dos consumidores (ERSKINE; WAGNER; DEGRAVES, 2003).

2.3 Oxidação do leite de cabra

A oxidação lipídica é uma das principais reações deteriorativas que podem ocorrer durante o processamento, armazenamento e distribuição dos alimentos, sendo responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, tornando o leite e seus derivados impróprios para o consumo (HEDEGAARD et al., 2006). Além disso, ela também provoca outras alterações que irão afetar a qualidade nutricional, a integridade e a segurança dos alimentos, por meio da formação de compostos potencialmente tóxicos (ARUOMA, 1998; HAVEMOSE et al., 2006; KUBOW, 1992).

O processo oxidativo em produtos lácteos resulta da aceleração dos processos de oxidação já iniciados no leite e a extensão dessa oxidação vai depender do balanço entre pró-oxidantes, como metais de transição (cobre e ferro), e antioxidantes naturais, como os tocoferóis e o ácido ascórbico (HEDEGAARD et al., 2006; KRISTENSEN et al., 2004).

A oxidação lipídica é constituída de três fases principais: iniciação, propagação e terminação (SEVANI; HOCHSTEIN, 1985). A fase de iniciação está relacionada com a formação de radicais livres, principalmente o ânion superóxido e os radicais hidroxil e peroxil, através de reações em cadeia até o total esgotamento das reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio (KIRK, 1984).

Na fase de propagação, ocorre a formação de diversos peróxidos e hidroperóxidos (FRANKEL, 1980; GRAY; GOMAA; BUCKLEY, 1996; WANG; JIANG; LIN, 1995), no entanto como esses compostos são instáveis, a mensuração é limitada à fase inicial da oxidação lipídica, uma vez que as reações continuam a ocorrer até a fase de terminação (SEVANI; HOCHSTEIN, 1985).

Uma das técnicas utilizadas para a determinação dos produtos iniciais da oxidação lipídica é o índice de peróxido (HAYMOSE et al., 2004; KING, 1962; ØSTDAL; ANDERSON; NIELSEN, 2000; SHANTA; DECKER, 1993). De acordo com esta metodologia, os peróxidos presentes na gordura oxidam o Fe^{2+} a Fe^{3+} e as leituras são realizadas em comprimento de onda de 500 nm, sob a forma de cloreto ou tiocianato férrico.

Com o esgotamento dos substratos, a fase de propagação chega ao fim e inicia-se a fase de terminação, com os produtos secundários da oxidação, os quais são estáveis e não reativos (KUBOW, 1992). Esses produtos compreendem os derivados da decomposição de hidroperóxidos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos (SEVANI; HOCHSTEIN, 1985; KUBOW, 1992; LI; CHOW, 1994). Dentre os aldeídos, o malonaldeído pode ser mensurado e serve como indicador dos produtos secundários da oxidação lipídica, através da técnica de TBARS ou teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (STAPELFELDT; NIELSEN; SKIBSTED, 1997; KRISTENSEN; SKIBSTED, 1999).

A técnica de TBARS está baseada na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com o malonaldeído, um aldeído com três átomos de carbono e, geralmente, uma molécula de malonaldeído reage com duas moléculas de TBA, formando um complexo, que é detectado em comprimento de onda de 532 nm, sendo a faixa de leitura ideal entre 500 a 550 nm (RAHARJO; SOFOS; SCHMIDT, 1992; ROSMINI et al., 1996).

2.4 Antioxidantes e estabilidade oxidativa do leite de cabra

Normalmente, os lipídios são protegidos contra a oxidação por antioxidantes naturais presentes no leite *in natura* (LINDMARK-MANSSON; AKESSON, 2000; KRISTENSEN et al., 2004), como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos, como os flavonóides, os quais são capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis (HALLIWELL, 2001; KRISTENSEN et al., 2004).

O leite deve apresentar elevada capacidade antioxidante para que possa chegar ao consumidor com suas propriedades nutricionais e organolépticas preservadas, pois os processos oxidativos diminuem sua vida útil e de seus derivados, além de promover a formação de sabores e odores desagradáveis (HAVEMOSE et al., 2006; VAN AARDT et al., 2005).

O balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes é crítico para a manutenção da estabilidade oxidativa do leite (KRISTENSEN et al., 2004) e o aumento de ácidos graxos insaturados favorece a oxidação lipídica (PALMQUIST; BEAULIEU; BARBANO, 1993; BARREFORS et al., 1995; HAVEMOSE et al., 2004; TIMMONS et al., 2001), assim como também influencia o acúmulo de hidroperóxidos lipídicos (KORYCKA-DAHL; RICHARDSON, 1980).

Nesse sentido, estudos comprovam que antioxidantes como tocoferóis e carotenóides podem ser transferidos para o leite através da alimentação e assim melhorar a estabilidade oxidativa do leite (BARREFORS et al., 2005; FOCANT et al., 1998). Focant et al. (1998) verificaram que a suplementação de vacas leiteiras com vitamina E aumentou a concentração de α -tocoferol em cerca de 45% no leite e foi suficiente para impedir a oxidação lipídica, mesmo com aumento no teor de ácidos graxos insaturados, principalmente o oléico. Da mesma forma, Al-Mabruk et al. (2004) verificaram que a suplementação com vitamina E evitou a deterioração oxidativa do leite de vacas, embora tenha sido verificado aumento do perfil de ácidos graxos insaturados, perdas mais rápidas de α -tocoferol e aumento das substâncias reativas ao TBA.

Antioxidantes fenólicos presentes em plantas atuam como sequestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais, tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992). Mourão (2007) verificou que o ácido indol-3-acético (AIA), uma auxina natural produzida por células vegetais, animais e alguns microrganismos, apresentou efeito antioxidante em fígado de ratos, promovendo a proteção do tecido hepático após a indução de estresse oxidativo via administração de um hepatocarcinógeno.

Nesse sentido, diversos trabalhos comprovam que ácidos fenólicos, como o ácido clorogênico, caféico, *p*-cumárico e ferúlico, apresentam atividade antioxidante significativa, indicando serem os ácidos fenólicos os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos de plantas (DZIEDZIC; HUDSON, 1984; NAGEN; ALBUQUERQUE; MIRANDA, 1992; PAPADOPOULOS; BOSKOU, 1991; VON GADOW; JOUBERT; HANSMANN, 1997).

Alguns pesquisadores verificaram que os ácidos caféico, clorogênico e protocatequínico apresentaram atividade antioxidante maior que o α -tocoferol, β -caroteno e vitamina C em experimentos *in vitro* (LARANJINHA; ALMEIDA; MADEIRA, 1994; LARANJINHA et al., 1996; VINSON et al., 1995; VON GADOW; JOUBERT; HANSMANN, 1997).

Cheel et al. (2005) avaliaram a atividade de diferentes extratos e compostos obtidos das folhas de capim-limão e verificaram a presença de sete compostos com propriedades antioxidantes, dentre eles o ácido caféico e o ácido clorogênico. Portanto, em função da presença de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes em sua composição (CHEEL et al., 2005), o capim-limão pode atuar como antioxidante e aumentar a estabilidade oxidativa do leite de cabra.

2.5 Influência do estresse na produção do leite de cabra

O estresse é caracterizado por um conjunto de reações fisiológicas que podem levar o organismo ao desequilíbrio. Um dos primeiros estudos sobre estresse foi realizado em 1936, pelo pesquisador canadense Hans Selye (apud NEYLAN, 1998), que observou um padrão específico na resposta comportamental e física dos animais, o qual ficou conhecido como “Síndrome Geral de Adaptação”.

A resposta mais conhecida do estresse é a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e corticóides (cortisol) na corrente sanguínea, como resultado da ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (BISPO; LANZIOTTI, 1998; MATTERI; CARROL; DYER, 2000).

Estudos comprovam que animais submetidos a manejos estressantes apresentam aumento nos níveis de cortisol e redução da produção de leite (BREUER et al., 2000; HEMSWORTH et al., 2000; RUSHEN; DePASSILLÉ; MUNKSGAARD, 1999). A ejeção do leite durante a ordenha é essencial para garantir a retirada completa de leite e reduzir a incidência de mastite (GRÖHN; EICKER; HERTL, 1995) e, aparentemente, essa remoção está relacionada a características individuais do animal e ao seu comportamento em situações de estresse (VAN REENEN et al., 2002).

Além disso, outros fatores também podem contribuir para perdas produtivas relacionadas ao estresse, podendo provocar aumento na liberação de catecolaminas, falhas na liberação de ocitocina e diminuição do fluxo sanguíneo no úbere (NEGRÃO; MARNET, 2003). Porcionato et al. (2009) verificaram maiores porcentagem de coices, sobrepessos, derrubada de teteiras, micções e vocalizações para vacas primíparas nas primeiras semanas de lactação, mostrando que as primeiras ordenhas também podem provocar estresse nos animais.

Adicionalmente, mudanças no ambiente também podem causar estresse e provocar aumento na concentração plasmática de cortisol e frequência cardíaca (BRUCKMAIER; SCHAMS; BLUM, 1993; RUSHEN et al., 2001). Canaes et al. (2009) verificaram aumento nos níveis plasmáticos de cortisol e redução na produção de leite de cabras leiteiras após transporte e mudança do local de manejo.

Além disso, o estresse pode aumentar a taxa metabólica do organismo, provocando desequilíbrio entre as taxas de redução e oxidação celular, acelerando o processo de apoptose na glândula mamária (STEFANON et al., 2002; BOUTINAUD; GUINARD-FLAMENT; JAMMES, 2004). As espécies reativas de oxigênio também podem aumentar no organismo em função de fatores estressores, podendo intensificar o processo de apoptose do tecido mamário (STEFANON et al., 2002; TIAN et al., 2005).

Assim, a liberação de cortisol e catecolaminas na corrente sanguínea pode afetar o sistema imune dos animais (CRARY et al., 1983; LANDMANN et al., 1984) e provocar maior perda de células secretoras pelo úbere, ocasionando aumento na contagem de células somáticas no leite (CANAES et al., 2009; YAGI et al., 2004).

Nesse sentido, o uso de plantas com propriedades antioxidantes na alimentação animal pode contribuir para a redução do estresse, em função de benefícios relacionados ao bem-estar (HOSODA et al., 2006).

2.6 Apoptose do tecido mamário

A apoptose ocorre em resposta a um estímulo fisiológico que culmina com a morte celular programada, sem alterações na arquitetura ou na fisiologia dos tecidos (HOCKENBERY, 1995), pois as células apoptóticas são eliminadas por fagocitose antes de perderem sua integridade (STRANGE et al., 1992). Conseqüentemente, não há inflamação e o processo pode ser histologicamente imperceptível em muitos tecidos (WILDE et al., 1997). Contrariamente, na morte por necrose ocorre perda de integridade da membrana e aparecimento de processos inflamatórios (STRANGE et al., 1992).

A apoptose é uma forma de morte celular dependente de adenosina trifosfato (ATP), caracterizada morfológicamente por condensação da cromatina e fragmentação nuclear, com diminuição do tamanho da célula (GRANVILLE et al., 1998; REED, 2000). Conseqüentemente, ocorre fragmentação dos corpos apoptóticos limitados por uma membrana, que são rapidamente removidos por células fagocíticas (SLÁDEK; RYSÁNEK, 2000).

Bioquimicamente, a apoptose é caracterizada pela ativação de caspases, que são proteases altamente específicas que ativam substratos intracelulares. Existem duas classes de caspases especializadas, as iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e as efetoras (caspases 3, 6 e 7). As caspases iniciadoras são ativadas após estímulo apoptótico por auto-proteólise, enquanto as caspases efetoras se ativam através das caspases iniciadoras, em uma cascata amplificada. A ativação da onda de caspases inicia uma cascata proteolítica que leva à fragmentação do ácido desoxirribonucléico

(DNA) e clivagem das principais proteínas reguladoras, levando à morte celular (CHANG; YANG, 2000).

A apoptose é o elemento-chave para o desenvolvimento e função da glândula mamária, sendo um processo crítico para a renovação das células epiteliais durante a involução (CAPUCO; AKERS, 1999; CAPUCO et al., 2003). Tanto em bovinos, como em caprinos, a morte celular por apoptose parece ser um evento fisiológico comum no tecido mamário que aumenta em determinados momentos da lactação. Após o pico de lactação, o processo de apoptose das células alveolares aumenta gradualmente, reduzindo a produção de leite até o final da lactação (BOUTINAUD; GUINARD-FLAMENT; JAMMES, 2004; TIAN et al., 2005). Em cabras, verificou-se que a produção de leite diminuiu por volta de 32% entre os dias 60 e 160 de lactação, enquanto que o número de células (avaliados pela quantidade total de DNA) diminuiu 35% (KNIGHT; PEAKER, 1984).

Adicionalmente, outros fatores também podem contribuir com processo apoptótico, como a presença de radicais livres e a mastite. O excesso de espécies reativas de oxigênio no organismo pode danificar estruturas, como DNA, ácido ribonucléico (RNA), proteínas e componentes lipídicos e danificar a própria célula (ALLEN; TRESINI, 2000; KRUTMANN; GREWE, 1995; WILGUS et al., 2002). A indução de apoptose por patógenos bacterianos, como *Staphylococcus aureus*, principal agente causador da mastite, também já foi comprovada em diversos trabalhos (DALLARD, 2007; LONG et al., 2001; SHEFFIELD, 1997; WESSON et al., 2000), mostrando a importância do controle da mastite para a longevidade das células epiteliais da glândula mamária.

Nesse sentido, a utilização plantas com propriedades antioxidantes, como o capim-limão (CHEEL et al., 2005), pode reduzir o processo apoptótico do tecido mamário e aumentar a sobrevivência das células alveolares ao final da lactação e, conseqüentemente, aumentar a vida produtiva do animal (FURTH, 1999).

2.7 Capim-limão

O capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) é considerado uma planta medicinal e aromática, pertencente à família *Poaceae* e, embora seja originária da Índia, também pode ser encontrada nas Américas, África e Austrália (SILVA et al., 2003; DUARTE; ZANETI, 2004).

É conhecido no Brasil por diversos nomes populares, tais como capim-cidreira, capim-cidró, capim-santo, capim-cheiroso e em países de língua inglesa, como *lemongrass* (CORREIA, 1984), sendo cultivado para produção comercial de óleo essencial, rico em citral. No Peru é utilizado para preparação de refrigerantes, chás e infusão, sendo largamente utilizado na medicina popular no tratamento de distúrbios digestivos, inflamações, diabetes, distúrbios do sistema nervoso e outros problemas de saúde (CARLINI et al., 1986).

Seu óleo essencial possui forte odor de limão e é largamente empregado como aromatizante em perfumaria e cosmética, porém seu maior emprego é na indústria farmacêutica, servindo de matéria-prima para a síntese de importantes compostos, como iononas, metil-iononas e vitamina A (CARVALHO et al., 2005). A composição química do óleo essencial de capim-limão é relatada em diversos trabalhos, sendo o citral o constituinte principal (47 a 85%), formado por uma mistura dos isômeros geranial e neral (PINO; ROSADO, 2000; KASALI; OYEDEJI; ASHILOKUN, 2001; SIDIBÉ et al., 2001).

O citral é citado como sendo o principal responsável pelas atividades atribuídas ao seu óleo essencial, como atividade anti-helmíntica (KOKATE; VARMA, 1971; ALMEIDA et al., 2003), antibacteriana (CIMANGA et al., 2002; ONAWUNMI; YISAK; OGUNLANA, 1984; PEREIRA et al., 2004), antifúngica (SCHUCK et al., 2001; MAHANTA et al., 2007; VIOLLON; CHAUMONT, 1994; WANNISSORN; JARIKASEM; SOONTORNTANASART, 1996), inseticida (RAJAPAKSE; VAN EMDEN, 1997; SAMARASEKERA; KALHARI, 2006), diurética (GÁLVEZ et al., 1998), anticarcinogênica (PUATANACHOKCHAI et al., 2002), além de comprovado efeito parasitológico contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (SCHUCK et al., 2001; WANNISSORN et al., 2005).

Na última década tem sido demonstrado que os antioxidantes e seqüestradores de radicais livres são importantes na prevenção de patologias como a aterosclerose, doenças cardíacas, câncer e artrite (MIDDLETON JUNIOR; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000). Flavonóides e compostos fenólicos de plantas foram relatados como potentes seqüestradores de radicais livres e ocorrem com freqüência em plantas medicinais e aromáticas (CHEEL et al., 2005). Esse efeito antioxidante é atribuído à presença de ácidos fenólicos, como os ácidos caféico, clorogênico e protocatequínico (DZIEDZIC; HUDSON, 1984; NAGEN; ALBUQUERQUE; MIRANDA, 1992; PAPADOPOULOS; BOSKOU, 1991; VON GADOW; JOUBERT; HANSMANN, 1997).

O potencial antioxidante do capim-limão (CHEEL et al., 2005; MAHMOUD, 1994; MENÉNDEZ, 1993; ONAWUNMI; YISAK; OGUNLANA, 1984; SIMÕES et al., 1986) sugere que sua utilização na alimentação de caprinos leiteiros pode ser uma alternativa para melhorar a qualidade do leite de cabra, podendo resultar em diminuição da apoptose e aumento da vida útil deste produto.

Em estudo recente, Canaes (2011) verificou que a inclusão de teores crescentes de capim-limão em substituição à silagem de milho na alimentação de cabras leiteiras aumentou a produção de leite, alterando 40% dos ácidos graxos do leite, com aumento da concentração de ácidos graxos poliinsaturados e aumento de 134% na concentração de CLA. Nesse sentido, é possível que os compostos antioxidantes presentes no capim-limão (CHEEL et al., 2005) possam prevenir a oxidação lipídica do leite avaliada no presente estudo, mesmo com o aumento da concentração de ácidos graxos poliinsaturados no leite.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), campus de Pirassununga-SP (Latitude 21° 58' 93" sul, Longitude 47° 26' 00" oeste e Altitude de 623 metros) e compreendeu três fases distintas:

- **Primeira fase (Fase 1):** Avaliação do potencial antioxidante do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) sobre a produção, composição e características físico-químicas, contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e oxidação lipídica do leite de cabra;
- **Segunda fase (Fase 2):** Avaliação do potencial antioxidante do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) sobre a produção, composição e características físico-químicas, contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e oxidação lipídica do leite de cabra durante estresse via administração pontual de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH);
- **Terceira fase (Fase 3):** Avaliação do potencial antioxidante do capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) sobre a apoptose do tecido mamário.

O presente estudo fez parte de um projeto de pesquisa aprovado pela FAPESP, envolvendo outras duas bolsas. Os dados e as análises comuns aos outros trabalhos serão apresentados com o devido mérito ao seu responsável.

Os três experimentos foram conduzidos simultaneamente, utilizando a mesma alimentação e os mesmos animais, entretanto apenas alguns resultados foram comuns. Dentre eles, o consumo de matéria seca, a produção, composição e características físico-químicas do leite, contagem de células somáticas e as análises de cortisol.

As análises de composição, características físico-químicas, contagem de células somáticas, perfil de ácidos graxos do leite e cortisol foram realizados pela pós-graduanda Taissa de Souza Canaes, assim como a descrição das metodologias utilizadas nessas análises, as quais foram originalmente descritas na tese da aluna em questão (CANAES, 2011).

3.1 Primeira fase (Fase 1)

3.1.1 Animais, instalações experimentais e manejo da ordenha

Foram utilizadas 44 cabras da raça Saanen homogêneas quanto ao peso vivo ($59,17 \pm 2,69$ kg), dias em lactação ($102,5 \pm 33,12$ dias), produção de leite ($2,58 \pm 0,27$ kg), idade (3 anos $\pm$ 2 meses) e escore corporal ($3,0 \pm 0,5$). Esses animais foram mantidos em confinamento, agrupados em quatro baias experimentais cobertas, com piso ripado (11 animais/baia), providas de comedouro, bebedouro, cocho para sal mineral e livre acesso ao solário de piso cimentado.

Durante o período experimental foram coletados os seguintes dados climáticos médios da estação meteorológica Campbell Scientific modelo 21X (L): temperatura ($23,2 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$), sensação térmica ($25,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$), radiação solar ($180,0 \pm 12,8 \text{ W m}^{-2}$), umidade relativa ($79,7 \pm 0,6\%$), velocidade do vento ($2,84 \pm 0,1 \text{ km h}^{-1}$) e pluviosidade total (29,8 mm), conforme descrito por Canaes (2011).

As fêmeas foram ordenhadas uma vez ao dia, sempre com início às 6:00 h, em sistema de ordenhadeira mecânica do tipo paralela (Westfalia Surge[®]), com seis conjuntos de teteiras reguladas para manter 120 pulsações/minuto com vácuo ajustado para pressão de 44 kPa. Os animais foram pesados semanalmente, sempre após a ordenha e antes da alimentação durante todo o período experimental.

A rotina de ordenha foi mantida a mesma durante todo o período experimental:

- Lavagem do sistema de ordenha antes do início;
- Retirada de água e preparo do equipamento para a ordenha;
- Fornecimento de 400 g de milho moído no canzil;
- Condução dos animais da baia até a sala de ordenha;
- Registro do número dos animais;
- Desinfecção dos tetos com solução *pré-dipping* (solução iodada a 0,5%);
- Secagem dos tetos com papel toalha;
- Teste da caneca com descarte dos três primeiros jatos de leite para diagnóstico de mastite;

- Retirada do leite por ordenha mecanizada;
- Retirada manual do leite residual;
- Realização do *pós-dipping* com solução glicerizada de iodo a 1,0%;
- Controle leiteiro individual;
- Retorno do lote ordenhado à sua respectiva baia;
- Condução do próximo lote à sala de ordenha.

3.1.2 Período experimental e tratamentos

A primeira fase do experimento foi realizada nos meses de setembro e outubro de 2009 e teve duração de 54 dias, sendo 7 dias de adaptação e 47 dias de fornecimento dos tratamentos. Foram utilizadas quatro rações experimentais com relação volumoso:concentrado de 53:47 na matéria seca.

As rações experimentais foram balanceadas para atender as exigências de cabras em lactação, segundo o AFRC (1993) e a fonte de variação da composição foi a substituição de silagem de milho por capim-limão, de acordo com os tratamentos:

- T1: Concentrado + 0% de substituição da silagem de milho por capim-limão;
- T2: Concentrado + 33,5% de substituição da silagem de milho por capim-limão;
- T3: Concentrado + 66,5% de substituição da silagem de milho por capim-limão;
- T4: Concentrado + 100% de substituição da silagem de milho por capim-limão.

O concentrado foi formulado com milho moído, farelo de soja, núcleo mineral e óleo de soja e peletizado junto com o feno de capim-limão moído. Para o tratamento controle (T1), apenas o concentrado foi peletizado e fornecido misturado à silagem de milho *in natura*. A peletização foi realizada na Fábrica de Rações da UNESP (Campus de Jaboticabal) e a secagem dos *pellets* realizada no local do experimento (Laboratório de Fisiologia Animal da FZEA/USP). O capim-limão foi adquirido de uma propriedade localizada em Cajuru – SP e o corte realizado aos 90 dias após o plantio, conforme descrito por Canaes (2011).

A composição química dos ingredientes e das rações estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. O capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) foi incluído em 17,82; 35,38 e 53,20% na matéria seca, correspondendo aos teores de substituição de 33,5% (T2), 66,5% (T3) e 100% (T4) da silagem de milho por capim-limão, respectivamente e as rações foram formuladas para serem isoprotéicas (Tabela 4).

Tabela 3 – Composição química dos ingredientes das rações experimentais

Ingredientes	Composição química ¹										
	MS	PB	FB	EE	ENN	FDN	FDA	NDT	MM	CNF	CT
Silagem ²	39,6	10,4	15,3	3,7	66,4	36,8	20,0	73,4	4,2	49,1	81,7
Capim ³	97,1	10,3	21,9	3,7	57,8	64,9	31,5	64,4	6,3	21,1	79,7
Milho moído	88,1	9,1	2,9	3,9	83,0	14,9	4,6	85,3	1,2	72,1	85,9
Farelo de soja	87,6	51,1	7,1	1,9	34,6	14,3	11,6	79,9	5,4	32,7	41,7
Óleo de soja	99,0	-	-	5,7	-	-	-	-	-	-	-
Núcleo ⁴	97,6	-	-	-	-	-	-	-	87,3	-	-

¹ Resultados expressos na matéria seca a 100%: MS (matéria seca); MM (matéria mineral); PB (proteína bruta); FB (fibra bruta); EE (extrato etéreo); ENN (extrativo não nitrogenado); FDA (fibra em detergente ácido); FDN (fibra em detergente neutro); NDT (nutrientes digestíveis totais); CNF (carboidratos não fibrosos); CT (carboidratos totais); ² Silagem de milho; ³ Feno de capim-limão; ⁴ Núcleo mineral: composição por kg do produto: Cálcio (Ca) 240 g, Fósforo (P) 80 g, Sódio (Na) 20 g, Enxofre (S) 15 g, Magnésio (Mg) 18 g, Cromo (Cr) 13 mg, Ferro (Fe) 2600 mg, Zinco (Zn) 5040 mg, Manganês (Mn) 4560 mg, Flúor (F) 800 mg, Iodo (I) 90 mg, Selênio (Se) 30 mg, Cobalto (Co) 90 mg, Cobre (Cu) 1520 mg; Vitamina A 420000 UI kg⁻¹, Vitamina D 120000 UI kg⁻¹, Vitamina E 2400 mg. Adaptado de Canaes (2011).

As rações (*pellets* de capim-limão, *pellets* de concentrado e silagem de milho *in natura*) foram pesadas e fornecidas uma vez ao dia, sempre após a ordenha e a oferta de alimento ajustada para consumo de 3,5% do peso vivo e sobra diária de 15%, por meio da pesagem diária das sobras na manhã seguinte ao fornecimento. Água e suplemento mineral foram fornecidos *ad libitum*.

Tabela 4 – Proporção dos ingredientes e composição química das rações experimentais (% na MS)

Ingredientes	Tratamentos ¹			
	T1	T2	T3	T4
	(% de inclusão na dieta)			
Silagem de milho	53,20	35,38	17,82	0,00
Capim-limão	0,00	17,82	35,38	53,20
Milho moído	30,40	30,40	30,40	30,40
Farelo de soja	12,17	12,17	12,17	12,17
Núcleo mineral ²	2,13	2,13	2,13	2,13
Óleo de soja	2,10	2,10	2,10	2,10
Composição química	(% da MS)			
MS	62,68	72,94	83,04	93,29
PB	14,52	14,50	14,48	14,47
EE	3,49	3,49	3,50	3,51
ENN	64,75	63,22	61,71	60,17
FDN	25,83	30,84	35,78	40,79
FDA	13,43	15,48	17,50	19,55
NDT	74,68	73,08	71,51	69,91
MM	5,26	5,63	6,00	6,37
CNF	52,06	47,05	42,13	37,13
CT	74,63	74,27	73,91	73,55
Ácidos graxos	mg/g de lipídeo			
C _{14:0}	0,23	0,46	0,69	0,93
C _{16:0}	10,55	10,84	11,13	11,43
C _{18:0}	2,44	2,43	2,42	2,40
C _{18:1} <i>cis</i>	13,34	11,55	9,78	7,98
C _{18:2} (n-6)	28,10	26,13	24,19	22,22
C _{18:3} (n-3)	3,24	5,14	7,01	8,91

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão. Resultados expressos na matéria seca a 100%: MS (matéria seca); MM (matéria mineral); PB (proteína bruta); FB (fibra bruta); EE (extrato etéreo); ENN (extrativo não nitrogenado); FDA (fibra em detergente ácido); FDN (fibra em detergente neutro); NDT (nutrientes digestíveis totais); CNF (carboidratos não fibrosos); CT (carboidratos totais); ² Composição por kg do produto: Cálcio (Ca) 240 g, Fósforo (P) 80 g, Sódio (Na) 20 g, Enxofre (S) 15 g, Magnésio (Mg) 18 g, Cromo (Cr) 13 mg, Ferro (Fe) 2600 mg, Zinco (Zn) 5040 mg, Manganês (Mn) 4560 mg, Flúor (F) 800 mg, Iodo (I) 90 mg, Selênio (Se) 30 mg, Cobalto (Co) 90 mg, Cobre (Cu) 1520 mg; Vitamina A 420000 UI kg⁻¹, Vitamina D 120000 UI kg⁻¹, Vitamina E 2400 mg. Adaptado de Canaes (2011).

As amostras das rações experimentais e dos ingredientes foram analisadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia da FZEA/USP. Para determinação do teor de matéria seca, as amostras foram descongeladas, pesadas e levadas para secar em estufa com circulação forçada de ar a 65°C até peso constante. Em seguida, o material foi moído em moinho tipo Willey com peneira de 1,0 mm para determinação de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE) e estimado o teor de extrativo não nitrogenado (ENN), segundo a AOAC (1980). A proteína foi determinada pelo método micro-Kjeldahl (AOAC, 1980) e a fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) segundo Goering e Van Soest (1970). Os resultados de nutrientes digestíveis totais (NDT), carboidratos totais (CT) e carboidratos não fibrosos (CNF) foram calculados pelas fórmulas: %NDT= $[88,9 - (0,779 \times \text{FDA}\%)]$ (PATTERSON, 2001); %CT= $100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$ (SNIFFEN et al., 1992); %CNF= $100 - (\%PB + \%EE + \%FDN + \%MM)$ (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991), conforme descrito por Canaes (2011).

3.1.3 Produção, análises físico-químicas e perfil de ácidos graxos do leite de cabra

A produção de leite de cabra foi mensurada diariamente através de controle leiteiro individual dos animais. As amostras de leite utilizadas para as análises físico-químicas e para o perfil de ácidos graxos foram obtidas após 42 dias do fornecimento da dieta experimental e congeladas a -20°C, conforme descrito por Canaes (2011).

Para avaliação da acidez do leite foi utilizado o método Dornic e 10 mL da amostra homogeneizada foram transferidos para um béquer, adicionando-se 5 gotas de solução de fenolftaleína a 1,0%. Em seguida, titulou-se com solução de NaOH 1/9 sob agitação constante até viragem para coloração rósea e o volume de solução gasto foi anotado. Cada 0,1 mL da solução Dornic corresponde a 1°C, o que corresponde a 0,01% de ácido láctico. O resultado da titulação foi multiplicado pelo fator de padronização da solução de NaOH, conforme descrito por Canaes (2011).

As demais análises físico-químicas do leite foram realizadas mediante o uso do equipamento Milkoscope Expert Automatic (Scope Electric®, Bulgaria-German), após a colheita do leite em frascos de 50 mL diretamente dos medidores após o término da ordenha e homogeneização do leite. O teor de sólidos totais do leite de cabra foi obtido pela soma dos teores de gordura, proteína, lactose e sais (BEHMER, 1980), conforme descrito por Canaes (2011). Todas as análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal da FZEA/USP.

Para a análise do perfil de ácidos graxos, a gordura do leite foi extraída por centrifugação a 17800 x g por 30 minutos a 4,0°C e a 19300 x g por 20 minutos a 4,0°C (FENG; LOCK; GARNSWORTHY, 2004). Em seguida, a gordura (cerca de 600 a 800 mg) foi metilada e os ésteres metílicos foram formados de acordo com Kramer et al. (1997). Com o objetivo de detectar possíveis perdas de ácidos graxos durante o processo de esterificação foi utilizado o ácido esteárico (C_{18:0}) como padrão externo e o ácido nonadecanóico (C_{19:0}) como padrão interno para quantificação dos ácidos graxos (Sigma Aldrich®), conforme descrito por Canaes (2011).

Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (GC Shimadzu 2010, com injeção automática), utilizando-se coluna capilar SP-2560 com 100 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno com 0,02 mm de espessura (Supelco, Bellefonte, PA). As condições cromatográficas foram: temperatura inicial da coluna de 70°C por 4 minutos, aumentando 13°C minuto⁻¹ até chegar a 175°C, sendo mantida por 27 minutos; em seguida, um novo aumento de 4°C minuto⁻¹ foi iniciado até chegar em 215°C, mantendo por 31 minutos; gás de arraste hidrogênio com fluxo de 40 cm s⁻¹.

Para identificação dos ácidos graxos formados durante a biohidrogenação, os seguintes padrões foram utilizados: standard C₄₋₂₄ de ácidos graxos (Supelco® TM 37), ácido vacênico C_{18:1} *trans*-11 (V038-1G, Sigma®), C₁₈ CLA: 2 *trans*-10, *cis*-12 (UC-61M 100 mg), CLA e C_{18:2} *cis*-9, *trans*-11 (UC-60M 100 mg), (NU-CHEK-PREP E.U.A®), conforme descrito por Canaes (2011). A análise do perfil de ácidos graxos foi realizada no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP em Pirassununga.

3.1.4 Contagem de células somáticas e contagem bacteriana total

As amostras de leite para a análise da contagem de células somáticas (CCS) foram colhidas após 42 dias do fornecimento da dieta experimental e congeladas a -20°C. A análise de CCS foi realizada pelo método microscópico tradicional para o leite de cabra e os corantes utilizados foram o Pyronin Y Methyl – Green (PYMG), recomendado por diferenciar células somáticas dos corpúsculos citoplasmáticos (ZENG et al., 1999) e pironina, corante específico de DNA, o qual é usado por diferenciar células que contém DNA de células que contém apenas RNA ou corpúsculos citoplasmáticos. Nesse processo, as células somáticas são coradas de azul e as células com apenas RNA são coradas de rosa (DULIN; PAAPE; WERGIN, 1982), conforme descrito por Canaes (2011).

As lâminas foram preparadas de acordo com o método de contagem microscópica padronizado por Prescott e Breed (1910) e descrito por Schalm, Carrol e Jain (1971), o qual se baseia na estimativa da totalidade de células presentes em uma amostra de leite, contabilizadas com auxílio de um microscópio óptico em objetiva de imersão com aumento de 1000x, conforme descrito por Canaes (2011).

Para o preparo das lâminas, 10 µL de leite homogeneizado foram pipetados e depositados sobre uma lâmina retangular (5 x 20 mm) com quatro áreas pré-definidas de 1,0 cm². As alíquotas foram pipetadas em duplicata, portanto em cada lâmina foram depositados leite de dois animais diferentes. O leite depositado em cada área foi espalhado (esfregaço) com alça de Drigalsky e após a secagem, as lâminas foram fixadas durante 5 minutos em solução Carnoy's (100 mL de ácido acético glacial + 300 mL de clorofórmio + 600 mL de etanol), 1 minuto em etanol 50%, 1 minuto em etanol 30% e 1 minuto em água destilada. Na sequência, as lâminas foram coradas durante 6 minutos em solução com 1,0 g de pironina-Y e 0,56 g de verde de metil em 196 mL de água destilada. Após completa secagem dos esfregaços, as lâminas foram imersas durante 1 minuto em butanol, 1 minuto em água destilada e secas novamente. Após a secagem, as lâminas foram armazenadas para leitura, conforme descrito por Canaes (2011).

Para a leitura das lâminas, considerou-se 100 campos microscópicos (Committee on Screening Tests-NMC e IDF/FIL apud VASCONCELOS, 1996) e o resultado final (indicado pelo número de células somáticas compreendendo células epiteliais, leucócitos mononucleares e polimorfonucleares contados em 100 campos em duplicata) foi multiplicado por um fator calculado por meio de relação matemática entre a quantidade de amostra, área do esfregaço e área do campo visual, denominado fator de trabalho, e os resultados foram calculados e apresentados na base Log, conforme descrito por Canaes (2011).

As amostras de leite para a análise de contagem bacteriana total (CBT) foram colhidas após 49 dias do fornecimento das rações experimentais. Após a ordenha completa, o leite foi homogeneizado e coletado diretamente do medidor em tubos de 50 mL devidamente identificados. Em seguida, foram adicionadas 4 gotas do conservante Azidiol e cada frasco foi homogeneizado delicadamente, tombando-o várias vezes para a total mistura do conservante ao leite.

Os frascos com leite e conservante foram acondicionados em caixa térmica refrigerada e enviados logo após a ordenha para o Laboratório de Análise de Leite da Clínica do Leite do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP em Piracicaba, onde a análise foi realizada através de citometria de fluxo (PO ANA 010).

3.1.5 Oxidação lipídica do leite de cabra

Para o acompanhamento dos produtos iniciais da oxidação foram colhidos 100 mL de leite de cada animal em garrafas plásticas diretamente dos medidores, após o término da ordenha e homogeneização, aos 42 dias do início do fornecimento das rações experimentais. Durante a colheita, as amostras foram armazenadas em caixa térmica refrigerada e, imediatamente após o término da ordenha, foram levadas ao Laboratório de Fisiologia Animal da FZEA/USP para início da análise (tempo 0 horas), segundo a metodologia descrita por Østdal, Andersen e Nielsen (2000) e Havemose et al. (2004).

Após homogeneização, 2,0 mL de leite de cada amostra foram transferidos para tubos tipo Falcon de 15 mL identificados e misturados com 2,0 mL de metanol. Em seguida, foram adicionados 4,0 mL de clorofórmio e as amostras foram homogeneizadas em agitador de tubos tipo Vórtex durante 30 segundos. Após nova homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 1500 g durante 10 minutos e 1,0 mL do precipitado foi separado em duplicata para tubos de vidro. Ao precipitado foi adicionado 1,0 mL de solução Tiocianato/ Fe^{+2} .

Para o preparo dessa solução de Tiocianato/ Fe^{+2} outras três soluções foram preparadas antes: Solução I: 0,4 g de cloreto de bário dihidratado diluído em 50 mL de água Mili-Q (água ultra-pura) foi misturado com 0,5 g de sulfato de Fe^{+2} heptahidratado diluído em 50 mL de água de água Mili-Q (água ultra-pura) e a solução final foi filtrada e o filtrado utilizado; Solução II: 3,0 g de tiocianato de amônio diluídos em 10 mL de água Mili-Q (água ultra-pura); Solução III: 50 mL de clorofórmio foram misturados com 50 mL de metanol. Após essa etapa, 250 μL da solução I, 250 μL da solução II e 25 mL da solução III foram misturados e formaram a solução de Tiocianato/ Fe^{+2} .

Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, 1,0 mL das amostras foram pipetados em duplicata para cubetas de quartzo e as absorbâncias determinadas a 500 nm, em espectrofotômetro modelo Beckman Coulter® DU-800 contra o branco (solução contendo todos os reagentes menos a amostra), no Laboratório de Química Biológica do Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP. Os mesmos procedimentos foram repetidos nas mesmas amostras após 48 horas (tempo 48 horas) mantidas à temperatura ambiente (média de 23°C).

Para avaliar os produtos secundários da oxidação, as análises de TBARS foram realizadas imediatamente após a colheita de leite (tempo 0 horas) e 48 horas (tempo 48 horas) depois do leite ter sido mantido à temperatura ambiente. As amostras também foram colhidas aos 42 dias do início do experimento e permaneceram refrigeradas até o momento da análise (tempo 0 horas).

De acordo com a metodologia descrita por King (1962), a oxidação lipídica foi analisada a partir da determinação dos produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA) e 17,6 mL de leite foram pipetados de cada amostra e transferidos para tubos tipo Falcon de 50 mL identificados. As amostras foram aquecidas em banho-maria a 30°C e 1,0 mL da solução de ácido tricloroacético (TCA) (1,0 g de TCA dissolvido em 1,0 mL de água destilada) + 2,0 mL de etanol 95% foram adicionados. As amostras foram misturadas de forma vigorosa em agitador de tubos tipo Vórtex durante 10 segundos e deixadas em repouso durante 5 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, as amostras foram novamente homogeneizadas no agitador (Vórtex) e filtradas (papel filtro quantitativo JP42 – faixa azul com 12,5 cm de diâmetro) em outro tubo do tipo Falcon de 50 mL e 4,0 mL do filtrado foram separados em duplicata para tubos do tipo Falcon de 15 mL. Em cada tubo foi adicionado 1,0 mL da solução de ácido tiobarbitúrico (1,4 g de ácido 2-tiobarbitúrico dissolvido em 100 mL de etanol) e as amostras foram incubadas a 60°C durante 60 minutos. Após o total resfriamento, 400 µL das amostras (em duplicata) foram pipetadas em placas e lidas no equipamento ELISA (Multiscan MS, Labsystem®) a 540 nm, utilizando-se água destilada como padrão.

3.1.6 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e 11 repetições.

O modelo estatístico utilizado para as variáveis de peso corporal e produção de leite foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + D_j + (D_j \times T_i) + E_{ij}$$

Onde:

Y_{ij} = Variável dependente

μ = Média geral

T_i = Efeito de tratamento

D_j = Efeito de dias de fornecimento das rações experimentais

$D_j \times T_i$ = Interação entre dias de fornecimento das rações experimentais e tratamento

E_{ij} = Efeito aleatório

Para as variáveis de composição, características físico-químicas, contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e perfil de ácidos graxos do leite, o modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_i = \mu + T_i + E_i$$

Onde:

Y_i = Variável dependente

μ = Média geral

T_i = Efeito de tratamento

E_i = Efeito aleatório

O modelo utilizado para as variáveis de índice de peróxido e TBARS foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + H_j + (H_j \times T_i) + E_{ij}$$

Onde:

Y_{ij} = Variável dependente

μ = Média geral

T_i = Efeito de tratamento

H_j = Efeito de horas

$H_j \times T_i$ = Interação entre horas e tratamento

E_{ij} = Efeito aleatório

Os dados foram analisados utilizando-se o PROC MIXED do SAS (2002) e as médias apresentadas foram obtidas através do comando LSMEANS. Foram aplicados testes para polinômios ortogonais (linear, quadrático e cúbico) para todas as variáveis analisadas.

3.2 Segunda Fase (Fase 2)

3.2.1 Animais e período experimental

Foram utilizadas 44 cabras da raça Saanen ($62,60 \pm 2,59$ kg), aos $213,36 \pm 32,49$ dias em lactação, com produção de leite de $2,56 \pm 0,16$ kg, idade de 3 anos $\pm$ 2 meses e escore corporal de $3,0 \pm 0,5$.

A segunda fase do experimento foi realizada nos meses de janeiro e fevereiro de 2010 e teve duração de 39 dias, sendo 7 dias de adaptação e 32 dias de fornecimento dos tratamentos.

Durante o período experimental foram coletados os seguintes dados climáticos médios da estação meteorológica Campbell Scientific modelo 21X (L): temperatura ($22,6 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$), sensação térmica ($24,8 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$), radiação solar ($112,8 \pm 10,1 \text{ W m}^{-2}$), umidade relativa ($91,2 \pm 0,4\%$), velocidade do vento ($1,20 \pm 0,1 \text{ km h}^{-1}$) e pluviosidade total (39,8 mm), conforme descrito por Canaes (2011).

As rações experimentais e os demais procedimentos relacionados ao manejo experimental estão apresentados na primeira fase do período experimental.

As colheitas das amostras para análises produtivas, qualitativas e quantitativas foram realizadas após 24 horas da aplicação de ACTH ou placebo, seguindo os mesmos passos descritos na primeira fase do período experimental e utilizando as mesmas metodologias.

3.2.2 Tratamentos

Com o objetivo de avaliar o potencial antioxidante do capim-limão sobre a produção, composição, características físico-químicas, contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e oxidação lipídica do leite, os animais foram submetidos ao estresse pontual via administração endovenosa de 0,6 UI (Unidades Internacionais) kg^{-1} de peso vivo de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH (A_{6303} , 5000 UI, Sigma[®])) ou solução salina estéril a 0,9% (placebo) (FULKERSON e JAMIESON, 1982), conforme descrito por Canaes (2011).

As cabras foram selecionadas em duplas homogêneas para cada tratamento (T1, T2, T3 e T4), sendo que um animal recebeu ACTH e o outro placebo. Na semana seguinte, os animais que receberam ACTH na primeira semana, receberam placebo e vice-versa. O desafio foi realizado no horário da ordenha (6:00 h) durante quatro semanas e os resultados foram expressos pela média de todas as semanas de acordo com os teores de substituição do capim-limão e a administração de ACTH ou placebo, conforme descrito por Canaes (2011).

O sangue foi obtido mediante venopunção jugular e 9,0 mL foram colhidos em tubos do tipo *vacutainer* (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Rutherford, NJ) com anticoagulante contendo heparina sódica em cinco momentos: tempo -20 (20 minutos antes da administração de ACTH ou placebo); tempo 0 (no momento da aplicação de ACTH ou placebo e término da ordenha); tempo 60 (60 minutos após aplicação de ACTH ou placebo); tempo 120 (120 minutos após aplicação de ACTH ou placebo) e tempo 300 (300 minutos após aplicação de ACTH ou placebo), conforme descrito por Canaes (2011).

As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 x g durante 15 minutos a 15°C e os plasmas obtidos foram separados e congelados para posteriores análises. As análises plasmáticas de cortisol foram realizadas com auxílio de kits de dosagem imunoenzimática (EIA) de cortisol Monobind[®] (Monobind Inc., California, USA) e a curva padrão foi determinada utilizando-se sete pontos com as concentrações variando de 0,00 a 50,00 $\mu\text{g/dL}$. Para a leitura dos resultados foi utilizado um filtro com comprimento de onda de 450 nm e sensibilidade para a determinação de 0,10 $\mu\text{g/dL}$, conforme descrito por Canaes (2011).

3.2.3 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 com 11 repetições.

O modelo estatístico utilizado para as variáveis de peso corporal, produção, composição, características físico-químicas, contagem de células somáticas, contagem bacteriana total e perfil de ácidos graxos do leite foi:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + A_j + (A_j \times T_i) + E_{ij}$$

Onde:

Y_{ij} = Variável dependente

μ = Média geral

T_i = Efeito de tratamento

A_j = Efeito da aplicação de ACTH ou placebo

$A_j \times T_i$ = Interação entre a aplicação de ACTH ou placebo e tratamento

E_{ij} = Efeito aleatório

Para as variáveis de índice de peróxido e TBARS, o modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + H_k + (A_j \times H_k \times T_i) + E_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} = Variável dependente

μ = Média geral

T_i = Efeito de tratamento

A_j = Efeito da aplicação de ACTH ou placebo

H_k = Efeito de horas

$A_j \times H_k \times T_i$ = Interação entre a aplicação de ACTH ou placebo, horas e tratamento

E_{ijk} = Efeito aleatório

Os dados foram analisados utilizando-se o PROC MIXED do SAS (2002) e as médias apresentadas foram obtidas através do comando LSMEANS. Foram aplicados testes para polinômios ortogonais (linear, quadrático e cúbico) para todas as variáveis.

3.3 Terceira Fase (Fase 3)

3.3.1 Período experimental, animais e tratamentos

A terceira fase do experimento foi realizada em fevereiro de 2010, ao final do período de lactação dos animais. Para a realização da biópsia, foram sorteadas 12 cabras (três de cada tratamento), com produção de leite individual entre 1,5 a 2,5 kg e produção total de $2,03 \pm 0,04$ kg para cada tratamento.

3.3.2 Biópsia do tecido mamário

Duas horas após o término da ordenha mecânica, os animais sorteados foram separados e conduzidos novamente à plataforma de ordenha, onde foram contidos nos canzís com acesso a 400 g de milho moído. Inicialmente, foram injetados 5,0 mL de Monovin K (0,217 g vitamina K/100 mL) intramuscular em cada animal, aplicados 20 minutos antes do início da biópsia, com o objetivo de evitar eventual hemorragia.

As cabras foram ordenhadas manualmente para retirada do leite produzido no intervalo de duas horas e, em seguida, uma área de cerca de 20 cm² da glândula mamária esquerda de cada animal foi higienizada, tricotomizada e esterilizada com álcool 70% e iodo cirúrgico.

O local (ponto médio da glândula mamária esquerda) foi anestesiado em diferentes pontos (injeções subcutâneas) com 1,0 mL de Anestésico L (2,0 g cloridrato de lidocaína/100 mL) e uma incisão de aproximadamente 2,0 cm na pele e cápsula da glândula mamária foi feita com auxílio de bisturi descartável para facilitar a entrada do instrumento de biópsia (Trocater Bard[®] monoptty 22 mm) e a retirada dos tecidos, de acordo com a metodologia descrita por Farr et al. (1996).

Foram retirados quatro núcleos de tecido com peso médio de 8,65 mg de cada animal para análises de TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling), quantificação de DNA e fragmentação de DNA por eletroforese, quantificação de RNA e uma amostra extra para eventuais repetições. Os tecidos para análise de TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) foram armazenados em frascos contendo solução de formalina tampão 4% e os tecidos para as análises de DNA e RNA foram imediatamente embalados em papel alumínio e armazenados a -196°C em nitrogênio líquido.

Após a retirada dos tecidos, os coágulos de sangue foram retirados do úbere e o local do ferimento foi tratado com terra cortril spray (6,8 g de terramicina e 2,0 g de hidrocortisona/100 mL) e ungüento Miosthal (3,0 g de Dicloro Divinil Pirrolidona e 0,03 g de Orto-orto-dimetil-para-nitrofenil-fosforotioato/100 mL). Cada animal também recebeu 5,0 mL de antibiótico Penfort PPU (10.000.000 UI de benzil penicilina G procaína; 10.000.000 UI de benzil penicilina G benzatina e 20 g de sulfato de diidroestreptomicina/100 mL) e 1,0 mL de antiinflamatório Diclofenaco 50 (5,0 g de diclofenaco sódico/100 mL) em dose única. Os animais foram monitorados diariamente até a total recuperação (aproximadamente 7 dias).

3.3.3 TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling)

Para a análise de TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) foi utilizado o kit comercial *In situ cell death detection kit fluorescence* (Roche®, Alemanha) que detecta DNA fragmentado através da marcação do DNA de fita simples, por meio de uma transferase terminal, que adiciona nucleotídeos marcados ao DNA nos extremos 3' livres. Esses nucleotídeos marcados podem ser corados com fluorescência.

Após a biópsia, o tecido foi fixado em formalina tampão 4% e no dia seguinte transferido para o etanol 70%. Para o emblocamento dos tecidos em parafina e posterior preparo dos cortes histológicos em micrótomo foram seguidos os seguintes passos, segundo metodologia padrão de histologia: 30 minutos em álcool 95%; 30 minutos em álcool absoluto (100%) I; 30 minutos em álcool absoluto (100%) II; 30 minutos em xilol puro I; 30 minutos em xilol puro II; 30 minutos em parafina I (aquecida em estufa a 58°C) e 30 minutos em parafina II (aquecida em estufa a 58°C).

A parafina de inclusão (aquecida em estufa a 58°C) foi colocada em formas de papel (aproximadamente 3,0 cm de altura x 2,0 cm de largura x 2,0 cm de profundidade) para formar os blocos. Os tecidos foram colocados no centro dos blocos na posição vertical. Após a inclusão e secagem dos blocos, foram realizados os cortes histológicos com espessura de 6,0 µm em micrótomo (Leica® modelo RM2245) no Laboratório de Imunologia de Parasitas e Parasitologia do Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP.

As tiras de parafina com tecido foram colocadas em água a 37°C e retiradas com lâminas histológicas identificadas. Depois de secas, as lâminas foram colocadas em estufa a 37°C *over night* e, no dia seguinte, os tecidos foram reidratados de acordo com as seguintes etapas: 15 minutos no xilol puro I; 15 minutos no xilol puro II; 3 minutos no álcool absoluto (100%); 3 minutos no álcool 95%; 3 minutos no álcool 70%; 1 minuto em água destilada pura I; 1 minuto em água destilada pura II.

Em seguida, um tecido de cada lâmina foi escolhido e a área ao redor foi seca com papel sem tocá-lo e cada tecido foi circulado com caneta hidrofóbica (DakoCytomation® Pen). Os tecidos circulados foram incubados com 20 µL de proteinase K (20 mg/mL de 10 mM de Tris/HCl com pH 7,4 – 8,0) a 37°C durante 22 minutos. Poucos minutos antes de terminar a incubação com proteinase K, a solução TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) foi preparada (50 µL do vial 1 (Enzyme solution®) e 450 µL do vial 2 (Label solution®) e mantida no gelo até o momento do uso. As lâminas foram lavadas durante 5 minutos com solução de PBS (200 mL/well) duas vezes e a área ao redor de cada círculo foi novamente seca com papel (as lâminas foram balançadas algumas vezes para retirar o excesso de líquido dos círculos).

Após a secagem, todas as luzes foram apagadas (ambiente escuro) e 20 µL da solução TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) foram adicionados em cada círculo e as lâminas incubadas em atmosfera umidificada a 37°C durante 60 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas rapidamente em solução de PBS por três vezes e acondicionadas em caixas escuras umidificadas e levadas ao Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) do Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP para obtenção das imagens digitalizadas.

As lâminas foram fotografadas em microscópio de epifluorescência com onda de excitação na faixa de 450-500 nm e detecção na faixa de 515-565 nm (verde) com filtro zero para visualização sem ultravioleta (UV) e filtro 09 para visualização com UV, em objetivas de 10x, 20x e 40x.

Posteriormente, para a quantificação da apoptose, realizou-se a contagem das células apoptóticas (presença de fluorescência) de cada tratamento, considerando-se a captura de 10 campos/lâmina, conforme descrito por Capuco, Wood e Baldwin (2001) em aumento de 400x, e os resultados foram expressos como a média do número de células/campo.

3.3.4 Quantificação e fragmentação de DNA por eletroforese

Para a extração de DNA, os tecidos foram retirados do nitrogênio líquido no momento da análise e transferidos para tubos do tipo *ependorf*. Foram adicionados 200 µL de tampão de lise e os tubos foram misturados em homogeneizador de Potter. Em seguida, foram adicionados 12,5 µL de SDS e 4,0 µL de proteinase K e os tubos foram colocados em misturador do tipo Shaker *over night* a 37°C e 210 rpm. No dia seguinte, as amostras foram colocadas no gelo durante 15 minutos e após esse tempo, foram adicionados 300 µL de cloreto de sódio 5,0 M gelado e os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos tipo Vórtex e centrifugados a 14000 rpm durante 30 minutos a 4,0°C.

Em seguida, 400 µL do sobrenadante foram transferidos para novos tubos e adicionou-se 40 µL de acetato de amônia 3,0 M e os tubos foram homogeneizados levemente por inversão. Foram adicionados 1200 µL de etanol absoluto e novamente as amostras foram homogeneizadas levemente por inversão e centrifugadas a 14000 rpm durante 10 minutos a 4,0°C. Os sobrenadantes foram descartados e adicionou-se 1000 µL de etanol 70% aos sedimentos e os tubos foram centrifugados a 14000 rpm durante 5 minutos a 4,0°C.

Os sobrenadantes foram outra vez descartados e os sedimentos foram centrifugados em centrífuga de evaporação do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) do Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP durante 15 minutos. Após a centrifugação, 50 µL de água Mili-Q (ultra-pura) foram adicionados e, após nova homogeneização, as amostras foram incubadas em estufa a 37°C durante duas horas.

Após a retirada da estufa, as amostras foram levadas ao Laboratório de Química Biológica do Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP para leitura em biofotômetro (Biophotometer® *Eppendorf*, USA) e as concentrações de DNA foram obtidas através da leitura das absorbâncias em 260 nm. As amostras contendo DNA foram diluídas para obter a concentração de 180 ng/µL.

Após as leituras, as amostras foram armazenadas a -20°C para a análise de fragmentação de DNA por eletroforese em gel de poliacrilamida. Para essa análise utilizou-se a metodologia descrita por Bassam, Anollés e Gresshof (1991) e o DNA extraído e quantificado foi submetido à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 8% a 100 volts por 90 minutos e corado com nitrato de prata 0,2% (p/v), utilizando um padrão com 10.000 pares de base (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker, SIGMA®).

3.3.5 Quantificação de RNA

A extração de RNA do tecido mamário foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Capuco, Wood e Baldwin (2001). As amostras foram retiradas do nitrogênio líquido e misturadas em homogeneizador de Potter utilizando-se solução tampão na proporção 1:15 (p/v). Em seguida, foram adicionados 330 µL de ácido perclórico 1,2 N gelado e os tubos permaneceram no gelo durante 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 3600 x g durante 15 minutos a 4,0°C e o sobrenadante descartado.

Cada sedimento foi lavado duas vezes com 400 µL de ácido perclórico 0,2 N e, em seguida, foram adicionados 1000 µL de ácido perclórico 0,3 N e as amostras incubadas a 37°C durante 60 minutos em misturador do tipo Vórtex periódico. Após a incubação, foram adicionados 670 µL de ácido perclórico 1,2 N gelado e os tubos ficaram no gelo por 10 minutos.

Novamente os tubos foram centrifugados a 3600 x g durante 15 minutos a 4,0°C e os sedimentos foram lavados três vezes com 340 µL de ácido perclórico 0,2 N e os sobrenadantes foram misturados e armazenados para leitura. Para a leitura, 50 µL do sobrenadante foram pipetados em cubeta plástica e as absorbâncias lidas em biofotômetro (Biophotometer® *Eppendorf*, USA) pertencente ao Laboratório de Química Biológica do Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP e as concentrações de RNA foram obtidas através da leitura das absorbâncias em 260 nm em ng/µL.

3.3.6 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos e três repetições.

O modelo estatístico utilizado para as variáveis de DNA e RNA e TUNEL foi:

$$Y_i = \mu + T_i + E_i$$

Onde:

Y_i = Variável dependente

μ = Média geral

T_i = Efeito de tratamento

E_i = Efeito aleatório

Os dados foram analisados utilizando-se o PROC MIXED do SAS (2002) e as médias apresentadas foram obtidas através do comando LSMEANS. Foram aplicados testes para polinômios ortogonais (linear, quadrático e cúbico) para todas as variáveis.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Primeira fase do período experimental (Fase 1)

4.1.1 Desempenho, produção, composição e características físico-químicas do leite de cabra

Como esperado, não foi verificado efeito ($P>0,05$) no peso inicial (PI) dos animais experimentais, pois os grupos eram homogêneos. A inclusão de teores crescentes de capim-limão não influenciou ($P>0,05$) a variação corporal (VC) e o peso das cabras ao final do experimento (PF) (Tabela 5).

Tabela 5 – Peso, variação corporal e consumo de matéria seca de cabras Saanen alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P ³					
	T1	T2	T3	T4		Trat.	Dias	Trat. Dias	L	Q	C
PI ⁴ , kg	60,27	57,84	56,42	56,11	2,67	0,68	-	-	0,25	0,69	0,99
PF ⁵ , kg	63,90	63,18	60,13	60,60	3,10	0,79	-	-	0,37	0,85	0,68
VC ⁶ , kg/dia	0,089	0,107	0,076	0,109	0,03	0,62	<0,01	0,98	0,78	0,71	0,21
CMS ⁷ , kg/dia	1,74	2,43	2,91	2,23	0,71	-	-	-	-	-	-

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão; ² Erro padrão da média; ³ Efeito do tratamento: Valor de P para efeito de tratamento (Trat.) e Dias; Trat.*Dias= Efeito de interação entre tratamento e dias e teste de polinômio ortogonal apresentar resposta linear (L), quadrática (Q) ou cúbica (C); ⁴ PI: Peso inicial; ⁵ PF: Peso final; ⁶ VP: Variação corporal; ⁷ CMS: Consumo de matéria seca.

O consumo de matéria seca (CMS) foi avaliado nos grupos experimentais (tratamentos T1, T2, T3 e T4), e não individualmente para cada animal, não sendo possível a análise estatística desse tipo de dado. Porém, foi observado aumento numérico do CMS de 28 a 67% em relação à dieta controle (T1) (Tabela 5).

Hosoda et al. (2006) verificaram consumo de MS significativamente menor para novilhos de origem leiteira para o tratamento controle em comparação aos animais suplementados com 5% de capim-limão com base na MS. Adicionalmente, os mesmos autores verificaram aumento nas concentrações de uréia plasmática e concentrações ruminais de amônia em relação ao grupo controle e atribuíram esse aumento às diferenças entre a fermentação ruminal provocadas pela suplementação com capim-limão.

Por outro lado, Wanapat et al. (2011) não verificaram diferença no consumo de MS para novilhos de corte suplementados com 0, 100, 200 e 300 g/dia de capim-limão, porém verificaram que a digestibilidade da MS e da fibra em detergente neutro (FDN) aumentou significativamente com a inclusão de 100 g de capim-limão na ração e diminuiu com a inclusão de 200 e 300 g.

No entanto, Canaes (2011) observou aumento numérico do CMS de cabras Saanen em lactação com a inclusão de teores crescentes de capim-limão na ração, no entanto não observou alterações na concentração de uréia plasmática.

A inclusão de capim-limão aumentou o teor de FDN das rações experimentais (Tabela 4), com valores de 25,83; 30,84; 35,78 e 40,79%, para os tratamentos T1, T2, T3 e T4, respectivamente. Entretanto, mesmo com o aumento de FDN nas rações com teores crescentes de capim-limão do presente estudo, observou-se aumento numérico do CMS. Por outro lado, Carvalho et al. (2006) e Branco et al. (2010) observaram redução linear do CMS com o aumento dos teores de FDN nas rações de cabras leiteiras.

Os resultados obtidos no presente estudo podem ser explicados pela forma como o feno de capim-limão foi fornecido aos animais (*pellets*), o que provavelmente diminuiu o efeito de repleção ruminal, aumentando a taxa de passagem da fibra pelo ambiente ruminal (MERTENS, 1997) e assim promovendo maior ingestão das rações com teores crescentes de capim-limão. Além disso, de acordo com Van Soest, McCammon-Feldman e Cannas (1998), a espécie caprina apresenta menor tempo de retenção de partículas no rúmen em comparação aos bovinos, o que pode determinar maior capacidade de ingestão.

Em relação à produção de leite (Tabela 6), embora não tenha sido observado efeito significativo ($P>0,05$), verificou-se que a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura apresentou efeito quadrático ($P=0,04$), onde a maior produção foi verificada para o tratamento T2 (2,63 kg/dia).

Tabela 6 – Produção e composição do leite de cabras Saanen alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P ³			
	T1	T2	T3	T4		Trat.	L	Q	C
PL ⁴ , kg/dia	2,32	2,73	3,05	2,62	0,25	0,23	0,28	0,10	0,55
PLCG ⁵ , kg/dia	2,19	2,63	2,58	2,18	0,20	0,24	0,92	0,04	0,90
Gordura, %	3,25	2,63	2,61	2,90	0,26	0,31	0,38	0,09	0,81
Proteína, %	3,00	2,99	3,00	3,04	0,04	0,78	0,46	0,50	0,82
Lactose, %	4,49	4,48	4,49	4,56	0,06	0,78	0,46	0,50	0,81
ESD ⁶ , %	8,18	8,17	8,17	8,30	0,11	0,79	0,45	0,51	0,82
Sólidos totais, %	11,38	11,36	10,81	10,97	0,30	0,48	0,21	0,77	0,38
Sais, %	0,67	0,67	0,67	0,68	<0,01	0,60	0,30	0,41	0,72
Acidez, °D	16,83	17,36	17,52	17,44	0,41	0,60	0,27	0,67	0,77
Densidade, g/L	1,029	1,029	1,030	1,029	<0,01	0,63	0,21	0,79	0,72
PC ⁷ , °C	-0,51	-0,51	-0,51	-0,53	<0,01	0,50	0,30	0,28	0,71

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão; ² Erro padrão da média; ³ Efeito do tratamento: Valor de P para efeito de tratamento (Trat.) e teste de polinômio ortogonal apresentar resposta linear (L), quadrática (Q) ou cúbica (C); ⁴ PL: Produção de leite; ⁵ PLCG: Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura; ⁶ ESD: Extrato seco desengordurado; ⁷ PC: Ponto de congelamento.

Por outro lado, Canaes (2011) observou aumento linear na produção de leite corrigida para 3,5% de cabras leiteiras com a substituição de até 66,5% da silagem de milho por capim-limão (T3).

No presente estudo, quando a silagem de milho foi totalmente substituída pelo capim-limão (T4), a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura diminuiu (2,18 kg/dia), alcançando valor semelhante ao tratamento controle (T1) (2,19 kg/dia), o que pode ser explicado pela mesma tendência observada na produção de leite ($P=0,10$), demonstrando que o nível máximo de substituição da silagem de milho pelo capim-limão é de 66,5% (T3), cujo valor de FDN observado foi de 35,78%.

Carvalho et al. (2006) e Branco et al. (2010) observaram redução linear na produção de leite e produção de leite corrigida para 3,5% de gordura com o aumento dos teores de FDN nas rações de cabras leiteiras e concluíram que a melhor eficiência líquida de utilização da energia metabolizável consumida para produção de leite é atingida quando a dieta contém em torno de 35% de FDN, concordando com os resultados apresentados no presente estudo.

Figura 1 – Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno pelotizado de capim-limão em substituição à silagem de milho (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

Os resultados para as variáveis de composição e características físico-químicas do leite de cabra estão apresentados na Tabela 6. Não foi observada diferença ($P>0,05$) no teor de gordura do leite, apesar de a gordura ser o componente que mais sofre influência da alimentação (AL-MABRUK; BECK; DEWHURST, 2004; BAER et al., 1996; DHIMAN et al., 1999; HAVEMOSE et al., 2004; KRISTENSEN et al., 2004). Canaes (2011) também não observou diferença significativa no teor de gordura com a inclusão de teores crescentes de capim-limão na alimentação de cabras leiteiras.

Embora o aumento no teor de fibra na dieta favoreça o aumento da relação acetato:propionato, resultando em maiores teores de gordura no leite (PALMQUIST; MATTOS, 2006; RODRIGUES, 2004; SANTINI et al., 1992), a redução no tamanho de partícula pode reduzir a quantidade de ácido acético produzido (BRANCO et al., 2010; CARVALHO et al., 2006; VAN SOEST, 1963 apud MERTENS, 2001), resultando em menor conteúdo de gordura no leite. No presente estudo, o capim-limão foi fornecido peletizado, o que pode explicar a tendência ($P=0,09$) na redução do teor de gordura do leite, mesmo observando-se teores crescentes de FDN nas rações experimentais com a inclusão de capim-limão.

Os teores de proteína, lactose, extrato seco desengordurado e sais do leite obtidos no presente estudo foram semelhantes entre os tratamentos, assim como a acidez, densidade a 15°C e o ponto de congelamento (Tabela 6).

Esses parâmetros estão de acordo com a Instrução Normativa nº 37 (BRASIL, 2000), que estabelece os teores mínimos de proteína, lactose, extrato seco desengordurado e sais para o leite de cabra de 2,80; 4,30; 8,20 e 0,70%, respectivamente, e os resultados médios obtidos neste estudo para essas variáveis (Tabela 6) estão dentro desse limite (3,00; 4,51; 8,21 e 0,67%, respectivamente), com exceção do teor de sais, que apresentou valor ligeiramente inferior.

Prata et al. (1998) analisaram 179 amostras de leite caprino provenientes de cabras leiteiras da raça Saanen e verificaram teores médios de gordura, proteína, lactose, sais e sólidos totais de 3,74; 3,27; 4,35; 0,74 e 11,51%, respectivamente. Zambom et al. (2005), ao avaliarem a curva de lactação e a qualidade do leite de cabras Saanen após o pico de lactação e alimentadas com rações contendo relação volumoso:concentrado de 50:50, semelhante ao utilizado no presente estudo, encontraram teores inferiores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais (2,94; 2,67; 4,38 e 10,88, respectivamente) em relação aos apresentados no presente estudo (2,85; 3,00; 4,51 e 11,13%, respectivamente). Canaes (2011) observaram teores médios de gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado, sólidos totais e sais de 2,7; 3,33; 4,46; 8,11; 10,81 e 0,67%, respectivamente, para o leite de cabras Saanen alimentadas com teores crescentes de capim-limão.

Para a acidez, densidade a 15°C e o ponto de congelamento, os valores de referência considerados normais para o leite de cabra são: 0,13 a 0,18% ou 13 a 18°D; 1,028 a 1,034 g/L; -0,550°H e -0,585°H (graus Hortvet) ou -0,531°C e -0,565°C, respectivamente (BRASIL, 2000). Os valores médios encontrados no presente trabalho foram: 17,29°D; 1,029 g/L e -0,515°C, respectivamente, estando de acordo com os valores normais para o leite de cabra, com exceção do ponto de congelamento, que apresentou valor inferior. Prata et al. (1998) observaram valores médios de acidez, densidade a 15°C e ponto de congelamento para o leite de cabras Saanen de 15,95°D; 1,032 g/L; -0,574°H, respectivamente. Canaes (2011) observaram valores médios de acidez, densidade a 15°C e ponto de congelamento para o leite de cabras Saanen alimentadas com teores crescentes de capim-limão de 17,29°D; 1,029 g/L; -0,511°C, respectivamente.

4.1.2 Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) no leite de cabra

Não houve efeito de tratamento ($P>0,05$) para a contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite de cabra (Tabela 7).

Tabela 7 – Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite de cabras Saanen alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P ³			
	T1	T2	T3	T4		Trat.	L	Q	C
CCS ⁴ Log ₁₀ , células/mL	2,52	2,16	2,43	2,50	0,11	0,09	0,72	0,07	0,09
CBT ⁵ Log ₁₀ , UFC/mL	2,97	2,69	2,44	2,52	0,19	0,23	0,07	0,37	0,71

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão; ² Erro padrão da média; ³ Efeito do tratamento: Valor de P para efeito de tratamento (Trat.) e teste de polinômio ortogonal apresentar resposta linear (L), quadrática (Q) ou cúbica (C); ⁴ CCS: Contagem de células somáticas na base Log; ⁵ CBT: Contagem bacteriana total na base Log (Unidades formadoras de colônia por mL).

Os valores de referência para CCS no leite de cabra não são especificados pela Instrução Normativa n° 37 (BRASIL, 2000), no entanto alguns autores afirmam que 400×10^3 células/mL é um valor considerado normal (McDOUGALL et al., 2001). De acordo com Paape et al. (2001), o limite legal de CCS para o leite de cabra nos Estados Unidos é 1.000×10^3 células/mL. Entretanto, ao compilarem dados de diversos trabalhos, os mesmos autores encontraram valores médios variando de 270×10^3 a 2.000×10^3 células/mL para caprinos livres de infecção intramamária e de 659 a 4.213×10^3 células/mL para glândulas infectadas.

No presente estudo, o valor médio de CCS encontrado foi de $295,75 \times 10^3$ células/mL, o que está dentro dos limites considerados normais por McDougall et al. (2001) e Paape et al. (2001), demonstrando que os animais mantiveram-se sadios ao longo do período experimental e que os procedimentos sanitários de rotina foram adequados para o controle de mastite dos animais experimentais.

Zambom et al. (2005) observaram CCS superior ($1.158,57 \times 10^3$ células/mL) para cabras Saanen alimentadas com relação volumoso:concentrado de 50:50 após o pico de lactação, assim como Ribeiro et al. (2008), que encontraram valor médio para a CCS de $1.758,81 \times 10^3$ células/mL no leite de cabras Saanen alimentadas com silagem de milho. Por outro lado, Canaes (2011) verificaram valor médio para CCS no leite de cabras Saanen alimentadas com teores crescentes de capim-limão de $341,53 \times 10^3$ células/mL.

Em relação aos valores de CBT, o valor de referência considerado normal para o leite de cabra (BRASIL, 2000) é de 500.000 UFC/mL, entretanto, este se refere ao método tradicional de contagem, que é a Contagem Bacteriana em Placa (CBP). No presente estudo, as amostras de leite foram analisadas pelo método de citometria de fluxo. Cunha (2007), ao comparar a CBT do leite de cabras Saanen de diferentes propriedades, observou valores médios obtidos pelo método de citometria de fluxo variando de 2,04 e 2,44 Log UFC/mL para propriedades com ordenha mecânica e condições de higiene satisfatórias e de 3,13 e 3,32 Log UFC/mL para propriedades com ausência de sala de ordenha e condições de higiene insatisfatórias. No presente estudo, o valor médio observado para CBT foi de 2,66 Log UFC/mL, o que demonstra que as condições de higiene na obtenção do leite foram adequadas.

Adicionalmente, mesmo sem efeito significativo ($P > 0,05$), observou-se que os valores de CBT calculados na base Log (Tabela 7) tenderam a ser menores ($P = 0,07$) à medida que a silagem de milho foi substituída pelo capim-limão.

Por outro lado, em função do comprovado efeito antioxidante (CHEEL et al., 2005) e antibacteriano (BASKARAN et al., 2009; CIMANGA et al., 2002; MAYAUD et al., 2008; PEREIRA et al., 2004; WANNISSORN et al., 2005) do capim-limão, esperava-se que houvesse diminuição significativa nos valores de CCS e CBT com o aumento da substituição da silagem de milho por capim-limão nas rações experimentais, o que não foi verificado (Tabela 7).

Essa ausência de efeito nos valores de CCS e CBT pode ser explicada pela saúde da glândula mamária dos animais do presente experimento, pois Fonteque et al. (2010), ao avaliarem cabras da raça Saanen com mastite induzida por inoculação de *Staphylococcus aureus* no período parturiente e suplementadas com vitamina E,

verificaram valores menores de CCS e CBT para os animais suplementados em comparação ao tratamento controle (sem suplementação).

Da mesma forma que a vitamina E é um antioxidante biológico importante na defesa de células e tecidos (LAMSONL; BRIGNALL, 1999; PASCHOAL; ZANETTI; CUNHA, 2003), o capim-limão também apresenta comprovado efeito antioxidante (CHEEL et al., 2005) e antibacteriano (BASKARAN et al., 2009; CIMANGA et al., 2002; MAYAUD et al., 2008; PEREIRA et al., 2004; WANNISSORN et al., 2005) e seu uso na alimentação de animais leiteiros pode reduzir as perdas em produção decorrentes da mastite, com vantagens econômicas, ambientais e relacionadas à saúde dos consumidores (ERSKINE; WAGNER; DEGRAVES, 2003).

4.1.3 Perfil de ácidos graxos do leite de cabra

A composição de ácidos graxos foi influenciada pelas dietas experimentais (Tabela 8).

Tabela 8 – Perfil geral dos ácidos graxos (mg/g de lipídeo) do leite de cabras Saanen alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho

Ácido graxo	Tratamentos ¹				EPM ²	Efeito ³			
	T1	T2	T3	T4		Trat.	L	Q	C
Saturados	43,93	40,76	42,81	39,21	2,27	0,48	0,25	0,92	0,28
Monoinsaturados	20,77	18,51	19,04	18,67	1,05	0,40	0,24	0,37	0,42
Poliinsaturados	2,51 ^b	2,96 ^{bc}	3,72 ^{ac}	4,66 ^a	0,24	<0,01	<0,01	0,33	0,90
AGCC ⁴	9,46	9,30	9,97	8,76	0,64	0,65	0,63	0,42	0,35
AGCM ⁵	28,58 ^a	25,2 ^{ab}	26,45 ^{ab}	21,90 ^b	1,37	0,01	<0,01	0,67	0,08
AGCL ⁶	29,17	27,71	29,15	29,29	1,63	0,88	0,81	0,63	0,56

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão; ² Erro padrão da média; ³ Efeito do tratamento: Valor de P para efeito de tratamento (Trat.) e teste de polinômio ortogonal apresentar resposta linear (L), quadrática (Q) ou cúbica (C); Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si (P>0,05); ⁴ AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta (C₄ a C₁₃); ⁵ AGCM: Ácidos graxos de cadeia média (C₁₄ a C₁₇); ⁶ AGCL: Ácidos graxos de cadeia longa (> C₁₈). Adaptado de Canaes (2011).

A substituição da silagem de milho pelo capim-limão modificou 48% dos ácidos graxos do leite de cabra, aumentando de forma linear ($P<0,01$) a concentração de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) (Figura 2).

Figura 2 – Concentração de ácidos graxos poliinsaturados no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

A inclusão crescente de capim-limão aumentou linearmente ($P<0,01$) a concentração de ácido linolênico (18:3 n-3) no leite (Figura 3). Esse resultado era esperado, pois houve aumento desse ácido graxo nas rações experimentais (Tabela 4) à medida que a silagem de milho foi substituída pelo capim-limão.

Figura 3 – Concentração de ácido linolênico no leite de cabra Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

De acordo com Harris (1999) e Von Schacky (2000), o aumento da concentração do ácido linolênico é desejável para a nutrição humana, pois se trata de um precursor de AGPI n-3 de cadeias mais longas, incluindo o ácido eicosapentanóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), os quais estão relacionados às atividades anti-aterogênica, antitrombótica e antiinflamatória, além do menor risco de doenças cardiovasculares.

Outro ácido graxo modificado com a inclusão de capim-limão foi o isômero do ácido linoléico conjugado (CLA), o CLA *cis*-9 *trans*-11. O CLA de origem animal pode ser obtido a partir da biohidrogenação parcial do ácido linoléico (18:2 n-6 *cis*) no rúmen ou da síntese endógena no tecido adiposo e na glândula mamária. A síntese endógena envolve a enzima delta⁹-dessaturase e o ácido vacênico (18:1 *trans*-11) como substrato (GRIINARI et al., 2000; MOSLEY et al., 2006).

Observou-se no presente estudo aumento linear ($P < 0,01$) na concentração de CLA *cis-9 trans-11* no leite com a inclusão de teores crescentes de capim-limão (Figura 4).

Figura 4 – Concentração de CLA *cis-9 trans-11* no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

Bauman et al. (1999) afirmam que o aumento de ácido linoléico na ração promove aumento de CLA no leite. No presente estudo, a inclusão de capim-limão diminuiu a concentração de ácido linoléico nas rações experimentais (Tabela 4), mas o aumento do CMS pode justificar o aumento linear ($P < 0,01$) na concentração desse ácido no leite de cabra (Figura 5). Além disso, a biohidrogenação dos ácidos graxos no rúmen também pode ter contribuído para o aumento de ácido linoléico e CLA *cis-9 trans-11* no leite, visto que o ácido linoléico é precursor de CLA (GRIINARI et al., 2000; MOSLEY et al., 2006).

Figura 5 – Concentração de ácido linoléico no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

Adicionalmente, o aumento de ácido linolênico nas rações experimentais também pode explicar o aumento na concentração de CLA *cis-9 trans-11*, concordando com os resultados apresentados por Chilliard et al. (2007), os quais mostraram que dietas ricas em ácido linolênico aumentaram a concentração de CLA no leite, o que foi verificado no presente estudo.

Além disso, a combinação entre os ácidos linoléico e linolênico pode aumentar a produção de CLA, como relatado por Lock e Garnsworthy (2002), que verificaram maior eficiência na síntese de ácido linoléico em dietas contendo ambos os ácidos graxos do que os mesmos utilizados separadamente.

Apesar do apelo mercadológico relacionado à funcionalidade de alimentos ricos em ácidos graxos n-3, principalmente o CLA, a manipulação da composição do perfil lipídico do leite, aumentando a concentração de AGPI, principalmente o isômero CLA *cis-9 trans-11*, pode comprometer a qualidade do leite e de seus derivados, em função da redução da estabilidade oxidativa da gordura (PALMQUIST; MATTOS, 2006).

Da mesma forma que a oxidação lipídica do leite é altamente influenciada pela composição de AGPI, os quais são particularmente susceptíveis à oxidação (TIMMONS et al., 2001), o grau de insaturação também influencia a acumulação de hidroperóxidos lipídicos (KORYCKA-DAHL; RICHARDSON, 1980).

Observa-se pela Tabela 8 que houve efeito ($P < 0,01$) linear crescente na concentração de AGPI à medida que a silagem de milho foi substituída pelo capim-limão, o que não foi verificado nas rações experimentais, que apresentaram redução na concentração de AGPI com a inclusão de teores crescentes de capim-limão, explicado pela redução na concentração dos ácidos graxos oléico (18:1 *cis*-9) e linoléico (Tabela 4).

A concentração total dos ácidos graxos de cadeia média (AGCM) (C_{14} a C_{17}) também foi influenciada pela inclusão de capim-limão (Tabela 8) e verificou-se efeito ($P < 0,01$) linear decrescente à medida que a silagem de milho foi substituída pelo capim-limão. Essa redução observada no presente estudo é interessante, pois os principais responsáveis pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares são pertencentes a esse grupo (ácidos láurico ($C_{12:0}$), mirístico ($C_{14:0}$) e palmítico ($C_{16:0}$) (PALMQUIST; MATTOS, 2006).

Grumer (1991) afirma que a redução de AGCM no leite é atribuída à menor síntese de *novo* de ácidos graxos na glândula mamária, decorrente da provável redução da enzima acetil-CoA-carboxilase na presença de ácidos graxos de cadeia longa. Além disso, o mesmo autor comenta que a incorporação de ácidos graxos de cadeia longa da dieta no leite também reduz a síntese de novo de ácidos graxos na glândula mamária.

Embora não tenha sido verificado efeito ($P > 0,05$) das rações experimentais na concentração total de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), houve efeito ($P < 0,01$) linear crescente na concentração de AGPI (Tabela 8), que também são ácidos graxos de cadeia longa, o que pode explicar a redução na concentração de AGCM.

4.1.4 Oxidação lipídica do leite de cabra

No presente estudo, não foi verificado efeito ($P>0,05$) da inclusão de capim-limão para as variáveis de índice de peróxido (IP) e TBARS (Tabela 9). Entretanto, verificou-se efeito significativo ($P<0,01$) para horas na análise de TBARS, sendo verificada maior oxidação após 48 horas de armazenamento do leite (Figura 6), o que pode ser explicado pela incubação do leite em temperatura ambiente (temperatura média de 23°C), justamente com o objetivo de promover a oxidação lipídica.

Figura 6 – Valores médios de TBARS no leite de cabras Saanen logo após a ordenha e após 48 horas de armazenamento alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

Era esperado que a inclusão de teores crescentes de capim-limão na dieta diminuísse a oxidação lipídica, em função do comprovado efeito antioxidante de inúmeros compostos presentes na composição química do capim-limão, o que não foi verificado (Tabela 9). Por outro lado, Suaeyun et al. (1997) verificaram que a utilização de extrato etanólico de capim-limão (etanol 80%) inibiu a formação de compostos cancerígenos em cólon de ratos, o que, em parte, foi atribuído pelos autores às propriedades antioxidantes da planta.

Da mesma forma, Baratta et al. (1998) verificaram redução da oxidação lipídica em fígado de ratos, utilizando óleo essencial de capim-limão composto basicamente por citral (mistura dos isômeros geranial e neral).

Cheel et al. (2005) verificaram inibição da peroxidação lipídica em eritrócitos humanos variando de $19,1 \pm 3,1\%$; $38,1 \pm 5,0\%$ e $71,5 \pm 2,9\%$, utilizando diferentes extratos obtidos das folhas de capim-limão (extrato metanol/água 7:3; extrato metanol/água 1:1 e extrato metanólico puro, respectivamente). Além disso, os autores identificaram sete compostos com propriedades antioxidantes presentes no capim-limão e que também foram eficientes em diminuir a peroxidação lipídica dos eritrócitos humanos: isoorientina (inibição de $71,3 \pm 8,3\%$), isoscoparina (inibição de $41,7 \pm 4,0\%$), swertiajaponina (inibição de $60,6 \pm 8,3\%$), isoorientina-2-O-rhamnoside (inibição de $60,6 \pm 9,9\%$), orientina (inibição de $68,7 \pm 6,9\%$), ácido clorogênico (inibição de $33,8 \pm 4,2\%$) e ácido caféico (inibição de $84,9 \pm 0,4\%$).

Porém, era esperado que o aumento ($P < 0,01$) na concentração de AGPI observado neste estudo aumentasse a oxidação lipídica do leite. Como este efeito ($P > 0,05$) não foi observado, já que não houve diferença na oxidação, é provável que isso seja decorrente da ação dos compostos antioxidantes presentes no capim-limão, mostrando que o capim-limão é eficiente em aumentar a estabilidade oxidativa do leite de cabra.

Tabela 9 – Valores de índice de peróxido (IP) e TBARS do leite de cabras Saanen alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Horas		EPM ²	P ³				
	T1	T2	T3	T4		0	48		Trat.	Hora	L	Q	C
IP _(Abs500)	0,080	0,056	0,048	0,060	0,01	0,065	0,056	<0,01	0,46	0,50	0,31	0,23	0,95
TBARS _(Abs540)	0,050	0,045	0,049	0,045	<0,01	0,044 ^b	0,051 ^a	<0,01	0,37	<0,01	0,39	0,93	0,12

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão; ² Erro padrão da média; ³ Efeito do tratamento: Valor de P para efeito de tratamento (Trat.) e Hora e teste de polinômio ortogonal apresentar resposta linear (L), quadrática (Q) ou cúbica (C).

Adicionalmente, Aruoma (1998) comenta que a peroxidação lipídica pode ser iniciada por qualquer espécie com reatividade suficiente para retirar um átomo de hidrogênio a partir da cadeia lateral de um AGPI, como o ácido graxo linolênico. No presente estudo, a concentração de ácido linolênico aumentou ($P < 0,01$) linearmente com a inclusão de teores crescentes de capim-limão (Tabela 8), e não foi observado alteração ($P > 0,05$) na oxidação lipídica do leite de cabra.

Havemose et al. (2004) verificaram que, mesmo com maiores concentrações de antioxidantes naturais (tocoferol, β -caroteno, luteína e zeaxantina) no leite, o aumento de ácido graxo linolênico aumentou a oxidação lipídica do leite, o que reforça a capacidade antioxidante do capim-limão, já que não houve aumento dessa variável no presente estudo.

Em estudo mais recente, Havemose et al. (2006), ao avaliarem a oxidação lipídica do leite de vacas holandesas alimentadas com silagem de trevo ou feno, concluíram que a maior concentração dos ácidos palmitoléico ($C_{16:1}$) e oléico no leite das vacas alimentadas com feno não resultou em maior acúmulo de hidroperóxidos lipídicos, indicando que o ácido graxo linolênico, em maior concentração no leite das vacas alimentadas com silagem de trevo, foi o responsável pelo aumento na peroxidação lipídica do leite.

Em conclusão, a inclusão de capim-limão em substituição à silagem de milho na alimentação de cabras em lactação aumentou numericamente o consumo de matéria seca sem, no entanto, afetar a produção, composição, características físico-químicas, contagem de células somáticas e contagem bacteriana total do leite.

Além disso, a inclusão de capim-limão aumentou os ácidos graxos poliinsaturados no leite das cabras, principalmente os ácidos linolênico, linoléico e CLA *cis-9 trans-11*, sem alterar a oxidação lipídica do leite.

4.2 Segunda fase do período experimental (Fase 2)

4.2.1 Concentrações plasmáticas de cortisol

Não houve efeito ($P>0,05$) da administração de placebo (solução salina) sobre a concentração média de cortisol plasmático para nenhum dos tratamentos estudados (Tabelas 10, 11, 12 e 13).

Tabela 10 – Concentrações plasmáticas médias de cortisol (ng/mL) de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo 0% de capim-limão em substituição à silagem de milho (T1) e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo

Tempos ¹	Aplicação				P ³
	ACTH	EPM ²	Placebo	EPM ²	Tempo
-20	3,99 ^a	0,50	4,87 ^a	0,73	0,78
0	4,65 ^a	0,48	5,25 ^a	0,47	0,85
60	43,02 ^a	4,01	4,02 ^b	0,23	<0,01
120	37,79 ^a	3,13	3,91 ^b	0,48	<0,01
300	7,15 ^a	1,09	3,88 ^a	0,27	0,31

¹ Tempos: -20: 20 minutos antes da administração pontual de ACTH ou placebo e ordenha; 0: no momento da administração pontual de ACTH ou placebo e término da ordenha; 60: 60 minutos após a administração pontual de ACTH ou placebo; 120: 120 minutos após a administração pontual de ACTH ou placebo; e 300: 300 minutos após a administração pontual de ACTH ou placebo; ² Erro padrão da média; ³ Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si ($P>0,05$).

Alguns autores afirmam que o manejo de rotina dos animais, como desmame, ordenha, vacinação, everminação e pesagem podem estar associados ao estresse, com conseqüente aumento na concentração plasmática de ACTH e cortisol (FULKERSON; JAMIESON, 1982; KOMARA; MARNET, 2009; MARNET; NEGRÃO, 2000; RUSHEN et al., 2001).

Nesse sentido, os resultados obtidos no presente estudo comprovam que a aplicação em si não foi um fator estressante para os animais, já que a concentração média de cortisol dos animais que receberam placebo permaneceu abaixo do limite máximo basal para cabras, que é de 18 ng/mL (PINEDA; DOOLEY, 1999) em todos os tempos de colheita estudados, confirmando que os animais permaneceram em situação de conforto durante os procedimentos realizados. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Delgado (2008), Gaiato (2009) e Canaes (2011), que também observaram concentrações médias basais de cortisol (menor que 18 ng/mL) após a administração de placebo em cabras Saanen lactantes.

Tabela 11 – Concentrações plasmáticas médias de cortisol (ng/mL) de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo 33,5% de capim-limão em substituição à silagem de milho (T2) e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo

Tempos ¹	Aplicação				P ³
	ACTH	EPM ²	Placebo	EPM ²	Tempo
-20	4,48 ^a	0,59	3,29 ^a	0,38	0,73
0	5,61 ^a	0,68	5,16 ^a	0,39	0,89
60	45,00 ^a	3,08	4,47 ^b	0,76	<0,01
120	40,16 ^a	2,27	5,47 ^b	1,16	<0,01
300	5,73 ^a	1,77	3,24 ^a	0,15	0,47

¹ Tempos: -20: 20 minutos antes da administração pontual de ACTH ou placebo e ordenha; 0: no momento da administração pontual de ACTH ou placebo e término da ordenha; 60: 60 minutos após a administração pontual de ACTH ou placebo; 120: 120 minutos após a administração pontual de ACTH ou placebo; e 300: 300 minutos após a administração pontual de ACTH ou placebo; ² Erro padrão da média; ³ Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si (P>0,05).

Não houve alteração (P>0,05) dos níveis médios de cortisol até o momento da aplicação (tempo 0). No entanto, verificou-se aumento (P<0,01) da concentração plasmática de cortisol a partir desse momento, atingindo o pico de concentração aos 60 minutos e retornando ao nível basal apenas 300 minutos após a aplicação, o que foi observado para os animais dos quatro tratamentos (Tabelas 10, 11, 12 e 13).

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Toerien et al. (1999), que também verificaram maiores níveis de cortisol em caprinos aos 60 minutos da aplicação e retorno ao nível basal por volta dos 300 minutos após a aplicação de ACTH (0,4 ou 2,5 UI/kg PV). Delgado (2008), Gaiato (2009) e Canaes (2011) também observaram o mesmo perfil para a curva de cortisol plasmático, ao estudarem a indução de estresse via administração de ACTH em cabras Saanen lactantes.

A concentração média de cortisol aos 60 minutos (pico de cortisol) obtida no presente estudo foi de 43,63 ng/mL. Shamay et al. (2000), ao estudarem a administração de ACTH (2,5 UI/kg PV) em cabras mestiças Saanen, também observaram valores semelhantes (40 ± 60 ng/mL), com retorno ao nível basal após 180 minutos da aplicação.

Tabela 12 – Concentrações plasmáticas médias de cortisol (ng/mL) de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo 66,5% de capim-limão em substituição à silagem de milho (T3) e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo

Tempos ¹	Aplicação				P ³
	ACTH	EPM ²	Placebo	EPM ²	Tempo
-20	5,49 ^a	0,83	4,03 ^a	0,49	0,63
0	6,35 ^a	0,73	5,35 ^a	0,55	0,74
60	49,89 ^a	4,78	4,81 ^b	0,69	<0,01
120	46,59 ^a	5,21	4,44 ^b	0,35	<0,01
300	7,15 ^a	0,75	3,90 ^b	0,35	0,30

¹ Tempos: -20: 20 minutos antes da administração pontual de ACTH ou placebo e ordenha; 0: no momento da administração pontual de ACTH ou placebo e término da ordenha; 60: 60 minutos após a administração pontual de ACTH ou placebo; 120: 120 minutos após a administração pontual de ACTH ou placebo; e 300: 300 minutos após a administração pontual de ACTH ou placebo; ² Erro padrão da média; ³ Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si ($P>0,05$).

Adicionalmente, Delgado (2008), Aoyama et al. (2009) e Canaes (2011) também verificaram concentração média de cortisol em torno de 40,00 ng/mL para caprinos após a administração de ACTH e retorno dos níveis de cortisol aos valores iniciais após 300 minutos da aplicação, concordando com os resultados obtidos no presente estudo. Já Gaiato (2009) observou concentrações médias de cortisol superiores em relação ao presente estudo (63,54 ng/mL e 15,35 ng/mL aos 60 minutos e aos 300 minutos, respectivamente).

Tabela 13 – Concentrações plasmáticas médias de cortisol (ng/mL) de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo 100% de capim-limão em substituição à silagem de milho (T4) e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo

Tempos ¹	Aplicação				P ³
	ACTH	EPM ²	Placebo	EPM ²	Tempo
-20	3,45 ^a	0,4	3,23 ^a	0,10	0,94
0	4,78 ^a	0,7	4,40 ^a	1,07	0,90
60	36,60 ^a	1,0	6,21 ^b	3,91	<0,01
120	37,17 ^a	0,5	4,07 ^b	7,91	<0,01
300	7,08 ^a	0,7	3,56 ^a	1,67	0,30

¹ Tempos: -20: 20 minutos antes da administração pontual de ACTH ou placebo e ordenha; 0: no momento da administração pontual de ACTH ou placebo e término da ordenha; 60: 60 minutos após a administração pontual de ACTH ou placebo; 120: 120 minutos após a administração pontual de ACTH ou placebo; e 300: 300 minutos após a administração pontual de ACTH ou placebo; ² Erro padrão da média; ³ Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si (P>0,05).

Entretanto, observou-se que a concentração máxima de cortisol foi maior para tratamento T3 e menor para o T4, tanto no tempo de colheita 60 (pico de cortisol) (valores de 49,89 e 36,60 ng/mL, respectivamente), como no tempo 120 (46,59 e 37,17 ng/mL, respectivamente).

De acordo com diversos autores (BUTTERWECK; WINTERHOFF, 2004; DHANALASKSHMI et al., 2006), compostos alimentares com propriedades antioxidantes reduzem a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em animais, o qual é ativado principalmente quando o animal percebe um estímulo potencialmente nocivo, aumentando os níveis de cortisol plasmático (VON BORELL, 2001).

Adicionalmente, Megahed et al. (2008), avaliando o nível de cortisol e a peroxidação lipídica no plasma de búfalas induzidos pela época do ano (verão *versus* inverno), verificaram aumento das concentrações plasmáticas de cortisol em búfalas criadas durante o verão (14,17 ng/mL) em comparação aos animais criados no inverno (10,73 ng/mL) e observaram correlação positiva entre o nível de cortisol e o estresse oxidativo, principalmente no verão, com redução da atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD).

Por outro lado, quando Megahed et al. (2008) administraram ao grupo verão por via intramuscular, 15 mL de um antioxidante comercial à base de vitamina E (150 mg) e selenito de sódio (1,67 mg) durante 6 semanas, verificaram que a atividade antioxidante endógena aumentou progressivamente em relação aos animais do grupo controle, com redução dos níveis plasmáticos de cortisol e do estresse oxidativo, o que comprova que compostos antioxidantes, como os presentes no capim-limão (CHEEL et al., 2005), podem reduzir os níveis plasmáticos de cortisol e a peroxidação lipídica após indução de estresse.

Nesse sentido, em função da presença de compostos antioxidantes no capim-limão (CHEEL et al., 2005), era esperado que o pico de cortisol fosse menor para os animais alimentados com teores crescentes de capim-limão, o que foi verificado apenas para os animais do tratamento T4 (Tabela 13). É provável que a concentração desses compostos nas rações com menores quantidades de capim-limão (tratamentos T2 e T3) não tenha sido suficiente para reduzir o estresse provocado pela administração de ACTH ou ainda, que a silagem de milho em associação com o capim-limão tenha inibido o efeito antioxidante desses compostos.

4.2.2 Desempenho, produção, composição e características físico-químicas do leite de cabra

Não foi observado efeito ($P>0,05$) da administração pontual de ACTH ou placebo (solução salina) para as variáveis analisadas (Tabela 14). Entretanto, o peso inicial (PI) das cabras tendeu a aumentar linearmente ($P=0,09$) com a inclusão de teores crescentes de capim-limão nas rações experimentais (Tabela 14), o que pode ser explicado pela permanência dos animais utilizados na primeira fase nos mesmos grupos experimentais da segunda fase, cujo peso final (PF) na primeira fase (Tabela 5) apresentou aumento numérico à medida que a silagem de milho foi substituída pelo capim-limão.

Verificou-se efeito ($P<0,05$) linear crescente para a variação corporal (VC) e o peso final (PF) das cabras ($P<0,04$) ao final do experimento com a inclusão de teores crescentes de capim-limão em substituição à silagem de milho, o que foi acompanhado pelo aumento numérico do consumo de matéria seca (CMS).

O CMS variou de 12 a 57% em relação à dieta controle (T1), o que pode explicar o maior ganho de peso dos animais à medida que a silagem de milho foi substituída pelo capim-limão (Tabela 14). Esses resultados demonstram que o estresse pontual via administração de ACTH não foi suficiente para modificar o CMS, pois independente do aumento ou não dos níveis de cortisol plasmático, houve aumento do CMS com teores crescentes de capim-limão nas rações experimentais.

Tabela 14 – Peso, variação corporal e consumo de matéria seca de cabras Saanen submetidas à aplicação pontual de ACTH alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Aplicação		EPM ²	P ³					
	T1	T2	T3	T4		ACTH	Placebo		Trat.	Aplic.	Aplic. Trat.	L	Q	C
PI ⁴ , kg	59,0	61,5	64,9	64,6	2,62	-	-	-	0,34	-	-	0,09	0,59	0,68
PF ⁵ , kg	59,3	62,6	66,4	66,5	2,69	63,6	63,6	1,3	0,19	0,40	0,93	0,04	0,55	0,72
VC ⁶ , kg/dia	0,03	0,06	0,08	0,09	0,02	0,07	0,05	0,01	0,28	0,41	0,62	0,05	0,71	0,91
CMS ⁷ , kg/dia	1,70	1,90	2,67	2,00	0,65	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão; ² Erro padrão da média; ³ Efeito do tratamento: Valor de P para efeito de tratamento (Trat.) e aplicação (Aplic.); Trat.*Aplic.= Efeito de interação entre tratamento e aplicação e teste de polinômio ortogonal apresentar resposta linear (L), quadrática (Q) ou cúbica (C); ⁴ PI: Peso inicial; ⁵ PF: Peso final; ⁶ VC: Variação corporal;

⁷ CMS: Consumo de matéria seca.

Em relação à produção de leite (Tabela 15), não foi verificado efeito ($P>0,05$) da aplicação de ACTH ou placebo. Stewart e Thompson (1984) afirmam que o aumento de ACTH e cortisol na circulação podem aumentar a produção de leite. Entretanto, outros trabalhos relatam que a administração de ACTH, com conseqüente aumento na concentração plasmática de cortisol, afeta negativamente a secreção de leite (BREMEL; GANGWER, 1978; VARNER; JOHNSON, 1983).

Entretanto, Shamay et al. (2000) não encontraram alterações significativas ($P>0,05$) e nem mesmo tendência em aumentar a produção de leite de cabras mestiças Saanen após a administração de ACTH (2,5 UI/kg PV). No entanto, os mesmos autores esperavam redução na produção e mudanças na composição do leite em decorrência do aumento de cortisol plasmático e atribuíram a ausência de efeito ($P>0,05$) à rusticidade das cabras em relação a outros ruminantes, já que vários trabalhos comprovam que animais submetidos a manejos estressantes apresentam aumento nos níveis de cortisol e redução da produção de leite (BREUER et al., 2000; HEMSWORTH et al., 2000; RUSHEN; DePASSILLÉ; MUNKSGAARD, 1999). Da mesma forma, Delgado (2008) e Gaiato (2009) também não observaram diferença na produção de leite de cabras Saanen em lactação, ao comparar o grupo controle com o grupo estressado após a administração pontual de ACTH.

Tabela 15 – Produção e composição do leite de cabras Saanen submetidas à aplicação pontual de ACTH alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Aplicação		EPM ²	P ³					
	T1	T2	T3	T4		ACTH	Placebo		Trat.	Aplic.	Aplic. Trat.	L	Q	C
PL ⁴ , kg/dia	1,95	2,20	2,93	2,33	0,29	2,35	2,35	0,15	0,11	0,85	0,18	0,16	0,15	0,18
Gordura, %	3,30 ^a	3,20 ^{ab}	2,83 ^b	2,63 ^b	0,16	3,02 ^a	2,96 ^b	0,08	0,01	0,02	0,03	<0,01	0,76	0,52
Proteína, %	2,98	3,00	2,97	2,97	0,03	2,98	2,98	0,03	0,90	0,26	0,48	0,70	0,81	0,54
Lactose, %	4,46	4,49	4,44	4,45	0,05	4,47	4,46	0,02	0,90	0,22	0,39	0,69	0,81	0,56
ESD ⁵ , %	8,13	8,19	8,09	8,10	0,09	8,15	8,12	0,04	0,90	0,25	0,44	0,70	0,81	0,54
ST ⁶ , %	11,42	11,39	10,92	10,75	0,24	11,16 ^a	11,08 ^b	0,11	0,13	0,01	0,40	0,02	0,77	0,49
Sais, %	0,67	0,67	0,66	0,66	<0,01	0,67	0,66	<0,01	0,86	0,34	0,38	0,61	0,86	0,49
Acidez, °D	19,42	19,62	19,66	19,57	0,36	19,58	19,56	0,43	0,81	0,29	0,41	0,18	0,15	0,47
Dens. ⁷ , g/L	1,029	1,029	1,029	1,029	<0,01	1,029	1,029	<0,01	0,83	0,31	0,46	0,73	0,79	0,56
PC ⁸ , °C	-0,52	-0,53	-0,52	-0,52	<0,01	-0,52	-0,52	<0,01	0,83	0,27	0,65	0,53	0,86	0,51

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão; ² Erro padrão da média; ³ Efeito do tratamento: Valor de P para efeito de tratamento (Trat.) e aplicação (Aplic.); Trat.*Aplic= Efeito de interação entre tratamento e aplicação e teste de polinômio ortogonal apresentar resposta linear (L), quadrática (Q) ou cúbica (C); Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si (P>0,05); ⁴ PL: Produção de leite; ⁵ ESD: Extrato seco desengordurado; ⁶ ST: Sólidos totais; ⁷ Dens.: Densidade; ⁸ PC: Ponto de congelamento.

Também não foi observado efeito ($P>0,05$) da administração de ACTH ou placebo na composição e nas características físico-químicas do leite, com exceção do teor de gordura e sólidos totais (Tabela 15). Alguns autores afirmam que o aumento nos níveis de cortisol em decorrência do estresse pode comprometer a produção e a composição do leite, com redução nos teores de gordura, proteína e sólidos totais (BREUER et al., 2000; GONZÁLEZ; SILVA, 2003; HEMSWORTH et al., 2000; RUSHEN; DePASSILLÉ; MUNKSGAARD, 1999).

Como o estresse via administração de ACTH foi pontual, não era esperado que houvesse alterações significativas na produção e composição do leite de cabra para nenhum dos tratamentos estudados. Entretanto, verificou-se que o teor de gordura foi maior ($P=0,02$) no leite dos animais estressados com ACTH (Tabela 15), contrariando os resultados obtidos por Delgado (2008), Gaiato (2009) e Canaes (2011), que não verificaram alterações na composição do leite de cabras Saanen em lactação após a administração pontual de ACTH. Além disso, também foi observada interação ($P=0,03$) entre a administração de ACTH e o fornecimento de capim-limão, com maior teor de gordura no leite dos animais estressados dos tratamentos T1 ($P<0,01$) e T3 ($P=0,05$) (Tabela 16).

Tabela 16 – Teor de gordura (%) do leite de cabras Saanen resultante do desdobramento da interação entre tratamento e aplicação de ACTH ou Placebo

Tratamentos ¹	Aplicação		EPM ²	P ³
	ACTH	Placebo		
T1	3,38 ^a	3,21 ^b	0,21	<0,01
T2	3,20 ^a	3,20 ^a	0,21	0,95
T3	2,88 ^a	2,78 ^b	0,21	0,05
T4	2,76 ^a	2,89 ^a	0,21	0,78

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão; ² Erro padrão da média; ³ Efeito do tratamento: Valor de P para efeito de tratamento e aplicação; Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si ($P>0,05$).

Além disso, observou-se redução ($P < 0,01$) linear do teor de gordura com o aumento de capim-limão nas rações experimentais (Figura 7), contrariando os resultados obtidos na primeira fase do período experimental (Fase 1) do presente estudo e os resultados obtidos por Canaes (2011), que não observou diferença no teor de gordura do leite de cabras Saanen alimentadas com teores crescentes de capim-limão.

Figura 7 – Teor médio de gordura do leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

Houve também efeito ($P=0,01$) da aplicação de ACTH ou placebo para o teor de sólidos totais, sendo observado maior ($P=0,01$) teor para os animais que receberam ACTH, assim como efeito ($P=0,02$) linear decrescente com a inclusão de teores crescentes de capim-limão, o que pode ser explicado pelo comportamento observado para os teores de gordura, uma vez que os sólidos totais apresentam elevada correlação (0,82) com a concentração de gordura no leite de cabra (SUNG; WU; WANG, 1999; ZENG; ESCOBAR; POPHAM, 1997) e o teor de gordura foi utilizado no cálculo para obtenção do teor de sólidos, de acordo com a fórmula: sólidos totais = gordura + lactose + proteína + sais (BEHMER, 1980).

Como discutido na primeira fase do período experimental, embora o aumento no teor de fibra da dieta favoreça o aumento da relação acetato:propionato, resultando em maiores teores de gordura no leite (PALMQUIST; MATTOS, 2006; RODRIGUES, 2004; SANTINI et al., 1992), como verificado no presente estudo com a inclusão de teores crescentes de capim-limão nas rações, a redução no tamanho de partícula pode reduzir a quantidade de ácido acético produzido (BRANCO et al., 2010; CARVALHO et al., 2006; VAN SOEST, 1963 apud MERTENS, 2001), resultando em menor conteúdo de gordura no leite. No presente estudo, o capim-limão foi fornecido peletizado, o que pode explicar a redução do teor de gordura do leite, mesmo observando-se teores crescentes de FDN nas rações experimentais com a inclusão de capim-limão.

Em relação aos teores de proteína, lactose, extrato seco desengordurado (ESD) e sais, os valores observados foram semelhantes entre todos os tratamentos e não houve efeito ($P>0,05$) da aplicação de ACTH ou placebo, de tratamento ou interação entre tratamento e aplicação (Tabela 15). Os valores médios observados para essas variáveis no presente estudo (2,98; 4,46; 8,13 e 0,67%, respectivamente) estão de acordo com os valores de referência para o leite de cabra (2,80; 4,30; 8,20 e 0,70%), segundo a Instrução Normativa nº 37 (BRASIL, 2000).

Adicionalmente, Delgado (2008) observou valores médios semelhantes ao do presente estudo para a composição do leite de cabras Saanen em lactação (gordura, proteína, lactose e sólidos totais de 3,35; 2,88; 4,52 e 11,73%, respectivamente) após a indução de estresse pontual com ACTH.

Da mesma forma, Canaes (2011) também encontrou valores semelhantes (3,13; 2,86; 4,52 e 11,35% para gordura, proteína, lactose e sólidos totais, respectivamente) para o leite de cabras Saanen ao final da lactação e alimentadas com teores crescentes de capim-limão, após a indução de estresse pontual via ACTH, como observado no presente estudo.

Os parâmetros físicos do leite de cabra (acidez, densidade a 15°C e ponto de congelamento) também foram semelhantes entre os tratamentos e não foram influenciados ($P>0,05$) pela administração de ACTH ou placebo ou pela inclusão de capim-limão na dieta, concordando com os resultados obtidos por Canaes (2011). Os valores médios obtidos no presente estudo (19,57°D; 1,029 g/L e -0,52°C) também estão de acordo com os valores considerados normais para o leite de cabra, que são 0,13 a 0,18% ou 13 a 18°D; 1,028 a 1,034 g/L; -0,550°H e -0,585°H (graus Hortvet) ou -0,531°C e -0,565°C, respectivamente (BRASIL, 2000).

4.2.3 Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite de cabra

A contagem de células somáticas (CCS) não foi influenciada ($P>0,05$) pela administração de ACTH ou placebo (Tabela 17). Entretanto, verificou-se interação entre administração de ACTH e fornecimento de capim-limão, com menor ($P<0,01$) valor de CCS no leite dos animais estressados do tratamento T2 (Tabela 18), contrariando os resultados obtidos por Canaes (2011), que não verificou alterações na CCS do leite de cabras Saanen em lactação alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho após a administração pontual de ACTH.

Além disso, foi verificado efeito ($P<0,01$) linear decrescente da CCS do leite com a inclusão de teores crescentes de capim-limão, concordando com Canaes (2011), que também observou menor CCS no leite de cabras alimentadas com teores crescentes de capim-limão.

Tabela 17 – Contagem de células somáticas (CCS) e contagem bacteriana total (CBT) do leite de cabras Saanen submetidas à aplicação pontual de ACTH alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho

Item	Tratamentos ¹					Aplicação			P ³					
	T1	T2	T3	T4	EPM ²	ACTH	Placebo	EPM ²	Trat.	Aplic.	Trat. Aplic.	L	Q	C
CCS ⁴ Log ₁₀ , células/mL	2,78 ^a	2,14 ^b	2,30 ^b	2,07 ^b	0,10	2,30	2,35	0,07	<0,01	0,63	<0,01	<0,01	0,05	0,01
CBT ⁵ , log ₁₀ , UFC/mL	1,52	1,56	1,23	1,48	0,17	1,43	1,46	0,10	0,50	0,78	0,26	0,55	0,54	0,21

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão; ² Erro padrão da média; ³ Efeito do tratamento: Valor de P para efeito de tratamento (Trat.) e aplicação (Aplic.); Trat.*Aplic.= Efeito de interação entre tratamento e aplicação e teste de polinômio ortogonal apresentar resposta linear (L), quadrática (Q) ou cúbica (C); ⁴ CCS: Contagem de células somáticas na base Log (Células por mL). ⁵ CBT: Contagem bacteriana total na base Log (Unidades formadoras de colônia por mL).

Tabela 18 – Contagem de células somáticas (CCS) (Log células/mL) do leite de cabras Saanen resultante do desdobramento da interação entre tratamento e aplicação de ACTH ou Placebo

Tratamentos ¹	Aplicação		EPM ²	P ³
	ACTH	Placebo		
T1	2,93 ^a	2,64 ^a	0,15	0,19
T2	1,70 ^b	2,58 ^a	0,15	<0,01
T3	2,33 ^a	2,27 ^a	0,14	0,77
T4	2,24 ^a	1,90 ^a	0,14	0,10

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão; ² Erro padrão da média; ³ Efeito do tratamento: Valor de P para efeito de tratamento e aplicação; Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si (P>0,05).

Alguns autores afirmam que a liberação de cortisol e catecolaminas na corrente sanguínea pode afetar o sistema imune dos animais (CRARY et al., 1983; LANDMANN et al., 1984) e provocar maior perda de células secretoras pelo úbere, resultando em aumento na CCS do leite (CANAES et al., 2009; YAGI et al., 2004).

Adicionalmente, Van Reenen et al. (2002) afirmam que o comportamento animal frente a situações de estresse pode interferir na ejeção de leite durante a ordenha e, em caso de ordenha incompleta, aumentar a incidência de mastite.

Nesse sentido, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o capim-limão foi efetivo em reduzir a CCS do leite das cabras submetidas ao estresse pontual via ACTH. Adicionalmente, de acordo com Silanikove (2000), as cabras são melhores adaptadas às condições ambientais adversas que outros ruminantes, o que atenua a resposta frente ao estresse, o que foi observado no presente estudo, pois os valores médios de CCS observados foram baixos para todos os tratamentos, inclusive para o tratamento controle (T1) (Tabela 17).

Como já discutido na primeira fase do período experimental, os valores de referência para CCS no leite de cabra não são especificados pela Instrução Normativa nº 37 (BRASIL, 2000), no entanto alguns autores afirmam que 400×10^3 células/mL é um valor considerado normal (McDOUGALL et al., 2001) e outros que até 1.000×10^3 células/mL é aceito nos Estados Unidos (PAAPE et al., 2001).

A CCS média observada no presente estudo ($378,25 \times 10^3$ células/mL) foi inferior aos valores obtidos por Delgado (2008) e Gaiato (2009), ambos estudando a indução de estresse em cabras leiteiras da raça Saanen via administração pontual de ACTH, cujos valores médios foram $578,85 \times 10^3$ células/mL e 1.000×10^3 células/mL, respectivamente. Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo foram superiores aos obtidos na primeira fase do período experimental (média de $295,75 \times 10^3$ células/mL na primeira fase).

Considerando-se a alimentação como fator comparativo, Zambom et al. (2005) e Ribeiro et al. (2008) também observaram valores de CCS superiores aos obtidos no presente estudo ($1.158,57 \times 10^3$ células/mL e $1.758,81 \times 10^3$ células/mL, respectivamente), ao estudarem o fornecimento de diferentes volumosos na alimentação de cabras leiteiras da raça Saanen.

Em relação à contagem bacteriana total (CBT), observa-se pela Tabela 17, que não houve efeito ($P > 0,05$) da administração de ACTH ou placebo, tratamento ou interação entre tratamento e aplicação. O valor médio de CBT obtido no presente estudo foi de 1,45 Log UFC/mL. Esse resultado foi inferior ao obtido na primeira fase do período experimental, que foi de 2,66 Log UFC/mL, o que pode ser explicado pela forma como o leite foi colhido para análise. Na primeira fase, as amostras foram retiradas dos copos coletores através da torneira, o que provavelmente aumentou a contaminação das amostras e na segunda fase, o leite foi retirado diretamente dos tambores de leite.

Como discutido na primeira fase, Cunha (2007) observou valores médios de CBT superiores (2,24 Log UFC/mL) ao do presente estudo para o leite de cabra obtido de forma higiênica e satisfatória, o que demonstra que os animais mantiveram-se saudáveis durante o experimento e que os procedimentos relacionados ao manejo de ordenha foram adequados para o controle da contaminação microbiana do leite de cabra.

Entretanto, como já discutido na primeira fase do período experimental, em função do comprovado efeito antioxidante (CHEEL et al., 2005) e antibacteriano (BASKARAN et al., 2009; CIMANGA et al., 2002; MAYAUD et al., 2008; PEREIRA et al., 2004; WANNISSORN et al., 2005) do capim-limão, esperava-se que houvesse diminuição significativa nos valores de CCS e CBT com o aumento da substituição da silagem de milho por capim-limão nas rações experimentais, o que foi verificado apenas para CCS (Tabela 17).

Fontequê et al. (2010), ao avaliarem cabras da raça Saanen com mastite induzida por inoculação de *Staphylococcus aureus* no período parturiente e suplementadas com vitamina E, verificaram valores menores de CCS e CBT para os animais suplementados em comparação ao tratamento controle (sem suplementação), o que suporta a hipótese de que a CBT também deveria diminuir com a inclusão de capim-limão.

4.2.4 Perfil de ácidos graxos do leite de cabra

A composição de ácidos graxos do leite foi influenciada pela administração de ACTH e pelas dietas experimentais (Tabela 19). Observou-se que a concentração dos ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) foi maior no leite dos animais submetidos ao estresse via administração pontual de ACTH.

Por outro lado, a substituição da silagem de milho pelo capim-limão modificou em torno de 40% dos ácidos graxos do leite de cabra, aumentando linearmente ($P < 0,01$) a concentração de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI).

Tabela 19 – Perfil geral dos ácidos graxos (mg/g de lipídeo) no leite de cabras Saanen submetidas à aplicação pontual de ACTH alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho

Ácido graxo	Tratamentos ¹				EPM ²	Aplicação		EPM ²	P ³				
	T1	T2	T3	T4		ACTH	Placebo		Trat.	Aplic.	L	Q	C
Saturados	45,84	42,37	43,29	40,34	0,57	44,19	41,73	0,40	0,03	0,19	0,05	0,85	0,23
Monoinsaturados	18,81	17,35	17,94	17,46	0,40	18,16	17,62	0,28	0,17	0,36	0,15	0,32	0,18
Poliinsaturados	2,48	2,95	3,91	4,17	0,28	3,30	3,45	0,20	<0,01	0,80	<0,01	0,70	0,37
AGCC ⁴	10,63	9,36	9,87	8,41	0,63	9,71	9,42	0,44	0,06	0,74	0,07	0,87	0,20
AGCM ⁵	29,17	25,52	26,40	25,50	0,45	27,11	26,19	0,32	0,05	0,49	0,02	0,08	0,07
AGCL ⁶	28,65	29,52	30,32	29,88	0,41	30,44 ^a	28,74 ^b	0,29	0,25	0,04	0,33	0,51	0,79

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão; ² Erro padrão da média; ³ Efeito do tratamento: Valor de P para efeito de tratamento (Trat.) e aplicação (Aplic.) e teste de polinômio ortogonal apresentar resposta linear (L), quadrática (Q) ou cúbica (C); Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (P>0,05); ⁴ AGCC: Ácidos graxos de cadeia curta (C₄ a C₁₃); ⁵ AGCM: Ácidos graxos de cadeia média (C₁₄ a C₁₇); ⁶ AGCL: Ácidos graxos de cadeia longa (> C₁₈). Adaptado de Canaes (2011).

A inclusão de teores crescentes de capim-limão aumentou ($P < 0,01$) de forma linear a concentração de ácido linolênico (18:3 n-3) (Figura 8), concordando com os resultados obtidos na primeira fase do período experimental. Além disso, conforme já discutido na primeira fase, esse resultado era esperado em função da maior concentração desse ácido graxo nas rações com teores crescentes de capim-limão.

Figura 8 – Concentração de ácido linolênico no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

Da mesma forma, a concentração de CLA *cis*-9 *trans*-11 (Figura 9) e ácido linoléico (18:2 n-6 *cis*) (Figura 10) também aumentou ($P = 0,01$ e $P < 0,01$, respectivamente) linearmente à medida que a silagem de milho foi substituída pelo capim-limão nas rações experimentais, o que também foi observado e discutido na primeira fase do período experimental.

Figura 9 – Concentração de CLA *cis-9 trans-11* no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

Adicionalmente, como também discutido na primeira fase, o aumento na concentração de AGPI no leite pode ser benéfico do ponto de vista da funcionalidade dos ácidos graxos n-3, principalmente o CLA, entretanto essa maior concentração pode aumentar a susceptibilidade do leite e seus derivados à oxidação lipídica (PALMQUIST; MATTOS, 2006).

Figura 10 – Concentração de ácido linoléico no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

Semelhantemente à primeira fase, a concentração de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) (C_{14} a C_{17}) reduziu ($P=0,02$) linearmente com a inclusão de teores crescentes de capim-limão nas rações experimentais, assim como a concentração de ácidos graxos saturados ($P=0,05$) (Tabela 19).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a indução de estresse através da administração de ACTH não foi suficiente para modificar o perfil de ácidos graxos do leite e a inclusão de teores crescentes de capim-limão nas rações experimentais aumentou a concentração de ácidos graxos poliinsaturados.

4.2.5 Oxidação lipídica do leite de cabra

Não houve efeito ($P>0,05$) da aplicação de ACTH sobre a oxidação lipídica do leite de cabra (Tabela 20). Entretanto, houve efeito ($P=0,03$) quadrático para os valores de índice de peróxido (IP), com aumento da peroxidação lipídica até o tratamento T3 (Figura 11) e redução ($P=0,05$) linear dos valores de TBARS com a inclusão de teores crescentes de capim-limão (Figura 12).

Figura 11 – Valores médios de IP no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

Figura 12 – Valores médios de TBARS no leite de cabras Saanen alimentadas com dietas contendo feno pelotizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

Além disso, houve efeito ($P < 0,01$) de horas para os valores de IP e TBARS, com redução ($P < 0,01$) dos produtos iniciais da oxidação (Figura 13) e aumento ($P < 0,01$) dos produtos secundários da oxidação (Figura 14), após 48 horas de armazenamento do leite em temperatura ambiente (média de 23°C).

Figura 13 – Valores médios de IP no leite de cabras Saanen logo após a ordenha e após 48 horas de armazenamento alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

Figura 14 – Valores médios de TBARS no leite de cabras Saanen logo após a ordenha e após 48 horas de armazenamento alimentadas com dietas contendo feno peletizado de capim-limão em substituição à silagem de milho e submetidas à administração pontual de ACTH ou placebo (Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

Esses resultados eram esperados, pois os peróxidos formados durante a fase de propagação (FRANKEL, 1980; GRAY; GOMAA; BUCKLEY, 1996; WANG; JIANG; LIN, 1995) são instáveis e a mensuração desses compostos é limitada a fase inicial da oxidação lipídica (SEVANI; HOCHSTEIN, 1985), o que explica a redução ($P<0,01$) do IP após 48 horas de armazenamento. No entanto, as reações continuam a ocorrer até a fase de terminação (SEVANI; HOCHSTEIN, 1985), onde são formados os produtos secundários da oxidação lipídica, os quais são estáveis e não reativos (KUBOW, 1992), o que justifica o aumento ($P<0,01$) dos valores de TBARS.

Além disso, a redução ($P=0,05$) linear da oxidação lipídica do leite com a inclusão de teores crescentes de capim-limão pode ser explicada pelo comprovado efeito antioxidante (CHEEL et al., 2005) dos compostos já discutidos anteriormente. Observou-se que houve redução da oxidação lipídica do leite mesmo com o aumento da concentração de AGPI (Tabela 19), o que é muito interessante do ponto de vista funcional, pois ao mesmo tempo em que o fornecimento de capim-limão aumentou a concentração de ácidos graxos n-3 no leite, principalmente o CLA, também melhorou sua estabilidade oxidativa, o que foi comprovado pela redução da oxidação lipídica do leite (Tabela 20).

Tabela 20 – Valores de índice de peróxido (IP) e TBARS do leite de cabras Saanen submetidas à aplicação pontual de ACTH alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	Aplicação		EPM ²	Horas		EPM ²	P ³					
	T1	T2	T3	T4		ACTH	Placebo		0	48		Trat.	Aplic.	Hora	L	Q	C
IP _(Abs500)	0,059	0,066	0,083	0,038	0,011	0,064	0,059	<0,01	0,093 ^b	0,030 ^a	<0,01	0,04	0,62	<0,01	0,39	0,03	0,19
TBARS _(Abs540)	0,062	0,060	0,056	0,057	<0,01	0,058	0,059	<0,01	0,053 ^b	0,065 ^a	<0,01	0,04	0,69	<0,01	0,05	0,80	0,49

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão; ² Erro padrão da média; ³ Efeito do tratamento: Valor de P para efeito de tratamento (Trat.), aplicação (Aplic.) e Hora e teste de polinômio ortogonal apresentar resposta linear (L), quadrática (Q) ou cúbica (C); Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (P>0,05).

Adicionalmente, Loven (1988) comenta que condições estressantes podem provocar aumento na produção de radicais livres e, segundo Frankel (2005) e Vázquez-Añón et al. (2008), a inclusão de antioxidantes na dieta pode amenizar os efeitos negativos da oxidação lipídica, reduzindo a peroxidação dos ácidos graxos insaturados e melhorando o desempenho produtivo e o *status* antioxidante de vacas durante a lactação. Porém, no presente estudo não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$) na oxidação do leite de cabra do grupo estressado (via administração de ACTH) em relação ao grupo controle (via administração de placebo) (Tabela 20).

Por outro lado, Megahed et al. (2008) verificaram que houve aumento ($P < 0,01$) na peroxidação lipídica no plasma de búfalas criadas no verão (condição estressante) em comparação ao inverno (condição não estressante) e observaram correlação ($P < 0,01$) positiva entre o nível de cortisol e o estresse oxidativo, principalmente no verão. Além disso, como mencionado anteriormente, os mesmos autores observaram redução do estresse oxidativo e dos níveis plasmáticos de cortisol com a administração de antioxidante à base de vitamina E e selênio ao grupo estressado.

Em conclusão, a indução do estresse via administração pontual de ACTH em cabras lactantes não influenciou nenhum dos parâmetros estudados, com exceção do teor de gordura e sólidos totais do leite, que aumentaram com a indução do estresse pontual.

O consumo de matéria seca e o ganho de peso dos animais aumentaram com a inclusão de teores crescentes de capim-limão, sem alterar a composição, as características físico-químicas e a contagem bacteriana total do leite das cabras. Por outro lado, a contagem de células somáticas do leite diminuiu com a inclusão de teores crescentes de capim-limão nas rações experimentais.

Adicionalmente, a inclusão de capim-limão aumentou os ácidos graxos poliinsaturados no leite das cabras, principalmente os ácidos linolênico, linoléico e CLA *cis*-9 *trans*-11 e reduziu a oxidação lipídica do leite, comprovando seu efeito antioxidante.

No entanto, existem poucos trabalhos publicados utilizando capim-limão na alimentação de ruminantes e novos estudos devem ser realizados para melhorar o conhecimento sobre o metabolismo dos antioxidantes presentes e como eles podem contribuir para redução dos níveis de cortisol plasmático e da oxidação lipídica do leite de cabra.

4.3 Terceira fase do período experimental (Fase 3)

4.3.1 Concentração de DNA e RNA e contagem de células apoptóticas (TUNEL, Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling) no tecido mamário

Não houve efeito ($P>0,05$) da inclusão de teores crescentes de capim-limão na concentração de DNA e RNA do tecido mamário dos animais experimentais (Tabela 21).

Tabela 21 – Concentrações médias de DNA e RNA e número de células apoptóticas do tecido mamário de cabras Saanen alimentadas com capim-limão em substituição à silagem de milho

Item	Tratamentos ¹				EPM ²	P ³			
	T1	T2	T3	T4		Trat.	L	Q	C
DNA, ng/ μ L	1,35	1,43	1,36	1,35	0,06	0,80	0,82	0,49	0,52
RNA, ng/ μ L	4,66	2,86	4,60	4,06	1,80	0,88	0,99	0,73	0,49
TUNEL, células/campo	13 ^b	147 ^a	39 ^b	23 ^b	18,72	<0,01	0,37	<0,01	<0,01

¹ Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão; ² Erro padrão da média; ³ Efeito do tratamento: Valor de P para efeito de tratamento (Trat.) e teste de polinômio ortogonal apresentar resposta linear (L), quadrática (Q) ou cúbica (C); ³ Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si ($P>0,05$).

Por outro lado, a contagem de células apoptóticas apresentou efeito ($P<0,01$) quadrático, com o maior valor observado para o tratamento T2 (Figura 15).

Figura 15 – Número de células apoptóticas/campo de acordo com os tratamentos experimentais: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão.

As Figuras 16, 17, 18 e 19 ilustram algumas das células apoptóticas detectadas no tecido mamário das cabras, obtidas através da análise de TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling).

Figura 16 – Corte histológico de tecido mamário do animal 6049 (tratamento T1) corado através da técnica de TUNEL e fotografado através de microscopia de epifluorescência em aumento de 40 vezes (T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta).

Figura 17 – Corte histológico de tecido mamário do animal 3027 (tratamento T2) corado através da técnica de TUNEL e fotografado através de microscopia de epifluorescência em aumento de 40 vezes (T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão).

Figura 18 – Corte histológico de tecido mamário do animal 6047 (tratamento T3) corado através da técnica de TUNEL e fotografado através de microscopia de epifluorescência em aumento de 40 vezes (T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão).

Figura 19 – Corte histológico de tecido mamário do animal 6058 (tratamento T4) corado através da técnica de TUNEL e fotografado através de microscopia de epifluorescência em aumento de 40 vezes (T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão).

De acordo com Orrenius et al. (1989) e Dallard et al. (2007), o estresse oxidativo em células mamárias está relacionado ao aumento nos teores de cálcio livre e ferro dentro dessas células e o aumento excessivo de cálcio livre no meio intracelular pode provocar a fragmentação do DNA pela ativação de endonucleases. Ainda, segundo os mesmos autores, a importância da lesão em decorrência do estresse oxidativo vai depender do alvo molecular, gravidade do estresse e o mecanismo pelo qual esse estresse é imposto.

Uma vez que os antioxidantes, como as vitaminas A, E e C atuam como sequestradores de espécies reativas de oxigênio, protegendo as células contra os danos oxidativos (MUINDI, 1996), era esperado que o uso do capim-limão na alimentação das cabras, em função de seu comprovado efeito antioxidante (CHEEL et al., 2005), diminuísse o número de células apoptóticas no tecido mamário dos animais experimentais, o que não foi verificado.

Adicionalmente, como foi verificado efeito ($P < 0,01$) quadrático no número de células apoptóticas, com maior valor para o tratamento T2, e a técnica de TUNEL detecta células com DNA fragmentado, era esperado que a concentração de DNA intacto no tecido mamário dos animais desse tratamento fosse menor em relação aos outros tratamentos, o que também não foi observado.

Segundo Tucker (1969) apud Brown et al. (2005), a quantidade de DNA é um indicador do número de células secretoras e a de RNA um indicador da atividade metabólica dessas células. Como a proliferação de células mamárias predomina durante a gestação e início da lactação (KNIGHT, 1987; SORENSEN et al., 2006), pode-se afirmar que a concentração média de DNA e RNA do tecido mamário observada no presente estudo (1,37 e 4,05 ng/ μ L, respectivamente) foi baixa, uma vez que a biópsia foi realizada no final do período experimental, ou seja, no final da lactação (média de $264,67 \pm 31,86$ dias) e os animais experimentais não estavam prenhes.

Além disso, como os animais do presente estudo estavam no final do período de lactação, era esperado que o número de células apoptóticas fosse maior no tratamento controle, não em decorrência do processo de involução da glândula mamária para renovação da população celular (KNIGHT, 1987), pois isso afetaria todos os grupos, mas pelo fornecimento de capim-limão para os outros tratamentos, o que deveria

reduzir a apoptose do tecido mamário desses grupos, pela presença de compostos antioxidantes (CHEEL et al., 2005), o que não foi verificado.

Adicionalmente, diversos autores (DALLARD, 2007; LONG et al., 2001; SHEFFIELD, 1997; WEINRAUCH; ZYCHLINSKY, 1999; WESSON et al., 2000) afirmam que a apoptose também pode ser induzida por patógenos bacterianos e pela mastite, entretanto, no presente estudo foi verificado que nas duas fases experimentais (Fase 1 e Fase 2) a contagem bacteriana total (CBT) do leite (1.157×10^3 e 294×10^3 UFC/mL, respectivamente) e a contagem de células somáticas (CCS) (341×10^3 e 385×10^3 células/mL, respectivamente) foram baixas, o que pode ajudar a explicar o número reduzido de células apoptóticas dos tratamentos T1, T3 e T4.

Outro fator que pode acelerar o processo de apoptose na glândula mamária é o estresse, através do aumento da taxa metabólica do organismo (BOUTINAUD; GUINARD-FLAMENT; JAMMES, 2004; STEFANON et al., 2002). Esse aumento provoca desequilíbrio entre as taxas de redução e oxidação celular, acelerando o processo de apoptose. Além disso, agentes estressores podem aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio no organismo e intensificar o processo de apoptose do tecido mamário (STEFANON et al., 2002; TIAN et al., 2005).

Entretanto, como o estresse provocado pela administração pontual de ACTH durante a segunda fase do período experimental (Fase 2) do presente estudo não provocou mudanças significativas na produção e composição do leite dos animais (com exceção do maior ($P < 0,01$) teor de gordura e sólidos totais para os tratamentos T1 e T3), o estresse pontual não alterou a apoptose no tecido mamário dos animais estudados.

4.3.2 Fragmentação do DNA em gel de poliacrilamida 8%

Pela análise dos géis (Figuras 20 e 21), obtidos após a extração de DNA do tecido mamário observou-se que não houve fragmentação de DNA para nenhum dos tratamentos estudados. Como foi observada a presença de células apoptóticas pela técnica de TUNEL (Figuras 16, 17, 18 e 19), era esperado que houvesse fragmentação do DNA dos tecidos estudados.

Figura 20 – Análise eletroforética de DNA de tecido mamário em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata 0,2%. P: padrão com 10.000 pares de base (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker, SIGMA®). Amostras: 1 (T2), 2 (T3), 3 (T4), 4 (T3), 5 (T1) e 6 (T3) Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão.

Figura 21 – Análise eletroforética de DNA de tecido mamário em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata 0,2%. P: padrão com 10.000 pares de base (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker, SIGMA®). Amostras: 7 (T4), 8 (T1), 9 (T2), 10 (T1), 11 (T4) e 12 (T2). Tratamentos: T1: 0% de inclusão de capim-limão na dieta; T2: 33,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T3: 66,5% de substituição da silagem de milho pelo capim-limão; T4: substituição total da silagem de milho pelo capim-limão.

Entretanto, duas hipóteses podem ajudar a explicar esses resultados. A primeira é que a concentração de DNA obtida após o processo de extração foi baixa, em decorrência da perda de pequenos fragmentos de DNA durante o manuseio das amostras (MORENO; CUÉLLAR; GONZÁLEZ, 2000), justificando a ausência de formação de um padrão característico. Segundo Moreno, Cuéllar e González (2000) e Dallard et al. (2007), durante o processo de apoptose são produzidas endonucleases sensíveis ao cálcio, que fragmentam o DNA internucleossomal, liberando os nucleossomos, os quais contêm em torno de 200 pares de base e, ao realizar a corrida eletroforética, é possível observar um padrão de DNA em escada, o que não foi observado no presente estudo (Figuras 20 e 21).

A segunda hipótese é que houve a fragmentação do DNA dos tecidos mamários dos animais estudados, porém em pedaços grandes, pois de acordo com Corrêa e Possik (2004), o tipo de matriz utilizada na análise de fragmentação do DNA (gel de agarose ou poliacrilamida) é dependente do tamanho dos fragmentos que se pretende separar e visualizar e no presente estudo foi utilizado o gel de poliacrilamida. Ainda, segundo os mesmos autores, em função da diferença no tamanho dos poros dessas matrizes, utiliza-se normalmente o gel de agarose para separação de fragmentos que variam de 200 a 50.000 pares de base e o gel de poliacrilamida para separação de fragmentos pequenos (de até 1000 pares de base).

Nesse sentido, os resultados obtidos no presente estudo demonstram a necessidade de novas pesquisas envolvendo a apoptose e compostos antioxidantes, como os presentes no capim-limão, para que se possa concluir algo mais concreto sobre o uso de antioxidantes e a redução da apoptose.

Em conclusão, a inclusão de capim-limão nas rações experimentais e a administração pontual de ACTH não influenciaram a concentração de DNA e RNA e a apoptose do tecido mamário das cabras no final da lactação.

5 CONCLUSÃO GERAL

A inclusão de capim-limão em substituição à silagem de milho na alimentação de cabras em lactação não reduziu a apoptose da glândula mamária de cabras Saanen ao final da lactação, no entanto, aumentou a estabilidade oxidativa do leite, mesmo com o aumento da concentração de ácidos graxos poliinsaturados, comprovando seu efeito antioxidante.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRICULTURAL FOOD AND RESEARCH COUNCIL. Energy and Protein Requirements of Ruminants. An advisory manual prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients. 1993. **CAB INTERNATIONAL**, Wallingford, UK. 159p.
- ALLEN, R.G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 463-499, 2000.
- AL-MABRUK, R.M.; BECK, N.F.G.; DEWHURST, R.J. Effects of silage species and supplemental vitamin E on the oxidative stability of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 406-412, 2004.
- ALMEIDA, M.A.O.; BOTURA, M.B.; SANTOS, M.M.; ALMEIDA, G.N.; DOMINGUES, L.F.; COSTA, S.L.; BATATINHA, M.J.M. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (capim-santo) e de *Digitaria insularis* (L.) Fedde (capim-açu) sobre cultivos de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 3, p. 125-129, 2003.
- ALONSO, L.; FONTECHA, J.; LOZADA, L.; FRAGA, M.J.; JUÁREZ, M. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and trans fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 878-884, 1999.
- AMBROSOLI, R.; DI STASIO, L.; MAZZOCCO, P. Content of α_{s1} -casein and coagulation properties in goat Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 24-28, 1988.
- A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 13 ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C., 1980. p. 376-384.
- AOYAMA, M.; MAEJIMA, Y.; SUZUKI, T.; IIGO, M.; SUGITA, S. Androgen supresses corticotropin-induced increase in plasma cortisol level but enhances the increase in plasma aldosterone level in goats. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 71, n. 3, p. 281-285, 2009.
- ARUOMA, O.I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 2, p.199-212, 1998.

ATTAIE, R.; RICHTER, R.L. Size distribution of fat globules in goat Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 940-944, 2000.

BAER, R.J.; LENTSCH, M.R.; SCHINGOETHE, D.J.; MADISON-ANDERSON, R.J.; KASPERSON, K.M. Characteristics of milk and reduced fat cheddar cheese from cows fed extruded soybeans and niacin. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1127-1136, 1996.

BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 4, p. 235-244, 1998.

BARBOSA, M. Goat's milk research in Portugal. **Lait**, v. 73, p. 425-429, 1993.

BARREFORS, P.; GRANELLI, K.; APPELQVIST, L.A.; BJOERCK, L. Chemical characterization of raw milk samples with and without oxidative off-flavor. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2691-2699, 1995.

BASKARAN, S.A.; KAZMER, G.W.; HINCKLEY, L.; ANDREW, S.M.; VENKITANARAYANAN, K. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1423-1429, 2009.

BASSAM, B.J.; ANOLLÉS, G.C.; GRESSHOF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 196, n. 1, p. 80-83, 1991.

BAUMAN, D.E.; BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; GRINARI, J.M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminant. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, v. 77, p. 1-15, 1999.

BEHMER, M.L.A. Tecnologia do leite. 10 ed. São Paulo: Nobel, 1980. 320p.

BELURY, M.A. Dietary conjugated linoleic in health: physiological effects and mechanisms of action. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 505-531, 2002.

BERGHASH, S.R.; DAVIDSON, J.N.; ARMSTRONG, J.C.; DUNNY, G.M. Effects of antibiotic treatment of nonlactating dairy cows on antibiotic resistance patterns of bovine mastitis pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 24, n. 5, p. 771-776, 1983.

BISPO, D.L.N.; LANZIOTTI, V.M.B. Farmacologia do estresse. In: MAGALHAES, A.M. (Ed). **Farmacologia veterinária**. Belo Horizonte: Livraria e Editora Agropecuária, 1998. p. 37-109.

BORGES, C.H.P.; BRESSLAU, S. Produção de leite de cabra em confinamento. In: Simpósio de Pecuária do Nordeste, 6, 2002, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: PECNORDESTE. III Semana da caprino-ovinocultura brasileira. 2002. p. 1-16.

BOUTINAUD, M.; JAMMES, H. Potential uses of milk epithelial cells: a review. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 42, p. 133-147, 2002.

BOUTINAUD, M.; GUINARD-FLAMENT, J.; JAMMES, H. The number and activity of mammary epithelial cells, determining factors for milk production. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 44, p. 499-508, 2004.

BRANCO, R.H.; RODRIGUES, M.T.; SILVA, M.M.C.; RODRIGUES, C.A.F.; QUEIROZ, A.C.; ARAÚJO, F.L. Efeito dos níveis de fibra da forragem sobre o consumo, a produção e a eficiência de utilização de nutrientes em cabras lactantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 11, p. 2477-2485, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. **Instrução Normativa nº 37**. Brasília, 2000.

BREMEL, R.D.; GANGWER, M.I. Effect of adrenocorticotrophin injection and stress on milk cortisol content. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 1103-1108, 1978.

BREUER, K.; HEMSWORTH, P.H.; BARNETT, J.L.; MATTHEWS, L.R.; COLEMAN, G.J. Behavioural response to humans and the productivity of commercial dairy cows. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 66, n. 4, p. 273-288, 2000.

BROWN, E.G.; VANDEHAAR, M.J.; DANIELS, K.M.; LIESMAN, J.S.; CHAPIN, L.T.; FORREST, J.W.; AKERS, R.M.; PEARSON, R.E.; NIELSEN, M.S.W. Effect of increasing energy and protein intake on mammary development in heifer calves. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 595-603, 2005.

BRUCKMAIER, R.M.; SCHAMS, D.; BLUM, J.W. Milk removal in familiar and unfamiliar surroundings: concentrations of oxytocin, prolactin, cortisol and β -endorphin. **Journal of Dairy Research**, v. 60, n. 4, p. 449- 456, 1993.

BUTTERWECK, V.M.H.; WINTERHOFF, H. Flavonoids of Saint John's wort reduce HPA axis function in the rat. **Planta Medica**, v. 70, p. 1008-1011, 2004.

CANAES, T.S. **Capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) na alimentação de cabras Saanen nos parâmetros hematológicos, bioquímicos, produção, composição e aceitação do leite**. 2011. 196 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2011.

CANAES, T.S.; NEGRÃO, J.A.; PAIVA, F.A.; ZAROS, M.; DELGADO, T.F.G. Influência do transporte e mudança de local de manejo nas variáveis fisiológicas e produtivas de cabras alpinas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 935-940, 2009.

CAPUCO, A.V.; AKERS, R.M. Mammary involution in dairy animals. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 4, n. 2, p. 137-144, 1999.

CAPUCO, A.V.; WOOD, D.L.; BALDWIN, R. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2177-2187, 2001.

CAPUCO, A.V.; ELLIS, S.E.; HALE, S.A.; LONG, E.; ERDMAN, R.A.; ZHAO, X.; PAAPE, M.J. Lactation persistency: insights from mammary cell proliferation studies. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 18-31, 2003.

CARLINI, E.A.; CONTAR, J.D.P.; SILVA-FILHO, A.R.; SILVEIRA-FILHO, N.G.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BUENO, O.F.A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, p. 37-64, 1986.

CARVALHO, C.M.; COSTA, C.P.M.; SOUSA, J.S.; SILVA, R.H.D.; OLIVEIRA, C.L.; PAIXÃO, F.J.R. Rendimento da produção de óleo essencial de capim-santo submetido a diferentes tipos de adubação. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, p. 1-7, 2005.

CARVALHO, S.; RODRIGUES, M.T.; BRANCO, R.H.; RODRIGUES, C.A.F. Consumo de nutrientes, produção e composição do leite de cabras da raça Alpina alimentadas com dietas contendo diferentes teores de fibra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 1154-1161, 2006.

CHANG, H.Y.; YANG, X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 821-846, 2000.

CHEEL, J.; THEODULOZ, C.; RODRÍGUEZ, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Free radical scavengers and antioxidants from lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2511-2517, 2005.

CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A.; BERNARD, L.; ROUEL, A.; LAMBERET, G.; DOREAU, M. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, n. 8, p. 828-855, 2007.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 213-220, 2002.

CLARK, S.; SHERBON, J.W. Alpha_{s1}-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 38, p. 123-134, 2000.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Nacional, v. 1, 1984. 577 p.

CORRÊA, E.M.; POSSIK, P.A. **A análise de DNA por eletroforese**. 2004. Disponível em: <http://www.ciencianews.com.br>. Acesso em: 07 set. 2011.

CORTINHAS, C.S.; BOTARO, B.G.; PORCIONATO, M.A.F.; REIS, C.B.M.; BARREIRO, J.R.; SANTOS, M.V. Fornecimento de fontes orgânicas de zinco, cobre e selênio para vacas leiteiras e efeitos sobre a saúde da glândula mamária. **Novos desafios da pesquisa em nutrição animal**. In: SANTOS, M.V. (Ed); ALBUQUERQUE, R.; RENNÓ, F.P.; SILVA, L.F.P. Pirassununga: Editora 5 D. Capítulo 5, p. 93-112, 2009.

CRARY, B.; BORYSENKO, M.; SUTHERLAND, D. C.; KUTZ, I.; BORYSENKO, J.Z.; BESON, H. Decrease in mitogen responsiveness of mononuclear cells from peripheral blood after epinephrine administration in humans. **The Journal of Immunology**, v. 130, n. 2, p. 694-697, 1983.

CUNHA, F.L. **Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e contagem de células somáticas em leite de cabra produzido na região de Nova Friburgo-RJ. Metodologia tradicional versus metodologia eletrônica**. 2007. 73 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Fluminense, Centro de Ciências Médicas – Faculdade de Veterinária, Niterói, 2007.

DALLARD, B.E. Inducción de muerte celular em lãs infecciones intramamarias. **Revista FAVE – Ciências Veterinárias**, v. 6 (1-2), p. 19-29, 2007.

DALLARD, B.E.; RUFFINO, V.; HEFFEL, S.; CALVINO, L.F. Effect of a biological response modifier on expression of growth factors and cellular proliferation at drying off. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2229-2240, 2007.

DELGADO, T.F.G. **Produção leiteira de cabras da raça Saanen: influência dos hormônios cortisol e IGF-I**. 2008. 103 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

DHANALASKSHMI, S.; SRIKUMAR, R.; MANIKANDAN, S.; PARTHASARATHY, N.J.; DEVI, R.S. Antioxidant property of triphala on cold stress induced oxidative stress in experimental rats. **Journal of Health Science**, v. 56, p. 843-847, 2006.

DHIMAN, T.R.; ANAND, G.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2146-2156, 1999.

DINGWELL, R.T.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.F.; SCHUKKEN, Y.H.; DESCOUTEAUX, L.; KEEFE, G.P.; KELTON, D.F.; LISSEMORE, K.D.; SHEWFELT, W.; DICK, P.; BAGG, R. Efficacy of intramammary tilmicosin and risk factors for cure of *Staphylococcus aureus* infection in the dry period. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 159-168, 2003.

DONNELLY, J.K.; ROBINSON, D.S. Invited Review. Free radicals in foods. **Free Radical Research**, v. 22, n. 2, p. 147-176, 1995.

DUARTE, M.R.; ZANETI, C.C. Estudo farmacobotânico de folhas de capim-limão: *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, *Poaceae*. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 117-124, 2004.

DULIN, A.M.; PAAPE, M.J.; WERGIN, W.P. Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 435-439, 1982.

DUMOULIN, E.; PERETZ, G. Qualité bactériologique du lait cru de chèvre en France. **Lait**, v. 73, p. 475-483, 1993.

DZIEDZIC, S.Z.; HUDSON, B.J.F. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. **Food Chemistry**, v. 14, p. 45-51, 1984.

ERSKINE, R.J.; WAGNER, S.; DEGRAVES, F.J. Mastitis therapy and pharmacology. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 19, p. 109-138, 2003.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Tecnología de la producción caprina**. Santiago: FAO, 1987. 242 p.

FARR, V.C.; STELWAGEN, K.; CATE, L.R.; MOLENAAR, A.J.; McFADDEN, T.B.; DAVIS, S.R. An improved method for the routine biopsy of bovine mammary tissue. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 543-549, 1996.

FENG, S.; LOCK, A.L.; GARNSWORTHY, P.C. Technical note: a rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 11, p. 3785-3788, 2004.

FOCANT, M.; MIGNOLET, E.; MARIQUE, M.; CLABOTS, F.; BREYNE, T.; DALEMANS, D.; LARONDELLE, Y. The effect of vitamin E supplementation of cow diets containing rapeseed and linseed on the prevention of milk fat oxidation. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1095-1101, 1998.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite controle de mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

FONTEQUE, J.H.; KOHAYAGAWA, A.; MATTOSO, C.R.S.; LOPES, S.T.A.; PAES, P.R.O.; CASSETARI, M.L.; LANGONI, H. Perfil eletroforético e concentração de imunoglobulinas G (IgG) do soro sanguíneo de cabras Saanen com mastite experimental induzida por *Staphylococcus aureus* suplementadas com vitamina E. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n.1, p. 79-86, 2010.

FRANKEL, E.N. Lipid Oxidation. **Progress in Lipid Research**, v. 19, p. 1-12, 1980.

FRANKEL, E.N. Antioxidants. In: _____. **Lipid oxidation**. 2° ed. Bridgwater: The oil Press, 2005. p. 209-258.

FULKERSON, W.J.; JAMIESON, P.A. Pattern of cortisol release in sheep following administration of synthetic ACTH or imposition of various stressor agents. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 215-222, 1982.

FURTADO, M.M. **Fabricação de queijo de leite de cabra**. 6° ed. São Paulo: Nobel, 1985. 126p.

FURTH, P.A. Mammary gland involution and apoptosis of mammary epithelial cells. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 4, n. 2, p. 123-127, 1999.

GAIATO, A.P.R. **Pico de lactação, persistência e apoptose mamária em cabras da raça Saanen: alterações causadas pelo estresse**. 2009. 73 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

GÁLVEZ, J.L.H.; TORRES, I.P.; AGUILAR, O.E.A; LARA, M.L. Estudio del efecto diurético de la hoja de *Cymbopogon citratus* en modelo de ratas. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 3, n. 2, p. 79-82, 1998.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures, and some applications). **Agricultural Research Service**, United States, Washington, DC: USDA, 1970. Agricultural Handbook, n° 379.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução a bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 198 p.

GRANELLI, K.; BARREFORS, P.; BJÖRCK, L.; APPELQVIST, L.A. Further studies on lipid composition of bovine milk in relation to spontaneous oxidised flavour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, n. 2, p. 161-171, 1998.

GRANVILLE, D.J.; CARTHY, C.M.; HUNT, D.W.; McMANUS, B.M. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. **Laboratory Investigation**, v. 78, n. 8, p. 893-913, 1998.

GRAY, J.I.; GOMAA, E.A.; BUCKLEY, D.J. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science**, v. 43 (Suppl. 1), p. 111-123, 1996.

GRIINARI, J.M.; CORL, B.A.; LACY, S.H.; CHOUINARD, P.Y.; NURMELA, K.V.V.; BAUMAN, D.E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta⁹-desaturase. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 9, p. 2285-2291, 2000.

GRÖHN, Y.T.; EICKER, S.W.; HERTL, J.A. The association between previous 305-day milk yield and disease in New York State dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 8, p. 1693-1702, 1995.

GRUMER, R.R. Effect of feed on the composition of milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 9, p. 3244-3257, 1991.

GULATI, S.K.; KITESSA, S.M.; ASHES, J.R.; FLECK, E.; BYERS, E.B.; BYERS, Y.G.; SCOTT, T.W. Protection of conjugated linoleic acids from ruminal hydrogenation and their incorporation into milk fat. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, p.139–148, 2000.

HAENLEIN, G.F.W. Status and prospects of the dairy goat industry in the United States. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1173-1181, 1996.

HAENLEIN, G.F.W. Relationship of somatic cell counts in goat milk to mastitis and productivity. **Small Ruminant Research**, v. 45, p. 163-178, 2002.

HAENLEIN, G.F.W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 155-163, 2004.

HAENLEIN, G.F.W.; CACCESE, R. **Dairy Goat Journal**, 2003. Disponível em: <http://www.dairygoatjournal.com/issues/07_08_03.html>. Acesso em: 11 maio 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of Life Sciences. **Nature Publishing Group**, p. 1-7, 2001.

HARRIS, W.S. Nonpharmacologic treatment of hypertriglyceridemia: focus on fish oils. **Clinical Cardiology**, v. 22 (Suppl. II), p. II-40-II-43, 1999.

HAVEMOSE, M.S.; WEISBJERG, M.R.; BREDIE, W.L.P.; NIELSEN, J.H. Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 563–570, 2004.

HAVEMOSE, M.S.; WEISBJERG, M.R.; BREDIE, W.L.P.; POULSEN, H.D.; NIELSEN, J.H. Oxidative stability of milk influenced by fatty acids, antioxidants, and copper derived from feed. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1970-1980, 2006.

HEDEGAARD, R.V.; KRISTENSEN, D.; NIELSEN, J.H.; FROST, M.B.; ØSTDAL, H.; HERMANSEN, J.E.; KRÖGER-OHLSSEN, M.; SKIBSTED, L.H. Comparison of descriptive sensory analysis and chemical analysis for oxidative changes in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 495-504, 2006.

HEMSWORTH, P.H.; COLEMAN, G.J.; BARNETT, J.L.; BORG, S. Relationships between human-animal interactions and productivity of commercial dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 2821-2831, 2000.

HOCKENBERY, D. Defining apoptosis. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 16-19, 1995.

HOSODA, K.; KURAMOTO, K.; ERUDEN, B.; NISHIDA, T.; SHIOYA, S. The effects of three herbs as feed supplements on blood metabolites, hormones, antioxidant activity, IgG concentration, and ruminal fermentation in Holstein steers. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v. 19, n. 1, p. 35-41, 2006.

JARDIM, W.R. **Criação de caprinos**. São Paulo: Nobel, 1984. 239 p.

JENNESS, R. Composition and characteristics of goat milk: review 1968-1979. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 1605-1630, 1980.

JORDANA, J.; AMILLS, M.; DIAZ, E.; ANGULO, C.; SERRADILLA, J.M.; SANCHEZ, A. Gene frequencies of caprine α_{S1} -casein polymorphism in Spanish goat breeds. **Small Ruminant Research**, v. 20, p. 215-221, 1996.

KASALI, A. A.; OYEDEJI, A. O.; ASHILOKUN, A. O. Volatile leaf oil constituents of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, p. 377-378, 2001.

KING, R.L. Oxidation of milk fat globule membrane material. Thiobarbituric acid reaction as a measure of oxidized flavor in milk and model systems. **Journal of Dairy Science**, v. 45, n. 10, p. 1165-1171, 1962.

KNIGHT, C.H. Compensatory changes in mammary development and function after hemimastectomy in lactating goats. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 79, p. 343-352, 1987.

KNIGHT, C.H.; PEAKER, M. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, v. 69, p. 331-338, 1984.

KIRK, J.R. Biological availability of nutrients in processed foods. **Journal of Chemical Education**, v. 61, n. 4, p. 364-367, 1984.

KOKATE, C.K.; VARMA, K.C. A note on the antimicrobial activity of volatile oils of *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle and *Cymbopogon citratus* (Stapf.). **Science and Culture**, v. 37, p. 196-198, 1971.

KOMARA, M.; MARNET, P.G. Endocrine responses and milk emission characteristics in high yielding alpine dairy goats under once daily milking management. **Small Ruminant Research**, v. 87, p. 64-69, 2009.

KORYCKA-DAHL, M.; RICHARDSON, T. Initiation of oxidative changes in foods. Symposium: oxidative changes in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 1181-1198, 1980.

KRAMER, J.K.; FELLNER, V.; DUGAN, M.E.; SAUER, F.D.; MOSSOBA, M.M.; YURAWECZ, M.P. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, v.32, n. 11, p.1219-1228, 1997.

KRISTENSEN, D.; SKIBSTED, L.H. Comparison of three methods based on electron spin resonance spectrometry for evaluation of oxidative stability of processed cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3099-3104, 1999.

KRISTENSEN, D.; HEDEGAARD, R.V.; NIELSEN, J.H.; SKIBSTED, L.H. Oxidative stability of buttermilk as influenced by the fatty acid composition of cows' milk manipulated by diet. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 46-50, 2004.

KRUTMANN, J.; GREWE, M. Involvement of cytokines, DNA damage, and reactive oxygen intermediates in ultraviolet radiation-induced modulation of intercellular adhesion molecule-1 expression. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 105 (Suppl. 1), p. 67-70, 1995.

KUBOW, S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 63-81, 1992.

LAMSONL, D.W.; BRIGNALL, M.S. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. **Alternative Medicine Review**, v. 4, n. 5, p. 304-329, 1999.

LANDMANN, R.M.A.; MÜLLER, F.B.; PERINI, CH.; WESP, M.; ERNE, P.; BÜHLER, F.R. Changes of immunoregulatory cells induced by psychological and physical stress: relationship to plasma catecholamines. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 58, p. 127-135, 1984.

LARANJINHA, J.A.N.; ALMEIDA, L.M.; MADEIRA, V.M.C. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxil radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, n. 3, p. 487-494, 1994.

LARANJINHA, J.; VIEIRA, O.; ALMEIDA, L.; MADEIRA, V. Inhibition of metmyoglobin/H₂O₂ dependent low density lipoprotein lipid peroxidation by naturally occurring phenolic acids. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 395-402, 1996.

LE JAQUEN, J.C. Milking and the technology of milk and milk products. In: GALL, C. (Ed.). **Goat production**. London: Academic Press, p. 345-377, 1981.

LI, X.Y.; CHOW, C.K. An improved method for the measurement of malondialdehyde in biological samples. **Lipids**, v. 29, n. 1, p. 73-75, 1994.

LINDMARK-MANSSON, H.; AKESSON, B. Antioxidative factors in milk. **British Journal of Nutrition**, v. 84 (Suppl. 1), p. 103-110, 2000.

LOCK, A.L.; GARNSWORTHY, P.C. Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cow's milk. **Animal Science**, v. 74, p. 163-176, 2002.

LONG, E.; CAPUCO, A.V.; WOOD, D.L.; SONSTEGARD, T.; TOMITA, G.; PAAPE, M.J.; ZHAO, X. *Escherichia coli* induces apoptosis and proliferation of mammary cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 8, p. 808-816, 2001.

LOVEN, D.P. A role for reduced oxygen species in heat induced cell killing and the induction of thermo tolerance. **Medical Hypotheses**, v. 26, p. 39-50, 1988.

MAGAHED, G.A.; ANWAR, M.M.; WASFY, S.I.; HAMMADEH, M.E. Influence of heat stress on the cortisol and oxidant-antioxidants balance during oestrous phase in buffalo-cows (*Buffalo bubalis*): thermo-protective role of antioxidant treatment. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 672-677, 2008.

MAGALHÃES, A.C.M. **Obtenção higiênica e parâmetros de qualidade do leite de cabra**. 2005. Disponível em: <http://www.cpd.ufv.br>. Acesso em: 12 mar. 2011.

MAHANTA, J.J.; CHUTIA, M.; BORDOLOI, M.; PATHAK, M.G.; ADHIKARY, R.K.; SARMA, T.C. *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of *Pleurotus* spp. spawns. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 525-530, 2007.

MAHMOUD, A.L. Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 110-113, 1994.

MALDONADO, J.; GIL, A.; NARBONA, E.; MOLINA, J.A. Special formulas in infant nutrition: a review. **Early Human Development**, v. 53 (Suppl.), p. 23-32, 1998.

MARNET, P.G.; NEGRÃO J.A. The effect of a mixed-management system on the release of oxytocin, prolactin, and cortisol in ewes during sucking and machine milking. **Reproduction Nutrition Development**, v. 40, p. 271-281, 2000.

MATTERI, R.L.; CARROLL, J.A.; DYER, C.J. Neuroendocrine Responses to Stress. In: MOBERG, G.P.; MENCH, J.A. **The biology of animal stress**. Wallingford: CABI Publishing, 2000. Capítulo 3, p. 43-76.

MAYAUD, L.; CARRICAJÓ, A.; ZHIRI, A.; AUBERT, G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 167-173, 2008.

MCDougall, S.; MURDOUGH, P.; PANKEY, W.; DELANEY, C.; BARLOW, J.; SCRUTON, D. Relationships among somatic cell count, california mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. **Small Ruminant Research**, v. 40, n. 3, p. 245-254, 2001.

McLEOD, R.S.; LeBLANC, A.M.; LANGILLE, M.A.; MITCHELL, P.L.; CURRIE, D.L. Conjugated linoleic acids, atherosclerosis, and hepatic very-low-density lipoprotein metabolism. **The American Journal for Clinical Nutrition**, v. 79 (Suppl.), p. 1169-1174, 2004.

MENÉNDEZ, P.; O'NEILL, S.; MAHLER, S.; DELLACASSA, E.; LORENZO, O.; MOYNA, P. Estudio de la actividad antimicrobiana de distintos aceites esenciales. Nota L In: MENÉNDEZ, P.; O'NEILL, S.; MAHLER, S.; DELLACASSA, E. Jornada de Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria, 3, 1993. **Anais...** Santa Maria: AUGM, 1993. 124 p.

MERTENS, D.R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 7, p. 1463-1481, 1997.

MERTENS, D.R. Physical effective NDF and its use in formulating dairy rations. In: Simpósio Internacional em Bovinos de Leite, 2, 2001, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA-FAEPE, p. 25-36, 2001.

MIDDLETON JUNIOR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673-751, 2000.

MORENO, E.A.; CUÉLLAR, C.G.; GONZÁLEZ, A.D. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. **Instituto Nacional de Cancerología**, v. 46, n. 4, p. 275-280, 2000.

MORGAN, F.; MASSOURAS, T.; BARBOSA, M.; ROSEIRO, L.; RAVASCO, F.; KANDARAKIS, I.; BONNIN, V.; FISTAKORIS, M.; ANIFANTAKIS, E.; JAUBERT, G.; RAYNAL-LJUTOVAC, K. Characteristics of goat Milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. **Small Ruminant Research**, v. 47, p. 39-49, 2003.

MOSLEY, E.E.; SHAFFI, B.; MOATE, P.J.; MCGUIRE, M.A. *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 3, p. 570-575, 2006.

MOURÃO, L.R.M.B. **Efeito antioxidante do ácido indol-3-acético sobre o fígado de camundongos submetidos à hepatocarcinogênese induzida**. 2007. 105 p. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

MUINDI, J.R. Retinoids in clinical cancer therapy. **Cancer Treatment and Research**, v. 87, p. 305-342, 1996.

NAGEN, T.J.; ALBUQUERQUE, T.T.O.; MIRANDA, L.C.G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, n. 1, p. 129-138, 1992.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Current concepts of bovine mastitis. 4. ed. Madison: **National Mastitis Council**, 1996. 64 p.

NATZKE, R.P. Elements of mastitis control. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 1431-1442, 1981.

NEGRÃO, J.A.; MARNET, P.G. Cortisol, adrenalin, noradrenalin and oxytocin release and milk yield during the first milkings in primiparous ewes. **Small Ruminant Research**, v. 47, p. 69-75, 2003.

NEGRÃO, J.A.; MARNET, P.G. Milk yield, residual milk, oxytocin and cortisol release during machine milking in Gir, Gir x Holstein and Holstein cows. **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, p. 77-85, 2006.

NEYLAN, T.C. Hans Selye and the field of stress research. **Journal of Neuropsychiatry**, v.10, n. 2, p. 230-231, 1998.

ONAWUNMI, G.O.; YISAK, W-AB.; OGUNLANA, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, p. 279-286, 1984.

ORRENIUS, S.; McCONKEY, D.J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 10, p. 281-285, 1989.

ØSTDAL, H.; ANDERSEN, H.J.; NIELSEN, J.H. Antioxidative activity of urate in bovine milk. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5588-5592, 2000.

PAAPE, M.J.; POUTREL, B.; CONTRERAS, A.; MARCO, J.C.; CAPUCO, A.V. Milk somatic cells and lactation in small ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 84 (Suppl.), p. 237-244, 2001.

PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Prolgráfica, 2006. Capítulo 10, p. 287-310.

PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, A.D.; BARBANO, D.M. Feed and animal factors influencing milk fat composition. ADSA Foundation Symposium: milk fat synthesis and modification. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1753-1771, 1993.

PAPADOPOULOS, G.; BOSKOU, D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 68, n. 9, p. 669-671, 1991.

PARK, Y.W. Proteolysis and lipolysis of goat milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 84 (Suppl.), p. 84-92, 2001.

PARODI, P.W. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. Critical Review. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 1055–1060, 1997.

PASCHOAL, J.J.; ZANETTI, M.A.; CUNHA, J.A. Efeito da suplementação de selênio e vitamina E sobre a incidência de mastite clínica em vacas da raça holandesa. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 3, p. 249-255, 2003.

PATTERSON, H.H. **Protein supplementation to pregnant heifers and grazing management effects on cow diet quality**. ETD collection for University of Nebraska, 2001. Lincoln.

PELLERIN, P. Goat's milk in nutrition. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 59, n.1, p. 51-62, 2001.

PEREIRA, R.S.; SUMITA, T.C.; FURLAN, M.R.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 326-328, 2004.

PINEDA, M.H.; DOOLEY, M.P. **McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction**, 4° ed., p. 175-203, 597 p. Blackwell Publishing, 1999.

PINO, J.A.; ROSADO, A. Chemical composition of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, p. 301-302, 2000.

PORCIONATO, M.A.F.; NEGRÃO, J.A.; PAIVA, F.A.; DELGADO, T.F.G. Respostas produtivas e comportamentais durante a ordenha de vacas Holandesas em início de lactação. **Acta Scientiarum**, v. 31, n. 4, p. 447-451, 2009.

POUTREL, B.; LERONDELLE, C. Cell content of goat Milk: California mastitis test, coulter counter, and fossomatic for predicting half infection. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 2575-2579, 1983.

PRATA, L.F.; RIBEIRO, A.C.; REZENDE, K.T. CARVALHO, M.R.B.; RIBEIRO, S.D.A.; COSTA, R.G. Composição, perfil nitrogenado e características do leite caprino (Saanen). Região Sudeste, Brasil. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 1-12, 1998.

PUATANACHOKCHAI, R.; KISHIDA, H.; DENDA, A.; MURATA, N.; KONISHI, Y.; VINITKETKUMNUEN, U.; NAKAE, D. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fisher 344 rats. **Cancer Letters**, v. 183, p. 9-15, 2002.

QUEIROGA, R.C.R.E.; COSTA, R.G. Qualidade do leite caprino. In: Simpósio Internacional de Conservação de Recursos Genéticos. Raças nativas para o Semi-Árido, 1, 2004, Recife. **Anais...** Recife, 2004, p. 161-171.

RAHARJO, S.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Improved speed, specificity, and limit of determination of an aqueous acid extraction thiobarbituric acid-C₁₈ method for measuring lipid peroxidation in beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2182-2185, 1992.

RAJAPAKSE, R.; VAN EMDEN, H.F. Potential of four vegetable oils and ten botanical powders for reducing infestation of cowpeas by *Callosobruchus maculatus*, *C. chinensis* and *C. rhodesianus*. **Journal of Stored Products Research**, v. 33, n. 1, p. 59-68, 1997.

RAMOS, M.; JUAREZ, M. Current research on goats' milk in Spain. **Lait**, v. 73, p. 417-424, 1993.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCARD, P.; GUILLET, I.; CHILLIARD, Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. **Small Ruminant Research**, v. 79, p. 57-72, 2008.

REED, J.C. Mechanisms of apoptosis. Warner-Lambert/Parke-Davis award lecture. **American Journal of Pathology**, v. 157, n. 5, p. 1415-1430, 2000.

RIBEIRO, S.D.A. **Caprinocultura**: criação racional de caprinos. São Paulo: Nobel, 1997. 311 p.

RIBEIRO, E.L.A.; RIBEIRO, H.J.S.S. Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. Revisão. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 229-235, 2001.

RIBEIRO, L.R.; DAMASCENO, J.C.; CECATO, U.; JOBIM, C.C.; SANTOS, G.T.; MACEDO, F.A.F.; MACEDO, L.G.P. Produção, composição do leite e constituintes sangüíneos de cabras alimentadas com diferentes volumosos. **Arquivo Brasileiro de medicina, Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1523-1530, 2008.

RODRIGUES, M.T. Alimentação de cabras leiteiras. In: Encontro Nacional para o Desenvolvimento da espécie caprina, 8, 2004, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2004, p. 121-154.

ROSMINI, M.R.; PERLO, F.; PÉREZ-ALVAREZ, J.A.; PAGÁN-MORENO, M.J.; GAGO-GAGO, A.; LÓPEZ-SANTOVEÑA, F.; ARANDA-CATALÁ, V. TBA test by an extractive method applied to 'paté'. **Meat Science**, v. 42, n. 1, p. 103-110, 1996.

RUSHEN, J.; DePASSILLÉ, A.M.B.; MUNKSGAARD, L. Fear of people by cows and effects on milk yield, behavior, and heart rate at milking. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 720-727, 1999.

RUSHEN, J.; MUNKSGAARD, L.; MARNET, P.G.; DePASSILLÉ, A.M. Human contact and the effects of acute stress on cows at milking. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 73, p. 1-14, 2001.

SAMARASEKERA, R.; KALHARI, K.S. Insecticidal activity of essential oils of *Ceylon cinnamomum*, and *Cymbopogon* species against *Musca domestica*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 352-354, 2006.

SANTINI, F.J.; LU, C.D.; POTCHOIBA, M.J.; FERNANDEZ, J.M.; COLEMAN, S.W. Dietary fiber and milk yield, mastication, digestion, and the rate of passage in goats fed alfalfa hay. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 1, p. 209-219, 1992.

SANTOS, M.V. Aspectos não microbiológicos afetando a qualidade do leite. In: DURR, J.W.; CARVALHO, M.P.; SANTOS, M.V. (org.). **O compromisso com a qualidade do leite no Brasil**. Passo Fundo, 2004, p. 269-283.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Manole, 2006. 314 p.

SAS INSTITUTE. **SAS systems for windows**: version 9. Cary, 2002.

SCHALM, O.W.; CARROL, E.J.; JAIN, N.C. **Bovine mastitis**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. 360 p.

SCHUCK, V.J.A.; FRATINI, M.; RAUBER, C.S.; HENRIQUES, A.; SCHAPOVAL, E.E.S. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 1, p. 45-49, 2001.

SEVANIAN, A.; HOCHSTEIN, P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. **Annual Reviews of Nutrition**, v. 5, p. 365-390, 1985.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAMAY, A.; MABJEESH, S.J.; SHAPIRO, F.; SILANIKOVE, N. Adrenocorticotrophic hormone and dexamethasone failed to affect milk yield in dairy goats: comparative aspects. **Small Ruminant Research**, v. 38, p. 255-259, 2000.

SHANTA, N.C.; DECKER, E.A. Conjugated linoleic acid concentrations in processed cheese containing hydrogen donors, iron and dairy-based additives. **Food Chemistry**, v. 47, p. 257-261, 1993.

SHEFFIELD, L.G. Mastitis increases growth factor Messenger ribonucleic acid in bovine mammary glands. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2020-2024, 1997.

SHINGFIELD, K.J.; CHILLIARD, Y.; TOIVONEN, V.; KAIRENIUS, P.; GIVENS, D.I. Trans fatty acids and bioactive lipids in milk. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 606, p. 3-65, 2008.

SIDIBÉ, L.; CHALCHAT, J.C.; GARRY, R.P.; LACOMBE, L.; HARAMA, M. Aromatic plants of Mali (IV): Chemical composition of essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf and *Cymbopogon giganteus* (Hochst.) Chiov. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, p. 110-112, 2001.

SILANIKOVE, N. The physiological basis of adaptation of goats in harsh environments. **Small Ruminant Research**, v. 35, p. 181-193, 2000.

SILVA, P.A.; BLANK, A.F.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BARRETTO, M.C.V. Efeitos da adubação orgânica e mineral na produção de biomassa e óleo essencial do capim-limão [*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf]. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n.1, p. 5-9, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. **Plantas da medicina popular do Rio Grande no Sul**. Porto Alegre: Editora da Universidade, 1986. 171 p.

SLÁDEK, Z.; RYSÁNEK, D. Apoptosis of polymorphonuclear leukocytes of the juvenile bovine mammary gland during induced influx. **Veterinary Research**, v. 31, p. 553-563, 2000.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3562-3577, 1992.

SORENSEN, M.T.; NØRGAARD, J.V.; THEIL, P.K.; VESTERGAARD, M.; SERJENSEN, K. Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and the dry period in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 4632-4639, 2006.

STAPELFELDT, H.; NIELSEN, B.R.; SKIBSTED, L.H. Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 331-339, 1997.

STEFANON, B.; COLITTI, M.; GIANFRANCO, G.; KNIGHT, C.H.; WILDE, C.J. Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. **Journal of Dairy Research**, v. 69, p. 37-52, 2002.

STEWART, H.J.; THOMPSON, G.E. Adrenocorticotrophic hormone stimulation of mammary secretion in lactating goats independent of increased mammary uptake of glucose. **Journal of Endocrinology**, v. 101, p. 203-211, 1984.

STRANGE, R., FENG, L., SAURER, S., BURKHARDT, A., FRIIS, R. Apoptotic cell death and tissue remodelling during mouse mammary gland involution. **Development**, v. 115, p. 49-58, 1992.

SUAHEYUN, R.; KINOUCI, T.; ARIMOCCHI, H.; VINITKETKUMNUEN, U.; OHNISHI, Y. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 5, p. 949-955, 1997.

SUNG, Y.Y.; WU, T.I.; WANG, P.H. Evaluation of milk quality of Alpine, Nubian, Saanen and Toggenburg breeds in Taiwan. **Small Ruminant Research**, v. 33, p. 17-23, 1999.

SWAISGOOD, H.E. Characteristics of milk. In: FENNEMA, O.R.; DEKKER, M. (Ed.) **Food Chemistry**, p. 841-876, 1996.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O (Ed.). **Dukes - Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1996. 856p.

TIAN, S.Z.; CHANG, C.J.; CHIANG, C.C.; PEH, H.C.; HUANG, M.C.; LEE, J.W.; ZHAO, X. Comparison of morphology, viability, and function between blood and milk neutrophils from peak lactating goats. **The Canadian Journal of Veterinarian Research**, v. 69, n. 1, p. 39-45, 2005.

TIMMONS, J.S.; WEISS, W.P.; PALMQUIST, D.L.; HARPER, W.J. Relationships among dietary roasted soybeans, milk components, and spontaneous oxidized flavor of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2440-2449, 2001.

TOERIEN, C.A.; PUCHALA, R.; MCCANN, J.P.; SAHLU, T.; GOETSCH, A.L. Adrenocortical response to ACTH in Angora and Spanish goat wethers. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1558-1564, 1999.

VAN AARDT, M.; DUNCAN, S.E.; MARCY, J.E.; LONG, T.E.; O'KEEFE, S.F.; NIELSEN-SIMS, S.R. Effect of antioxidant (α -tocopherol and ascorbic acid) fortification on light-induced flavor of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 872-880, 2005.

VAN REENEN, C.G.; VAN DER WERF, J.T.N.; BRUCKMAIER, R.M.; HOPSTER, H.; ENGEL, B.; NOORDHUIZEN, J.P.T.M.; BLOKHUIS, H.J. Individual differences in behavioral and physiological responsiveness of primiparous dairy cows to machine milking. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2551-2561, 2002.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

VAN SOEST, P.J.; McCAMMON-FELDMAN, B.; CANNAS, A. The feeding and nutrition of small ruminants: application of the Cornell discount system to feeding of dairy goats and sheep. In: Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, 1998, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, 1998, p. 95-104.

VARNER, N.A.; JOHNSON, B.H. Influence of adrenocorticotrophin upon milk production, milk constituents, and endocrine measures of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 458-465, 1983.

VASCONCELOS, C.G.C. **Estudo da variação do teor de cloretos e do número de células somáticas no leite bovino oriundo de quartos sadios, durante os diferentes meses do período de lactação, estações do ano e ordenha da manhã e da tarde.** 1996. 97 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

VÁZQUEZ-AÑÓN, M.; NOCEK, J.; BOWMAN, G.; HAMPTON, T.; ATWELL, C.; VÁZQUEZ, P.; JENKINS, T. Effects of feeding a dietary antioxidant in diets with oxidized fat on lactation performance and antioxidant status of the cow. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 8, p. 3165-3172, 2008.

VINSON, J.A.; DABBAGH, Y.A.; SERRY, M.M.; JANG, J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2800-2802, 1995.

VIOLLON, C.; CHAUMONT, J. P. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 128, p. 151–153, 1994.

VON BORELL, E.H. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. **Journal of Animal Science**, v. 79 (Suppl.), p. 260-267, 2001.

VON GADOW, A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocoferol, BHT and BHA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 632-638, 1997.

VON SHACKY, C. n-3 fatty acids and the prevention of coronary atherosclerosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 224-227, 2000.

WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A.; PAKDEE, P.; WANAPAT, S. Manipulation of rumen ecology by dietary lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) powder supplementation. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 3497-3503, 2008.

WANG, F.S.; JIANG, Y.N.; LIN, C.W. Lipid and cholesterol oxidation in Chinese-style sausage using vacuum and modified atmosphere packaging. **Meat Science**, v. 40, n. 1, p. 93-101, 1995.

WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SOONTORNTANASART, T. Antifungal activity of lemon grass oil and lemon grass oil cream. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 7, p. 551-554, 1996.

WANNISSORN, B.; JARIKASEM, S.; SIRIWANGCHAI, T.; THUBTHIMTHED, S. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 76, p. 233-236, 2005.

WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 155-187, 1999.

WESSON, C.A.; DERINGER, J.; LIOU, L.E.; BAYLES, K.W.; BOHACH, G.A.; TRUMBLE, W.R. Apoptosis induced by *Staphylococcus aureus* in epithelial cells utilizes a mechanism involving caspases 8 and 3. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2998-3001, 2000.

WILDE, C.J.; ADDEY, C.V.P.; PETER, L.; FENIG, D.G. Programmed cell death in bovine mammary tissue during lactation and involution. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 943-953, 1997.

WILGUS, T.A.; PARRETT, M.L.; ROSS, M.S.; TOBER, K.L.; ROBERTSON, F.M., OBERYSZYN, T.M. Inhibition of ultraviolet light B-induced cutaneous inflammation by a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 507, p. 85-92, 2002.

YAGI, Y.; SHIONO, H.; CHIKAYAMA, Y.; OHNUMA, A.; NAKAMURA, I.; YAYOU, K.I. Transport stress increases somatic cell counts in milk, and enhances the migration capacity of peripheral blood neutrophils of dairy cows. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 4, p.381-387, 2004.

ZAMBOM, M.A.; ALCADE, C.R.; MARTINS, E.N.; SANTOS, G.T.; MACEDO, F.A.F.; HORST, J.A.; VEIGA, D.R. Curva de lactação e qualidade do leite de cabras Saanen recebendo rações com diferentes relações volumoso:concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2515-2521, 2005.

ZENG, S.S.; ESCOBAR, E.N.; POPHAM, T. Daily variations in somatic cell count, composition, and production of Alpine goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 26, p. 251-258, 1997.

ZENG, S.S.; ESCOBAR, E.N.; HART, S.P.; HINCKLEY, L.; BAULTHAUS, M.; ROBINSON, G.T.; JAHNKE, G. Comparative study of the effects of testing laboratory, counting method, storage and shipment on somatic cell counts in goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 31, n. 2, p. 103-107, 1999.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.