



unopar

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE LEITE E DERIVADOS**

VITÓRIA MARIA MONTENEGRO HOLZMANN

**CONCENTRAÇÃO DE MELATONINA EM LEITE DE VACAS
SUPLEMENTADAS COM VITAMINAS EM DOIS PERÍODOS
DE ORDENHA**

Londrina

2018

VITÓRIA MARIA MONTENEGRO HOLZMANN

**CONCENTRAÇÃO DE MELATONINA EM LEITE DE VACAS
SUPLEMENTADAS COM VITAMINAS EM DOIS PERÍODOS
DE ORDENHA**

Dissertação apresentada à UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados.

Orientador: Prof. Dr. Agostinho Ludovico

Londrina

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de catalogação na publicação (CIP)

**Universidade Pitágoras Unopar
Biblioteca CCBS/CCECA PIZA
Setor de Tratamento da Informação**

Holzmann, Vitória Maria Montenegro

H762c Concentração de melatonina em leite de vacas suplementadas com vitaminas em dois períodos de ordenha. / Vitória Maria Montenegro Holzmann. Londrina: [s.n], 2018.

46 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados).
Universidade Pitágoras Unopar.

Orientador: Prof. Dr. Agostinho Ludovico.

1. Leite de vaca - Dissertação - UNOPAR. 2. Melatonina. 3. Horários de ordenha. 4. Ingestão de vitaminas. 5. Método de ELISA. I. Ludovico, Agostinho; orient. II. Universidade Pitágoras Unopar.

CDD 637

VITÓRIA MARIA MONTENEGRO HOLZMANN

CONCENTRAÇÃO DE MELATONINA EM LEITE DE VACAS SUPLEMENTADAS COM VITAMINAS EM DOIS PERÍODOS DE ORDENHA

Dissertação apresentada à UNOPAR, no Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados, área e concentração em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre conferido pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Agostinho Ludovico
Universidade Pitágoras Unopar

Profa. Dra. Joice Sifuentes dos Santos
Universidade Pitágoras Unopar

Prof. Dr. José Antonio Fregonesi
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 05 de março de 2018.

Dedico este trabalho aos meus alunos que me levaram a querer enfrentar essa luta, pois ser professor é não ter medo dos desafios mas respeitar e acreditar que somos capazes.

AGRADECIMENTOS

A EMATER, que durante 36 anos me ensinou o que hoje sei;

Aos meus colegas extensionistas, que não mediram esforços para me incentivarem a fazer esse mestrado;

Aos meus filhos e neto minhas desculpas por ter roubado horas de seu convívio;

A minha mãe, que com sua maturidade me ensinou a nunca desistir e esteve sempre ao meu lado em todos os momentos;

A minha família e amigos que, com sua confiança me trouxeram até aqui;

A Faculdade, que com sua seriedade trouxe a certeza de que vale a pena qualquer sacrifício desde que possamos formar cada vez melhores profissionais;

Ao Professor e Orientador Dr. Agostinho Ludovico, pelo seu empenho e entusiasmo com a pesquisa, norteando todo o trabalho;

Aos professores do Mestrado, por toda a dedicação e empenho profissional nestes dois anos de convívio;

Aos colegas Rafael Venâncio e Milena Trentin, por me ajudarem a realizar as análises e fazerem ficar mais fácil;

Aos proprietários e funcionários da Fazenda Fini, por me ajudarem nas coletas e abrirem a propriedade para a pesquisa;

Aos colegas da turma 11 do Mestrado, por estarem sempre juntos nos momentos difíceis e também nas comemorações;

As amigas mais próximas Sílvia Subtil e Gisele Barone, por terem tido a coragem de juntas comigo enfrentarem, depois de anos, o desafio da academia;

As colegas de profissão Marcelle e Juliana Mareze, por me ajudarem e muito.

HOLZMANN, V. M. M. **Concentração de melatonina em leite de vacas suplementadas com vitaminas e dois horários de ordenha.** 2018. 47. f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) - Unidade Piza, Universidade Pitágoras Unopar, Londrina, 2018.

RESUMO

O leite de vaca fornece uma enorme variedade de nutrientes em relação ao seu conteúdo energético e devido a sua composição se destaca como alimento nutritivo. A melatonina é um neuro-hormônio sintetizado pela glândula pineal, possuindo influência direta na regulação circadiana e no sono, e recentemente, pesquisas tem demonstrado que pode-se produzir leite com alta concentração desse hormônio, visando principalmente amenizar a insônia que acomete 45% da população mundial. A concentração de melatonina no leite pode ser regulada pela presença ou ausência de luz, alteração nos horários de ordenha, e disponibilidade metabólica de triptofano juntamente com o balanceamento de aminoácidos e vitaminas na dieta. Portanto, o objetivo deste estudo foi mensurar os teores de melatonina no leite em dois momentos de ordenha e a influência da adição de vitaminas como suplementação da dieta. Coletou-se amostras de 23 vacas em lactação de uma propriedade comercial de leite no município de Castro-PR. Foram realizadas coletas individuais e diretamente do tanque isotérmico de expansão no período diurno e noturno durante 2 dias. Os animais receberam a dieta em dois fornecimentos diários, e as amostras foram avaliadas antes e depois da suplementação. A determinação de gordura e proteína foi realizada por leitura de absorção infravermelha e a contagem de células somáticas por densitometria de fluxo em contador eletrônico. A concentração de melatonina foi determinada pelo método de ELISA. Utilizou-se a estatística não paramétrica, onde os dados foram analisados pelo teste de Wilcoxon, com nível de significância de 5%. Os teores de gordura e proteína no leite de vacas individuais e tanque de expansão, antes e após a suplementação, se apresentaram dentro dos limites preconizados pela legislação brasileira, Instrução Normativa 62 de 29 de dezembro de 2011. Os níveis de ureia encontrados entre 10 e 16 mg/dL, indicaram adequada nutrição proteica. A contagem de células somáticas não diferiu com a suplementação de vitaminas e os valores encontrados estão de acordo com as exigências na legislação brasileira. Por aproximadamente 8 horas sob a iluminância de até 0,1 lux, não houve inibição da síntese de melatonina. A concentração de melatonina diminuiu aproximadamente 19% após a adição de vitaminas na dieta. Confirmou-se que a presença de luz exerce papel fundamental na síntese de melatonina, pois a ordenha noturna aumentou significativamente sua síntese. Em relação a suplementação com vitaminas houve um decréscimo em sua síntese abrindo-se oportunidades de pesquisa em relação a sua suplementação em outros períodos de lactação.

Palavras-chave: Melatonina. Horários de ordenha. Ingestão de vitaminas. ELISA.

HOLZMANN, V. M. M. **Concentração de melatonina em leite de vacas suplementadas com vitaminas e dois horários de ordenha.** 2018. 47. f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) - Unidade Piza, Universidade Pitágoras Unopar, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Cow's milk provides a huge variety of nutrients in relation to its energy content and due to its composition stands out as nutritious food. Melatonin is a neurohormone synthesized by the pineal gland, which has a direct influence on circadian regulation and sleep, and recently research has shown that milk can be produced with a high concentration of this hormone, aiming mainly to soften the insomnia that affects 45% of the world population. There are foods that have melatonin in their composition, like some vegetables, and milk, of animal origin, is also a natural source of this hormone. The concentration of melatonin in milk can be regulated by the presence or absence of light, alteration in milking schedules, and availability of tryptophan along with balance of amino acids and vitamins in the diet. Therefore, the objective of this study was to measure the levels of melatonin in milk under different milking conditions and the influence of the addition of vitamins as dietary supplementation. Samples of 23 lactating cows from a commercial dairy farm in the municipality of Castro-PR were collected. Individual collections were carried out directly from the isothermal expansion tank at day and night for 2 days. The animals received the diet in two daily supplies, and the samples were evaluated before and after supplementation. The determination of fat and protein was performed by reading of infrared absorption and somatic cell count by flow densitometry in electronic counter. Melatonin concentration was determined by the ELISA method. The nonparametric statistic was used, where the data were analyzed by the Wilcoxon test, with a significance level of 5%. The levels of milk fat and protein of individual cows and expansion tank, before and after the supplementation, were within the limits recommended by Brazilian legislation, Normative Instruction 62 of December 29, 2011. The levels of urea found between 10 and 16 mg / dL, indicated adequate protein nutrition. The somatic cell count did not differ with vitamin supplementation and the values found are in accordance with the requirements in Brazilian legislation. For approximately 8 hours under illuminance up to 0.1 lux, there was no inhibition of melatonin synthesis. The melatonin concentration decreased approximately 19% after the addition of vitamins in the diet. It was confirmed that the presence of light plays a fundamental role in the synthesis of melatonin, since the nocturnal milking significantly increased its synthesis. In relation to vitamin supplementation there was a decrease in its synthesis, opening up research opportunities in relation to its supplementation in other lactation periods.

Keywords: Melatonin. Milking schedules. Vitamin intake. ELISA.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	08
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	10
2.1	Produção de Leite no Brasil	10
2.2	Melatonina	11
2.2.1	Benefícios da Melatonina para a Saúde Humana	13
2.2.2	Fatores que Alteram a Produção de Melatonina	14
2.2.3	Influência do Horário de Ordenha na Concentração de Melatonina do Leite...16	
2.2.4	Suplementação de Vitaminas e Minerais na Dieta das Vacas em Lactação...16	
3	OBJETIVOS	18
3.1	Objetivo Geral	18
3.2	Objetivos Específicos	18
	REFERÊNCIAS	19
4	ARTIGO	25
5	CONCLUSÃO GERAL	46

1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento completo com mais de 20 fontes de nutrientes essenciais, sendo que as recomendações dietéticas indicam consumo de duas a três porções diárias de derivados lácteos na dieta humana. Além disso, fornece uma enorme variedade de nutrientes em relação ao seu conteúdo nutricional. Desta forma, o leite atende proporcionalmente mais as exigências nutricionais de cálcio e proteína do que de energia, o que favorece as dietas para manutenção do peso corpóreo.

Em termos gerais, pode-se observar que o leite é uma fonte alimentar de proteína de alto valor biológico, vitaminas e minerais. O consumo de dois copos de 200 mL de leite fornece uma fração significativa de nutrientes como: cálcio, magnésio, fósforo e das vitaminas A, B2, B12 e D (MORCUENDE et al, 2013; WIJESINHA-BETTONI; BURLINGAME, 2013).

Atualmente, vários alimentos são considerados como funcionais, por exemplo: aveia, soja, óleo de girassol, tomate, alho, brócolis, frutas cítricas, chá, uva, peixe (fonte de ácidos graxos Omega-3), carne, leite, entre outros. Pode-se destacar o leite como um desses exemplos, além de estar presente na alimentação diária, é considerado um alimento funcional devido aos seus componentes bioativos (COSTA et al., 2013). Dentre os compostos bioativos tem-se a presença do chamado ácido linoléico conjugado (CLA), e no caso de outros derivados lácteos, a presença de probióticos, que possuem efeitos favoráveis sobre a saúde do consumidor (BHAT; BHAT, 2011)

A partir da importância do leite na alimentação diária, pesquisas tem demonstrado que pode-se produzir leite com alta concentração de melatonina. O aumento da concentração de melatonina no leite pode contribuir para a melhoria do sono. Segundo a Associação Mundial de Medicina do sono, a insônia é considerada uma epidemia global que ameaça a saúde e a qualidade de vida de até 45% da população mundial (ALVES et al., 1998; BASTA et al., 2007; BITTENCOURT, 2016).

A melatonina é um neuro-hormônio produzido pela glândula pineal e atua na regulação circadiana e no sono. Em presença de luz, uma mensagem neuro-endócrina é transmitida bloqueando a sua formação, portanto, a secreção dessa substância é quase exclusivamente determinada por estruturas fotossensíveis, principalmente à noite (BALLONE; MOURA, 2005; MILAGRES, 2012). Pode ser produzida a partir do triptofano, normalmente ingerido numa alimentação equilibrada,

presente em fontes como leite e laticínios, nozes, castanhas, batatas, banana e abacate (TOSINI; FUKUHARA, 2003). O triptofano passa pelo processo de metabolização e se transforma em serotonina; e essa em melatonina. Neste caso, a concentração de serotonina permanece aumentada na glândula pineal durante o dia, enquanto há luz, inversamente ao que ocorre com a melatonina que aumenta com a ausência de luz (BALLONE; MOURA, 2005).

Na Finlândia foi lançado o primeiro estudo baseado em um sistema de ordenha padronizado à noite (Yo'maito, Ingman Foods Ltda) (SAXELIN; KORPELA; MÄYRÄ-MÄKINEN, 2003). Em 2002, no Reino Unido foi lançado o leite orgânico Slumbering Bedtime Milk (Red Kite Farm, UK) o qual teria níveis maiores de melatonina do que o leite comum (SAXELIN; KORPELA; MÄYRÄ-MÄKINEN, 2003). Segundo informações do Milk Point (2002), a cooperativa de lácteos Maitoma, da Finlândia, produziu o chamado Night Milk, que teria de 2 a 5 vezes mais melatonina do que o leite normal.

Um leite de vaca especial, rico em melatonina por ser coletado nas primeiras horas da manhã, apresenta destaque na medicina humana, com relação aos distúrbios do sono como a insônia ou estresse (TAGUCHI, 2012). Além da Finlândia, outros países como, Reino Unido, Alemanha e Estados Unidos, leite com maiores teores de melatonina são comercializados de forma diferenciada, possibilitando agregar valor à produção de leite. (SAXELIN; KORPELA; MÄYRÄ-MÄKINEN, 2003; SPADOTI et al., 2012; TAGUCHI, 2012).

Este estudo teve como objetivo avaliar os teores de melatonina no leite de vacas em dois horários de ordenha, dia e noite (luz-escuro), com dieta sem suplementação e outra enriquecida com vitaminas, além de avaliar sua composição química, em relação aos teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e contagem de células somáticas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Produção de Leite no Brasil

O Brasil tem se destacado no mundo como um grande produtor de lácteos, em 2017 estimou-se, pela CNA - Confederação e Pecuária do Brasil, a produção de 34,9 bilhões de litros de leite, situando o país em quarto lugar no ranking mundial de países produtores (ZOCCAL, 2017). Apesar de ser um grande produtor de lácteos, ainda importamos para abastecer o mercado interno, sendo que de janeiro a julho de 2016 foram importadas 130,2 mil toneladas de produtos, correspondendo-a de 1,1 bilhão de litros de leite. No Brasil, a estimativa é de que um terço da produção nacional seja consumida na forma fluída, 11,6 bilhões de litros, ou seja, 57 litros/*per capita*/ano ou 4,8 litros/mês. Dados de 2016 colocam que no Brasil, o volume disponível é de 170 litros/habitante/ano (IBGE, 2016).

O leite no país é produzido em pequenas propriedades, estando em torno de 1,3 milhões de litros no território nacional. A cadeia de leite está presente em 99% dos municípios brasileiros com um rebanho de 23 milhões de vacas ordenhadas. Estão envolvidos direta e indiretamente cerca de 4 milhões de trabalhadores. Essa força de trabalho tem movimentado a economia das pequenas cidades na distribuição de renda e geração de emprego, principalmente no meio rural. Esses números se tornarão ainda mais relevantes nos próximos 10 anos (IBGE, 2016).

O Sul do país destaca-se por deter os estados com maior produção de leite: Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul. O Paraná com uma produção de 4,660 bilhões de litros em 2015, passou a ser o segundo maior estado produtor de leite no País, superando o volume produzido no Rio Grande do Sul, que foi de 4,599 bilhões. Minas Gerais continua como maior produtor, com 9,145 bilhões de litros (IBGE, 2016). No Paraná, a produção de leite ocorreu em 399 municípios, em 2016. A primeira posição do ranking nacional está em Castro/PR, que alcançou 255 milhões de litros.

Observa-se no país, o aumento no consumo de produtos lácteos e outros produtos pecuários, tendo estes trazido enormes benefícios nutricionais para a população em desenvolvimento. A partir disso, destaca-se o leite e seus derivados, por possuírem todos os nutrientes necessários em uma dieta saudável, principalmente o cálcio, potássio e vitamina D, que estão relacionados à saúde.

2.2 Melatonina

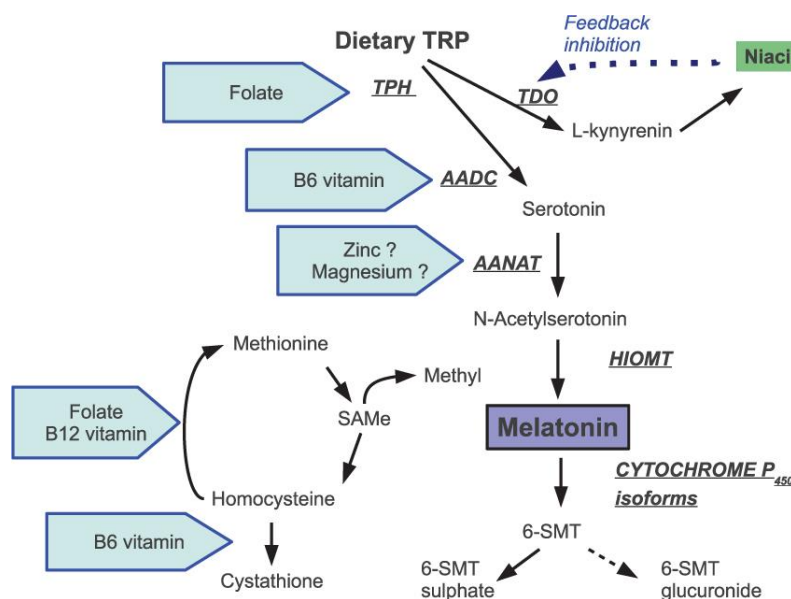
A melatonina é um neuro-hormônio produzido principalmente pela glândula pineal de vertebrados a partir do aminoácido essencial triptofano e tem função na regulação circadiana e do sono, principalmente (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; TAMURA et al., 2009). Nos seres humanos, os ritmos biológicos com período de recorrência de aproximadamente 24 horas são designados de ritmos circadianos, controlados por um sistema endógeno de manutenção do tempo (MAURY; RAMSEY; BASS, 2010). Além disso, existem trabalhos que demonstram sua ação como antioxidante, antitumoral e com potencial benefício na osteoporose (CASADO-ZAPICO et al., 2011).

O oscilador mestre, que responde aos sinais interiores e exteriores, está localizado no núcleo supraquiasmático (SCN) do hipotálamo anterior no cérebro. O marcapasso natural é o ciclo ambiental claro-escuro. Os neurônios SCN transmitem esta informação rítmica luz-escuro para outras regiões cerebrais e órgãos periféricos que controlam muitos aspectos da fisiologia e do comportamento, incluindo ciclos de sono-vigília, atividade cardiovascular, sistema endócrino, comportamento dietético e metabolismo energético (CHALLET; MENDOZA, 2010).

A taxa de síntese de melatonina depende da atividade das enzimas - arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT) e, em menor grau, da triptofano-hidroxilase (TPH). A enzima AANAT está representada principalmente na glândula pineal, onde sua atividade é controlada pelo SCN. A atividade da TPH pineal flutua em um ritmo circadiano impulsionado pelo relógio biológico, que atinge seus níveis mais altos durante a noite (PEUHKURI; SIHVOLA; KORPELA, 2012).

Na Figura 1, é demonstrada esquematicamente a bioquímica de síntese de melatonina, que pode ser influenciada pela disponibilidade metabólica de triptofano e balanço deste com outros aminoácidos, além de vitaminas e minerais.

Figura 1: Vias metabólicas da síntese de melatonina e possíveis sítios de influência de alguns nutrientes sobre a mesma, em mamíferos.



Fonte: Peuhkuri et al. (2012).

Nota: Enzimas estão com letras maiúsculas, sublinhadas e em itálico: TRP (triptofano); TPH (triptofano hidroxilase); TDO (triptofano dioxigenase); AADC (aminoácido aromático descarboxilase); AANAT (arilalquilamona-N-acetiltransferase) HIOMT (hidroxiindol-O-metiltransferase); 6-SMT (6-sulfatoximelatonina); S-AMe (S-adenosilmetionina).

Para garantir a síntese bioquímica da melatonina, adiciona-se, na dieta, niacina e demais vitaminas do complexo B além de minerais para inibir o “desvio” do uso de triptofano para essa síntese (ARCHER et al., 2015). A síntese de melatonina é controlada tanto por um relógio circadiano endógeno quanto pela luz ambiental. Os níveis de melatonina começam a aumentar no final da noite, atingindo o máximo entre as 2:00 e 4:00 horas da manhã, seguido por um declínio lento para níveis inferiores durante o dia.

Os níveis diurnos de melatonina são pouco detectáveis. Além da luz solar, a iluminação interior artificial pode ser suficientemente brilhante para evitar a liberação noturna de melatonina (ARCHER et al., 2015). No leite, a proteína alfa-lactoalbumina do soro, contém maior concentração de triptofano, sendo, assim, desejável leite com maior concentração desta proteína para propiciar maior síntese de melatonina em consumidores humanos (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

A produção de melatonina em adultos jovens durante o dia é menor que 10 pg/mL (ZHDANOVA et al., 1998; WASSMERA; WHITEHOUSE, 2006). Nos adultos, a melatonina apresenta o pico de secreção de 100,9 pg/mL no sangue entre

4:00 e 5:00 horas da manhã. Já os adultos acima de 50 anos apresentaram o pico de produção de 34,5 pg/ml no horário entre 2:00 e 3:00 horas da manhã (ZHDANOVA et al., 1998).

2.2.1 Benefícios da Melatonina para a Saúde Humana

Por ser indutora de sono, a melatonina tem sido utilizada por pessoas que têm transtornos do sono como insônia, transtornos decorrentes de mudanças de fusos horários e trabalhadores com jornadas noturnas (ALVES et al., 1998).

A melatonina também apresenta ação antioxidante, pois atua como doadora de elétrons em processos não enzimáticos, além de inibir enzimas da família citocromo P450 (BERRA; RIZZO, 2009; MAGANHIN et al., 2008), havendo evidências de que a melatonina atua como modulador de respostas inflamatórias e imunológicas (MAGANHIN et al., 2008). Níveis de melatonina também podem influenciar os processos biológicos e neoplásicos do sistema reprodutor feminino (MAGANHIN et al., 2008).

A diminuição da produção da melatonina durante o envelhecimento e a redução da proteção antioxidante, pode estar relacionada com alterações na fisiologia celular dos órgãos reprodutivos (MAURIZ et al., 2013). Desse modo, a administração diária de melatonina para mulheres na menopausa, pode ajudar a prolongar a saúde reprodutiva relacionada a regulação hormonal feita pela melatonina.

O consumo de alimentos que contém melatonina pode trazer diversos benefícios à saúde humana (RODRIGUEZ et al., 2013). A presença de melatonina nas plantas é universal, embora com concentrações amplamente variadas de picogramas para microgramas por grama de tecido vegetal, conforme apresentado na Tabela 1 (PEUHKURI; SIHVOLA; KORPELA, 2012).

Tabela 1 (adaptada): Concentração de melatonina nos alimentos

Alimento	Melatonina
Tomate	3.000-114.000 pg/g
Nozes	3.000-4.000 pg/g
Cereais (arroz, cevada)	300-1.000 pg/g
Morango	1.000-11.000 pg/g
Azeite	53-119 pg/mL
Vinho	50-230 pg/mL
Cerveja	52-170 pg/mL
Leite de vaca	3-25 pg /mL
Leite noturno	10.000-40.000 pg/mL

Fonte: Peukhkuri et al. (2012).

Os valores de melatonina em leite produzido sob condições normais, podem variar de 10 a 60 pg/mL (VALTONNEN; KANGAS; VOUTILAINEN, 2001). O leite de vacas expostas a luz durante um tempo reduzido, a concentração de melatonina aumenta consideravelmente, conforme é demonstrado na Tabela 1.

Devido aos benefícios da ingestão de produtos lácteos e o seu consumo habitual pela população brasileira, o leite pode ser considerado o alimento de contribuição mais relevante para a ingestão de melatonina (GARCIA-PARRILLA; CANTOS; TRONCOSO, 2009). Valtonen e seus colaboradores (2005) confirmam os benefícios da ingestão de leite rico em melatonina, o qual foi ordenhado no período noturno.

2.2.2 Fatores que Alteram a Produção de Melatonina

Segundo Haraguchi, Abreu e Paula (2006), além da alimentação, o estresse e a temperatura também podem alterar a síntese de melatonina. Normalmente, o teor de melatonina no leite de vaca é de 5 pg/mL. Para Valtonen, Kangas e Voutilainen (2001) teores de até 56,4 pg/mL com alterações nos fotoperíodos em que as vacas ordenhadas foram submetidas. Milagres et al. (2014) encontraram teores de 4,03 pg/mL em ordenhas às 15:00 horas e 39,43 pg/mL nas ordenhas às 02:00 horas da manhã. O consumo deste leite resultou em níveis significativamente maiores de melatonina no sangue.

Os níveis circulantes de melatonina podem ser alterados por vários fatores, sendo o mais importante o ciclo ambiental claro-escuro. A produção de melatonina pela glândula pineal aumenta muito durante a noite e, prolongando-se o período escuro, ocorre um aumento proporcional dos níveis noturnos de melatonina (REITER, 1991). A duração da secreção noturna da melatonina é diretamente proporcional à duração da noite (CARDINALI; PÉVET, 1998; HOFMAN; SKENE; SWAAB, 1995). A concentração de melatonina no sangue em indivíduos normais é muito baixa durante a maior parte do dia, mas aumenta significativamente entre 02:00 e 04:00 horas da manhã, caindo abruptamente após esse horário (BASTA et al., 2007).

A produção noturna de melatonina é interrompida se o organismo for exposto a luz artificial (TAN et al., 2000), sendo que a intensidade da luz de 2000-2500 luxes durante duas horas suprime completamente a secreção de melatonina. Enquanto que a luz doméstica, de intensidade de 50-300 luxes, tem um efeito supressor menor (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005; MUTHURAMALINGAM, KENNEDY, BERRY, 2006).

Tanto na glândula pineal (MAURIZ et al., 2013; REITER, 1981) quanto nos órgãos periféricos (SANCHEZ-HIDALGO; DE LA LASTRA, 2009) as concentrações de melatonina diminuem com o avanço da idade. Na espécie humana, a maior concentração de melatonina ocorre durante a infância, caindo rapidamente antes do início da puberdade e sofrendo nova queda acentuada durante a senectude (MAGANHIN et al., 2008).

Bebês com idade inferior a três meses secretam menores quantidades de melatonina, sendo o fornecimento de melatonina pelo leite de grande importância para regular o ritmo circadiano em mamíferos nas primeiras semanas de vida. Em crianças com idade de um a três anos há aumento da secreção com pico noturno e concentrações (média de 325 pg/mL no sangue). Posteriormente, a produção de melatonina diminui com o envelhecimento (PANDI-PERUMA et al., 2006; WASSMER; WHITEHOUSE, 2006). Dessa forma, a melatonina também desempenha um importante papel na determinação das modificações fisiológicas associadas ao ciclo de vida (crescimento, amadurecimento e envelhecimento) (MARKUS et al., 2003).

2.2.3 Influência do Horário de Ordenha na Concentração de Melatonina do Leite

Durante a produção de leite pelos mamíferos, alguns hormônios como a melatonina são transferidos do sangue para o leite (ERICKSON et al., 1998). A concentração de melatonina excretada no leite depende do período do dia, da estação do ano, do período de reprodução e da lactação do animal (VALTONNEN; KANGAS; VOUTILAINEN, 2001). A concentração de melatonina é maior durante os períodos em ausência de luz. Valtonnen, Kangas e Voutilainen (2001) avaliaram o leite de ordenha de vacas em ciclos de 12 horas de claridade/escuridão e ciclos de 7 horas de claridade e 17 horas no escuro. O primeiro tratamento apresentou níveis de melatonina de aproximadamente 10 pg/mL e no segundo tratamento, a concentração de melatonina foi aumentada para 60 pg/mL.

Haigh (2003) também observou que em ordenhas realizadas no período noturno (iluminação máxima de 50 lux) obteve-se concentração mais elevada de melatonina em relação às ordenhas diurnas. Para estes autores, a ordenha realizada das 14:00 às 16:00 horas, obteve-se concentração de melatonina de 20 pg/mL. Já nas ordenhas feitas das 2:00 às 4:00 horas da manhã, foram obtidos níveis de melatonina de 35 pg/mL. Milagres (2012), ao realizar, a ordenha de vacas nos horários de 2:00 horas da manhã e 15:00 horas, durante 15 dias, observaram que o leite proveniente da ordenha noturna apresentou maior teor de melatonina (39,43 pg/mL) que o leite das 15:00 horas (4,03 pg/mL). De acordo com esses estudos, a ordenha noturna é uma estratégia eficiente para aumentar o teor de melatonina no leite de vaca.

2.2.4 Suplementação de vitaminas e minerais na dieta das vacas em lactação

O sistema regulador para a secreção de melatonina é complexo. A luz é o fator ambiental mais influente. Além disso, a síntese de melatonina depende da disponibilidade de seu precursor, sendo este aminoácido um componente essencial do metabolismo animal. Se a ingestão de TRP for severamente restrita, a síntese de melatonina é significativamente reduzida em vacas em lactação (ZIMMERMANN et al., 1993).

A evidência da influência dos nutrientes na síntese de melatonina

tende a variar. Existem alguns estudos, com base principalmente em evidências em animais, que demonstram a importância de vitaminas B, magnésio, zinco e ácidos graxos poliinsaturados (FOURNIER et al., 2002).

As deficiências de fosfato, magnésio e zinco foram associadas com menores níveis de melatonina em roedores. Nos estudos sobre essa temática, a vitamina B6, isoladamente ou em combinação com zinco, aumenta a melatonina plasmática (BEDIZ et al., 2003). O ácido fólico e a vitamina B6 devem impulsionar a formação de serotonina a partir do TRP como coenzimas (BELVIRANLI; BALTAÇI, 2008; BILLYARD; EGGETT; FRANZ, 2006). O zinco e o magnésio, em vez disso, devem aumentar a formação de melatonina a partir da serotonina por ligação à enzima AANAT- arilalquilamona-N-acetiltransferase, ativando-a e aumentando a afinidade da serotonina para a ligação a AANAT (MORTON, 1989). Nos seres humanos, o papel dessas vitaminas e minerais é menos estudado nesta conexão.

As vitaminas do Complexo B são hidrossolúveis: Vitaminas B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B5 (ácido pantotênico), B6 (piridoxina), B12 e Ácido Fólico; Vitamina H (biotina) e Vitamina C (ácido ascórbico). Essas são encontradas principalmente em alimentos de origem vegetal, sendo consideradas componentes de sistemas de enzimas essenciais. Ao contrário das vitaminas lipossolúveis, as hidrossolúveis não são normalmente armazenadas no organismo em quantidades apreciáveis. Quando ingeridas em excesso em relação a exigência, são geralmente excretadas em pequenas quantidades na urina; sendo desejável seu suprimento diário ao animal (BERCHIELLI, 2006).

As vitaminas atuam como fator de crescimento para a microbiota ruminal e alguns microrganismos são capazes de sintetizar vitaminas. Contudo, nem todas as vitaminas são sintetizadas, sendo obtidas unicamente através da dieta (BERCHIELLI, 2006). A produção de vitaminas do complexo B e vitamina K ocorrem durante a degradação e fermentação de nutrientes presentes na microbiota ruminal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do horário de ordenha e adição de vitaminas na dieta sobre a concentração de melatonina no leite de vacas.

3.2 Objetivos Específicos

Determinar a concentração de componentes do leite de vacas, incluindo a melatonina, com dieta suplementadas com vitaminas hidrossolúveis (niacina, piridoxina, ácido pantotênico, biotina, cianocobalamina e ácido fólico e lipossolúveis (A,D,E).

Determinar o efeito do horário da ordenha sobre a concentração de melatonina no leite.

REFERÊNCIAS

ALVES, R. S. C.; CIPOLLA-NETO, J.; NAVARRO, J. M.; OKAY, Y. A melatonina e o sono em crianças. **Pediatria (São Paulo)**, v. 20, n. 2, p. 99-105, 1998.

ARCHER, S. N.; OSTER, H. How sleep and wakefulness influence circadian rhythmicity: effects of insufficient and mistimed sleep on the animal and human transcriptome. **Journal of Sleep Research**, v. 24, n. 5, p. 476-493, 2015.

ASHER, A.; SHABTAY, A.; BROSH, A.; EITAM, H.; AGMON, R.; COHEN-ZINDER, M.; HAIM, A. "Chrono-functional milk": The difference between melatonin concentrations in night-milk versus day-milk under different night illumination conditions. **Chronobiology International**, v. 32, n. 10, p. 1409-1416, 2015.

BALLONE G. J.; MOURA E. C. - Melatonina - in. PsiqWeb, 2005. Disponível em: <www.psiqweb.med.br>. Acesso em: 20 dez 2016.

BASTA, M.; CHROUSOS, G. P.; VELA-BUENO, A.; VGONTZAS, A. N. Chronic insomnia and the stress system. **Sleep Medicine Clinics**, v. 2, n. 2, p. 279-291, 2007.

BEDIZ, C. S.; BALTACI, A. K.; MOGULKOC, R. Both zinc deficiency and supplementation affect plasma melatonin levels in rats. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 90, n. 4, p. 335-339, 2003.

BELVIRANLI, M.; BALTACI, A. K. The relation between reduced serum melatonin levels and zinc in rats with induced hypothyroidism. **Cell Biochemistry and Function**, v. 26, n. 1, p. 19-23, 2008.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 583p.

BERRA, B.; RIZZO, A. M. Melatonin: circadian rhythm regulator, chronobiotic, antioxidant and beyond. **Clinics in Dermatology**, v. 2, p. 202-209, 2009.

BHAT, Z. F.; BHAT I. Milk and dairy products as functional foods: a review. **International Journal of Dairy Science**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2011.

BILLYARD, A. J.; EGGETT, D. L.; FRANZ, K. B. Dietary magnesium deficiency decreases plasma melatonin in rats. **Magnesium Research**, v. 19, n. 3, p. 157-161, 2006.

BITTENCOURT, M. Insônia ameaça qualidade de vida de até 45% da população mundial. O Dia, 2016. Disponível em: <
<https://odia.ig.com.br/conteudo/mundoeciencia/2016-03-19/insonia-ameaca-qualidade-de-vida-de-ate-45-da-populacao-mundial.html>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

CARDINALI, D. P.; PÉVET, P. Basic aspect of melatonin action. **Sleep Medicine Reviews**, v. 2, n. 3, p. 175-190, 1998.

CASADO-ZAPICO, S.; MARTÍN, V.; GARCÍA-SANTOS, G.; RODRÍGUEZ-BLANCO, J.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, A. M.; LUÑO, E.; SUÁREZ C.; GARCÍA-PEDRERO, J. M.; MENENDEZ, S. T.; ANTOLÍN I., RODRIGUEZ, C. Regulation of the expression of death receptors and their ligands by melatonin in haematological cancer cell lines and in leukaemia cells from patients. **Journal of Pineal Research**, v. 50, n. 3, p. 345-355, 2011.

CHALLET, E.; MENDOZA, J. Metabolic and reward feeding synchronises the rhythmic brain. **Cell and Tissue Research**, v. 341, n. 1, p. 1-11, 2010.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 11-24, 2005.

COSTA, M. P.; BALTHAZAR, C. F.; MOREIRA, R. V. B. P.; CRUZ, A. G.; CONTE JUNIOR, C. A. Leite fermentado: potencial do alimento funcional. **Enciclopedia Biosfera**, v. 9, n.16, p.1387-1408, 2013.

ERIKSON, P. S.; PERFILIEVA, E.; BJORK-ERIKSON, T.; ALBORN, A.M.; NORDBORG, C.; PETERSON, D.A.; GAGE, F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1313-1317, 1998.

FOURNIER, I.; PLOYE, F.; COTTET-EMARD, J. M.; BRUN, J.; CLAUSTRAT, B. Folate deficiency alters melatonin secretion in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 9, p. 2781-2784, 2002.

GARCIA-PARRILLA, M. C.; CANTOS, E.; TRONCOSO, A. M. Analysis of melatonin in foods. **Journal of food composition and analysis**, v. 22, n. 3, p. 177-183, 2009.

HAIGH, B. S. **Method for producing milk with an enhanced content of naturally expressed melatonin**, UK PATENT APPLICATION; 2 387 009 A, 2003.

HAIGH, J. J.; MORELLI, P. I.; GERHARDT, H.; HAIGH, K.; TSIEN, J.; DAMERT, A.; MIQUEROL, L.; MUHLNER, U.; KLEIN, R.; FERRARA, N.; WAGNER, E. F.; BETSHOLTZ, C.; NAGY, A. Cortical and retinal defects caused by dosage-dependent reductions in VEGF-A paracrine signaling. **Developmental Biology**, v. 262, n. 2, p. 225-241, 2003.

HARAGUCHI, F.K.; ABREU, W.C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição.**, v.19, n. 4, p. 479-488, 2006.

HOFMAN, M. A.; SKENE, D. J.; SWAAB, D. F. Effect of photoperiod on the diurnal melatonin and 5-methoxytryptophol rhythms in the human pineal gland. **Brain Research**, v. 671, n. 2, p. 254-260, 1995.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores. Estatística da Pecuária de Produção. 2016. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201601_publicacao_completa.pdf>. Acesso em: 13 set. 2016.

KRYGER, M. H.; ROSENBERG, R.; MARTIN, L.; E KIRSCH, D. B. Kryger's Sleep Medicine Review: A Problem-oriented Approach. **Elsevier Health Sciences**. 2015.

MAGANHIN, C. C.; CARBONEL, A. A. F.; HATTY, J. H.; FUCHS, L. F. P.; OLIVEIRA-JÚNIOR, I. S. D.; SIMÕES, M. D. J.; SOARES-JR, J. M. Melatonin effects on the female genital system: a brief review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 3, p. 267-271, 2008.

MARKUS, R. P.; SANTOS, J. M.; ZAGO, W.; RENÓ, L. A. Melatonin nocturnal surge modulates nicotinic receptors and nicotine-induced [3H] glutamate release in rat cerebellum slices. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 305, n. 2, p. 525-530, 2003

MAURIZ, J. L.; COLLADO, P. S.; VENEROSO, C.; REITER, R. J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 1, p. 1-14, 2013.

MAURY, E.; RAMSEY, K. M.; BASS, J. Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. **Circulation Research**, v. 106, n. 3, p. 447-462, 2010.

MILAGRES, M. P.; MINIM, V. P. R.; SIMIQUELLI, A. A.; ESPESCHIT, A. C. R. **Leite de vaca com concentração aumentada de melatonina: obtenção, avaliação sensorial e biológica**. 2012. 124f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2012. 105p.

MILKPOINT. Cientistas da Finlândia desenvolvem leite com substância indutora do sono. 2002. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/giro-noticias/cientistas-da-finlandia-desenvolvem-leite-com-substancia-indutora-do-sono-13781n.aspx>>. Acesso em: 15 dez. 2017.

MINIM, L. A. Fatores da embalagem de leite com concentração aumentada de melatonina na intenção de compra do consumidor. **Revista Instituto Laticínios Candido Tostes**, v. 69, n. 1, p 25-36, 2014.

MORCUENDE, J.A.; MINHAS, R.; DOLAN, L.; STEVENS, J.; BECK, J. Allelic variants of human melatonin 1A receptor in patients with familial adolescent idiopathic scoliosis. **Spine** (Phila 1976), v. 28, n. 17, p. 2025-2028, 2013.

MORTON, D. J. Possible mechanisms of inhibition and activation of rat N-acetyltransferase (EC 2.3. 1.5.) by cations. **Journal of neural transmission**, v. 75, n. 1, p. 51-64, 1989.

MUTHURAMALINGAM, P.; KENNEDY, A. D.; BERRY, R. J. Plasma melatonin and insulin-like growth factor-1 responses to dim light at night in dairy heifers. **Journal of Pineal Research**, v. 40, n. 3, p. 225-229, 2006.

PANDI-PERUMAL, S. R.; SRINIVASAN, V.; MAESTRONI, G. J. M.; CARDINALI, D. P.; POEGGELER, B.; HARDELAND, R. Melatonin. **The FEBS Journal**, v. 273, n. 13, p. 2813-2838, 2006.

PEUHKURI, K.; SIHVOLA, N.; KORPELA, R. Dietary factors and fluctuating levels of melatonin. **Food & Nutrition Research**, v. 56, n. 1, p. 17252, 2012.

REITER, R. J. The mammalian pineal gland: structure and function. **Developmental Dynamics**, v. 162, n. 4, p. 287-313, 1981.

REITER, R. J. Pineal Melatonin: Cell Biology of Its Synthesis and of Its Physiological

Interactions. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 2, p. 151–180, 1991.

RODRÍGUEZ, E. D.; GAYARRE, N. G.; CAÑEDO, M. V.; FERNÁNDEZ, B. M.; LÓPEZ, B. D. Efectos de la melatonina sobre el mantenimiento de parámetros corporales durante el envejecimiento. Estudio en *Rattus norvegicus*. **Revista Española de Geriatría y Gerontología**, v. 36, n. 5, p. 287-292, 2001.

RODRIGUEZ, C.; MARTÍN, V.; HERRERA, F.; GARCÍA-SANTOS, G.; RODRIGUEZ-BLANCO, J.; CASADO-ZAPICO, S.; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, A. M.; SUÁREZ, S.; PUENTE-MONCADA, N.; ANÍTUA, M. J.; ANTOLÍN, I. Mechanisms involved in the pro-apoptotic effect of melatonin in cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 6597-6613, 2013.

SANCHEZ, S.; SANCHEZ, C. L.; PAREDES, S. D.; RODRIGUEZ, A. B.; BARRIGA, C. The effect of tryptophan administration on the circadian rhythms of melatonin in plasma and the pineal gland of rats. **Journal of Applied Biomedicine (De Gruyter Open)**, v. 6, n. 4, 2008.

SANCHEZ-HIDALGO, M.; DE LA LASTRA, C. A.; CARRASCOSA-SALMORAL, M. D. P.; NARANJO, M. C.; GOMEZ-CORVERA, A.; CABALLERO, B.; GUERRERO, J. M. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. **Experimental Gerontology**, v. 44, n. 5, p. 328-334, 2009.

SANTOS, J. E. P. Distúrbios Metabólicos. In: Berchieli, T.T.; Pires, A. V.; Oliveira, S. G. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006.

SAXELIN, M.; KORPELA, R.; MAYRÄ-MÄKINEN, A. **Functional dairy products**. In Dairy Processing, pp. 229-245, 2003.

SPADOTI, L. M.; MORENO, I.; ZACARCHENCO, P. B.; ROIG, S. M. A melatonina e leites funcionais com apelo de melhoria do sono. **Leite e Derivados**, v. 21, p. 60-66, 2012.

TAGUCHI, V. **Boa noite, Cinderela: empresa faz leite para dormir**. Revista Globo Rural. 2012. Disponível em:<
<http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI311045-18080,00-BOA+NOITE+CINDERELA+EMPRESA+FAZ+LEITE+PARA+DORMIR.html>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X.;

SUGINO, N.; REITER, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and sterility**, v. 92, n. 1, p. 328-343, 2009.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J.; QI, W. B.; KARBOWNIK, M.; CALVO, J. R. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. **Neurosignals**, v. 9, n. 3-4, p. 137-159, 2000.

TAN, D. X.; HARDELAND, R.; MANCHESTER, L. C.; KORKMAZ, A.; MA, S.; ROSALES-CORRAL, S.; REITER, R. J. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 2, p. 577-597, 2011.

TOSINI, G.; FUKUHARA, C. Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 15, n. 4, p. 364-369, 2003.

VALTONEN, M.; KANGAS, A.P.; VOUTILAINEN, M. **Method for producing melatonin rich milk**. Patent Cooperation Treaty WO, v. 1, n. 01784, p. A1, 2001.

WASSMER, E.; WHITEHOUSE, W. P. Melatonin and sleep in children with neurodevelopmental disabilities and sleep disorders. **Current Pediatrics**, v. 16, n. 2, p. 132-138, 2006.

WIJESINHA-BETTONI, R.; BURLINGAME, B. Milk and dairy product composition. In.: MUEHLHOFF, E.; BENNETT, A.; McMAHON, D (Ed.). **Milk and dairy products in human nutrition**. Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO, p. 41-102, 2013.

ZHDANOVA, I. V.; WURTMAN, R. J.; BALCIOGLU, A.; KARTASHOV, A. I.; LYNCH, H. J. Endogenous melatonin levels and the fate of exogenous melatonin: age effects. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 53, n. 4, p. B293-B298, 1998.

ZOCCAL, R. A força do agro e do leite no Brasil. **Revista Balde Branco**. 2017. Disponível em: < <http://www.baldebranco.com.br/forca-agro-e-leite-no-brasil/>> Acesso em: 15 dez. 2017.

4 ARTIGO

**CONCENTRAÇÃO DE MELATONINA EM LEITE DE VACAS SUPLEMENTADAS
COM VITAMINAS E DOIS HORÁRIOS DE ORDENHA**

RESUMO

A melatonina é um neuro-hormônio sintetizado pela glândula pineal, possuindo influência direta na regulação circadiana e no sono. Essa tem como precursor o triptofano, o qual sua biodisponibilidade tem relação direta com a produção de melanina. O leite é um alimento que pode ser fonte natural desse hormônio. A partir disso, o estudo teve como objetivo verificar os teores de melatonina no leite, em diferentes horários de ordenha, e a influência da adição de vitaminas como suplementação da dieta para a síntese de melatonina. Foi realizada em um rebanho comercial de uma propriedade no município de Castro-PR. Utilizou-se 23 vacas da raça Holandesa, em confinamento tipo *free stall*. As vacas receberam a dieta em duas refeições diárias, e as amostras de leite foram coletadas antes e depois da suplementação e nas duas ordenhas diárias, dia e noite. A concentração de melatonina foi determinada por meio do imunoensaio enzimático de ELISA. Como os dados não apresentam distribuição normal, utilizou-se a estatística não paramétrica, onde os dados foram analisados pelo teste de Wilcoxon, com nível de significância de 5%. A concentração de melatonina no leite diminuiu 19% após a suplementação com vitaminas. No entanto, o leite produzido no período noturno teve um aumento de 2,28 vezes em relação ao leite produzido em condições normais, indicando que a iluminação determina a inibição ou estímulo de sua síntese. Pode-se concluir que os horários da ordenha interferem na concentração de melatonina produzida e que a suplementação de vitaminas diminuiu a concentração de melatonina no leite.

Palavras-chave: Melatonina. Horários de ordenha. Ingestão de vitaminas. ELISA.

ABSTRACT

Melatonin is a neurohormone synthesized by the pineal gland, having a direct influence on circadian regulation and sleep. This is a precursor of tryptophan, which has its highest levels at night. Milk is a food that can be a natural source of this hormone. From this, the study aimed to verify the melatonin levels in milk at different milking times and the influence of the addition of vitamins as dietary supplementation in melatonin synthesis. It was carried out in a commercial herd of a property in the municipality of Castro-PR. Twenty-three Holstein cows were used in *free stall* confinement. The cows received the diet in two daily supplies, and the samples were evaluated before and after the supplementation and in the two milking periods, day and night. The concentration of melatonin was determined by the ELISA method. As the data do not present normal distribution, the non-parametric statistic was used, where the data were analyzed by the Wilcoxon test, with a significance level of 5%. Melatonin concentration in milk decreased by 19% after vitamin supplementation. However, milk produced at night had an increase of 2.28 times relative to milk produced under normal conditions, indicating that the illuminance determines the inhibition or stimulation of its synthesis. It can be concluded that milk schedules interferes with the concentration of melatonin produced and that vitamin supplementation decreased the concentration of melatonin in milk.

Keywords: Melatonin. Milking schedules. Vitamin intake. ELISA.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem influência na produção de produtos lácteos, em 2017 estimou-se, pela CNA- Confederação e Pecuária, 34,9 bilhões de litros de leite, situando o país em quarto lugar no ranking mundial de países produtores (ZOCCAL, 2017). Um terço da produção nacional foi consumida na forma fluída, 11,6 bilhões de litros, ou seja, 57 litros/per capita/ano ou 4,8 litros/mês. Dados de 2016 informaram que no Brasil, o volume disponível é de 170 litros/habitante/ano (IBGE, 2016).

O leite é um alimento completo, com mais de 20 fontes de nutrientes essenciais, o que favorece as dietas para manutenção do peso corpóreo. Além disso, fornece uma fração significativa de nutrientes como: cálcio, magnésio, fósforo e das vitaminas A, B2, B12 e D (SANTOS, 2006). Também possui proteínas precursoras do triptofano, que favorecem a síntese de melatonina em consumidores humanos (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

A composição do leite pode ser adaptada para atender a necessidade do mercado, principalmente aos requisitos industriais específicos (KARATZAS; TURNER, 1997). Estratégias para melhorar a qualidade dos leites estão sendo desenvolvidas. Dentre elas tem-se a obtenção do leite de vaca rico em melatonina, que deve ser coletado nas primeiras horas da manhã (TAGUCHI, 2012).

A melatonina é um neuro-hormônio sintetizado pela glândula pineal a partir do aminoácido essencial, triptofano (TRP) e tem influência direta na regulação circadiana e no sono, atingindo seus níveis mais altos durante a noite (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006; TAMURA et al., 2009). A taxa de formação da melatonina depende da atividade de algumas enzimas controladas pelo Sistema Nervoso Central (SNC) (PEUHKURI; SIHVOLA; KORPELA, 2012). Além destes, a alimentação tem grande influência na síntese de melatonina (HARAGUCHI; ABREU; PAULA, 2006).

Por ser indutora de sono, a melatonina tem sido utilizada por pessoas que têm transtornos do sono como insônia, transtornos decorrentes de mudanças de fusos horários e trabalhadores com jornadas noturnas (ALVES et al., 1998). O consumo de alimentos que contém este neuro-hormônio pode trazer diversos benefícios à saúde humana (BITTENCOURT, 2016; RODRIGUÉZ et al., 2001).

Esse estudo teve como objetivo avaliar os teores de melatonina no leite de vacas em dois horários de ordenha, dia e noite (luz-escuro), com e sem suplementação de vitaminas hidrossolúveis, além de avaliar sua composição química

e contagem de células somáticas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

A pesquisa foi realizada em um rebanho comercial de uma propriedade no município de Castro– PR, situada a 996 m de altitude, apresentando as seguintes coordenadas geográficas: Latitude: 24° 47' 32" Sul, Longitude: 50° 0' 42" Oeste. A temperatura, nos dias da coleta, variou em mínima 14,38°C, no período noturno, e máxima de 29,83°C, no período diurno. (Fundação ABC – Castro/PR)

2.2 Caracterização dos animais

Foram utilizadas 23 vacas da raça Holandesa (Tabela 1), em confinamento tipo *free-stall*, cuja altura de pé direito do barracão era de 5,5 m e a cobertura com telhas de aluzinco, com abertura central, alojadas em baias com cama de areia. Todas as vacas estavam na fase final de lactação, sendo a produtividade média de 38 kg/dia.

Tabela 1: Características produtivas das vacas coletadas.

Parâmetro	Médias e desvio padrão (\pm)
N	23
Idade (meses)	62,41 \pm 19,51
Número de lactações	2,77 \pm 1,48
Dias em lactação	356,95 \pm 126,87
Produção em 305 dias	11.601,89 \pm 1.980,39
Prenhez confirmada (%)	68,18

Fonte: do autor.

2.3 Dieta dos animais

As vacas receberam duas refeições diárias, as quais continham

65,38% de volumoso e 34,62% de concentrado, cuja concentração de ingredientes e composição bromatológica estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Composição de ingredientes e nutrientes na dieta das vacas coletadas.

Ingredientes	% na MS
Silagem de milho	45
Silagem pré-secada	21
Palha de trigo	3
Silagem grão de milho úmido	4
Fubá de milho	8
Casca de soja	4
Farelo de soja 46%	11
Optigen	1
Núcleo Especial BL – baixa lactação	3
Composição bromatológica	
Matéria seca	44,55
Extrato etéreo	3,07
Ácidos graxos insaturados	2,60
Energia líquida lactação, Mcal/kg MS	1,55
Proteína bruta – PB	16,64
Proteína degradável no rúmen	11,39
Fibra em detergente neutro	38,70
Fibra em detergente neutro efetiva	31,52
Fibra em detergente ácido	21,06
Amido	18,74
Aminoácido triptofano PB*	0,86
Ca	1,03
P	0,43
Mg	0,31
Enxofre	0,24
Zn, mg/Kg	87,19
Proporção estimada da exigência de absorção intestinal	

A suplementação de vitaminas na dieta ocorreu do dia 03 até dia 10 dezembro de 2017, sendo fornecida através de uma mistura em fubá de milho, fornecidas em quantidades que possibilitaram o seguinte consumo médio/dia/vaca: três gramas de um composto com vitaminas rúmen-protégidas (Vivalto, ®Trow Nutrition)), seis gramas de Niacina (Niavit) e 141 g de milho- fubá, o qual foi misturado na dieta total fornecida. A dieta foi fornecida *ad libitum*, em duas refeições diárias, com sobras de 14% do fornecido.

Através da suplementação fornecida, foi consumido, em média, as seguintes quantidades de vitaminas por vaca: 120 mg de ácido pantotênico (B5), 76,5 mg de piridoxina (B6), 13,05 mg de ácido fólico (B9), 9,69 mg de biotina (B7), 921 mcg de cianocobalamina (B12), 4500 U.I. de vitamina A, 900 U.I. de vitamina D₃, 45 U.I. de vitamina E e seis gramas de niacina (B3), sendo esta não protegida da degradação ruminal. No primeiro dia, foi fornecido apenas meia dosagem com a finalidade de adaptação a mudança na dieta, e, após isso, durante 7 dias consecutivos passaram a receber a dosagem completa da suplementação.

2.4 Monitoramento da Iluminância

Durante o período experimental, os animais permaneceram no período noturno sem iluminação artificial. Para o monitoramento da iluminância dentro do estábulo (*free-stall*) foi instalado um luxímetro portátil, modelo MLM-1020 (Minipa do Brasil Ltda, São Paulo) equipado com sensor de luz visível digital, precisão de 3% e registro de leituras automáticas (*data logger*) em intervalos de 4 minutos. O equipamento foi fixado a uma altura de 1,5 m do piso ao lado das baias das vacas, e permaneceu ligado durante todo o período experimental.

2.5 Coletas das amostras

As amostras foram coletadas nas duas ordenhas diárias, durante dois dias consecutivos, antes e após sete dias do início da suplementação vitamínica das vacas. A primeira ordenha diária foi realizada às 05:00 h (noite) e a segunda às 15:00 h (dia) (tabela 3).

Tabela 3: Descrição dos dias das coletas de amostras antes do fornecimento de vitaminas e após 7 dias da suplementação.

Coletas	Dieta
Coleta 1º Dia – Manhã	Sem suplementação
Coleta 1º Dia – Tarde	Sem suplementação
Coleta 2º Dia – Manhã	Sem suplementação
Coleta 2º dia – Tarde	Sem suplementação
Coleta 9º Dia – Manhã	Com suplementação
Coleta 9º Dia – Tarde	Com suplementação
Coleta 10º Dia – Manhã	Com suplementação
Coleta 10º Dia – Tarde	Com suplementação

As amostras foram coletadas diretamente dos coletores da ordenhadeira, com leite representativo da toda a ordenha.

Após as coletas, as amostras coletadas de cada vaca individual em cada dois dias consecutivos, foram compostas da seguinte forma: uma amostra representativa apenas da ordenha da noite (05:00 h) e outra amostra representativa de ambas ordenhas diárias (leite total).

Todas as amostras compostas foram acondicionadas em frasco plástico de 100 mL e mantidas à -20°C, até a determinação da concentração de melatonina. Parte das amostras compostas do leite total diário (duas ordenhas), foram também acondicionadas em frascos de 70 mL com conservante bronopol, para determinação da composição química.

Para conhecimento da composição do leite produzido por todo o rebanho foram coletadas amostras do tanque de expansão, em todos os dias em que foram coletadas amostras das vacas individuais.

2.6 Análises e determinações dos constituintes do leite e melatonina

A composição físico- química do leite foi feita pela Associação Paranaense de Criadores da Raça Holandesa- APCBRH, em Curitiba-PR, onde os teores de gordura, proteína e lactose foram determinados através da leitura de absorção infravermelha em equipamento automatizado Bentley 2000® (Bentley

Intruments Inc.). A contagem de células somáticas (CCS) foi obtida em contador eletrônico, pela técnica densitometria de fluxo no equipamento Somacount 500® (Bentley Intruments Inc.).

Para a quantificação da melatonina, as amostras foram descongeladas e centrifugadas à 3000 x g durante 10 minutos à 4°C, para separação da gordura. A concentração de melatonina foi determinada na fase desengordurada, de acordo com metodologia de extração adaptada para o uso em leite por Kollmann et al. (2006), por meio de imunoenensaio enzimático em kit Elisa (RE54041, IBL-International). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro à 450 nm. O ajuste da curva e o modelo matemático para a determinação da concentração de melatonina foi feito através de regressão logística utilizando-se dos padrões, obtendo coeficiente de determinação (R^2) igual à 0,99.

2.7 Análise Estatística

Os dados foram analisados através de estatística descritiva e teste de normalidade Shapiro-Wilk; para homocedasticidade teste de Levene e como os pressupostos da estatística paramétrica não foram atendidos, os dados foram analisados pelo teste de Wilcoxon, com nível de significância de 5 %, utilizando-se o programa STATISTICA 13.5 (STATSOFT, 2013).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição do leite das vacas individuais sem e com suplementação de vitaminas, e do tanque de expansão, é demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4: Mediana de teores (%), valores mínimos e máximos (entre parêntesis) de nutrientes, concentração de uréia (mg/dL) e contagem de células somáticas (CCS) no leite de vacas individuais sem e com suplementação vitamínica e leite em tanque de expansão da propriedade.

Parâmetro	Vitaminas ^{1, 4}		Tanque Expansão
	Antes	Depois	
N	23	23	
Leite (kg/vaca/dia)	23,73 (17,23-27,40)	23,12 (18,05-29,05)	-
Gordura	3,96 ^a (1,98-5,91)	3,79 ^b (2,87-5,37)	3,37 (3,24-3,49)
Proteína	3,32 ^b (3,01-4,13)	3,45 ^a (1,10-3,98)	3,09 (3,07-3,11)
Lactose	4,38 ^a (3,55-5,05)	4,32 ^b (2,80-4,80)	4,62 (4,61-4,63)
Sólidos Totais	12,82 (9,99-15,35)	12,49 (8,04-14,62)	11,99 (11,88-12,15)
ESD ²	8,78 (7,70-9,77)	8,64 (3,84-9,71)	8,62 (8,59-8,66)
CCS ³ (x1000/mL)	148,50 (14,00-542)	108,00 (24,00-558)	211 (183,50-238,50)

¹Vitaminas suplementadas/vaca/dia: 120 mg de d-ácido pantotênico, 76,5 mg de piridoxina, 13,05 mg de ácido fólico, 9,69 mg de biotina, 921 mcg de cianocobalamina, 4500 U.I. de vitamina A, 900 U.I. de vitamina D₃ e 45 U.I. de vitamina E rúmen-protetidas, e seis gramas de niacina não protegida da degradação ruminal.

²Extrato Seco Desengordurado;

³ Média geométrica;

⁴Composição com letras diferentes na mesma linha diferem no teste de Wilcoxon com probabilidade de 5%.

Os teores de gordura e proteína no leite de vacas individuais e tanque de expansão, antes e após a suplementação, estão acima do preconizado pela legislação brasileira, que segundo a Instrução Normativa 62 de 29 de dezembro de 2011, o leite cru refrigerado deve apresentar um teor mínimo de 3,0% de gordura e 2,9% de proteína. Os resultados encontrados são semelhantes aos observados por Ribas et al. (2015) em 1.950.034 amostras de leite em tanques de expansão no estado do Paraná, e encontraram 3,74±0,69% de gordura, 3,22±0,27% de proteína, 4,40±0,23% de lactose e 12,29±0,85% de sólidos totais.

Os teores de gordura e lactose diminuíram e proteínas aumentou ($p < 0,05$) após suplementação de vitaminas na dieta. Majee et al. (2003) suplementaram vitaminas do complexo B em dieta de vacas produzindo, em média, 41 kg de leite/dia e não observaram efeitos na composição do leite. As vitaminas visam otimizar as reações bioquímicas e, através do presente estudo, não é possível determinar se as diferenças na composição do leite são atribuídas à suplementação de vitaminas ou a fatores não controlados.

As concentrações de nutrientes encontradas permitem hipotetizar que não faltaram nutrientes para o metabolismo de sua síntese, incluindo os aminoácidos para síntese de proteínas, entre os quais o triptofano que é precursor da síntese de melatonina. Também, os níveis de uréia no leite são indicadores da nutrição proteica, e os níveis encontrados estão entre 10 e 16 mg/dL, os quais indicam uma adequada nutrição proteica (SANTOS; PAULA, 2010). Assim conclui-se que os animais tiveram uma nutrição proteica adequada pois os valores de concentração de ureia estavam dentro dos limites aceitos (BRASIL, 2011).

A contagem de células somáticas não diferiu com a suplementação de vitaminas e os valores encontrados estão de acordo com as exigências na legislação brasileira (max.400 mil/mL) e inferiores a 553 mil/mL encontrado por Ribas et al. (2014) em 1.950.000 amostras analisadas. Essas amostras estão acima do que é preconizado pela legislação brasileira, (400.000 células/mL) (RIBAS et al., 2014). Comparando-se esses dados com os das coletas realizadas nos tanques de expansão da propriedade, a CCS ficou bem abaixo (200.000 células/ml).

Na Tabela 5 está descrito a quantidade de horas que as vacas permaneceram com iluminância até 1 lux (noite) e acima de 100 lux (dia), além do número de horas considerado e período de transição entre dia e noite.

Tabela 5: Períodos de iluminância dentro do estábulo *free stall* nos dois dias de coleta de leite das vacas.

	0,1 Lux	>100 Lux	Transição manhã	Transição tarde	Total
Sem vitaminas	08:54	11:54	02:30	00:48	24:00
Com vitaminas	08:18	12:24	02:36	00:30	24:00

Segundo Muthuramalingam, Kennedy e Berry (2006), iluminância entre 5 e 10 lux não afeta a síntese de melatonina. Quando igual a 50 lux, a síntese é inibida em 50%. Assim, durante aproximadamente 8 horas em que a iluminância foi mantida em até 0,1 lux, supõe-se que não houve inibição da síntese de melatonina devido a iluminância.

Na Tabela 6 estão descritas as concentrações de melatonina no leite sem e com a suplementação na dieta, nas ordenhas de dia e a noite.

Tabela 6: Concentração de melatonina (pg/mL) no leite de vacas sem e com da suplementação vitamínica na dieta, horários de ordenha e do tanque de expansão.

	Vitaminas ¹		Horário ²		Tanque
	Sem	Com	Total diário	Noite	-
N	23	23	23	23	
Mediana	4,87 ^A	3,93 ^B	2,36 ^b	7,74 ^a	2,13
Média	6,94±5,91	4,75±3,22	2,76±1,59	8,78±5,11	2,96±1,17
Mínimo	0,12	0,92	0,12	2,80	2,96
Máximo	25,90	13,13	6,62	25,90	3,79

¹Vitaminas suplementadas na dieta: ácido nicotínico: 6 g/vaca/dia; Vivalto: 3 g/vaca/dia

²Horário de ordenha (5:00 h e 15:00 h);

Concentrações com letras maiúsculas e minúsculas diferentes na mesma linha diferem no teste de Wilcoxon com $p=0,0185$ e $p<0,001$, respectivamente.

O valor da mediana da concentração de melatonina diminuiu aproximadamente 19% após a adição de vitaminas na dieta. As vitaminas hidrossolúveis suplementadas funcionam como coenzimas e são essenciais para o metabolismo de carboidratos, lipídios, proteínas e, também, as reações metabólicas de biosíntese de melatonina (LEHNINGER, 1986; PEUHKURI; SIHVOLA; KORPELA,

2012).

A suplementação da dieta com vitaminas foi feita visando otimizar as reações bioquímicas para a síntese de melatonina. Então, era esperado aumento da produção de melatonina, caso houvesse deficiência das vitaminas suplementadas no metabolismo, ou, apenas a manutenção da sua produção, caso não houvesse deficiência das mesmas no metabolismo.

Pesquisas que estudaram os efeitos de nutrientes sobre a síntese de melatonina geralmente foram realizadas com ratos e humanos. Assim, já foram comprovados efeitos positivos dos seguintes minerais sobre a produção de melatonina: zinco (BEDIZ; BALTACI; MOGULKOC, 2003; BELVIRANLI; BALTACI, 2008), magnésio (BILLYARD; EGGET; FRANZ, 2006; MORTON, 1985) e cálcio (MORTON, 1989).

Também, já foi comprovado aumento da produção de melatonina através do fornecimento de vitaminas como o ácido fólico e piridoxina (FOURNIER et al., 2002; MUÑOZ-HOYOS et al., 1996; SCHERNHAMMER et al., 2009) e ácidos graxos poliinsaturados n-3, tal como ácido docosahexaenoico (DHA) (LAVIALLE et al., 2008; ZAOUALI-AJINA et al., 1999). O ácido fólico, piridoxina e cianocobalamina também são essenciais para o metabolismo da homocisteína, o qual doa um grupamento metil para a síntese de melanina (LEHNINGER, 1986; PEUHKURI; SIHVOLA; KORPELA, 2012).

Como a melatonina, também a vitamina nicotinamida, genericamente chamada de niacina, tem como seu precursor o aminoácido triptofano (60 mg triptofano para 1 mg de niacina) (DAWN et al., 2009). Nos tecidos, a nicotinamida é convertida em adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP⁺), os quais são coenzimas essenciais para o metabolismo energético e lipídico, funcionando comoceptor de elétrons em reações catabólicas ou, como doador de elétrons em reações anabólicas (MARIA; MOREIRA, 2011).

A síntese de niacina a partir do triptofano é controlada através de um mecanismo de *feedback* negativo, onde um nível adequado de niacina no metabolismo inibe a sua síntese a partir de triptofano. No presente estudo, se forneceu niacina na dieta, buscando aumentar a sua absorção intestinal, o que possibilita diminuir a utilização de triptofano para sua síntese e aumentar a síntese de melatonina a partir deste aminoácido (DAWN et al., 2009; MARIA; MOREIRA, 2011).

Em ruminantes, as vitaminas hidrossolúveis não protegidas da

degradação ruminal fornecidas na dieta, tal como a niacina fornecida no presente estudo, são intensamente degradadas pela microbiota ruminal. Mas, esta mesma microbiota ruminal, também sintetiza vitaminas hidrossolúveis, o que, normalmente, torna desnecessário a suplementação das mesmas para ruminantes. Aparentemente de 80 a 90% da niacina da dieta é degradada no rúmen e a síntese neste sítio não compensa totalmente a degradação (NIEHOFF et al., 2013; SANTOSCHI et al., 2005).

Possíveis explicações para a diminuição de melatonina com a suplementação de vitaminas hidrossolúveis poderiam ser o aumento das exigências de aminoácidos, incluindo o triptofano, com avanço de 8 dias da gestação em 68% das vacas, o que diminuiria sua disponibilidade para síntese de melatonina. Também, a elevada degradabilidade ruminal da niacina na dieta e um possível aumento de sua exigência no metabolismo (NAD, NADP) pode ter aumentado o uso do triptofano para a síntese de niacina e limitado síntese de melatonina. Não constam na literatura possíveis efeitos inibitórios das vitaminas hidrossolúveis fornecidas sobre a síntese de melatonina.

O resultado obtido é inesperado, pois não consta na literatura inibição de sua síntese pelas vitaminas fornecidas. A presença das mesmas é necessária para a produção de melatonina, incluindo a niacina, cuja deficiência pode resultar no uso do aminoácido triptofano para a sua formação, e assim ocorrerá um *feed back* negativo, ocorrendo desvio do uso de triptofano para a obtenção de niacina, acarretando uma diminuição da síntese de melatonina (CAMPBELL et al., 1994).

O leite da ordenha noturna (05:00 h) apresentou concentração de melatonina 228% superior ao leite total diário (duas ordenhas diárias: noite+dia), o que comprova a influência do nível de iluminância sobre a síntese de melatonina. No presente estudo, as vacas foram mantidas durante apenas oito a nove horas com iluminância até 0,1 lux, ou seja dentro de limites que não inibem a síntese de melatonina (MUTHURAMALINGAM, KENNEDY, BERRY, 2006). Valtonnen, Kangas e Voutilainen (2001) obtiveram aumento de 10 pg/mL para 60 pg/mL de leite, quando aumentaram duração de período escuro de 12 para 17 horas/dia. Asher e colaboradores (2015), encontraram 30.70 ± 1.79 pg/mL no leite de vacas mantidas 13 horas com iluminância até $5,08 \pm 0.04$ lux.

Assim, pode ser hipotetizado a pequena duração do período escuro, com iluminância até 0,1 lux, limitando a concentração de melatonina no leite e que no período de inverno, quando a duração da noite é maior, possibilita sua maior

concentração no leite.

Para avaliar os efeitos do consumo de leite da noite em humanos, Valtonen et al. (2005) forneceram 0,65 L de leite com concentração de $15,3 \pm 3,1$ pg/mL e observaram melhoria ($p < 0,001$) na qualidade do sono e nível de atividade diurna. Recentemente, Bae et al. (2016), observaram maior ($p < 0,023$) satisfação com sono e diminuição da sonolência diurna quando forneceram 1000 pg de melatonina e 58,24 mg de triptofano através da ingestão de leite da noite (equivalente a aprox. 130 mL leite presente estudo), comparado com ingestão de 100 pg de melatonina e 47,5 mg de triptofano no leite total diário (leite normal).

4 CONCLUSÃO

Nas condições do presente estudo, a suplementação de dietas de vacas na fase final de lactação, com a niacina não protegida da degradação ruminal e as vitaminas piridoxina, cianobalamina, ácido fólico, biotina, ácido pantotênico, vitamina A, vitamina D e vitamina E protegidas da degradação ruminal, diminui a concentração de melatonina no leite.

O leite da ordenha no final do período noturno, com 8:30 h de duração abaixo de 0,1 lux, tem concentração de melatonina 2,28 vezes maior que o leite total diário de vacas em final de lactação.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. S. C.; CIPOLLA-NETO, J.; NAVARRO, J. M.; OKAY, Y. A melatonina e o sono em crianças. **Pediatria (São Paulo)**, v. 20, n. 2, p. 99-105, 1998.
- ASHER, A.; SHABTAY, A.; BROSH, A.; EITAM, H.; AGMON, R.; COHEN-ZINDER, M.; HAIM, A. "Chrono-functional milk": The difference between melatonin concentrations in night-milk versus day-milk under different night illumination conditions. **Chronobiology International**, v. 32, n. 10, p. 1409-1416, 2015.
- BAE, S. M.; JEONG, J.; JEON, H. J.; BANG, Y. R.; YOON, I. Y. Effects of Melatonin-Rich Milk on Mild Insomnia Symptoms. **Sleep Medicine Clinics**, v. 7, p. 60-67, 2016.
- BEDIZ, C. S.; BALTACI, A. K.; MOGULKOC, R. Both zinc deficiency and supplementation affect plasma melatonin levels in rats. **Acta Physiologica Hungarica**, v. 90, n. 4, p. 335-339, 2003.
- BELVIRANLI, M.; BALTACI, A. K. The relation between reduced serum melatonin levels and zinc in rats with induced hypothyroidism. **Cell biochemistry and function**, v. 26, n. 1, p. 19-23, 2008.
- BILLYARD, A. J.; EGGETT, D. L.; FRANZ, K. B. Dietary magnesium deficiency decreases plasma melatonin in rats. **Magnesium Research**, v. 19, n. 3, p. 157-161, 2006.
- BITTENCOURT, M. Insônia ameaça qualidade de vida de até 45% da população mundial. O Dia, 2016. Disponível em: <
<https://odia.ig.com.br/conteudo/mundoeciencia/2016-03-19/insonia-ameaca-qualidade-de-vida-de-ate-45-da-populacao-mundial.html>> Acesso em: 18 dez. 2017.
- BRASIL. Instrução Normativa no 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, seção 1, n. 251, p. 6, 31 dez. 2011.
- CAMPBELL, J. M.; MURPHY, M. R.; CHRISTENSEN, R. A.; OVERTON, T. R. Kinetics of niacin supplements in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 2, p. 566-575, 1994.

DAWN, M. R.; DAWES, M. A.; MATHIAS, C. W.; ACHESON, A.; HILL-KAPTURCZAK, N.; DOUGHERTY, D. M. L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. **International Journal of Tryptophan Research**, v. 2, p. 45–60, 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations. Fao. **Countries by commodity**. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 13 set. 2016.

FOURNIER, I.; PLOYE, F.; COTTET-EMARD, J. M.; BRUN, J.; CLAUSTRAT, B. Folate deficiency alters melatonin secretion in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 132, n. 9, p. 2781-2784, 2002.

Fundação ABC- Castro-PR- Estação Meteorológica Santa Ângela

GARCIA-PARRILLA, M. C.; CANTOS, E.; TRONCOSO, A. M. Analysis of melatonin in foods. **Journal of food composition and analysis**, v. 22, n. 3, p. 177-183, 2009.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Revista de Nutrição**., v. 19, n. 4, p. 479-488, 2006.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal (PPM) 2016**. 2016. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>>. Acesso em: 30 nov. 2017.

KARATZAS, C. N.; TURNER, J. D. Toward altering milk composition by genetic manipulation: current status and challenges. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 9, p. 2225-2232, 1997.

KOLLMANN, M. T.; LOCHER, M.; HIRCHE, F.; EDER, K.; MEYER, H.H.D; BRUCKMAIER, R. M. Effect of tryptophan supplementation on plasma-tryptophan and related hormone levels in heifers and dairy cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, p. 14-24, 2006.

LAVIALLE M.; CHAMPEIL-POTOKAR, G.; ALESSANDRI, J. M.; BALASSE, L.; GUESNET, P.; PAPILLON, C.; PÉVET, P.; VANCASSEL, S.; VIVIEN-ROELS, B.; DENIS, I. An (n-3) polyunsaturated fatty acid-deficient diet disturbs daily locomotor activity, melatonin rhythm, and striatal dopamine in Syrian hamsters. **Journal of Nutrition**, v. 138, n. 171924, 2008.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1986.

MAJEE, D. N.; SCHWAB, E. C.; BERTICS, S. J.; SEYMOUR, W. M.; SHAVER, R. D. Lactation performance by dairy cows fed supplemental biotin and a B-vitamin blend. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2106–2112, 2003.

MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. A intrigante bioquímica da niacina- Uma revisão crítica. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1739- 1752, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v34n10/v34n10a07.pdf>>. acesso em: 12 nov.2017.

MENDONÇA JÚNIOR, A. F.; BRAGA, A. P.; SANTOS, A. P. M. R.; SALES, L. E. M. Vitaminas: uma abordagem prática de uso na alimentação de ruminantes. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 6, n. 4, 2011.

MORTON, D. J.; JAMES, M. F. M. Effect of Magnesium Ions on Rat Pineal N-Acetyltransferase (EC 2. 3 1.5) Activity. **Journal of Pineal Research**, v. 2, n. 4, p. 387-391, 1985.

MORTON, D. J. Possible mechanisms of inhibition and activation of rat N-acetyltransferase (EC 2.3. 1.5.) by cations. **Journal of neural transmission**, v. 75, n. 1, p. 51-64, 1989.

MUÑOZ-HOYOS, A.; AMORÓS-RODRÍGUEZ, I.; MOLINA-CARBALLO, A.; UBEROS-FERNÁNDEZ, J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Pineal response after pyridoxine test in children. **Journal of Neural Transmission**, v. 103, p. 83-342, 1996.

MUTHURAMALINGAM, P.; KENNEDY, A. D.; BERRY, R. J. Plasma melatonin and insulin-like growth factor-1 responses to dim light at night in dairy heifers. **Journal of Pineal Research**, v. 40, n. 3, p. 225-229, 2006.

NIEHOFF, D.; HÜTHER, L.; LEBZIEN, P.; FLACHOWSKY, G. The effect of a niacin supplementation to different diets on ruminal fermentation and flow of nutrients to the duodenum of dairy cows. **Applied Agricultural Forestry Research**, v. 2, n. 63, p. 143-154, 2013.

PEUHKURI, K.; SIHVOLA, N.; KORPELA, R. Dietary factors and fluctuating levels of melatonin. **Food & Nutrition Research**, v. 56, n. 1, p. 17252, 2012.

RIBAS, N. P.; JUNIOR, P. R.; ANDRADE, U. V. C.; VALOTTO, A. A.; JESUS, C. P.; ALMEIDA, M. C. Escore de células somáticas e sua relação com os componentes do leite em amostras de tanque no estado do paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 19, n. 3, 2014.

RODRÍGUEZ, E. D.; GAYARRE, N. G.; CAÑEDO, M. V.; FERNÁNDEZ, B. M.; LÓPEZ, B. D. Efectos de la melatonina sobre el mantenimiento de parámetros corporales durante el envejecimiento. Estudio en *Rattus norvegicus*. **Revista Española de Geriátria y Gerontología**, v. 36, n. 5, p. 287-292, 2001.

SANTSCHI, D. E.; BERTHIAUME, R.; MATTE, J. J.; MUSTAFA, A. F.; GIRARD, C. L. Fate of supplementary B-vitamins in the gastro-intestinal tract of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2043–2054, 2005.

SCHERNHAMMER, E. S.; FESKANICH, D.; NIU, C.; DOPFEL, R.; HOLMES, M. D.; HANKINSON, S.E. Dietary correlates of urinary 6- sulfatoxymelatonin concentrations in the Nurses' Health Study cohorts. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, p. 97-585, 2009.

STATSOFT. 2013. Statistica (data analysis software system). Version 10.0.

TAGUCHI, V. **Boa noite, Cinderela: empresa faz leite para dormir**. Revista Globo Rural. 2012. Disponível em:<
<http://revistagloborural.globo.com/Revista/Common/0,,EMI311045-18080,00-BOA+NOITE+CINDERELA+EMPRESA+FAZ+LEITE+PARA+DORMIR.html>. Acesso em: 12 jan. 2018.

TAMURA, H.; NAKAMURA, Y.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L. C.; TAN, D. X.; SUGINO, N.; REITER, R. J. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertility and sterility**, v. 92, n. 1, p. 328-343, 2009.

VALTONEN, M.; KANGAS, A.P.; VOUTILAINEN, M. **Method for producing melatonin rich milk**. Patent Cooperation Treaty WO, v. 1, n. 01784, p. A1, 2001.

VALTONEN, M. A. I. J. A.; NISKANEN, L.; KANGAS, A. P.; KOSKINEN, T. E. U. V. O. Effect of melatonin-rich night-time milk on sleep and activity in elderly institutionalized subjects. **Nordic Journal of Psychiatry**, v. 59, n. 3, p. 217-221, 2005.

ZAOUALI-AJINA, M.; GHARIB, A.; DURAND, G.; GAZZAH, N.; CLAUSTRAT, B.; GHARIB, C.; SARDA, N. Dietary docosahexaenoic acid-enriched phospholipids

normalize urinary melatonin excretion in adult (n-3) polyunsaturated fatty acid-deficient rats. **Journal of Nutrition**, n. 129, n. 11, p. 2074-2080, 1999.

ZOCCAL, R. A força do agro e do leite no Brasil. **Revista Balde Branco**. 2017. Disponível em: < <http://www.baldebranco.com.br/forca-agro-e-leite-no-brasil/>>.

5 CONCLUSÃO GERAL

O leite é um alimento completo em nutrientes essenciais e outras proteínas importantes, como as precursoras do triptofano que favorecem a síntese de melatonina.

Devido aos benefícios da ingestão de produtos lácteos, o leite pode ser considerado um alimento de contribuição relevante para a ingestão de melatonina por meio da alimentação.

É possível elaborar estratégias para melhorar a concentração de melatonina no leite de vaca.

As coletas de leite de vaca nas primeiras horas da manhã (madrugada) favorecem ao aumento da concentração da melatonina no leite.