

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

USO DA METABOLÔMICA NA COMPREENSÃO DA  
DINÂMICA DO METABOLISMO RUMINAL DAS  
LIGNANAS *IN VIVO* E *IN VITRO*.

Autor: Jesus Alberto Cardozo Osorio  
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu Dos Santos  
Co-Orientador: Prof. Rodolpho Martin do Prado  
Co-Orientador: Profa. Adriana Gonela

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Fevereiro - 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

USO DA METABOLÔMICA NA COMPREENSÃO DA  
DINÂMICA DO METABOLISMO RUMINAL DAS  
LIGNANAS *IN VIVO* E *IN VITRO*.

Autor: Jesus Alberto Cardozo Osorio  
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu Dos Santos  
Co-Orientador: Prof. Rodolpho Martin do Prado  
Co-Orientador: Profa. Adriana Gonela

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Fevereiro - 2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)**

083u Osorio, Jesus Alberto Cardozo  
    Uso da metabolômica na compreensão da dinâmica do  
metabolismo ruminal das lignanas *in vivo* e *in vitro*  
/ Jesus Alberto Cardozo Osorio. -- Maringá, 2022.  
    xx, 166 f. : il. color., figs., tabs.

    Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos.  
    Coorientador: Prof. Dr. Rodolpho Martin do Prado.  
    Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Gonela.  
    Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento  
de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia, 2022.

    1. Lignanas. 2. Líquido ruminal. 3. Metabolômica  
direcionada. 4. Metabolômica não direcionada. 5.  
Vacas secas (Holandesa). I. Santos, Geraldo Tadeu  
dos, orient. II. Prado, Rodolpho Martin do,  
coorient. III. Gonela, Adriana, coorient. IV.  
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências  
Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia. V. Título.

CDD 21.ed. 636.224

Elaine Cristina Soares Lira - CRB-9/1202



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

USO DA METABOLÔMICA NA COMPREENSÃO  
DA DINÂMICA DO METABOLISMO RUMINAL DAS  
LIGNANAS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Autor: Jesus Alberto Cardozo Osorio  
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos

TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADO em 25 de fevereiro de 2022.

---

Prof. Dr. Eduardo Pilau

---

Prof. Dr. Luciano Soares de Lima

---

Dr. Cristiano Cortês

---

Dr. Thomer Durman

---

Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos  
Orientador

## EPÍGRAFE

“Se quisermos que a glória e o sucesso acompanhem nossas armas, jamais devemos perder de vista os seguintes fatores: a doutrina, o tempo, o espaço, o comando, a disciplina”

Sun Tzu

## DEDICATÓRIAS

À Deus, muita gratidão por permitir-me dar este grande passo na minha vida de ser Doutor, por guiar meu caminho no dia a dia dando-me força, consolando minhas tristezas e cuidar de minha família.

À minha mãe, Maria Adela Osorio Torres, por ser o motor de minhas conquistas, por apoiar meus sonhos, por escutar-me e guiar-me, pelos conselhos, ensinamentos e orações, e muita gratidão por ser uma mãe tão especial.

Aos meus irmãos, Diego Armando Cardozo Osorio, Juan Carlos Cardozo Osorio e Jhon Fredy Cardozo, pelo apoio, amor e amizade.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, por ter permitido realizar meu projeto de Doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, por toda orientação, por me conceder a oportunidade de aprimorar meus conhecimentos, pela amizade e pela confiança em mim depositada.

Ao professor Rodolpho Martin do Prado, pela co-orientação, pela ajuda e pelos conselhos para sempre superar as dificuldades que se apresentaram no dia a dia do meu doutorado.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UEM, pelos valiosos ensinamentos, especialmente ao professor João Daniel.

À professora Adriana Gonela, pela co-orientação, apoio e disposição para me ajudar.

Aos meus amigos Thomer Durman e Ana Carolina Vital, pela estruturada e execução do projeto, vocês dedicaram tempo, conhecimentos e esforços para me ajudar a tornar este trabalho realidade.

Ao Prof. Tiago del Valle pelos valiosos ensinamentos na área nutrição e estatística.

Ao Prof. Eduardo Jorge Pilau, pelos ensinamentos na área de metabolômica e proteômica e a parceria com as análises metabolômica não direcionada e proteômica.

Ao time da Empresa Matrix – LCMS, Thiago Magoon e Marília Galuch, pela parceria com as análises de metabolômica direcionada.

À professora Francilaine Eloise, pela colaboração no grupo de pesquisa e amizade.

Aos meus amigos e companheiros do grupo de pesquisa NUPEL Jakeline Fernandes Cabral, Micheli Regiani Sippert, Jean Carlos Steinmacher, Kleves Vieira de Almeida, Karol Guimarães, Monique Figueiredo e Rogério Aleson e os alunos de IC Beatriz e Regina. Sem vocês nada disso seria possível.

À PhD. Rafaela Takako Ribeiro de Almeida e à MSc. Daniele Maria Zanzarin pelos ensinamentos na área de metabolômica e a parceria com as análises.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi, em especial aos funcionários do Setor de Bovinocultura de Leite da FEI a Célio e Dú.

Aos meus amigos e família colombiana no Brasil, Sandra Díaz, Jessica Camargo, Maria Paula e Vicente Díaz, pelos momentos de descontrações e amizade.

Aos meus amigos brasileiros Lucas Maldona, Janaina Bragatto, Wesley Luar, Alex Bertolazzo e Ranulfo Combuca, pelos momentos de descontrações e amizade, aonde eu estiver vocês também terão um lugar para ficar.

Aos meus amigos da graduação, Andreina, Andres, Diana e Diego, obrigado por sempre se lembrar de mim apesar da distância e por me encorajar enquanto percorria este caminho que culminou hoje.

A todos àqueles que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho e com meu crescimento pessoal e acadêmico.



## **BIOGRAFIA**

JESUS ALBERTO CARDOZO OSORIO, filho de Maria Adela Osorio Torres e Armando Cardozo Gonzáles, nasceu em Dolores, Tolima, no dia 10 de maio de 1990.

Em fevereiro de 2008, iniciou o Curso de Graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia, na Fundación Universitaria San Martín, Bogotá – Colombia.

Em dezembro de 2013, foi graduado em Medicina Veterinária e Zootecnia, na Fundación Universitaria San Martín.

Em 2016, iniciou no mestrado em Produção Animal, sub-área de Nutrição de ruminantes da Pós-graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá.

Em fevereiro de 2018, submeteu-se à banca examinadora para defesa da dissertação.

Em 2018, iniciou no doutorado em Produção Animal, sub-área de Nutrição de ruminantes da Pós-graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá.

Em fevereiro de 2022, submeteu-se à banca examinadora para defesa da tese.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE SIGLAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xvii</b>
<b>PALAVRAS CHAVE .....</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xix</b>
<b>KEYWORDS .....</b>	<b>xix</b>
<b>I. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
<b>II.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1. Metabolismo de lignanas em ruminantes .....	21
1.1 Linhaça .....	23
1.2. Metabolismo de lignanas .....	23
1.3. Efeito da linhaça nos fluidos corporais dos ruminantes.....	27
2.Ômicas .....	29
2.1.Metabolômica .....	29
2.2 Coleta e extração da amostra .....	30
2.3 Análise instrumental.....	32
2.4 Processamento e análise de dados .....	34
Referencias.....	36
<b>III.OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>

Objetivos Gerais: .....	44
Objetivos específicos:.....	44
<b>IV – Uso da metabolômica na compreensão do metabolismo ruminal de lignanas da linhaça em vacas secas</b> .....	<b>45</b>
Resumo.....	45
Asbract.....	45
Introdução .....	46
Materiais e Métodos.....	47
Local, Instalações e Animais.....	47
Dietas experimentais .....	47
Extração líquido-líquido de metabólitos do líquido ruminal.....	48
Análise metabolômica direcionada.....	49
Análise metabolômica não-direcionada.....	50
Análise dos dados de metabolômica não-direcionada pelo GPNS.....	51
Resultados.....	53
Análise metabolômica direcionada.....	53
Análise metabolômica não-direcionada.....	54
Discussão.....	55
Conclusão.....	59
Declaração de disponibilidade de dados.....	59
Referencias.....	60
<b>V – Uso da metabolômica na compreensão do metabolismo ruminal <i>in vitro</i> de lignanas da linhaça</b> .....	<b>90</b>
Resumo .....	90
Asbract.....	91
Introdução .....	92
Materiais e Métodos .....	93
Local, Instalações e Animais .....	93
Dietas experimentais.....	93
Incubações .....	94
Extração líquido-líquido de metabólitos do líquido ruminal.....	96
Análise metabolômica direcionada.....	97
Análise metabolômica não-direcionada.....	97
Análise dos dados de metabolômica não-direcionada pelo GPNS.....	99

Resultados.....	101
Análise metabolômica direcionada.....	101
Análise metabolômica não-direcionada.....	101
Discussão.....	103
Conclusão.....	108
Declaração de disponibilidade de dados .....	109
Referencias.....	110

## LISTA DE TABELAS

<b>I. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
Tabela 1. Composição diferentes produtos da semente de linhaça.....	24
Tabela 2. Concentração de enterolactona no líquido ruminal, sangue, urina e leite em vacas leiteiras alimentadas com diferentes produtos da linhaça.....	28
<b>IV – Uso da metabolômica na compreensão do metabolismo ruminal de lignanas da linhaça em vacas secas .....</b>	<b>45</b>
Tabela 1. Proporção dos ingredientes e composição química das dietas sem e com inclusão de farelo de linhaça .....	48
Tabela 2. Condições empregadas para a determinação de SGD, SECO, enterodiol e enterolactona por UPLC-MS/MS .....	51
Tabela 3. Determinação de lignanas no líquido ruminal de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça .....	54
Tabela S1. Identificação, fórmula molecular, massa monoisotópica, m / z observada de íon e erro de metabólitos no líquido ruminal vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça .....	63
Tabela S2. Identificação e nome da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) dos metabólitos no líquido ruminal de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça .....	65
Tabela S3. Perfil de metabólitos identificados a partir do líquido ruminal de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça .....	67

<b>V – Uso da metabolômica na compreensão do metabolismo ruminal <i>in vitro</i> de lignanas da linhaça .....</b>	<b>90</b>
Tabela 1. Proporção dos ingredientes e composição química das dietas sem e com inclusão de farelo de linhaça .....	94
Tabela 2. Soluções de meio anaeróbio cultura para incubação.....	96
Tabela 3. Condições empregadas para a determinação de SGD, SECO, enterodiol e enterolactona por UPLC-MS/MS .....	98
Tabela 4. Determinação de lignanas em incubação <i>in vitro</i> de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça.....	102
Tabela S1. Identificação, fórmula molecular, massa monoisotópica, m / z observada de íon e erro de metabólitos da incubação <i>in vitro</i> de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça .....	114
Tabela S2. Identificação e nome da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) dos metabólitos da incubação <i>in vitro</i> de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça .....	117
Tabela S3. Perfil de metabólitos identificados a partir de incubação <i>in vitro</i> de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça .....	121

## LISTA DE FIGURAS

<b>I. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
Figura 1. Culturas puras selecionadas associadas à conversão de secoisolariciresinol diglucosídico (SDG) em secoisolariciresinol (SECO) e identificação taxonômica potencialmente associadas à produção de enterolactona no fluido ruminal.....	25
<b>IV – Uso da metabolômica na compreensão do metabolismo ruminal de lignanas da linhaça em vacas secas .....</b>	<b>45</b>
Figura 1. Esquema da coleta de líquido ruminal proveniente de 4 animais com ou sem adição de farelo de linhaça.....	49
Figura 2. Cromatogramas obtidos para os compostos secoisolariciresinol diglucosídico, secoisolariciresinol, enterodiol e enterolactona, empregados para a determinação por UPLC-MS/MS.....	51
Figura 3. Diagrama de Venn compilando características moleculares extraídas do líquido ruminal de vacas alimentadas sem farelo linhaça (LCFL) e sem farelo de linhaça (LSFL) nos tempos 0, 5 e 24h .....	55
Figura 4. Rede molecular (MN) gerada usando características moleculares extraídas do líquido ruminal de vacas alimentadas com farelo linhaça (LCFL) e sem farelo de linhaça (LSFL) nos tempos 0, 5 e 24h.....	56
Figura S1 – S21.....	<b>69</b>

<b>V – Uso da metabolômica na compreensão do metabolismo ruminal <i>in vitro</i> de lignanas da linhaça .....</b>	<b>85</b>
Figura 1. Esquema de incubação das culturas com ou sem adição de farelo de linhaça.....	95
Figura 2. Cromatogramas obtidos para os compostos secoisolariciresinol diglucosídeo, secoisolariciresinol, enterodiol e enterolactona, empregados para a determinação por UPLC-MS/MS.....	99
Figura 3. Diagrama de Venn compilando características moleculares extraídas das culturas 1 e 2 sem adição de FL (LSFL) e as culturas 3 e 4 com adição FL (LCFL) nos tempos 0, 5 e 24h.....	104
Figura 4. Rede molecular (MN) gerado usando características moleculares das amostras sem adição de FL (LSFL) e das amostras com adição FL (LCFL) no tempo 5 h.....	105
Figura 5. Rede molecular (MN) gerada usando características moleculares das amostras sem adição de FL (LSFL) e das amostras com adição FL (LCFL) no tempo 24h.....	106
Figura S1 – S48 .....	124



## LISTA DE SIGLAS

- ABO: Abomaso
- APCI: ionização química de pressão atmosférica
- APPI: Pressão atmosférica fotoionização
- CAT: Catalase
- CL: Casca de linhaça
- DBC: Delineamento Bloco Casualizado
- CON: Controle
- DBC: Delineamento Bloco Casualizado
- ED: Enterodiol
- EL: Enterolactona
- EM: Multiplicador de elétron
- ESI: ionização por electrospray
- FAB: bombardeio atômico rápido
- FDN: Fibra em detergente neutro
- FEI: Fazenda Experimental de Iguatemi
- FG: Farelo de girassol
- FL: Farelo de linhaça
- FM: Fubá de milho
- FS: Farelo de soja
- FTICR: Fourier cíclotron de íon de transformação

GC-MS: Do inglês, *gas chromatography-mass spectrometry*)

GNPS: Global Natural Products Social

GPX: Glutathione peroxidase

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

LC-MS (do inglês, *liquid chromatography-mass spectrometry*)

LCFL: Líquido ruminal de animais alimentados com farelo de linhaça

LIF: fluorescência induzida por laser

LLE: líquido-líquido

LSFL: líquido ruminal de animais alimentados sem farelo de linhaça

MAT: Matairesinol

MCP: Placas de microcanais

MHEND: 2-(3,4-dihydroxybenzyl)-3-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl) butane-1,4-diol

ML: Melão líquido

MN: Rede molecular

MON: Monensina

MS: Matéria Seca

MS<sup>1</sup>: Espectrometria de massa

MS<sup>2</sup>: Massa de fragmentação

NDT: Nutrientes digestíveis totais

N.E: Não estimado.

NMR: Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

OG: Óleo de girassol

OL: Óleo de linhaça

RUM: Rúmen

SDG-HMG: éster de hidroximetil glutaril

SIL: Semente inteira de linhaça

SLE: sólido-líquido

SOD: Superóxido dismutase

SPE: fase sólida

TOF: tempo de voo

UEM: Universidade Estadual de Maringá

UPLC-MS/MS: Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem

## RESUMO

Capítulo IV: Objetivou-se com o presente estudo compreender o metabolismo ruminal das lignanas em vacas secas alimentadas sem e com adição de farelo de linhaça por meio da metabolômica direcionada e da metabolômica não-direcionada. Quatro vacas secas da raça Holandesa canuladas no rúmen foram distribuídas em dois tratamentos (sem ou com adição de farelo de linhaça (FL)). No 25º dia de fornecimento do FL, amostras de líquido ruminal foram coletadas nos tempos 0 e 5 e 24h após alimentação, as quais foram submetidas a análises de metabolômica direcionada e não-direcionada. A metabolômica direcionada no líquido ruminal permitiu quantificar enterolactona (EL) no tempo de 0, 5 e 24 h de 0,04, 0,05 e 0,03 mg/L para o tratamento sem FL e 1,27, 2,70 e 0,04 mg/L para o tratamento com FL, e 0,15 mg/L enterodiol (ED) no tempo 5h no líquido com FL. Houve maior abundância de entidades químicas nas amostras dos animais que receberam FL, ao redor 1.436 (38,11% do total). Destes, seis entidades químicas observadas tiveram correspondência positiva com o banco de dados *Global Natural Products Social Molecular Networking* e bibliotecas públicas, sendo dois da classe das lignanas, dois da classe de ácidos carboxílicos e derivados, um da classe alcalóides de carbolina e um da classe nucleosídeos. A inclusão de FL na alimentação de vacas secas aumentou % EL no líquido ruminal, e o uso de metabolômica direcionada e não-direcionada sugere que os metabólitos produzidos a partir do FL pela microbiota ruminal é a enterolactona e enterodiol.

Capítulo V: A microbiota ruminal desempenha importante papel na conversão de lignanas vegetais em lignanas mamíferas. O objetivo com o presente estudo compreender o metabolismo ruminal das lignanas nas incubações das culturas *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça por meio de da metabolômica direcionada e da metabolômica não-direcionada. Quatro vacas Holandesas com cânula ruminal foram distribuídas em dois regimes de alimentação: duas vacas sem e duas vacas com adição de farelo de linhaça (FL) à dieta. Os animais foram alimentados com as respectivas dietas durante 21 dias, e foi realizada uma coleta do líquido ruminal no 21º dia. Foram preparados quatro conjuntos de incubações das culturas usando os líquidos ruminais e a adição ou não de FL ao meio de cultura Van Soest. Os tratamentos foram: 1) contendo líquido ruminal das vacas que não consumiram FL e sem adição de FL ao meio de cultura; 2) contendo líquido ruminal das vacas que não consumiram FL e com adição de FL ao

meio de cultura; 3) contendo líquido ruminal das vacas que consumiram FL e sem adição de FL ao meio de cultura; 4) contendo líquido ruminal das vacas que consumiram FL e com adição de FL ao meio de cultura. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 5 e 24h de cada cultura, extraídas com metanol, e submetidas a análises de metabolômica direcionada e não direcionada. Foram quantificados secoisolariciresinol diglucosídeo (SDG), secoisolariciresinol (SECO) e ED no líquido ruminal das vacas que não consumiram FL, e SDG, SECO, ED e EL no líquido ruminal das vacas que consumiram FL. Foram observadas 1351 entidades químicas nas culturas com e sem FL. A maior abundância de entidades químicas foi observada nas culturas com FL, no total de 1221 (90,37% do total). Destas, 44 foram identificadas como ácidos carboxílicos e derivados, ácidos graxos, lignanas, compostos orgânicos de oxigênio, ácidos cinâmicos e derivados, flavonóides, nucleosídeos, alcalóides e um metabólito intermediário da reação de conversão de SECO em ED (MHEND). As culturas sem FL não apresentaram lignanas vegetais e lignanas mamíferas por falta de substrato, as culturas com FL permitiu a quantificação de SDG, SECO, ED e EL, e os metabólitos produzidos a partir da lignanas vegetais do FL foram o ED e EL e outras entidades químicas como MHEND.

**Palavras-chave:** Lignanas, Líquido ruminal, metabolômica direcionada, metabolômica não-direcionada

## ABSTRACT

Chapter IV: The objective of the present study was to understand the ruminal metabolism of lignans in dry cows fed without and with the addition of flaxseed meal through targeted metabolomics and non-targeted metabolomics. Four dry Holstein cows with rumen fistulated were distributed in two treatments (with or without the addition of flaxseed meal (FM)). On the 25th day of FM supply, rumen fluid samples were collected at times 0 and 5 and 24 hours after feeding, which were submitted to targeted and non-targeted metabolomics analysis. Targeted metabolomics in rumen fluid allowed to quantify enterolactone (EL) at 0, 5 and 24 hours at 0.04, 0.05 and 0.03 mg/L for treatment without FL and 1.27, 2.70 and 0.04 mg/L for FM treatment, and 0.15 mg/L enterodiol (ED) at 5 hours' time in FM fluid. There was a greater abundance of chemical entities in the samples of animals that received FM, around 1436 (38.11% of the total). Of these, six chemical entities observed had positive correspondence with the Global Natural Products Social Molecular Networking database and public libraries, two from the lignan class, two from the carboxylic acids and derivatives class, one from the carboline alkaloid class and one from the nucleosides. The inclusion of FM in the dry cow feed increased % EL in the rumen fluid, and the use of targeted and untargeted metabolomics suggest that the metabolites produced from FM by the rumen microbiota are enterolactone and enterodiol.

Chapter IV: The ruminal microbiota plays an important role in the conversion of vegetative lignans into mammalian lignans. The objective of the present study was to understand the ruminal metabolism of lignans in the incubation of in vitro cultures of rumen fluid without and with the addition of flaxseed meal through targeted metabolomics and non-targeted metabolomics. Four Holstein cows with rumen fistulated were distributed in two feeding regimes: two cows without and two cows with addition of flaxseed meal (FM) to the diet. The animals were fed with their respective diets for 21 days, and rumen fluid was collected on the 21st day. Four sets of culture incubations were prepared using the rumen fluids and the addition or not of FM to the Van Soest culture medium. The treatments were: 1) Ruminal fluid from cows that did not consume FM and without addition of FM to the culture medium; 2) Ruminal fluid from cows that did not consume FM and with the addition of FM to the culture medium; 3) Ruminal fluid from

cows that consumed FM and without FM addition to the culture medium; 4) Ruminal fluid from cows that consumed FM and with the addition of FM to the culture medium. Samples were collected at times 0, 5 and 24 hours of each culture, extracted with methanol, and submitted to targeted and non-targeted metabolomics analysis. Secoisolariciresinol diglucoside (SDG), secoisolariciresinol (SECO) and enterodiol (ED) were quantified in the ruminal fluid of cows that did not consume FM, and SDG, SECO, ED and enterolactone (EL) in the ruminal fluid of cows that consumed FM. 1,351 chemical entities were observed in cultures with and without FM. The highest abundance of chemical entities was observed in cultures with FM, totaling 1,221 (90.37% of the total). Of these, 44 were identified as carboxylic acids and derivatives, fatty acids, lignans, organic oxygen compounds, cinnamic acids and derivatives, flavonoids, nucleosides, alkaloids and an intermediate metabolite of the SECO to ED conversion reaction (MHEND). Cultures without FM did not present the conversion of plant lignans to mammalian lignans due to lack of substrate, cultures with FM allowed the quantification of SDG, SECO, ED and EL, and the metabolites produced from plant lignans of FM are ED and EL and others chemical entities like MHEND.

**Keywords:** Lignans, Ruminal fluid, targeted metabolomics, non-targeted metabolomics.

## **I. REVISÃO DE LITERATURA**

### **II. INTRODUÇÃO**

#### **1. Metabolismo de lignanas em ruminantes**

Durante os últimos anos, as pesquisas em nutrição de ruminantes tiveram um amplo interesse no uso de alimentos com potencial antioxidativo. Objetiva-se com estas pesquisas minimizar efeitos oxidativos, proteger a qualidade do produto (carne e leite) e aumentar seu valor agregado. Dentro da grande variedade de antioxidantes disponíveis, as lignanas se destacam por serem antioxidante natural e facilmente obtidas nos grãos das oleaginosas e nos grãos dos cereais.

Estudos epidemiológicos e experimentais sugerem que as lignanas têm uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, antitumorais e imunomoduladoras ( Murkies et al., 1998; Liu et al., 2006;). O consumo de alimentos ricos em lignanas reduz o risco de câncer de mama (Mense et al., 2008), diminui a incidência de doenças cardiovasculares em humanos (Vanharanta et al., 1999) e previnem sintomas da menopausa por inibir enzimas envolvidas no metabolismo dos hormônios sexuais (Murkies et al., 1998).

As lignanas vegetais são um grupo de compostos polifenólicos, se apresentando como um conjugado de glicosídeos presentes nas plantas, principalmente em grãos de oleaginosas, e se destacam como a fonte mais rica de precursores de lignanas de mamíferos (Wang, 2002; Stopper et al., 2005). As lignanas de mamíferos são obtidas por meio da ação de enzimas microbianas, após a ingestão do alimento, através dos



precursores como são lignanas vegetais, as principais lignanas mamíferas são o enterodiol (2,3-bis(3- hidroxibenzil) butano-1,4-diol) e a enterolactona [trans- 2,3-bis (3- hidroxibenzil)- $\gamma$ -butirolactona] (Setchell et al., 1980). A enterolactona (EL) e o enterodiol (ED) são denominadas lignanas mamíferas ou enterolignanas por serem metabolizadas por microrganismos intestinais em humanos e monogástricos e por microrganismos do rúmen (Clavel et al., 2006; Côrtes et al., 2008; Raffaelli et al., 2002; Wang, 2002). A EL e o ED são considerados os dois mais importantes fitoestrógenos que compõem as lignanas mamíferas, pois são os mais recorrentes no soro, urina, bile e líquido seminal dos animais, já que cumprem a função antioxidante (Gagnon et al., 2009<sup>a</sup>; Saarinen et al., 2008).

Dentro das fonte de lignanas que se destacam na alimentação de ruminantes são grãos tais como: Grãos de centeio (*Secale cereale*), trigo (*Tritium aestivum*), cevada (*Hordeum vulgare*), linhaça (*Linum usitatissimum*), caju (*Anacardium occidentale*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), amendoim americano (*Apios americana*), amendoim (*Arachis hypogaea*), lentilhas (*Lens culinaris*), girassol (*Helianthus annuus*), gergelim (*Sesamum indicum*), papoula do ópio (*Papaver somniferum*) e soja (*Glycine max*) (Meagher e Beecher, 2000; Murphy e Hendrich, 2002).

A linhaça é a principal fonte das lignanas vegetais matairesinol (MAT) e secoisolariciresinol (SECO) provenientes das sementes e casca, além de ser uma rica fonte do ácido graxo poli-insaturado  $\alpha$ -linolênico (Glasser et al., 2008; Liu et al., 2006; Thompson et al., 1991). Ademais, se destaca como um fonte mais rica de secoisolariciresinol diglucosídeo (SDG), que representa mais de 95% de todas as suas lignanas, sendo encontrada principalmente na porção fibrosa da linhaça (Adlercreutz and Mazur, 1997; Liu et al., 2006).

Em ruminantes, a SDG é metabolizada por microrganismos do rúmen em enterolignanas (Côrtes et al., 2008; Gagnon et al., 2009a). A EL produzida no rúmen é excretada na urina, sangue e no leite, demonstrando que as enterolignanas podem ser transferidas para os fluidos corporais (Petit e Gagnon, 2009<sup>a</sup>). A concentração de EL varia de acordo com a inclusão do farelo e da casca de linhaça na dieta de vacas leiteiras (Petit et al., 2009; Petit e Gagnon, 2009<sup>a</sup>; Schogor et al., 2014). As concentrações de lignanas de mamíferos no leite podem resultar em benefícios para a saúde do animal (Do Prado et al., 2016).

Ademais, as lignanas da linhaça desempenham um papel importante no controle da hiperglicemia (Adolphe et al., 2010) e também podem exercer atividades antibacteriana, citotóxica e antiviral (Moujir et al., 2007; Rajesha et al., 2006).

### **1.1 Linhaça (*Linum usitatissimum*)**

A linhaça é a semente do linho (*Linum usitatissimum*), pertencente à família Linaceae. É uma planta nativa da Ásia, Europa e regiões mediterrâneas, sendo utilizada por milênios na alimentação humana. A composição química da semente de linhaça para os ruminantes, segundo BCNRM (2016), é de  $21,67 \pm 10,97$  (em % de MS) de proteína bruta,  $27,67 \pm 10,19$  (em % de MS) de extrato etéreo,  $31,84 \pm 7,21$  (em % de MS) de fibra em detergente neutro (FDN),  $18,94 \pm 5,31$  (em % de MS) de fibra em detergente ácido (FDA) e  $81,9 \pm 8,89$  (% de MS) de nutrientes digestíveis totais (NDT). Além disso, a semente tem vitaminas, minerais, ácidos graxos (especialmente o ácido  $\alpha$ -linolênico) e antioxidantes. A composição bromatológica da semente inteira, óleo e farelo de linhaça está apresentada na Tabela 1.

A semente inteira de linhaça é composta por lignanas, contendo cerca de 75 – 800 vezes mais que outros alimentos vegetais (Mazur et al., 1996). Além das lignanas, a linhaça possui outros compostos de interesse como fenilpropanóides, flavonóides, taninos (Kasote, 2013; Panaite et al., 2017), peptídeos cíclicos, glicosídeos cianogênicos, alcalóides, cádmio e polissacarídeos (Shim et al., 2014).

Na casca da semente de linhaça se encontra uma variedade de lignanas tais como SDG, SECO, isolariciresinol, pinoresinol e MAT, e todos esses compostos, exceto isolariciresinol, podem ser precursores do ED e da EL (Heinonen et al., 2001). As concentrações da SDG na semente e no farelo de linhaça variam, respectivamente, de 6,1-13,3 mg/g e 11,7-24,1 mg/g (Johnsson et al., 2000).

Uma importante lignana fitoestrogênica presente na semente de linhaça é o SECO, que existe principalmente em sua forma glicosilada, ou seja, está conjugado na forma do diglicosídeo SDG (Thompson et al., 1991). Este é armazenado como um complexo ligado ao éster de hidroximetil glutaril (SDG-HMG) (Ford et al., 2001) e ocorre de forma proeminente na camada fibrosa externa da semente (Adlercreutz e Mazur, 1997).

### **1.2 Metabolismo de lignanas**

Em ruminantes, os processos de conversão das lignanas da linhaça SDG, SECO, pinoresinol, lariciresinol e MAT ocorrem primeiro no rúmen, diferentemente de humanos

e monogástricos, onde esse processo é realizado pela microbiota intestinal. Para tanto, as lignanas vegetais sofrem diversas reações catalíticas: O-deglicosilação, O-demetilação, desidroxilação e desidrogenação (Figura 1), como as relatadas em humanos (Want et al., 2000; Clavel et al., 2006).

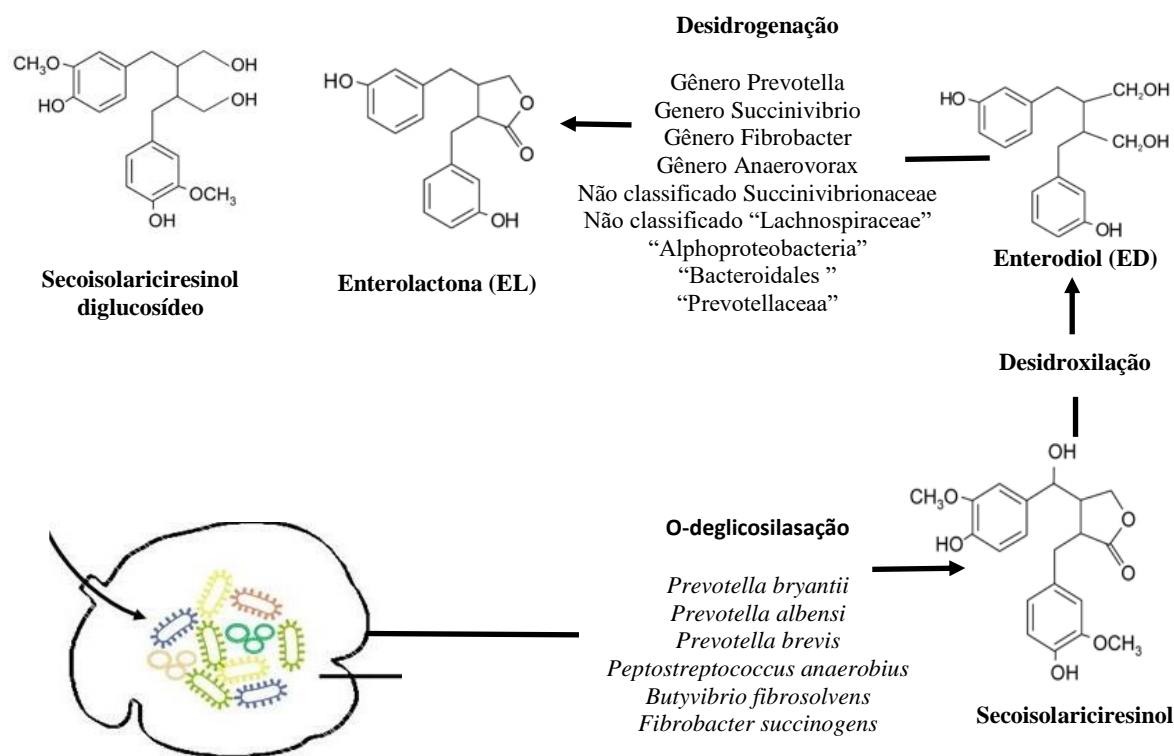
**Tabela 1. Composição diferentes produtos da semente de linhaça**

Item	Produtos Semente de linhaça		
	Semente Inteira	Óleo	Farelo
Matéria seca (g/100 g)	91,6 ± 1,9	99,8	90,5 ± 1,9
Proteína bruta (% MS)	21,7 ± 10,9	N,S	36,9 ± 5,2
Extrato etéreo (% MS)	27,7 ± 10,19	99,7	11,9 ± 12,1
Fibra em detergente neutro (% MS)	31,8 ± 7,21	N,S	32,10 ± 5,3
Fibra detergente ácido (% MS)	18,9 ± 5,3	N,S	17,3 ± 3,9
Nutrientes digestíveis totais (% MS)	81,9 ± 8,9	100	73,6 ± 7,6
C14:0 (ácido mirístico mg/g)	0,1	1	0,03
C16:0 (ácido palmítico mg/g)	18,5	66,6	4,9
C18:0 (ácido esteárico mg/g)	14,6	38,1	3,9
C18:1 (ácido oleico mg/g)	66,2	171,3	17,6
C18:2 (ácido linoleico mg/g)	48,3	152,3	12,9
C18:3 (ácido $\alpha$ -linolênico mg/g)	117	514,0	47,1
Lignanas (mg/g)	60- 75	N,S	35-70
SDG (mg/g)	6,1-13,3	N,S	11,7 – 24,1
SECO (mg/g)	0,37	N,S	3,7
Ácido ascórbico (mg/100 g)	0,34	N,S	N,S
Tiamina (mg/100 g)	0,53	N,S	N,S
Riboflavina (mg/100 g)	0,23	N,S	N,S
Niacina (mg/100 g)	3,21	N,S	N,S
Piridoxina (mg/100 g)	0,61	N,S	N,S
Ácido pantatênico (mg/100 g)	0,57	N,S	N,S
Ácido fólico (mg/100 g)	112,0	N,S	N,S
Biotina (mg/100 g)	6,0	N,S	N,S
$\alpha$ -tocoferol (mg/100 g)	7,0	N,S	N,S
$\delta$ -tocoferol (mg/100 g)	10,0	N,S	N,S
$\gamma$ -tocoferol (mg/100 g)	552,0	N,S	N,S
Cálcio (% MS)	0,31 ± 0,12	N,S	0,39 ± 0,09
Fósforo (% MS)	0,7 ± 0,2	N,S	0,88 ± 0,18
Magnésio (% MS)	0,45 ± 0,11	N,S	0,58 ± 0,10
Potássio (% MS)	0,94 ± 0,26	N,S	1,18 ± 0,22
Sódio (% MS)	0,06 ± 0,03	N,S	0,09 ± 0,06
Cloro (% MS)	0,09 ± 0,04	N,S	0,08 ± 0,03
Enxofre (% MS)	0,29 ± 0,07	N,S	0,38 ± 0,04
Cobalto (mg/kg)	0,71	N,S	N,S
Cobre (mg/kg)	0,09 ± 0,07	N,S	21,4 ± 0,04
Iodo (mg/kg)	N,S	N,S	N,S
Ferro (mg/kg)	109,6 ± 82,4	N,S	280,5 ± 52,6
Magnésio (mg/kg)	32,9 ± 9,4	N,S	50,7 ± 18,4
Molibdênio (mg/kg)	0,6	N,S	N,S
Selênio (mg/kg)	N,S	N,S	N,S
Zinco (mg/kg)	52,7 ± 14,7	N,S	73,9 ± 11,6

Adaptado de (Carraro et al., 2012; INRA, 2018; Johnsson et al., 2000; Kajla et al., 2015; Singh et al., 2011).

Em primeiro lugar, SDG passa por um processo de O-deglicosilação formando SECO. O próximo processo é O-demetilação de SECO, que resulta em um metabólito intermediário chamado 2,3-bis (3,4-dihidroxibenzil) -butano-1,4 diol, por meio da reação de conversão de SECO em ED. Posteriormente, ocorre um processo de desidroxilação, convertendo o composto ED, que é finalmente convertido em EL após uma desidrogenação da molécula de ED (Clavel et al., 2006; Wang et al., 2000).

Segundo Wang et al. (2000) os microrganismos envolvidos na O-deglicosilação de SDG para SECO pelo microbiota intestinal humana são: *Parabacteroides distasonis*, *Parabacteroides fragilis*, *Parabacteroides ovatus*, *Clostridium cocleatum*, *Clostridium ramosum* e *Clostridium saccharogumia*. Por outro lado, Clavel et al. (2006) relataram que a cepa *Clostridium* sp. SDGMt85-3Db tem uma alta taxa inicial de O-deglicosilação da SDG para SECO. Roncaglia et al. (2011) demonstraram que as culturas de bifidobactérias hidrolisam SDG para SECO, sendo as maiores taxas de conversão obtidas pela *Bifidobacterium pseudocatenulatum* WC 401.



**Figura 1.** Culturas puras selecionadas associadas à conversão de secoisolariciresinol diglicosídeo (SDG) em secoisolariciresinol (SECO) e identificação taxonômica potencialmente associadas à produção de enterolactona no fluido ruminal. Adaptado por Durman (2018) de Wang et al. (2000) e Schogor et al. (2014).

Schogor et al. (2014) avaliaram os efeitos da inclusão de 15% de farelo de linhaça (em % da MS) na dieta de vacas leiteiras sobre a microbiota ruminal e observaram que a *Prevotella* spp. (*Prevotella bryantii*, *Prevotella albensis*, *Prevotella ruminicola* e *Prevotella brevis*) apresentaram elevada atividade na conversão de SDG em SECO, bem como outras bactérias (*Peptostreptococcus anaerobius*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Fibrobacter succinogenes*). A *Ruminococcus albus*, *Eubacterium ruminantium*, *Butyrivibrio proteoclasticus* e *Ruminococcus flavefaciens* foram menos eficientes na conversão de SDG em comparação com as bactérias do gênero *Prevotella* sp.

A O-demetilação da SECO é produzida por bactérias intestinais, como *Butyribacterium methylotrophicum*, *Eubacterium callanderi*, *Eubacterium limosum*, *Ruminococcus productus* e *Peptostreptococcus productus*. As bactérias *Eubacterium limosum* e *Blautia producta* são capazes de catalisar esta conversão da O-demetilação do SECO a ED, por meio do intermediário 2,3-bis- (3,4-dihidroxi-benzil) butano-1,4-diol (Clavel et al., 2006; Jin et al., 2007). Os microrganismos também conseguem fazer a O-demetilação de outras lignanas vegetais como o pinoresinol, lariciresinol e MAT a vários compostos aromáticos, tendo como exemplo a bactéria *Peptostreptococcus productus*. Zhou et al. (2009) infundiram 1 mg de SDG por kg de peso corporal no rúmen de cabras e relataram um aumento no nível de SDG, ED e EL no fluido e no soro ruminal, onde identificaram a bactéria *Ruminococcus gnavus*, que também foi caracterizada em estudos de humanos. Esta bactéria tem a função de produzir enzima  $\beta$ -glucuronidase em humanos (Beaud et al., 2005).

O processo de desidroxilação (didemetil-SECO a ED) foi associado à atividade da *Eggerthella slow*, e a desidrogenação (ED a EL) foi atribuída à atividade do *Lactonifactor longoviformis*. Essas associações foram realizadas por Zhu et al. (2014) quando, conduzindo ensaios in vitro com bactérias intestinais humanas, observaram atividades de conversão de SDG em ED, para os *B. uniformis*, *Eubacterium limosum* e *Eggerthella slow*. Observaram ainda que a espécie *Eubacterium limosum* apresentava atividade de O-demetilação, enquanto *Eggerthella Slow*, possuía atividade de desidroxilação.

### 1.3 Efeito da linhaça nos fluidos corporais dos ruminantes

Até o ano de 2021 foram publicados 14 artigos que são encontrados na Tabela 2 avaliando as concentrações de EL no leite de vacas leiteiras alimentadas com diferentes

produtos da linhaça, dos quais seis (Gagnon et al., 2009; Petit et al., 2009b; Côrtes et al., 2013; De Marchi et al., 2016; Lima et al., 2016; Schogor et al., 2017) quantificaram EL no líquido ruminal, seis no sangue (Gagnon et al., 2009; Côrtes et al., 2012; Côrtes et al., 2013; De Marchi et al., 2016; Lima et al., 2016; Schogor et al., 2017) e cinco na urina (Gagnon et al., 2009; ; Côrtes et al., 2013; De Marchi et al., 2016; Lima et al., 2016; Schogor et al., 2017).

Três dos 14 artigos que avaliaram EL no leite apresentaram uma resposta linear, onde duas pesquisas utilizaram farelo de linhaça em uma inclusão de 0 %, 5 %, 10 % e 15 % (em base de MS) (Petit et al., 2009; Schogor et al., 2017) apresentando um aumento 110 % e 330 % a mais de EL para o tratamento de 15% comparado com o tratamento controle, respectivamente, para cada estudo. Petit e Gagnon (2011) avaliaram o uso da casca de linhaça em inclusão de 0 %, 5 %, 10 % e 20 % (em base de MS), encontrando um aumento 250% de EL no leite a mais comparado ao tratamento sem casca linhaça. A resposta relacionada ao aumento das concentrações de EL no leite relatada nas pesquisas anteriormente mencionadas deve-se ao fato que a casca e o farelo de linhaça têm maiores concentrações de SDG.

A semente inteira de linhaça tem menor concentração de SDG, porém Petit e Gagnon (2009b) encontraram uma tendência linear positiva com relação às concentrações de EL no leite quando foi incluída semente nas porcentagens de 0 %, 5 %, 10 % e 15 % (em base de MS). Segundo Schogor et al. (2017), a inclusão de 0 %, 5 %, 10 % e 15 % de farelo de linhaça (em base de MS) indicou haver uma resposta linear para EL produzida no rúmen e excreção via urina, sangue e no leite, indicando que os fitoestrógenos podem ser transferidos aos fluidos corporais.

O primeiro trabalho de pesquisa que ratificou essas hipóteses de encontrar EL nos fluidos corporais foi conduzido por Gagnon et al. (2009), aonde foi infundido óleo e casca de linhaça no rúmen e abomaso de vacas leiteiras. Cabe ressaltar o papel que desempenham as lignanas contra os radicais livres quando os animais sofrem estresse oxidativo severo, principalmente por apresentarem a capacidade de aumentar a capacidade antioxidante endógena do animal, que é composto pelas enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase (GPX) (Brito e Zang, 2019).

Tabela 2. Concentração de enterolactona no líquido ruminal, sangue, urina e leite em vacas leiteiras alimentadas com diferentes produtos da linhaça.

Referência	Número de Vaca	Delineamento experimental	Tratamento	Líquido ruminal	Sangue	Urina	Leite
Petit et al. (2009a)	24	DBC	CON, 10% FL e SIL	N.E	N.E	N.E	10% FL = 10% SIL > CON
Gagnon et al. (2009a)	4	QL 4 x 4	OL e CL ABO/ABO, RUM/ABO, RUM/RUM e ABO/RUM	ABO/ABO = RUM/ABO, RUM/RUM e ABO/RUM	ABO/ABO = RUM/ABO, RUM/RUM e ABO/RUM	RUM/RUM = ABO/RUM > ABO/ABO = RUM/ABO	RUM/RUM = ABO/RUM > ABO/ABO = RUM/ABO
Petit e Gagnon (2009a)	32	DBC	0%, 5%, 10% e 15% FL	N.E	N.E	N.E	Resposta Linear
Gagnon et al. (2009b)	12	DBC	COM e 20 % FL	N.E	N.E	N.E	20% FL > CON
Petit e Gagnon (2009b)	32	DBC	0%, 5%, 10% e 15% SIL	N.E	N.E	N.E	Tendencia Linear
Petit et al. (2009b)	4	QL 4 x 4	COM, 20% CL, MON e 20 CL + MON	20% CL = 20% CL + MON > CON = MON	N.E	N.E	20% CL = 20% CL + MON > CON = MON
Petit e Gagnon (2011)	45	DBC	0%, 5%, 10%, 15% e 20% CL	N.E	N.E	N.E	Resposta Linear
Côrtes et al. (2012)	8	QL 4 x 4	CON, 9,88% CL, 500 gr/d OL em ABO, 9,88 CL +500 gr/d OL em ABO	N.E	9,88% CL = 9,88 CL +500 gr/d OL em ABO > CON = 500 gr/d OL em ABO	N.E	9,88% CL = 9,88 CL +500 gr/d OL em ABO > 500 gr/d OL em ABO > CON
Côrtes et al. (2013)	6	QL 6 x 6	2 x 3 CL (0% e 15,9%) x OL (0, 250, 500 gr/d)	15,9 % CL > 0% CL	15,9 % CL > 0% CL	15,9 % CL > 0% CL	15,9 % CL > 0% CL
Brito et al. (2015)	16	QL 4 x 4	2 x 2: FM + Mis de 16% FS + FG, FM + 16% FS, ML + Mis de 16% FL + FG e ML + 16% FL	N.E	N.E	N.E	16 % FL > Mis de 16% FS + FG & ML > FM
De Marchi et al. (2016)	8	QL 4 x 4	2 x 2 Fatorial: CON ,13,7% FL, 250 gr/d OG em ABO, 13,7% FL + 250 gr/d OG em ABO	13,7 FL = 13,7% FL + 250 gr/d OG em ABO > CON = 250 gr/d em ABO	13,7 FL = 13,7% FL + 250 gr/d OG em ABO > CON = 250 gr/d em ABO	13,7 FL = 13,7% FL + 250 gr/d OG em ABO > CON = 250 gr/d em ABO	Sem Diferença
Lima et al. (2016)	8	QL 4 x 4	2 x 2 Fatorial: CON ,12,4% FL, 250 gr/d OG em ABO, 12,4% FL + 250 gr/d OG em ABO	12,4 FL = 12,4% FL + 250 gr/d OG em ABO > CON = 250 gr/d em ABO	12,4 FL = 12,4% FL + 250 gr/d OG em ABO > CON = 250 gr/d em ABO	12,4 FL = 12,4% FL + 250 gr/d OG em ABO > CON = 250 gr/d em ABO	12,4 FL = 12,4% FL + 250 gr/d OG em ABO > CON = 250 gr/d em ABO
Schogor et al. (2017)	8	QL 4 x 4	0%, 5%, 10% e 15% FL	Resposta Linear	Resposta Linear	Resposta Linear	Resposta Linear
Ghedini et al. (2018)	16	QL 4 x 4	Diferentes proporções de FM para LM (12: 0, 8: 4, 4: 8 e 0:12) + 15% FL	N.E	N.E	N.E	Tendencia Cúbica

Adaptado de Brito and Zang (2019) <sup>1</sup>DBC: Delineamento Bloco Casualizado; <sup>2</sup>Con: Controle; FL: Farelo de linhaça; SIL: Semente inteira de linhaça; OL: Óleo de linhaça; CL: Casca de linhaça; ABO: Abomaso; RUM: Rúmen; MON: Monensina; FM: Fubá de milho; ML: Melaço líquido; FS: Farelo de soja; FG: Farelo de girassol; OG: Óleo de girassol; N.E: Não estimado.

Segundo Lima et al., 2015), a inclusão de 12,4% de FL (farelo de linhaça) reduziu a atividade plasmática da CAT e tendeu a elevar a concentração CAT nos eritrócitos. Vale ressaltar que a CAT atua principalmente contra os radicais livres quando os animais sofrem estresse oxidativo severo. Segundo Côrtes et al. (2012) a suplementação de 9,8% de FL proporcionou uma tendência de aumento da atividade endógena da enzima SOD nos tecidos mamários. A SOD atua na reação de superóxidos altamente reativos para formar peróxidos menos reativos.

## 2. Ômicas

O sufixo “-ômica” é utilizado para abranger as novas técnicas de pesquisa, as quais são: genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica. Tais técnicas podem ser utilizadas para explicar a complexa relação entre um ruminante (hospedeiro) e sua microbiota (habitantes) (Denman et al., 2018).

A genômica consiste em estudos dos genes e suas funções com objetivo de conhecer a evolução e origem desta. A transcriptômica é o conjunto completo de transcritos de um dado organismo (Morgavi, 2012). A proteômica é o conjunto completo de proteínas codificado por um genoma (Wilkins et al., 2013). Finalmente, a metabolômica é o estudo dos metabólitos que interagem diretamente com as proteínas e/ou outras moléculas nas células, fluidos e tecidos (Goldansaz et al., 2017).

### 2.1 Metabolômica

O termo “metabolômica” foi introduzido nos anos 2000 por Dr. Oliver Fiehn e colaboradores (Fiehn et al., 2000a). O propósito da metabolômica é caracterizar e quantificar metabólitos para entender as interações entre os genes e o ambiente (Allen et al., 2003). Os metabólitos são os produtos finais de interações complexas que ocorrem dentro da célula (o genoma) e eventos, exposições ou fenômenos que ocorrem fora da célula ou organismo (o ambiente) (Goldansaz et al., 2017; Yang et al., 2019).

A metabolômica pode ser classificada conforme sua abordagem. Uma abordagem é a metabolômica direcionada (do inglês, *targeted metabolomics*), a qual quantifica grupos definidos de metabólitos quimicamente caracterizados e bioquimicamente anotados, ou que estejam associados a rotas metabólicas específicas (Roberts et al., 2012). Outra abordagem é a metabolômica não-direcionada (do inglês, *untargeted*



*metabolomics*), que é uma análise qualitativa e abrangente, permitindo avaliar o maior número de metabólitos desconhecidos de uma amostra, pertencentes a diversas classes químicas, contidas no sistema biológico em estudo (Dunn e Ellis, 2005).

Qualquer das duas abordagens utiliza metodologias e equipamentos específicos para caracterizar e quantificar os metabólitos. Segundo Barnes et al. (2016), a primeira etapa de um estudo metabolômico é aplicar um planejamento experimental criterioso. No caso metabolômica direcionada, a segunda etapa é a seleção de metabólitos; a terceira etapa é o preparo de amostra; a quarta etapa consiste na análise instrumental utilizando: espectrometria de massas ( $MS^1$ ), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) e fluorescência induzida por laser (LIF) (Dunn e Ellis, 2005; Yang et al., 2019); a quinta etapa é a aquisição dos dados (associação com metadados) e pré-processamento; a sexta etapa é a análise dos dados (estatística e quimiometria) e a interpretação dos resultados.

A diferença com a metabolômica não-direcionada é que não existe a segunda etapa de seleção de metabólitos, e entre a análise dos dados e a interpretação dos resultados encontramos uma etapa de identificação dos metabólitos (Roberts et al., 2012; Zhou et al., 2012). Segundo Goldansaz et al. (2017), dos 21 artigos em nutrição ruminantes na área metabolômica não direcionada publicados até 2017, 10 foram de bovinos, seis de ovinos e cinco de caprinos, dos quais sete exploraram o líquido ruminal em bovinos, um em ovinos e caprinos, identificando ao redor de 248 metabólitos utilizando MS e NMR .

### **2.3 Coleta e extração da amostra**

Em estudos de metabolômica no líquido ruminal a coleta é fundamental para comparação da identidade e quantidade dos metabólitos (Goldansaz et al., 2017). Logo após a coleta é necessário minimizar que reações metabólicas ocorrem. Para tal, pode-se usar uma etapa conhecida como *quenching* metabólico, que interrompe a atividade metabólica, geralmente via congelamento instantâneo utilizando nitrogênio líquido (congelamento por choque) (Álvarez-Sánchez et al., 2010). Interromper imediatamente o metabolismo através de congelamento evitará a degradação dos metabólitos ou variações em suas propriedades químicas ou físicas (Zhou et al., 2012).

O preparo das amostras é outra etapa importante, devendo ser cuidadosamente escolhido de acordo com o objetivo do trabalho de pesquisa. Em particular, os

procedimentos de extração para metabolômica alvo é extrações do tipo líquido-líquido (LLE), sólido-líquido (SLE), ou em fase sólida (SPE), com o objetivo de quantificar os analitos, remoção de interferentes e seleção das espécies de interesse (Barnes et al., 2016; De Almeida et al., 2018; Zhou et al., 2012).

A extração líquido-líquido é baseada na partição da amostra entre duas fases. A efetividade depende da polaridade do solvente e dos metabólitos, resultando em fases que contém por um lado os compostos polares e por outro lado compostos apolares (Zhou et al., 2012). A escolha do solvente deve considerar fatores tais como: o grau de pureza, possibilidade de gerar artefatos, facilidade de manuseio e o método de análise. Os metabólitos polares são extraídos por solventes tais como: isopropanol, etanol, metanol, metanol ácido, acetonitrila (Aharoni et al., 2002), água, ou misturas de metanol: água (Roessner et al., 2000). Os metabólitos apolares são principalmente extraídos por clorofórmio ou acetato de etila. Quando se utiliza uma mistura de solventes de extração polares e apolares gera-se uma amostra bifásica e o fracionamento dos metabólitos em frações polares aquosas e orgânicas lipofílicas, que podem ser analisadas separadamente (Colebatch et al., 2004; Fiehn et al., 2000b).

A extração em fase sólida (SPE) se tornou uma das mais importantes técnicas de preparação de amostras para extração e/ou pré-concentração de solutos de fluidos biológicos. É amplamente utilizada para a metabolômica direcionada e análises de perfis de metabólitos quando uma separação suficiente de analitos da matriz interferente é necessária (Altun, 2005; Dettmer et al., 2007). A SPE consiste na remoção de analitos contidos numa matriz aquosa, juntamente com os compostos interferentes após passarem por uma fase extratora. Normalmente, a amostra é colocada em cartuchos que têm um adsorvente sólido ou sorvente (Altun, 2005). Os analitos retidos na fase extratora, posteriormente são eluídos usando um solvente ou misturas de solventes com força de eluição suficiente (Andrade-Eiroa et al., 2016a, 2016b). Os solventes têm como objetivo a remoção de contaminantes orgânicos ou interferentes das amostras, e o solvente é usado para lavar os analitos de interesse.

Quando o objetivo é avaliar metabólitos voláteis por meio de GC-MS (do inglês, *gas chromatography-mass spectrometry*), o preparo da amostra é sem solvente, sendo frequentemente utilizado como método de escolha para a análise de metabólitos voláteis (Dettmer et al., 2007). Outra técnica de preparo de amostra para GC-MS são reações de derivatização (Vuckovic, 2013), que consiste modificar composto para gerar novos

produtos por meio de processos químicos, aumentando a volatilidade, estabilidade térmica e detectabilidade do analito ao ser analisado no GC-MS (Schummer et al., 2009).

## 2.4 Análise instrumental

Diferentes ferramentas foram desenvolvidas para análises instrumentais de diversos metabólitos, como objetivo aumentar o nível de separação, detecção, estabilidade, resolução, sensibilidade, velocidade e amplitude do intervalo dinâmico de detecção. Dentro das técnicas analíticas encontramos a LC-MS (do inglês, *liquid chromatography-mass spectrometry*), a GC-MS e a NMR que são amplamente empregadas nos estudos metabolômicos.

O método LC-MS é uma técnica sensível, podendo fornecer informações qualitativas e quantitativas, geralmente com pequenas quantidades de material, permitindo que um número muito maior de metabólitos que sejam detectado nos estudos de exploração do líquido ruminal (Goldansaz et al., 2017; Zhou et al., 2012). Este método tem capacidade de detectar milhares de íons de uma única amostra, gerando uma grande diversidade de metabólitos associados como amostras biológicas e microrganismo (Prado, 2018). A dificuldade do acoplamento do espectrômetro de massas a um método cromatográfico é o fluxo de eluente. Os novos cromatógrafos líquidos e colunas tem um baixo fluxo, diminuindo os problemas do acoplamento de cromatografia líquida de ultra desempenho (UPLC) (Dettmer et al., 2007). O UPLC-MS fornece picos cromatográficos estreitos, resultando não apenas em uma melhor resolução, mas também em limites de detecção mais baixos.

Um espectrômetro de massas é normalmente composto de três partes principais: fonte de íons, analisador de massa e detector. As fontes de íon podem ser: ionização por electrospray (ESI), ionização química de pressão atmosférica (APCI), pressão atmosférica fotoionização (APPI) e bombardeio atômico rápido (FAB) (Zhou et al., 2012). A fonte ionização mais utilizada é a ESI, onde o líquido, ao entrar no espectrômetro, recebe uma carga elétrica e é evaporado, levando a transferência de carga para as moléculas a serem analisadas. A ESI é uma fonte de ionização suave, no sentido que há muito pouca fragmentação, permitindo a formação de íons moleculares intactos que auxiliam na identificação inicial dos metabólitos (Banerjee e Mazumdar, 2012).

Os analisadores de massas podem ser categorizados como: quadrupolo, *ion trap*, tempo de voo (TOF), Orbitrap e Fourier ciclotron de íon de transformação (FTICR). Os espectrômetros de massa híbridos ou tandem referem-se à combinação de dois ou mais analisadores (Glish e Burinsky, 2008). Os modernos espectrômetros de massas de alta resolução, como FTICR, Orbitrap e TOF, podem fornecer medições de massa precisas para facilitar a identificação de metabólitos e fornecer quantificação mais precisa de metabólitos (Glish e Burinsky, 2008). Além de resolver íons por seus valores  $m/z$  e obter estimativas de suas massas moleculares, os analisadores de massa também podem auxiliar ainda mais na identificação do metabólito através da aquisição de espectros de MS / MS altamente resolvidos e precisos (Zhou et al., 2012).

Os detectores são considerados o cérebro de um espectrômetro de massas. Existem principalmente três tipos de detectores: detectores de íons, dinodos de conversão e detectores criogênicos chapas de fotográficas, detector Faraday, multiplicador de elétron (EM) e detectores de matriz (Medhe, 2018). Na atualidade, os detectores de íons baseados na multiplicação de elétrons são os mais utilizados, podendo ter várias geometrias diferentes. Na prática, na maioria dos instrumentos utilizados para o acoplamento LC-MS, em especial do tipo quadrupolo e *ion trap*, as EM apresentam uma boa razão entre custo e benefício, sendo as preferidas (Banerjee e Mazumdar, 2012).

O GC-MS é uma técnica amplamente utilizada para análises de compostos voláteis, apresenta uma alta robustez e repetibilidade, e menos sensível em comparação com LC-MS (Koek et al., 2011). No GC-MS os compostos polares requerem uma derivatização para que o grupo funcional possa reduzir a polaridade e aumentar a estabilidade térmica e a volatilidade (Dettmer et al., 2007). A derivatização forma compostos indesejados e pode introduzir erros por perdas por volatilização. As vantagens do GC-MS é que a identificação dos metabólitos está baseada nas informações de tempo de retenção e o padrão de fragmentação obtido, em decorrência da ionização por elétrons, permitindo desenvolver bibliotecas de compostos para identificação estrutural dos picos cromatográficos (Fiehn, 2016). Esta ferramenta permite identificar maior número de biomarcadores potenciais para a produção e qualidade do leite em ruminantes usando análises GC- tempo de voo/MS do fluido ruminal, leite, soro e urina (Sun et al., 2014).

No entanto, as placas de microcanais (MCP) que são outro tipo de detectores usados em MS de tempo de voo, por que o detector tem muitos canais separados, ele pode

fornecer resolução espacial adicional, aumentando a sensibilidade das análises (Medhe, 2018). No caso de um equipamento do tipo FTICR-MS, os íons aprisionados ou em ressonância são detectados pelas correntes que eles induzem em um par de placas de detecção em uma cela cúbica de ICR (Scigelova et al., 2011).

A NMR é uma técnica não destrutiva, não tendenciosa, facilmente quantificável, requer pouca ou nenhuma separação cromatográfica e permite a identificação de rotina de novos compostos. (Zhang et al., 2020). Em contrapartida, apresenta baixa sensibilidade e seletividade, apresentando regiões espectrais com sobreposição de sinais, comprometendo a interpretação dos resultados em comparação de GC-MS e LC-MS. Além disso, fornece uma preparação de amostra relativamente simples e quantificação de moléculas altamente reprodutíveis (Zhu et al., 2019). O NMR não se restringe às análises de biofluidos ou extrato de tecido, sendo adequada para a análise de vários metabólitos nos biofluidos de ruminantes. Entretanto é uma técnica relativamente menos sensível para identificar metabólitos do que LC-MS e GC-MS, mas é de alta quantificação de moléculas reprodutíveis como açúcares, ácidos orgânicos, álcoois, polióis e outros compostos altamente polares (Eom et al., 2021). Inúmeras pesquisas analisaram previamente os metabólitos em biofluidos de ruminantes (por exemplo, fluido ruminal, soro, leite e urina) usando espectroscopia de NMR e pela identificação e quantificação de metabólitos por meio de comparação de concentração (Goldansaz et al., 2017).

## 2.5 Processamento e análise de dados

Os dados gerados a partir das análises metabolômica são abundantes e de alta complexidade. Logo, é necessário usar ferramentas adequadas para tratamentos dos dados. Os experimentos que utilizam o modo tandem MS (MS/MS) (fragmentação molecular de íons) podem explorar extensivamente a desreplicação metabolômica, uma vez que os fragmentos gerados são características definitivas de uma molécula (Martin, 2018). A rede molecular (*Molecular networking*) dentro da plataforma web *Global Natural Products Social* (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>) se baseia no princípio de que estruturas semelhantes do modo tandem a formar padrões semelhantes em espectros de massa de fragmentação (MS<sup>2</sup>) (Schmid et al., 2020).

A introdução da ferramenta online GNPS, um repositório de conhecimento de origem coletiva e infraestrutura de análise, promove a captura de experiência em

espectrometria de massa da comunidade científica (Martin, 2018; Schmid et al., 2020). A rede molecular é construída por meio de comparações espectrais de pares de um conjunto de dados, criando uma rede espectral MS<sup>2</sup> (Schmid et al., 2020). Após a construção de redes moleculares de identidade de íons, os recursos compartilham conectividade com base na similaridade espectral de cosseno MS<sup>2</sup> e correlação de forma de recurso baseada em MS<sup>1</sup> (Schmid et al., 2021). Esta rede é então enriquecida anotando os espectros experimentais MS<sup>2</sup> contra bibliotecas espectrais MS<sup>2</sup> ou bancos de dados compostos (Schmid et al., 2020). Os resultados estão disponíveis nas interfaces da web do GNPS e como downloads em vários formatos abertos como tabelas e arquivos de rede para permitir a visualização, revisão e pós-processamento local (Schmid et al., 2021).

## Referências

- Adlercreutz, H., Mazur, W., 1997. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann. Med.* 29, 95–120. <https://doi.org/10.3109/07853899709113696>.
- Adolphe, J.L., Whiting, S.J., Juurlink, B.H.J., Thorpe, L.U., Alcorn, J., 2010. Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Br. J. Nutr.* 103, 929–938. <https://doi.org/10.1017/S0007114509992753>.
- Aharoni, A., De Vos, C.H.R., Verhoeven, H.A., Maliepaard, C.A., Kruppa, G., Bino, R., Goodenowe, D.B., 2002. Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry. *Omi. A J. Integr. Biol.* 6, 217–234. <https://doi.org/10.1089/15362310260256882>.
- Allen, J., Davey, H.M., Broadhurst, D., Heald, J.K., Rowland, J.J., Oliver, S.G., Kell, D.B., 2003. High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat. Biotechnol.* 21, 692–696. <https://doi.org/10.1038/nbt823>
- Altun, Z., 2005. *New Techniques for Sample Preparation in Analytical Chemistry*.
- Álvarez-Sánchez, B., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D., 2010. Metabolomics analysis I. Selection of biological samples and practical aspects preceding sample preparation. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 29, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.003>.
- Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., Cerdà, V., 2016a. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80, 641–654. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>.
- Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., Cerdà, V., 2016b. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80, 655–667. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.014>.
- Banerjee, S., Mazumdar, S., 2012. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Environ Anal Chem.* 2012, 40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- Barnes, S., Benton, H.P., Casazza, K., Cooper, S.J., Cui, X., Du, X., Engler, J., Kabarowski, J.H., Li, S., Pathmasiri, W., Prasain, J.K., Renfrow, M.B., Tiwari, H.K., Genetics, M., Jolla, L., 2016. Training in metabolomics research. II. Processing and statistical analysis of metabolomics data, metabolite identification, pathway analysis, applications of metabolomics and its future. *J Mass Spectrom.* 51, 535–548. <https://doi.org/10.1002/jms.3782>.
- Beaud, D., Tailliez, P., Aba-Mondoloni, J., 2005. Genetic characterization of the  $\beta$ -glucuronidase enzyme from a human intestinal bacterium *Ruminococcus gnavus*. *Microbiology* 151, 2323–2330. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27712-0>.
- Brito, A.F., Petit, H. V., Pereira, A.B.D., Soder, K.J., Ross, S., 2015. Interactions of corn meal or molasses with a soybean-sunflower meal mix or flaxseed meal on production, milk fatty acid composition, and nutrient utilization in dairy cows fed

- grass hay-based diets. *J. Dairy Sci.* 98, 443–457. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8353>.
- Brito, A.F., Zang, Y., 2019. A review of lignan metabolism, milk enterolactone concentration, and antioxidant status of dairy cows fed flaxseed. *Molecules* 24, 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules24010041>.
- Carraro, J.C.C., de Souza Dantas, M.I., Espeschit, A.C.R., Martino, H.S.D., Ribeiro, S.M.R., 2012. Flaxseed and Human Health: Reviewing Benefits and Adverse Effects. *Food Rev. Int.* 28, 203–230. <https://doi.org/10.1080/87559129.2011.595025>.
- Clavel, T., Borrmann, D., Braune, A., Doré, J., Blaut, M., 2006. Occurrence and activity of human intestinal bacteria involved in the conversion of dietary lignans. *Anaerobe* 12, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2005.11.002>.
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., Kopka, J., Udvardi, M.K., 2004. Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *Plant J.* 39, 487–512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02150.x>.
- Côrtés, C., Da Silva-Kazama, D., Kazama, R., Benchaar, C., Dos Santos, G., Zeoula, L.M., Gagnon, N., Petit, H. V., 2013. Effects of abomasal infusion of flaxseed (*Linum usitatissimum*) oil on microbial  $\beta$ -glucuronidase activity and concentration of the mammalian lignan enterolactone in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Br. J. Nutr.* 109, 433–440. <https://doi.org/10.1017/S0007114512001341>.
- Côrtés, C., Gagnon, N., Benchaar, C., Da Silva, D., Santos, G.T.D., Petit, H. V., 2008. In vitro metabolism of flax lignans by ruminal and faecal microbiota of dairy cows. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1585–1594. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03922>.
- Côrtés, C., Palin, M.F., Gagnon, N., Benchaar, C., Lacasse, P., Petit, H. V., 2012. Mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes and concentration of the mammalian lignan enterolactone in milk and plasma of dairy cows fed flax lignans and infused with flax oil in the abomasum. *Br. J. Nutr.* 108, 1390–1398. <https://doi.org/10.1017/S0007114511006829>.
- De Almeida RTR, do Prado RM, Porto C, Dos Santos GT, Huws SA, Pilau EJ., 2018. Exploring the rumen fluid metabolome using liquid mass spectrometry and Molecular Networking. *Scientific reports.* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36196-4>.
- De Marchi, F.E., Palin, M.F., Santos, G.T., Benchaar, C., Petit, H. V., 2016. Effects of duodenal infusion of sunflower oil on  $\beta$ -glucuronidase activity and enterolactone concentration in dairy cows fed flax meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 220, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.08.002>.
- Denman, S. E., Morgavi, D. P. & Mcsweeney, C. S., 2018. Review : The application of omics to rumen microbiota function. *animal.* 12, 233–245. [doi:10.1017/S175173111800229X](https://doi.org/10.1017/S175173111800229X).
- Dettmer, K., Aronov, P.A., Hammock, B.D., 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* 26, 51–78. <https://doi.org/10.1002/mas.20108>.
- Do Prado, R.M., Palin, M.F., do Prado, I.N., dos Santos, G.T., Benchaar, C., Petit, H. V.,



2016. Milk yield, milk composition, and hepatic lipid metabolism in transition dairy cows fed flaxseed or linola. *J. Dairy Sci.* 99, 8831–8846. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11003>.
- Do Prado, R. M., Porto, C., Nunes, E., de Aguiar, C. L., Pilau, E. J., 2018. Metabolomics and agriculture: what can be done?. *Msystems.* 3, 156-17.. <https://doi:10.1128/mSystems.00156-17>. eCollection Mar-Apr 2018.
- Dunn, W.B., Ellis, D.I., 2005. *Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies* 24. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>.
- Durman, Thomer. "Prospecção por enzimas da microbiota ruminal capazes de aumentar a capacidade antioxidante." (2018): 125-125.
- Eom, J.S., Kim, E.T., Kim, H.S., Choi, Y.Y., Lee, S.J., Lee, Sang Suk, Kim, S.H., Lee, Sung Sill, 2021. Metabolomics comparison of rumen fluid and milk in dairy cattle using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Animal bioscience.* 34, 213–222.
- Fiehn, O., 2016. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology.* 114, 1-30–32. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>.
- Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R.N., Willmitzer, L., 2000a. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat. Biotechnol.* 18, 1157–1161. <https://doi.org/10.1038/81137>.
- Fiehn, O., Kopka, J., Trethewey, R.N., Willmitzer, L., 2000b. Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chem.* 72, 3573–3580. <https://doi.org/10.1021/ac991142i>.
- Ford, J.D., Huang, K.S., Wang, H.B., Davin, L.B., Lewis, N.G., 2001. Biosynthetic pathway to the cancer chemopreventive secoisolariciresinol diglucoside - Hydroxymethyl glutaryl ester-linked lignan oligomers in flax (*Linum usitatissimum*) seed. *J. Nat. Prod.* 64, 1388–1397. <https://doi.org/10.1021/np010367x>.
- Gagnon, N., Côrtes, C., Da Silva, D., Kazama, R., Benchaar, C., Dos Santos, G., Zeoula, L., Petit, H. V., 2009a. Ruminal metabolism of flaxseed (*Linum usitatissimum*) lignans to the mammalian lignan enterolactone and its concentration in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Br. J. Nutr.* 102, 1015–1023. <https://doi.org/10.1017/S0007114509344104>.
- Gagnon, N., Côrtes, C., Petit, H. V., 2009b. Weekly excretion of the mammalian lignan enterolactone in milk of dairy cows fed flaxseed meal. *J. Dairy Res.* 76, 455–458. <https://doi.org/10.1017/S0022029909990082>.
- Ghedini, C.P., Moura, D.C., Santana, R.A.V., Oliveira, A.S., Brito, A.F., 2018. Replacing ground corn with incremental amounts of liquid molasses does not change milk enterolactone but decreases production in dairy cows fed flaxseed meal. *J. Dairy Sci.* 101, 2096–2109. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13689>.
- Glasser, F., Ferlay, A., Chilliard, Y., 2008. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 91, 4687–4703. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-0987>.

- Glish, G.L., Burinsky, D.J., 2008. Hybrid Mass Spectrometers for Tandem Mass Spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry* 19, 161-172. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.11.013>
- Goldansaz, S.A., Guo, A.C., Sajed, T., Steele, M.A., Plastow, S., Wishart, D.S., 2017. Livestock metabolomics and the livestock metabolome : A systematic review 1–26. *PloS one*, 12(5), e0177675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177675>.
- Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., Wähälä, K., Deyama, T., Nishibe, S., Adlercreutz, H., 2001. In vitro metabolism of plant lignans: New precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3178–3186. <https://doi.org/10.1021/jf010038a>.
- INRA, Feeding System for Ruminants, (2018), Wageningen Academic Publishers, 640.
- Jin, J.S., Kakiuchi, N., Hattori, M., 2007. Enantioselective oxidation of enterodiol to enterolactone by human intestinal bacteria. *Biol. Pharm. Bull.* 30, 2204–2206. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.2204>.
- Johnsson, P., Kamal-Eldin, A., Lundgren, L.N., Man, P.A., 2000. HPLC Method for Analysis of Secoisolariciresinol Diglucoside in Flaxseeds. *J Agric Food Chem.* 48, 5216-5219. <https://doi.org/10.1021/jf0005871>.
- Kajla, P., Sharma, A., Sood, D.R., 2015. Flaxseed—a potential functional food source. *J. Food Sci. Technol.* 52, 1857–1871. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1293-y>.
- Kasote, D.M., 2013. Flaxseed phenolics as natural antioxidants. *Int. Food Res. J.* 20, 27–34.
- Koek, M.M., Jellema, R.H., van der Greef, J., Tas, A.C., Hankemeier, T., 2011. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: Status and perspectives. *Metabolomics.* 7, 307–328. <https://doi.org/10.1007/s11306-010-0254-3>.
- Lima, L.S., Palin, M.F., Santos, G.T., Benchaar, C., Petit, H. V., 2016. Dietary flax meal and abomasal infusion of flax oil on microbial  $\beta$ -glucuronidase activity and concentration of enterolactone in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 215, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.03.006>.
- Lima, L.S., Palin, M.F., Santos, G.T., Benchaar, C., Petit, H. V., 2015. Effects of supplementation of flax meal and flax oil on mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes in mammary tissue, plasma and erythrocytes of dairy cows. *Livest. Sci.* 176, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.03.015>.
- Liu, Z., Saarinen, N.M., Thompson, L.U., 2006. Sesamin is one of the major precursors of mammalian lignans in sesame seed (*Sesamum indicum*) as observed in vitro and in rats. *J. Nutr.* 136, 906–912. <https://doi.org/10.1093/jn/136.4.906>.
- Matumoto-Pintro, P.T., Petit, H. V., Giroux, H.J., Côrtes, C., Gagnon, N., Britten, M., 2011. Effect of flaxseed lignans added to milk or fed to cows on oxidative degradation of dairy beverages enriched with polyunsaturated fatty acids. *J. Dairy Res.* 78, 111–117. <https://doi.org/10.1017/S0022029910000853>.
- Mazur, W., Fotsis, T., Wähälä, K., Ojala, S., Salakka, A., Adlercreutz, H., 1996. Isotope dilution gas chromatographic - Mass spectrometric method for the determination of

- isoflavonoids, coumestrol, and lignans in food samples. *Anal. Biochem.* 233, 169–180. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0025>.
- Meagher, L.P., Beecher, G.R., 2000. Assessment of Data on the Lignan Content of Foods. *J. Food Compos. Anal.* 13, 935–947. <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0932>.
- Medhe, S., 2018. Mass Spectrometry : Detectors Review. *Chem Biomol Eng.* 3, 51-58. <https://doi.org/10.11648/j.cbe.20180304.11>.
- Morgavi, D.P., 2012. Rumen microbial ( meta ) genomics and its application to ruminant production. *Animal.* 7, 184-201. <https://doi.org/10.1017/S1751731112000419>.
- Moujir, L., Seca, A.M.L., Silva, A.M.S., López, M.R., Padilla, N., Cavaleiro, J.A.S., Neto, C.P., 2007. Cytotoxic activity of lignans from *Hibiscus cannabinus*. *Fitoterapia* 78, 385–387. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.03.010>.
- Murkies, a L., Wilcox, G., Davis, S.R., 1998. Clinical review 92: Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 297–303. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.2.4577>.
- Murphy, P.A., Hendrich, S., 2002. Phytoestrogens in foods, *Advances in Food and Nutrition Research.* [https://doi.org/10.1016/s1043-4526\(02\)44005-3](https://doi.org/10.1016/s1043-4526(02)44005-3).
- Nutrient Requirements of Beef Cattle. 2016: Eighth Revised Edition. The National Academies Press, Washington, DC. <https://doi.org/10.17226/19014>.
- Panaite, T., Ropota, M., Turcu, R., Olteanu, M., Corbu, A.R., Nour, V., 2017. Flaxseeds: Nutritional Potential and Bioactive Compounds. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca. Food Sci. Technol.* 74, 65. <https://doi.org/10.15835/buasvmcnfst:0016>.
- Petit, H el ene V., C ortes, C., Da Silva, D., Kazama, R., Gagnon, N., Benchaar, C., Dos Santos, G.T., Zeoula, L.M., 2009b. The interaction of monensin and flaxseed hulls on ruminal and milk concentration of the mammalian lignan enterolactone in late-lactating dairy cows. *J. Dairy Res.* 76, 475–482. <https://doi.org/10.1017/S0022029909990215>.
- Petit, H. V., Gagnon, N., 2009a. Milk concentrations of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol, milk production, and whole tract digestibility of dairy cows fed diets containing different concentrations of flaxseed meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 152, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.04.004>.
- Petit, H. V., Gagnon, N., 2009b. Concentration of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol in milk of cows fed diets containing different concentrations of whole flaxseed. *Animal* 3, 1428–1435. <https://doi.org/10.1017/S1751731109990346>.
- Petit, H el ene V., Gagnon, N., Mir, P.S., Cao, R., Cui, S., 2009. Milk concentration of the mammalian lignan enterolactone, milk production, milk fatty acid profile, and digestibility in dairy cows fed diets containing whole flaxseed or flaxseed meal. *J. Dairy Res.* 76, 257–264. <https://doi.org/10.1017/S0022029909003999>.
- Petit, H. V, Gagnon, N., 2011. Production performance and milk composition of dairy cows fed different concentrations of flax hulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 169, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.05.008>.
- Raffaelli, B., Hoikkala, A., Lepp al a, E., W ah al a, K., 2002. Enterolignans. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 777, 29–43.

0232(02)00092-2.

- Rajasha, J., Murthy, K.N.C., Kumar, M.K., Madhusudhan, B., Ravishankar, G.A., 2006. Antioxidant potentials of flaxseed by in vivo model. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3794–3799. <https://doi.org/10.1021/jf053048a>.
- Roberts, L.D., Souza, A.L., Gerszten, R.E., Clish, C.B., 2012. Targeted metabolomics. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 1, 1–24. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3002s98>.
- Roncaglia, L., Amaretti, A., Raimondi, S., Leonardi, A., Rossi, M., 2011. Role of bifidobacteria in the activation of the lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 159–168. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3338-8>.
- Saarinen, N.M., Power, K.A., Chen, J., Thompson, L.U., 2008. Lignans are accessible to human breast cancer xenografts in athymic mice. *Nutr. Cancer* 60, 245–250. <https://doi.org/10.1080/01635580701649669>.
- Schmid, R., Petras, D., Nothias, L., Wang, M., Aron, A.T., 2020. Ion Identity Molecular Networking in the GNPS Environment. *Nature communications*, 12, 1-12.
- Schmid, R., Petras, D., Nothias, L., Wang, M., Aron, A.T., Jagels, A., Tsugawa, H., Rainer, J., Garcia-aloy, M., Dührkop, K., Korf, A., Pluskal, T., Jarmusch, A.K., Caraballo-rodríguez, A.M., Weldon, K.C., Nothias-esposito, M., Aksenov, A.A., Bauermeister, A., Orio, A.A., Grundmann, C.O., Vargas, F., Koester, I., Gauglitz, J.M., Gentry, E.C., Hövelmann, Y., Kalinina, S.A., Pendergraft, M.A., Panitchpakdi, M., Tehan, R., Gouellec, A. Le, Aleti, G., Russo, H.M., Arndt, B., Hübner, F., Hayen, H., Zhi, H., Raffatellu, M., Prather, K.A., Aluwihare, L.I., 2021. environment. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23953-9>.
- Schogor, A.L.B., Huws, S.A., Santos, G.T.D., Scollan, N.D., Hauck, B.D., Winters, A.L., Kim, E.J., Petit, H. V., 2014. Ruminant *Prevotella* spp. may play an important role in the conversion of plant lignans into human health beneficial antioxidants. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087949>
- Schogor, A.L.B., Palin, M.F., Santos, G.T., Benchaar, C., Petit, H. V., 2017.  $\beta$ -glucuronidase activity and enterolactone concentration in ruminal fluid, plasma, urine, and milk of Holstein cows fed increased levels of flax (*Linum usitatissimum*) meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 223, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.11.004>.
- Schummer, C., Delhomme, O., Appenzeller, B.M.R., Wennig, R., Millet, M., 2009. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta* 77, 1473–1482. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.043>.
- Scigelova, M., Hornshaw, M., Giannakopoulos, A., Makarov, A., 2011. Fourier Transform Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 10, 1–19. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009431>
- Setchell, K.D.R., Lawson, A.M., Mitchell, F.L., Adlercreutz, H., Kirk, D.N., Axelson, M., 1980. Lignans in man and in animal species. *Nature.* 287, 740–742. <https://doi.org/10.1038/287740a0>.
- Shim, Y.Y., Gui, B., Arnison, P.G., Wang, Y., Reaney, M.J.T., 2014. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 38, 5–20. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.03.011>.

- Singh, K.K., Mridula, D., Rehal, J., Barnwal, P., 2011. Flaxseed: A potential source of food, feed and fiber. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 210–222. <https://doi.org/10.1080/10408390903537241>
- Stopper, H., Schmitt, E., Kobras, K., 2005. Genotoxicity of phytoestrogens. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 574, 139–155. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.01.029>.
- Sun, H., Wang, D., Wang, B., Wang, J., Liu, H., Guan, L.L., Liu, J., 2014. Metabolomics of Four Bio fluids from Dairy Cows: Potential Biomarkers for Milk Production and Quality. *J. Proteome Res.* 14, 1287–1298. <https://doi.org/10.1021/pr501305g>.
- Thompson, L.U., Robb, P., Serraino, M., Cheung, F., 1991. Mammalian Lignan Production From Various Foods. *Nutr. Cancer* 16, 43–52. <https://doi.org/10.1080/01635589109514139>.
- Vanharanta, M., Voutilainen, S., Lakka, T.A., Van Der Lee, M., Adlercreutz, H., Salonen, J.T., 1999. Risk of acute coronary events according to serum concentrations of enterolactone: A prospective population-based case-control study. *Lancet.* 354, 2112–2115. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)05031-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)05031-X),
- Vuckovic, D., 2013. Sample Preparation in Global Metabolomics of Biological Fluids and Tissues. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery.* Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394446-7.00004-2>
- Wang, L.-Q., Meselhy, M.R., Li, Y., Qin, G.-W., Hattori, M., 2000. Human Intestinal Bacteria Capable of Transforming Secoisolariciresinol Diglucoside to Mammalian Lignans, Enterodiol and Enterolactone. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 48, 1606–1610. <https://doi.org/10.1248/cpb.48.1606>.
- Wang, L.Q., 2002. Mammalian phytoestrogens: Enterodiol and enterolactone. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 777, 289–309. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00281-7](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00281-7).
- Wilkins, M.R., Sanchez, J., Gooley, A., Appel, R.D., Humphery-smith, I., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L., 2013. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews Progress with Proteome Projects : Why all Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How To Do It. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 13, 19–50. <https://doi.org/10.1080/02648725.1996.10647923>.
- Yang, Q., Zhang, A.H., Miao, J.H., Sun, H., Han, Y., Yan, G.L., Wu, F.F., Wang, X.J., 2019. Metabolomics biotechnology, applications, and future trends: A systematic review. *RSC Adv.* 9, 37245–37257. <https://doi.org/10.1039/c9ra06697g>.
- Zhang, X.W., Li, Q.H., Xu, Z. Di, Dou, J.J., 2020. Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: A systematic review. *RSC Adv.* 10, 3092–3104. <https://doi.org/10.1039/c9ra08985c>.
- Zhou, B., Xiao, J.F., Tuli, L., Resson, H.W., 2012. LC-MS-based metabolomics. *Mol. Biosyst.* 8, 470–481. <https://doi.org/10.1039/c1mb05350g>.
- Zhou, W., Wang, G., Han, Z., Yao, W., Zhu, W., 2009. Metabolism of flaxseed lignans in the rumen and its impact on ruminal metabolism and flora. *Anim. Feed Sci. Technol.* 150, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.07.006>.
- Zhu, C., Li, C., Wang, Y., Laghi, L., 2019. Characterization of yak common biofluids

metabolome by means of proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. Metabolites 9. <https://doi.org/10.3390/metabo9030041>.

### III OBJETIVOS

#### Objetivos Gerais:

Compreender o metabolismo ruminal das lignanas *in vivo* e *in vitro* e *invitro* por meio da metabolômica direcionada e da metabolômica não-direcionada.

#### Objetivos específicos:

Capítulo IV: Compreender o metabolismo ruminal das lignanas em vacas secas alimentadas sem e com adição de farelo de linhaça por meio da metabolômica direcionada e da metabolômica não-direcionada.

Capítulo V: Compreender o metabolismo ruminal das lignanas nas incubações das culturas *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça por meio de da metabolômica direcionada e da metabolômica não-direcionada.

#### **IV. Uso da metabolômica na compreensão do metabolismo ruminal de lignanas da linhaça em vacas secas**

Use of metabolomics to understand the ruminal metabolism of linseed lignans in dry cows  
(Scientific reports)

##### **Resumo**

Objetivou-se com o presente estudo compreender o metabolismo ruminal das lignanas em vacas secas alimentadas sem e com adição de farelo de linhaça por meio da metabolômica direcionada e da metabolômica não-direcionada. Quatro vacas secas da raça Holandesa canuladas no rúmen foram distribuídas em dois tratamentos (sem ou com adição de farelo de linhaça (FL)). No 25º dia de fornecimento do FL, amostras de líquido ruminal foram coletadas nos tempos 0 e 5 e 24h após alimentação, as quais foram submetidas a análises de metabolômica direcionada e não-direcionada. A metabolômica direcionada no líquido ruminal permitiu quantificar enterolactona (EL) no tempo de 0, 5 e 24h de 0,04, 0,05 e 0,03 mg/L para o tratamento sem FL e 1,27, 2,70 e 0,04 mg/L para o tratamento com FL, e 0,15 mg/L enterodiol (ED) no tempo 5h no líquido com FL. Houve maior abundância de entidades químicas nas amostras dos animais que receberam FL, ao redor 1.436 (38,11% do total). Destes, seis entidades químicas observadas tiveram correspondência positiva com o banco de dados *Global Natural Products Social Molecular Networking* e bibliotecas públicas, sendo dois da classe das lignanas, dois da classe de ácidos carboxílicos e derivados, um da classe alcalóides de carbolina e um da classe nucleosídeos. A inclusão de FL na alimentação de vacas secas aumentou EL no líquido ruminal, e o uso de metabolômica direcionada e não-direcionada sugere que os metabólitos produzidos a partir do FL pela microbiota ruminal é a enterolactona e o enterodiol.

##### **Abstract**

The objective of the present study is to understand the ruminal metabolism of lignans in dry cows fed without and with the addition of flaxseed meal through targeted metabolomics and non-targeted metabolomics. Four dry Holstein cows with rumen fistulated were distributed in two treatments (with or without the addition of flaxseed meal (FM)). On the 25th day of FM supply, rumen fluid samples were collected at times 0 and 5 and 24 h after feeding, which were submitted to targeted and non-targeted



metabolomics analysis. Targeted metabolomics in rumen fluid allowed to quantify enterolactone (EL) at 0, 5 and 24 hours at 0.04, 0.05 and 0.03 mg/L for treatment without FL and 1.27, 2.70 and 0.04 mg/L for FM treatment, and 0.15 mg/L enterodiol (ED) at 5 hours' time in FM fluid. There was a greater abundance of chemical entities in the samples of animals that received FM, around 1436 (38.11% of the total). Of these, six chemical entities observed had positive correspondence with the Global Natural Products Social Molecular Networking database and public libraries, two from the lignan class, two from the carboxylic acids and derivatives class, one from the carboline alkaloid class and one from the nucleosides. The inclusion of FM in the dry cow feed increased EL in the rumen fluid, and the use of targeted and untargeted metabolomics suggest that the metabolites produced from FM by the rumen microbiota are enterolactone and enterodiol.

## **Introdução**

Nos últimos anos, os consumidores preocupados com a saúde estão procurando produtos com compostos nutracêuticos. No que tange ao leite, os consumidores têm exigido melhorias da qualidade do mesmo, especialmente nos ácidos graxos poli-insaturados, ácidos linoleicos conjugados, fitoestrogênios e antioxidantes<sup>1,2</sup>. Para aumentar compostos nutracêuticos no leite, pode-se fornecer fontes de alimentos que tenham potencial antioxidativo que podem ser transferidos ao leite<sup>3,4</sup>.

A linhaça é uma fonte de antioxidantes pela presença de lignanas, as quais fazem parte de uma classe de antioxidantes naturais<sup>5</sup>. A linhaça é a fonte mais rica de lignanas vegetais, como o secoisolariciresinol diglucosídeo (SDG), o secoisolariciresinol (SECO) e matairesinol. O SDG representa mais de 95% de todas as lignanas da linhaça<sup>6,7</sup>. Os microrganismos do rúmen modificam as lignanas vegetais em lignanas mamíferas, também conhecidas como enterolignanas: a enterolactona (EL) e o enterodiol (ED)<sup>8,9</sup> que atuarão positivamente, protegendo o organismo do animal.

Compreender a transformação de lignanas vegetais em lignanas mamíferas é fundamental para explorar fonte de lignanas que se destacam na alimentação de ruminantes, e tenham um potencial na transferência de antioxidantes. Um exemplo são as lignanas vegetais que são convertidas no rúmen a EL e ED, e posteriormente transferidas nos fluídos como são a urina e leite de vacas alimentadas com linhaça<sup>10-13</sup>. Estudos demonstraram que a absorção de EL e ED ocorre no rúmen ou no intestino delgado<sup>14,15</sup> e

que subsequentemente, são absorvidas e passam por circulação entero-hepática<sup>16</sup>, para serem excretadas na urina ou no leite<sup>8,1</sup>.

Atualmente, para entender os mecanismos de conversão de antioxidante pode-se utilizar estratégias como as técnicas ômicas, objetivando explicar a relação entre um ruminante (hospedeiro) e sua microbiota (habitantes)<sup>17</sup>. Uma técnica interessante é a metabolômica, que permite o estudo dos metabólitos que interagem diretamente com as proteínas e/ou outras moléculas nas células, fluidos e tecidos<sup>18</sup>. A metabolômica tem duas abordagens: a metabolômica direcionada; e a metabolômica não-direcionada<sup>19,20</sup>. A metabolômica direcionada quantifica metabólitos, previamente conhecidos<sup>19</sup> e a metabolômica não-direcionada identifica os metabólitos presentes na amostra<sup>20</sup>.

Neste estudo foi usado a metabolômica direcionada e não-direcionada na quantificação e identificação do metabolismo das lignanas no líquido ruminal de vacas alimentadas sem e com de farelo de linhaça.

## **Materiais e Métodos,**

### ***Local, Instalações e Animais***

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) do Departamento de Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), no mês de novembro/2018 e aprovado pelo comitê de ética animal (no. 5668221018) da UEM. Foram utilizadas quatro vacas secas da raça Holandesa canuladas no rúmen, com peso médio de 504±45 kg. Os animais foram alimentados às 07h e 15h para ingestão *ad libitum* e foram alojados em baias individuais do tipo “*tie-stall*” com livre acesso a água limpa.

### ***Dietas experimentais***

Os animais foram distribuídos em dois tratamentos: dieta sem adição de FL; e dieta com adição de FL. As dietas experimentais foram compostas por silagem de milho (65%) e concentrado (35%), composto milho moído fino, farelo de soja, casquinha de soja, calcário calcítico suplemento mineral e vitamínico. Os animais foram alimentados com as respectivas dietas durante 24 dias, a dieta com FL tinha como objetivo elevar a quantidade de microrganismos com afinidade para degradar FL.

Para estimativa do consumo foram feitas pesagens das quantidades do volumoso e concentrado fornecidos e das sobras de cada tratamento, diariamente. Foi realizado ajuste do fornecimento da dieta com base no consumo de matéria seca no dia anterior, de

forma a ser mantido um percentual de sobras, entre 5 e 10% da matéria natural fornecida, para que não houvesse limitação de consumo. O balanceamento das rações foi feito de forma a obter uma dieta isoprotéica e isoenergética, atendendo as exigências das vacas em seca conforme preconizado pelo NRC (2001; Tabela 1).

Tabela 1. Proporção dos ingredientes e composição química das dietas sem e com inclusão de farelo de linhaça

Item <sup>1</sup>	Sem farelo de linhaça	Com farelo de linhaça
<b>Ingrediente (g/kg de MS)</b>		
Silagem de milho	650,0	650,0
Milho moído fino	159,8	159,3
Farelo de soja	103,0	0
Farelo de linhaça	0	174,7
Casquinha de soja	71,2	0
Suplemento mineral e vitaminico <sup>2</sup>	8,0	8,0
Calcário calcítico	8,0	8,0
<b>Nutrientes</b>		
Matéria seca (g/kg de MN)	394,4	397,7
Matéria orgânica (g/kg de MS)	943,4	942,1
Proteína bruta (g/kg de MS)	120,0	120,0
Extrato etéreo (g/kg de MS)	29,7	29,3
Fibra em detergente neutro (g/kg de MS)	416,2	418,3
Carboidratos não fibrosos (g/kg de MS)	375,5	371,1

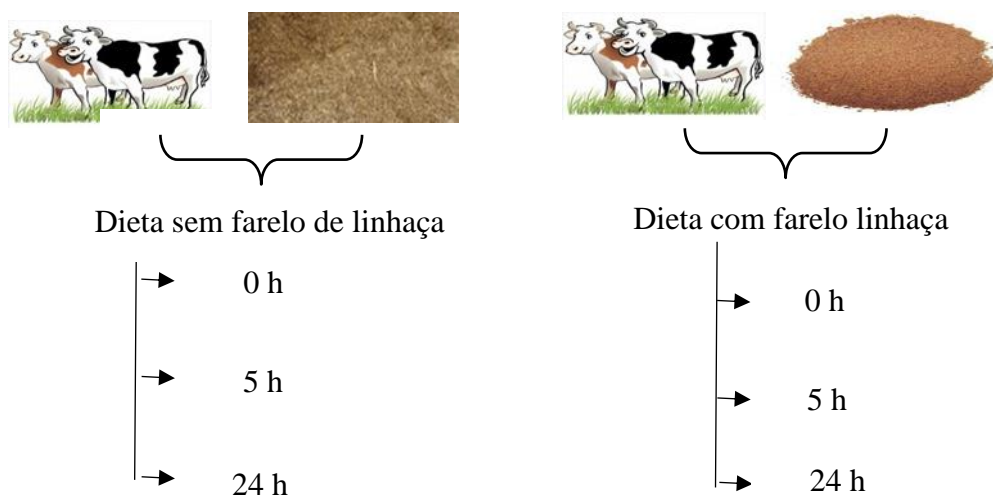
<sup>1</sup>MS= matéria seca; MN= matéria natural.

Foi realizada uma coleta do líquido ruminal no 25º dia do estudo em três momentos: logo após a alimentação matinal; 5 h, e 24 h após alimentação (Figura 1). O líquido ruminal foi centrifugado a 800 g por 15 min, sendo recolhido o sobrenadante. Este foi centrifugado novamente a 12.000 g por 12 min. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi armazenado a -80 °C.

#### ***Extração líquido-líquido de metabólitos do fluido ruminal***

O sobrenadante do líquido ruminal foi descongelado a temperatura de 4 °C. e centrifugado a 12.000 g por 15 min, filtrado em membrana Durapore de 0,45 µm PVDF com diâmetro de 47 mm; e posteriormente filtrado em membrana Durapore de 0,22 µm PVDF com diâmetro de 47 mm. O material foi diluído na razão 1:1 em metanol, e centrifugado por 4.300 g x 10 min, e novamente diluído 1:20 para análises de

metabolômica direcionada. Para as análises de metabolômica não-direcionada, o material extraído foi diluído 2:1 em metanol e centrifugado por 12.000 g x 10 minutos. Subsequentemente, o sobrenadante do ruminal diluído foi filtrado em membrana de 0,22 PVDF Analítica® com diâmetro de 13 mm.



**Figura 1.** Esquema da coleta de líquido ruminal proveniente de 4 animais com ou sem adição de farelo de linhaça.

### ***Metabolômica direcionada***

Padrões analíticos de secoisolariciresinol diglucosídeo (SDG) ( $\geq 97\%$ ), secoisolariciresinol (SECO) ( $\geq 95\%$ ), enterodiol ( $\geq 95\%$ ) e enterolactona ( $\geq 95\%$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Metanol grau HPLC (J.T. Baker), água ultrapura obtida pelo sistema Gehaka, e ácido fórmico (J.T. Baker) foram empregados para as quantificações por UPLC-MS/MS. Soluções estoque dos padrões ( $10 \text{ mg L}^{-1}$  de SDG,  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de SECO e  $2 \text{ mg L}^{-1}$  enterodiol em metanol, e enterolactona  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , em água) foram preparadas e armazenadas  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . As curvas analíticas foram preparadas utilizando líquido ruminal, empregando-se 11 pontos em triplicata, envolvendo as faixas de concentração: a) de  $1,95$  a  $2.000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para SDG, enterolactona e enterodiol; b) de  $4,88$  a  $5.000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para SECO. As amostras de líquido ruminal foram adequadamente diluídas a fim de que as áreas encontradas estivessem contidas dentro da faixa de concentração das curvas analíticas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo com fonte de ionização por *electrospray* (ACQUITY UPLC – ACQUITY TQD, Waters). Como condições

cromatográficas, empregou-se a eluição por gradiente, utilizando os solventes: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente empregado envolveu as etapas: 10% de B, de 0 a 0,3 min; de 10% a 90% de B, de 0,3 a 8,0 min; de 90% a 10% de B, de 8,0 a 8,5 min); mantendo 10% B de 8,5 a 13,0 min para equilibrar a coluna cromatográfica com a condição inicial do gradiente. Como fluxo de fase móvel, empregou-se 0,15 mL min<sup>-1</sup>. Utilizou-se uma coluna de fase reversa ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS C18 (2,1 x 100 mm, 1,8 µm) em temperatura de 35 °C, e volume de injeção de 2 µL.

No espectrômetro de massas, a fonte de ionização operou em modo negativo (ESI), empregando-se as condições MS/MS: temperatura da fonte de 120 °C, voltagem do capilar de 3,0 kV e temperatura de dessolvatação de 300 °C. Um gerador de nitrogênio (N<sub>2</sub>) de elevado grau de pureza (PeakScientific<sup>®</sup>) foi utilizado, a fim de gerar N<sub>2</sub> empregado como gás de dessolvatação, em fluxo de 800 L h<sup>-1</sup>, e também empregado como *cone gás*, em fluxo de 30 L h<sup>-1</sup>. Argônio (100 % pureza, marca Air liquide), utilizado com o gás de colisão, foi empregado em fluxo de 0,12 mL/min. As voltagens do cone empregadas para os compostos SDG, SECO, enterodiol e enterolactona, bem como as energias de colisão empregadas para seus respectivos fragmentos, estão apresentados na Tabela 2. Os cromatogramas de cada transição de quantificação estão apresentados na Figura 2.

#### ***Metabolômica não-direcionada:***

Para a análise de metabolômica não-direcionada, os extratos foram analisados usando um cromatógrafo líquido de ultra-alto desempenho (Shimadzu, Nexera X2, Japão) acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução quadrupolo híbrido com tempo de voo (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização por “*electrospray*”. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna de fase reversa ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS C18 (2,1 x 100 mm, 1,8 µm) (Waters, Reino Unido), a uma taxa de fluxo de 0,2 mL min<sup>-1</sup>. A mistura de gradiente de solventes A (H<sub>2</sub>O com 0,1% de ácido fórmico; v:v) e B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico; v:v) foi a seguinte: 5% B 0-1 min, 50% B 1-5 min, 95% B 5–10 min, mantido a 95% B 10–16 min, 5% B 16–18 min, e mantido a 5% B 18–21 min a 40 °C. A tensão capilar foi operada nos modos de ionização positivo e negativo, fixados em 4.500 e 3.000 V, respectivamente; com um potencial de definição da placa final de -500 V. Os parâmetros do gás seco foram ajustados para 8 L min<sup>-1</sup> a 180 °C com uma pressão do gás de nebulização de 4 bar. Os

dados foram coletados de  $m/z$  50 a 1.300 com uma taxa de aquisição de 5 Hz, e os 4 íons de interesse foram selecionados por fragmentação de varredura de MS / MS automática.

**Tabela 2.** Condições empregadas para a determinação de SGD, SECO, enterodiol e enterolactona por UPLC-MS/MS

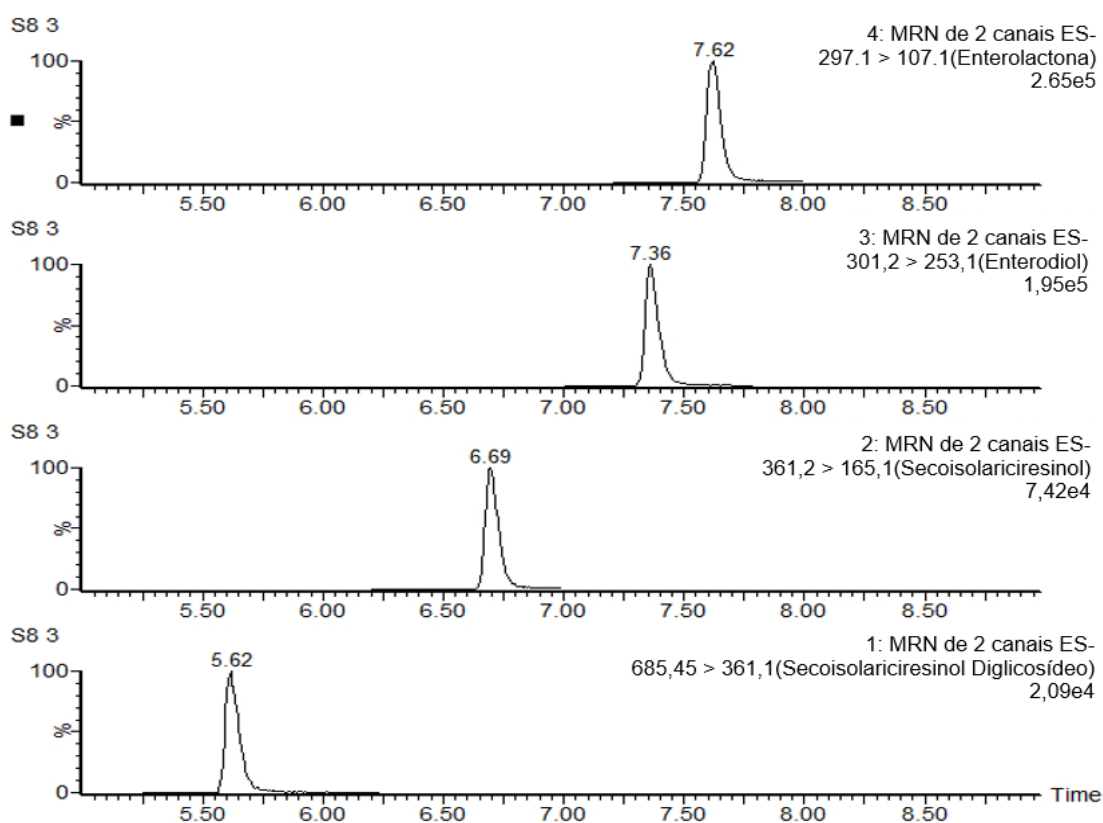
Compostos	Massa monoisotópica	Cone (V)	Transição SRM <sup>1</sup>	Energia de colisão (V)	Tempo de retenção (min)	Janela de aquisição (min)	
SDG	686,2786	70	6,85 → 361,1 <sup>2</sup>	5,62	5,25 - 6,25		
			6,85 → 523,3 <sup>3</sup>				30
			361,2 →				25
SECO	362,1729	45	165,1 <sup>2</sup> → 361,2	6,69	6,20 - 7,00		
			346,2 <sup>3</sup> → 301,2				20
			253,1 <sup>2</sup> → 301,2				21
Enterodiol	302,1518	40	271,3 <sup>3</sup> → 297,1	7,36	7,00 - 7,80		
			107,1 <sup>2</sup> → 297,1				22
			107,1 <sup>2</sup> → 253,13 <sup>3</sup>				20
Enterolactona	298,1205	45	107,1 <sup>2</sup> → 297,1	7,61	7,20 - 8,00		
			107,1 <sup>2</sup> → 253,13 <sup>3</sup>				20
			253,13 <sup>3</sup>				

<sup>1</sup> Monitoramento de reação única; <sup>2</sup>Transição de quantificação; <sup>3</sup> Transição de confirmação.

A abordagem de rede molecular exigia a conversão de dados brutos de espectrometria de massa em arquivo mzXML formato seguido de upload para o Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) para gerar a rede molecular (MN), de acordo com as diretrizes da GNPS <sup>21</sup>. Foram comparados os tratamentos do líquido ruminal das vacas secas alimentadas com farelo de linhaça vs sem farelo de linhaça nos tempos 0, 5 e 24 h.

A rede molecular foi criada usando o fluxo de trabalho online (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Os dados foram filtrados removendo todos os íons de fragmento de MS / MS dentro de +/- 17 Da

do precursor  $m/z$ . Os espectros de MS / MS foram filtrados por janela, escolhendo apenas os 6 íons de fragmento superiores na janela +/- 50 Da em todo o espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi fixada em 2,0 Da e uma tolerância de fragmento de íon MS / MS de 0,5 Da. A rede foi então criada onde as bordas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,65 e mais de 5 picos correspondentes.



**Figura 2.** Cromatogramas obtidos para os compostos secoisolariciresinol diglicosídeo, secoisolariciresinol, enterodiol e enterolactona, empregados para a determinação por UPLC-MS/MS.

Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca deveriam ter uma pontuação acima de 0,7 e pelo menos 6 picos correspondidos. A abordagem GNPS consiste em comparar espectros de fragmentação (experimentos de MS/MS) e agrupar moléculas com estruturas químicas semelhantes.

Cada espectro é representado como um nó no MN visual, e os alinhamentos espectro a espectro são representados como linhas que se conectam nós, evidenciando

íons que estão correlacionados uns com os outros. A comunicação entre os nodos está relacionada a semelhanças nos espectros de fragmentação entre os íons, e a semelhança entre os padrões de fragmentação são avaliados via relação vetorial. Moléculas estruturalmente relacionadas exibem padrões de fragmentação semelhantes. Portanto, as famílias moleculares tendem a se unir em grupos no MN, chamados de *clusters*. Além disso, é possível determinar a diferença de  $m/z$  entre os nodos, definindo a proximidade espectral entre todos os espectros MS/MS em um conjunto de dados. Esta ferramenta permite a comparação de características moleculares com a biblioteca espectral GNPS e todos os dados disponíveis publicamente. A rede molecular foi visualizada usando o Cytoscape<sup>22</sup>. Metabólitos com correspondência positiva com a biblioteca GNPS tinham íons pai e fragmento manualmente comparados com a biblioteca espectral GNPS e dados disponíveis publicamente (Figuras suplementares S01 – S21). O erro de massa foi inferior a 10 ppm (Tabela suplementar S1). Um diagrama de Venn foi construído no Microsoft Excel a partir de dados de características moleculares exportados usando GNPS (Figura. 3).

## **Resultados**

### ***Metabolômica direcionada***

De acordo com a análise metabolômica direcionada, não foram detectadas as lignanas vegetais no líquido ruminal de vacas alimentadas com 17,5% de FL (com base na MS; Tabela 3). Entretanto, a EL foi detectada no líquido ruminal nos três momentos de coleta, tanto para as vacas alimentadas com ou sem FL. Mesmo quando não foi adicionado FL às dietas das vacas, houve detecção de EL para os tempos 0, 5 e 24h de 0,04, 0,05 e 0,03 mg/L, respectivamente. Quando as vacas foram alimentadas com FL, houve detecção no líquido ruminal de EL para os tempos 0, 5 e 24h de 1,27, 2,70 e 0,04 mg/L respectivamente, aumentando em 96,%, 98,1% e 25% a quantidade EL no líquido ruminal com FL em comparação ao líquido ruminal sem FL. O ED foi detectado no líquido ruminal no tempo 5h para o tratamento com FL de 0,15 mg/L.

### ***Metabolômica não-direcionada***

Os dados de metabolômica não-direcionada, tanto no modo positivo quanto negativo, em ambos os tratamentos, e nos três tempos de coleta do líquido ruminal resultaram em 3.647 entidades químicas. Estes foram utilizados para gerar um diagrama de Venn (Figura. 3). Das 3.647 entidades químicas, 21 foram anotadas usando



correspondências moleculares publicamente disponíveis (Tabelas S1 e S2), o que representa 0,57 % das entidades químicas observadas.

Um total de 821 entidades químicas (22,51% do total) estavam presentes no líquido ruminal das vacas alimentadas com e sem adição FL nos três tempos, das quais 14 foram identificadas. Cinco são da classe ácidos graxos (ácidos graxos conjugados, ácidos linoleicos e derivados), três são da classe de ácidos carboxílicos e derivados (aminoácidos, peptídeos e análogos), uma da classe quinolinas e derivados (quinolinas), uma da classe alcalóides de carbolina (alcalóides de triptofano), uma da classe nucleotídeos de pirimidina, uma da classe prenol lipídios (terpenos lactonas), uma da classe de policetídeos aromáticos e uma da classe ácidos orgânicos fosfóricos e derivados (ésteres de fosfato).

**Tabela 3.** Determinação de lignanas no líquido ruminal *in vivo* de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça

Itens	LSFL <sup>1</sup>			LCFL <sup>2</sup>		
	Tempo			Tempo		
	0h	5h	24h	0h	5h	24h
SDG <sup>1</sup> , mg/L	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
SECO <sup>2</sup> , mg/L	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Enterodiol, mg/L	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,15	<LOQ
Enterolactona, mg/L	0,04	0,05	0,03	1,27	2,70	0,04

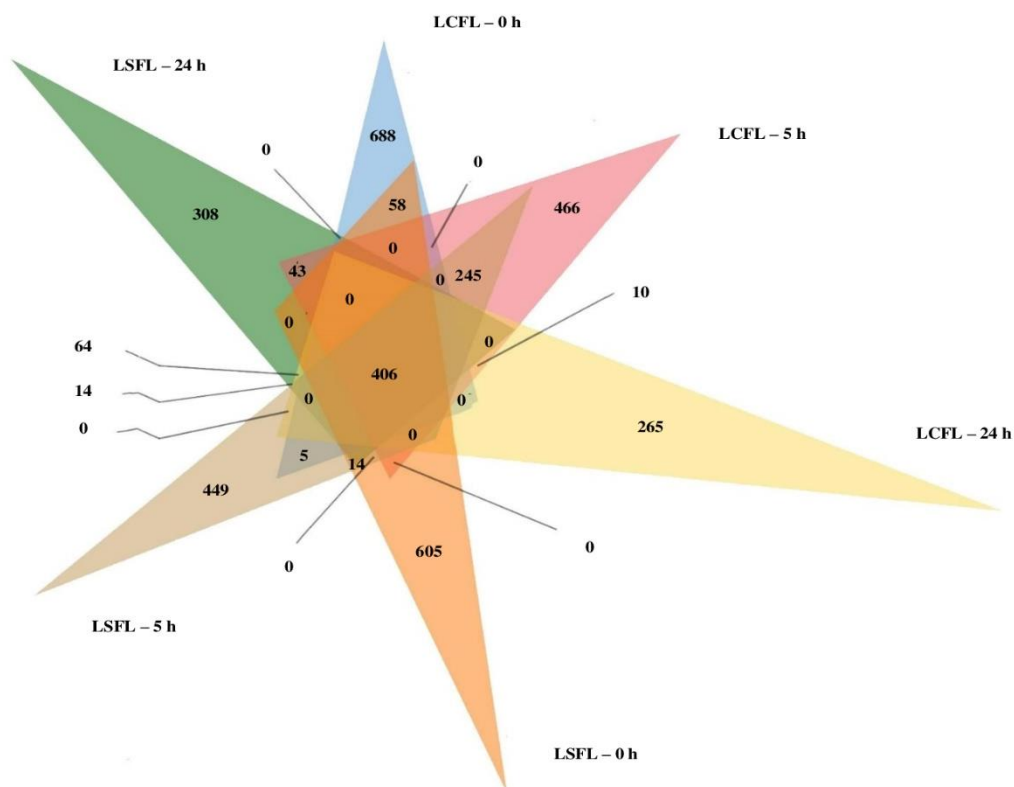
LSFL; líquido ruminal de animais alimentos sem farelo de linhaça; <sup>2</sup> LCFL; líquido ruminal de animais alimentos com farelo de linhaça; <sup>3</sup> SDG: secoisolariciresinol diglucosídeo; <sup>4</sup> SECO: secoisolariciresinol, < LOQ = limite de quantificação baixa.

Os dados de metabolômica não-direcionada, tanto no modo positivo quanto negativo, em ambos os tratamentos, e nos três tempos de coleta do líquido ruminal resultaram em 3.647 entidades químicas. Estes foram utilizados para gerar um diagrama de Venn (Figura. 3). Das 3.647 entidades químicas, 21 foram anotadas usando correspondências moleculares publicamente disponíveis (Tabelas S1 e S2), o que representa 0,57% das entidades químicas observadas.

Um total de 821 entidades químicas (22,51% do total) estavam presentes no líquido ruminal das vacas alimentadas com e sem adição FL nos três tempos, das quais 14 foram identificadas. Cinco são da classe ácidos graxos (ácidos graxos conjugados, ácidos linoleicos e derivados), três são da classe de ácidos carboxílicos e derivados (aminoácidos, peptídeos e análogos), uma da classe quinolinas e derivados (quinolinas), uma da classe alcalóides de carbolina (alcalóides de triptofano), uma da classe nucleotídeos de pirimidina, uma da classe prenol lipídios (terpenos lactonas), uma da

classe de policetídeos aromáticos e uma da classe ácidos orgânicos fosfóricos e derivados (ésteres de fosfato).

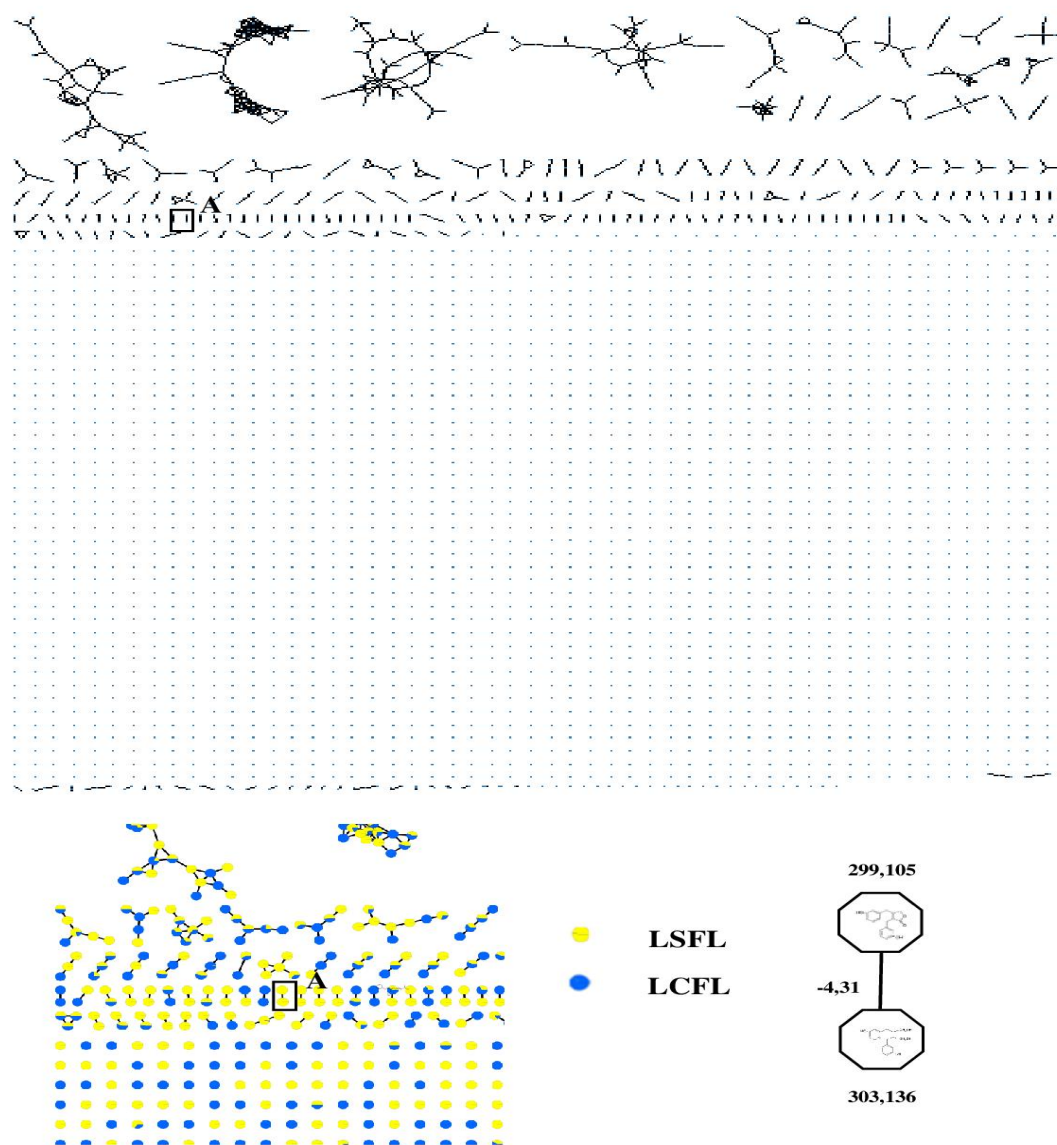
Um total de 1.390 entidades químicas (38,11% do total) foram observadas no líquido ruminal de vacas alimentadas sem adição FL nos três tempos, dos quais um foi identificado da classe da micotoxinas. No líquido ruminal das vacas alimentadas com adição FL nos três tempos, um total de 1.436 entidades químicas (39,45% do total) estiveram presentes, dos quais seis entidades químicas foram identificadas. Duas entidades químicas são da classe da lignanas (enterolactona e enterodiol) (Figura 4), duas da classe de ácidos carboxílicos e derivados (aminoácidos, peptídeos e análogos), uma da classe alcalóides de carbolina (alcalóides triptofano), e uma da classe nucleosídeos.



**Figura 3.** Diagrama de Venn compilando as características moleculares extraídas do líquido ruminal de vacas alimentadas com farelo linhaça (LCFL) e sem farelo de linhaça (LSFL) nos tempos 0, 5 e 24h.

## Discussão

O estudo foi desenhado para identificar os metabólitos intermediários da conversão de lignanas de vegetais em lignanas mamíferas. Entretanto, observou-se o metabolismo do EL e ED no líquido ruminal de vacas secas alimentadas com FL, como esperado. Isto se deve pela ação dos microrganismos ruminais que convertem lignanas vegetais a lignanas mamíferas<sup>23</sup>.



**Figura 4.** Rede molecular (MN) gerado com o uso das características moleculares extraídas do líquido ruminal de vacas alimentadas com farelo linhaça (LCFL) e sem farelo de linhaça (LSFL) nos tempos 0, 5 e 24h. (A) O nó indica a correspondência espectral do GNPS da Entolactona com  $([M+H]^+; m/z 299,105)$ ; Enterodiol com  $([M+H]^+; m/z 303,136)$ .

No presente estudo, eram de esperar altas concentrações de lignanas vegetais no líquido ruminal das vacas alimentadas com FL, uma vez que foi utilizada uma inclusão de 17,5% do FL (em base na MS) que apresentavam alto níveis de lignanas vegetais. Schogor et al.<sup>7</sup> identificaram baixa concentração de lignanas vegetais (SDG e SEC) no líquido ruminal por meio da análise de HPLC, possivelmente, foi menor a recuperação de ambas as lignanas vegetais, sugerindo outros compostos intermediários além de ED e EL foram gerados a partir do metabolismo das lignanas vegetais. Gagnon et al.<sup>23</sup> realizaram o primeiro estudo *in vivo* para avaliar o papel dos microrganismos ruminais no metabolismo da linhaça em vacas leiteiras em lactação. Naquele trabalho, foi evidenciada o metabólito SDG através da atividade da enzima  $\beta$ -glucorindase, que tem como objetivo hidrolisar o SDG em SECO<sup>10,24</sup>. Segundo Côrtes et al.<sup>14</sup> em ruminantes, o metabolismo o SECO é convertido a ED, para posteriormente dar origem a a EL.

Em comparação dos níveis de EL no fluido ruminal de vacas alimentadas com 17,5% de FL (em % da MS) foi maior ao redor em um 96,%, 98,1% e 25% para os tempos 0, 5 e 24h respeito ao líquido ruminal sem FL, pois os ingredientes para a dieta controle apresentaram soja e milho, os quais contém níveis baixos de lignanas<sup>25,26</sup> que permitem ter substrato de lignanas vegetais para levar a produção de EL<sup>27</sup>. Isto pode explicar a existência da EL no líquido ruminal das vacas alimentadas sem FL, resultado similares encontraram Gagnon et al.<sup>23</sup> no líquido ruminal, aumentando em um 78,2%, 54,6% e 28,9 para o tempo de 0h, e 67,2%, 62,2% e 54,1% para o pool (2, 4 e 6h) de EL para o tratamento com suplementação de 15. 9% de casca de linhaça (em % da MS) e infundidas com três diferentes quantidades de óleo de linhaça (0, 250 e 500 g/dia) vs o tratamento sem casca e infundidas com três diferentes quantidades de óleo de linhaça no abomaso em vacas da raça Holandesa alimentadas.

Lima et al.<sup>11</sup> também encontraram um aumento na concentração de EL no líquido ruminal em vacas raça Holandesa, ao redor de 46,1% e 49,6% para o tempo 0 h, e 64,4% e 68,9 para o pool (2, 4 e 6h) para o tratamento com suplementação de 12,4% de FL (em % da MS) e infundidas ou não com óleo de linhaça (250 g/dia) no abomaso vs o tratamento sem farelo de linhaça e infundidas ou não com óleo de linhaça (250 g/dia) no abomaso. De Marchi et al.<sup>28</sup> alimento às vacas da raça Holandesa com dietas com 13,7 de FL (em % da MS) e infundidas ou não com 250 g de óleo de girassol no abomaso vs dietas sem FL e infundidas ou não com 250 g de óleo de girassol no abomaso, encontrando um aumento da concentração de EL no líquido ruminal, ao redor de 65,2% e 37,2% para o tempo 0h, e 84,9% e 68,5% para o pool (2, 4 e 6h) para o tratamento com FL. A adição

de 17,5% de FL em base de MS na dieta das vacas secas resultou em maior aumento de EL no líquido ruminal comparado com os estudos de Gagnon et al.<sup>23</sup>, de Lima et al.<sup>11</sup> e de De Marchi et al.<sup>28</sup>. Isso demonstra que maior quantidade de substrato a microbiota ruminal pode converter a lignanas vegetais presente no FL a lignanas mamíferas como EL.

A metabolômica não-direcionada no presente estudo identificou ED e EL, permitindo inferir que bactérias ruminais poderiam ser potencialmente responsáveis pela metabolização das lignanas vegetais do FL a lignanas mamíferas.<sup>7,11,28</sup>. Apesar da importância dos microrganismos ruminais no metabolismo das lignanas em ruminantes, poucos estudos investigaram o metabolismo das lignanas no rúmen. Schogor et al.<sup>7</sup> estudaram o metabolismo de lignanas usando culturas puras bactérias ruminais selecionadas incubadas *in vitro* com SDG, encontrando que o gênero da *Prevotella spp* é capaz de converter SDG em SECO formado um intermediário no metabólito ruminal de SDG em EL. Isso sugere que *Prevotella spp.* pode desempenhar um papel importante no metabolismo da lignanas em ruminantes<sup>7</sup>.

Às 5h após a alimentação a concentração de ED aumentou, possivelmente pelo uso completo do SDG, precursor de ED. Às 24 h as concentrações de ED não foram determinadas, possivelmente pela conversão de ED a EL. Às 24h a concentração da EL foi menor que às 0h, possivelmente pela absorção da EL. Estudos demonstraram que a absorção de EL e ED ocorre no rúmen ou no intestino delgado<sup>14,15</sup>. Logo, é fundamental fornecer o FL continuamente quando é desejado melhorar a saúde da vaca e enriquecer o leite com o antioxidante EL.

A maior abundância de entidades químicas foi para o líquido ruminal de vacas alimentadas com FL nos três tempos: um total de 39,45% das entidades químicas. Destas, seis foram identificadas (0,17% do total), como são as lignanas, os ácidos carboxílicos e derivados, os alcalóides de carbolina e os nucleosídeos. Estudos recentes explorando o metaboloma do fluido ruminal têm se concentrado principalmente em como os metabólitos são influenciados por diferentes dietas. Por exemplo, ácidos orgânicos, aminoácidos, aminas, açúcares e nucleosídeos/nucleotídeos, que são o núcleo do fluido ruminal, são afetados quando as vacas leiteiras são alimentadas com dietas que variam em níveis de concentrado<sup>29</sup>.

Com respeito às duas classes de ácidos carboxílicos e derivados (N-metil-L-triptofano e triptofano) provém do metabolismo proteico do FL no líquido ruminal, pois fazem parte do perfil de aminoácidos essenciais do FL<sup>30</sup>. Além do que, outra classe de

composto identificado foi alcalóide de carbolina (ácido tetrahydroharman-3-carboxílico). Os alcalóides estão presentes na casca da lignanas<sup>31</sup> que faz parte dos compostos fenólicos cuja função é antioxidante. Um nucleosídeo foi identificado (uridina) do metabolismo de ácidos nucleicos. A presença da uridina é indicativa de maior renovação de materiais genéticos microbianos ou vegetais<sup>32</sup>. A fumonisina B2 é uma micotoxina produzida pela espécie de fusarium, e esta toxina ocorre com muita frequência no milho<sup>33</sup>, possivelmente a identificação da fumosina B2 está relacionado com o milho da dieta no líquido ruminal sem FL.

### **Conclusão**

A inclusão de FL na alimentação de vacas secas aumento % EL no líquido ruminal em comparação com o tratamento sem inclusão de FL. Ademais o líquido ruminal das vacas que consumiram FL apresentou ED. De acordo com a análise de rede molecular, observou-se 3.647 entidades químicas no líquido ruminal de vacas alimentadas com e sem FL, analisadas por UHPLC-MS / MS, dos quais 21 foram identificadas, o que correspondeu a 0,57% das características moleculares totais. Dos quais seis compostos foram identificados, duas entidades químicas são da classe da lignanas (enterolactona e enterodiol), duas são da classe de ácidos carboxílicos e derivados (aminoácidos, peptídeos e análogos), uma da classe alcalóides de carbolina (alcalóides triptofano), e uma da classe nucleosídeos. Os resultados do presente experimento com o uso de metabolômica direcionada e não-direcionada sugerem que os metabólitos produzidos a partir do FL pela microbiota ruminal são a enterolactona e o enterodiol.

### **Declaração de disponibilidade de dados:**

O conjunto de dados foi submetido a Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) e está disponível através do identificador de estudo

Modo Positivo

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=651c1559a70a48b9b95b51af97d27754>

Modo Negativo

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=375f422db01242a3b4c7183aa12d438f>

## Referências

1. Zened, A., Enjalbert, F., Nicot, M. C. & Troegeler-Meynadier, A. Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation. *J. Dairy Sci.* **96**, 451–459 (2013).
2. Xu, C. Z. *et al.* Effects of feeding lutein on production performance, antioxidative status, and milk quality of high-yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* **97**, 7144–7150 (2014).
3. Petit, H. V. & Gagnon, N. Milk concentrations of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol, milk production, and whole tract digestibility of dairy cows fed diets containing different concentrations of flaxseed meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* **152**, 103–111 (2009).
4. Petit, H. V. Review: Feed intake, milk production and milk composition of dairy cows fed flaxseed. *Can. J. Anim. Sci.* **90**, 115–127 (2010).
5. Landete, J. M. Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Res. Int.* **46**, 410–424 (2012).
6. Meagher, L. P. & Beecher, G. R. Assessment of Data on the Lignan Content of Foods. *J. Food Compos. Anal.* **13**, 935–947 (2000).
7. Schogor, A. L. B. *et al.* Ruminal *Prevotella* spp. may play an important role in the conversion of plant lignans into human health beneficial antioxidants. *PLoS One* **9**, (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087949>.
8. Clavel, T., Borrmann, D., Braune, A., Doré, J. & Blaut, M. Occurrence and activity of human intestinal bacteria involved in the conversion of dietary lignans. *Anaerobe* **12**, 140–147 (2006).
9. Wang, L.-Q., Meselhy, M. R., Li, Y., Qin, G.-W. & Hattori, M. Human Intestinal Bacteria Capable of Transforming Secoisolariciresinol Diglucoside to Mammalian Lignans, Enterodiol and Enterolactone. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **48**, 1606–1610 (2000).
10. Schogor, A. L. B., Palin, M. F., Santos, G. T., Benchaar, C. & Petit, H. V.  $\beta$ -glucuronidase activity and enterolactone concentration in ruminal fluid, plasma, urine, and milk of Holstein cows fed increased levels of flax (*Linum usitatissimum*) meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* **223**, 23–29 (2017).
11. Lima, L. S., Palin, M. F., Santos, G. T., Benchaar, C. & Petit, H. V. Dietary flax meal and abomasal infusion of flax oil on microbial  $\beta$ -glucuronidase activity and concentration of enterolactone in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* **215**, 85–91 (2016).
12. Petit, H. V. & Gagnon, N. Concentration of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol in milk of cows fed diets containing different concentrations of whole flaxseed. *Animal* **3**, 1428–1435 (2009).
13. Petit, H. V., Gagnon, N., Mir, P. S., Cao, R. & Cui, S. Milk concentration of the mammalian lignan enterolactone, milk production, milk fatty acid profile, and

- digestibility in dairy cows fed diets containing whole flaxseed or flaxseed meal. *J. Dairy Res.* **76**, 257–264 (2009).
14. Côrtes, C. *et al.* In vitro metabolism of flax lignans by ruminal and faecal microbiota of dairy cows. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1585–1594 (2008).
  15. Njåstad, K. M. *et al.* Gastrointestinal metabolism of phytoestrogens in lactating dairy cows fed silages with different botanical composition. *J. Dairy Sci.* **97**, 7735–7750 (2014).
  16. Borriello, S. P., Setchell, K. D. R., Axelson, M. & Lawson, A. M. Production and metabolism of lignans by the human faecal flora. *J. Appl. Bacteriol.* **58**, 37–43 (1985).
  17. Denman, S. E., Morgavi, D. P. & Mcsweeney, C. S. Review : The application of omics to rumen microbiota function. *animal.* **12**, 233–245. (2018) doi:10.1017/S175173111800229X.
  18. Goldansaz, S. A. *et al.* Livestock metabolomics and the livestock metabolome : A systematic review. 1–26 (2017).
  19. Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E. & Clish, C. B. Targeted metabolomics. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **1**, 1–24 (2012).
  20. Dunn, W. B. & Ellis, D. I. Metabolomics : Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Anal. Chem.*, **24**, 24, 285–294 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>.
  21. Networking, S. M. Perspective Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **34**, (2016).
  22. Shannon, P. *et al.* Cytoscape : A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome research.* **13**, 2498–2504 (2003) doi:10.1101/gr.1239303.metabolite.
  23. Gagnon, N. *et al.* Ruminal metabolism of flaxseed (*Linum usitatissimum*) lignans to the mammalian lignan enterolactone and its concentration in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Br. J. Nutr.* **102**, 1015–1023 (2009).
  24. Côrtes, C. *et al.* Effects of abomasal infusion of flaxseed (*Linum usitatissimum*) oil on microbial  $\beta$ -glucuronidase activity and concentration of the mammalian lignan enterolactone in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Br. J. Nutr.* **109**, 433–440 (2013).
  25. Adlercreutz, H. Quantification of Lignans in Food Using Isotope Dilution Gas Chromatography / Mass Spectrometry Quantification of Lignans in Food Using Isotope Dilution Gas Chromatography / Mass Spectrometry. (2005) doi:10.1021/jf051488w.
  26. Steinshamn, H., Purup, S. & Thuen, E. Effects of Clover-Grass Silages and Concentrate Supplementation on the Content of Phytoestrogens in Dairy Cow Milk Effects of Clover-Grass Silages and Concentrate Supplementation on the Content of Phytoestrogens in Dairy Cow Milk ABSTRACT. (2008) doi:10.3168/jds.2007-0857.



27. Thompson, L. U., Robb, P., Serraino, M. & Cheung, F. Mammalian Lignan Production From Various Foods. *Nutr. Cancer* **16**, 43–52 (1991).
28. De Marchi, F. E., Palin, M. F., Santos, G. T., Benchaar, C. & Petit, H. V. Effects of duodenal infusion of sunflower oil on  $\beta$ -glucuronidase activity and enterolactone concentration in dairy cows fed flax meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* **220**, 143–150 (2016).
29. Zhang, R., Zhu, W., Jiang, L. & Mao, S. Comparative metabolome analysis of ruminal changes in Holstein dairy cows fed low- or high-concentrate diets. *Metabolomics*. **13**, 0–15 (2017).
30. Shim, Y. Y., Gui, B., Arnison, P. G., Wang, Y. & Reaney, M. J. T. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **38**, 5–20 (2014).
31. Hao, M. & Beta, T. Qualitative and quantitative analysis of the major phenolic compounds as antioxidants in barley and flaxseed hulls using HPLC/MS/MS. *J. Sci. Food Agric.* **92**, 2062–2068 (2012).
32. Clemmons, B. A. et al. Rumen fluid metabolomics of beef steers differing in feed efficiency. *Metabolomics* 1–9 (2020) doi:10.1007/s11306-020-1643-x.
33. Custódio, L., Prados, L. F., Yiannikouris, A., Holder, V., Pettigrew, J., Kuritza, L., ... & Siqueira, G. R. (2019). Mycotoxin contamination of diets for beef cattle finishing in feedlot. *Rev. Bras. de Zootec*, **48**, (2019).

Tabela suplementar S1

Identificação, fórmula molecular, massa monoisotópica, m / z observada de íon e erro de metabólitos no líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça

Número dos Compostos	Metabólitos	Fórmula	Massa monoisotópica	m/z <sub>Exp</sub> positivo	m/z <sub>Exp</sub> negativo	Erro (ppm)
01	Ácido octanodioico	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	174,09	-	173,0819	2,98
02	N-Metil-L-triptofano	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	218,1055	188,0711	-	-6,66
03	Ácido azelaico	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	188,1049	189,1127	-	0,61
04	Ácido quinurênico	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	189,0426	190,0540	-	-5,88
05	Ácido tetrahydroharman-3-carboxílico	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	230,1055	-	229,0995	7,83
06	L-Prolina-L-Valina	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	196,1212	197,1280	-	-5,08
07	Uridina	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	244,0700	-	243,0630	5,30
08	Ácido decanedióico	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	202,1205	203,1281	-	-1,15
09	Triptofano	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204,0899	205,0977	-	-6,58
10	Ácido jasmônico	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	210,1256	211,1334	-	0,85
11	Ácido dodecanodioico	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	230,1518	231,1596	-	-0,98
12	Monofosfato de timidina	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> P	322,0566	-	321,0503	4,74
13	Costunolide	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	232,1463	233,1542	-	-1,52
14	Ácido hipoprotocetrárico	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	344,0896	687,1719	-	0,75
15	Enterolactona	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	298,1205	299,1283	-	-5,79
16	Enterodiol	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	302,1518	303,1596	-	-5,06
17	Diocetil benzeno-1,2-dicarboxilato <sup>a</sup>	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	390,2770	413,2663	-	-1,15
18	Fosfato de tributoxietila	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> P	398,2433	421,2331	-	-2,39

Continuação

Número dos Compostos	Metábolitos	Fórmula	Massa monoisotópica	m/z <sub>Exp</sub> positivo	m/z <sub>Exp</sub> negativo	Erro (ppm)
19	N - [(2S) -2- (2-hidroxi-4-oxoquinazolin-3 (4H) -il) -3-fenilpropanoil] -L-valil-D-prolina	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	506,2165	507,2244	-	-8,98
20	Fumonisina B2	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>14</sub>	705,3936	706,3992	-	-3,14
21	L-tirosina	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>	181,0739	182,0800	-	-9,43

<sup>a</sup> Íon observado com o aduto de sódio [M + Na]<sup>+</sup>.

Identificação e nome da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) dos metabólitos no líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça

Número dos Compostos	Metabólitos	Nome IUPAC
01	Ácido octanodioico	Ácido octanodioico
02	N-Metil-L-triptofano	Ácido (2S) -3- (1H-indol-3-il) -2- (metilamino) propanóico
03	Ácido azelaico	Hydron; nonanoato
04	Ácido quinurênico	Ácido 4-oxo-1H-quinolina-2-carboxílico
05	Ácido tetrahydroharman-3-carboxílico	Ácido 1-metil-2,3,4,9-tetrahydro-1H-pirido [3,4-b] indol-3-carboxílico
06	L-Prolina-L-Valina	(3S, 8aS) -3-propan-2-il-2,3,6,7,8,8a-hexa-hidropirroló [1,2-a] pirazina-1,4-diona
07	Uridina	1 - [(2R, 3R, 4S, 5R) -3,4-dihidroxi-5- (hidroximetil) oxolan-2-il] pirimidina-2,4-diona
08	Ácido decanedióico	Ácido decanodioico
09	Triptofano	Ácido (2S) -2-amino-3- (1H-indol-3-il) propanóico
10	Ácido jasmônico	Ácido 2- (3-oxo-2-pent-2-enilciclopentil) acético
11	Ácido dodecanodioico	Ácido dodecanodioico
12	Monofosfato de timidina	[(2R, 3S, 5R) -3-hidroxi-5- (5-metil-2,4-dioxopirimidin-1-il) oxolan-2-il] metil di-hidrogenofosfato
13	Costunolide	(3aS, 6E, 10E, 11aR) -6,10-dimetil-3-metilideno-3a, 4,5,8,9,11a-hexahidrociclododeca [b] furan-2-ona
14	Ácido hipoprotocetrárico	Ácido 3,9-dihidroxi-1,4,7,10-tetrametil-6-oxobenzo [b] [1,4] benzodioxepina-2-carboxílico
15	Enterolactona	(3R, 4R) -3,4-bis [(3-hidroxifenil) metil] oxolan-2-ona
16	Enterodiol	(2R, 3R) -2,3-bis [(3-hidroxifenil) metil] butano-1,4-diol

Continuação

Número dos Compostos	Metabólitos	Nome IUPAC
12	Monofosfato de timidina	[(2R, 3S, 5R) -3-hidroxi-5- (5-metil-2,4-dioxopirimidin-1-il) oxolan-2-il] metil di-hidrogenofosfato
13	Costunolide	(3aS, 6E, 10E, 11aR) -6,10-dimetil-3-metilideno-3a, 4,5,8,9,11a-hexahidrociclo-deca [b] furan-2-ona
14	Ácido hipoprotocetrárico	Ácido 3,9-dihidroxi-1,4,7,10-tetrametil-6-oxobenzo [b] [1,4] benzodioxepina-2-carboxílico
15	Enterolactona	(3R, 4R) -3,4-bis [(3-hidroxifenil) metil] oxolan-2-ona
16	Enterodiol	(2R, 3R) -2,3-bis [(3-hidroxifenil) metil] butano-1,4-diol
17	Dioctil benzeno-1,2-dicarboxilato	dioctil benzeno-1,2-dicarboxilato
18	Fosfato de tributoxietila	tris (2-butoxietil) fosfato
19	N - [(2S) -2- (2-hidroxi-4-oxoquinazolin-3 (4H) -il) -3-fenilpropanoil] -L-valil-D-prolina	(2R) -1 - [(2S) -2 - [[(2S) -2- (2,4-dioxo-1H-quinazolin-3-il) -3-fenilpropanoil] amino] -3-metilbutanoil] pirrolidina- Ácido 2-carboxílico
20	Fumonisina B2	Micotoxina
21	L-tirosina	Ácido (2S) -2-amino-3- (4-hidroxifenil) propanóico

Tabela suplementar S3

Perfil de metabólitos identificados a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça

Número dos compostos	Metabólitos	Modo		Tratamento		Tempo		
		Positivo	Negativo	Com linhaça	Sem linhaça	0h	5h	24h
1	Ácido octanodioico		x	x	x	x	x	x
2	N-Metil-L-triptofano	x		x		x		
3	Ácido azelaico	x		x	x	x	x	
4	Ácido quinurênico	x		x	x	x	x	
5	Ácido tetrahydroharman-3-carboxílico	x		x		x		
6	L-Prolina-L-Valina	x		x	x	x	x	
7	Uridina		x	x		x		
8	Ácido decanedióico		x	x	x	x	x	x
9	Triptofano	x		x		x		
10	Ácido jasmônico	x		x	x	x	x	x
11	Ácido dodecanodioico	x		x	x	x	x	x
12	Monofosfato de timidina		x	x	x		x	
13	Costunolide	x		x	x			
14	Ácido hipoprotocetrárico		x	x	x	x	x	
15	Enterolactona		x	x		x		
16	Enterodiol		x	x		x		
17	Diocetil benzeno-1,2-dicarboxilato	x		x	x	x	x	
18	Fosfato de tributoxietila	x		x	x	x		

A continuação

Metabólitos	Modo	Tratamento	Tempo
-------------	------	------------	-------

Número dos compostos		Positivo	Negativo	Com linhaça	Sem linhaça	0 h	5 h	24 h
19	N - [(2S) -2- (2-hidroxi-4-oxoquinazolin-3 (4H) -il) -3-fenilpropanoil] -L-valil-D-prolina	x		x	x	x	x	x
20	Fumonisina B2	x		x		x		
21	L-tirosina	x		x	x	x		

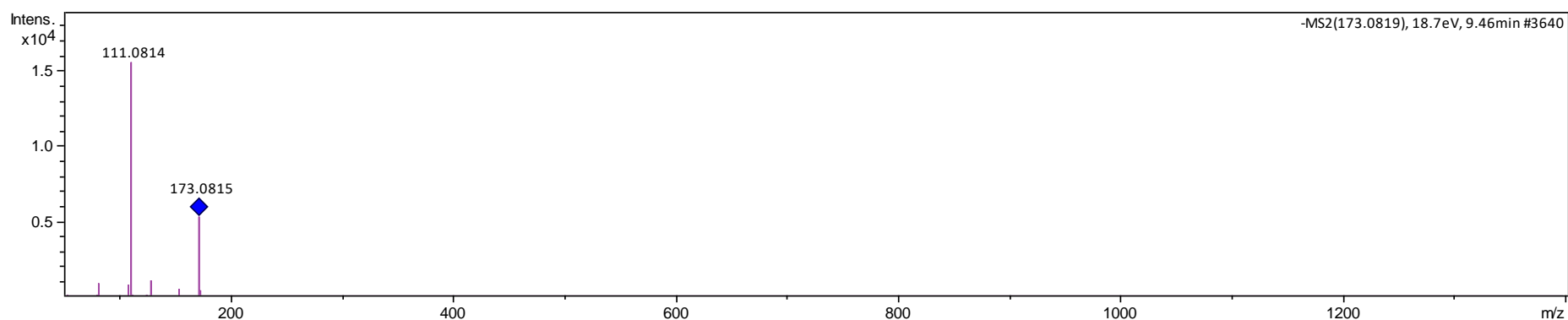


Figura S1

Ácido octanodioico foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^-$  com erro de massa de 2,98 ppm



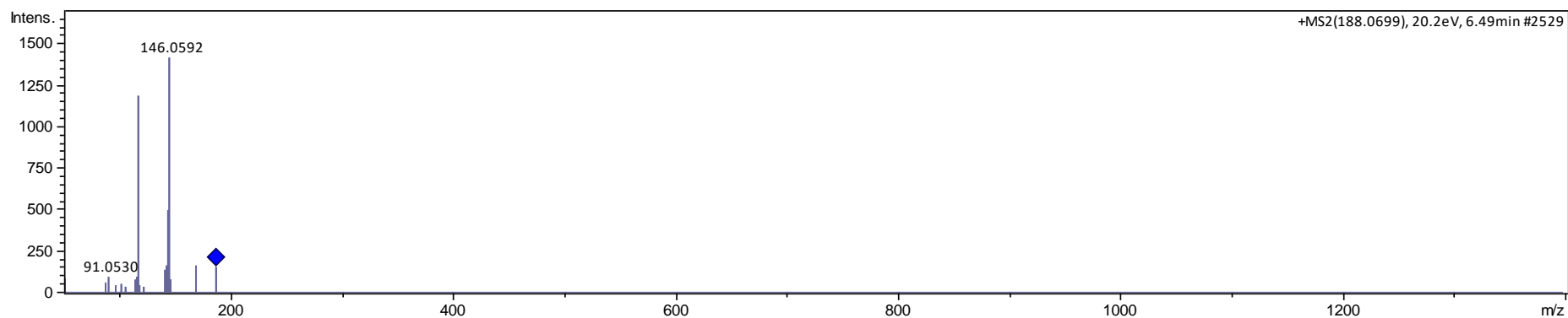


Figura S2

N-Metil-L-triptofano foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -6,66 ppm

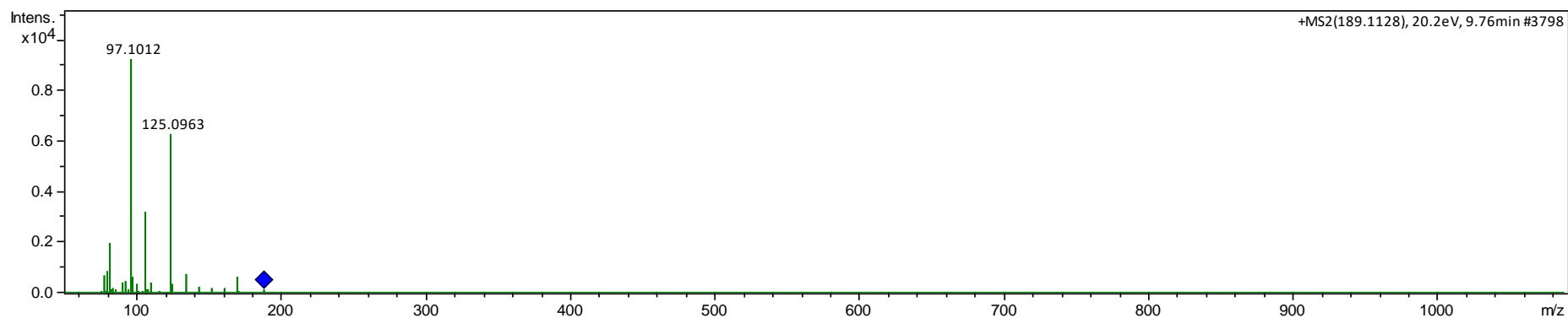


Figura S3

Ácido azelaico foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de 0,61 ppm

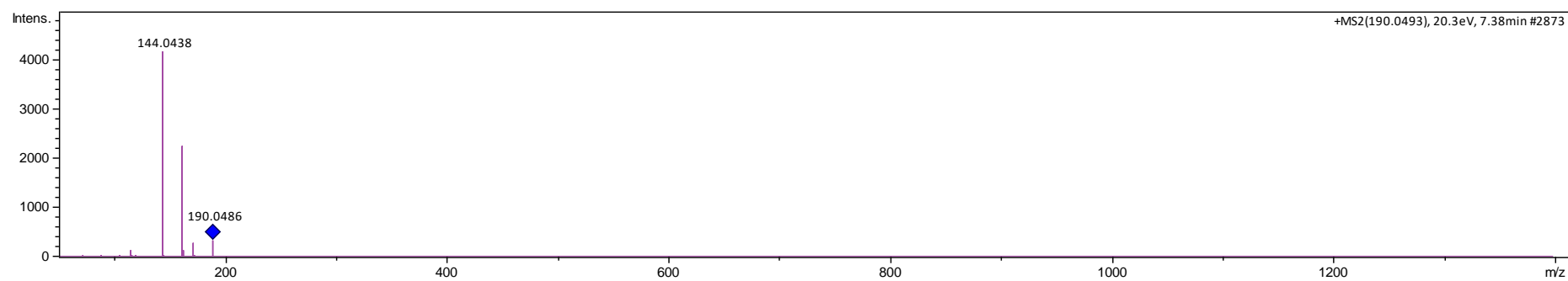


Figura S4

Ácido quinurênico foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de  $-5,88$  ppm.

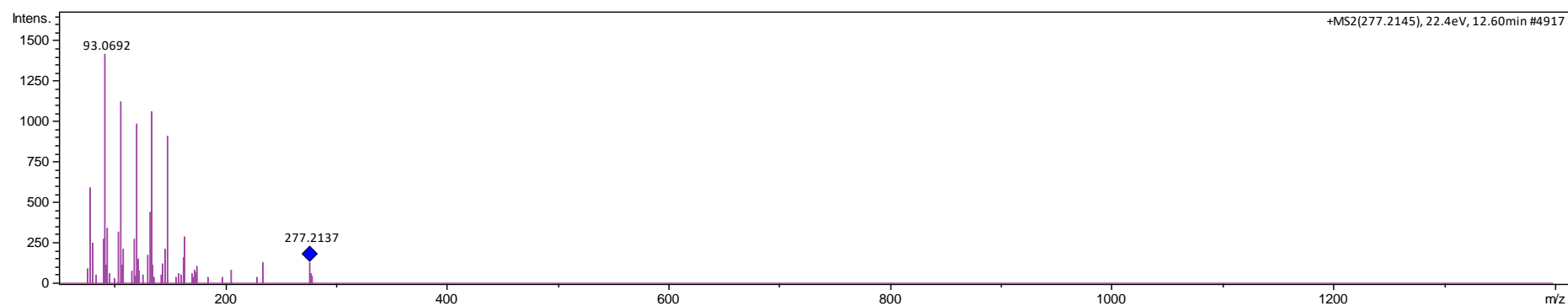


Figura S5

Ácido tetrahydroarman-3-carboxílico foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]$  - com erro de massa de 7,83 ppm.

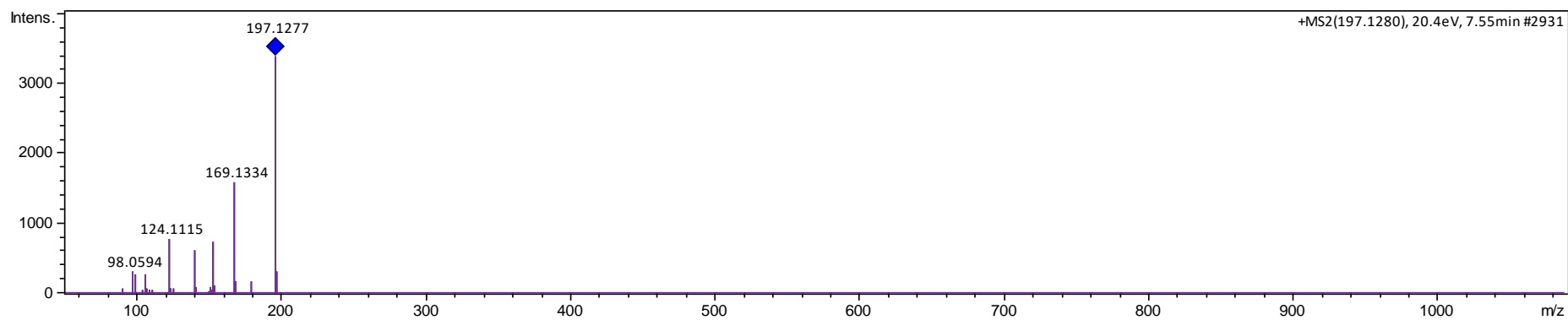


Figura S6

L-Prolina-L-Valina foi identificado usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -5,08 ppm.

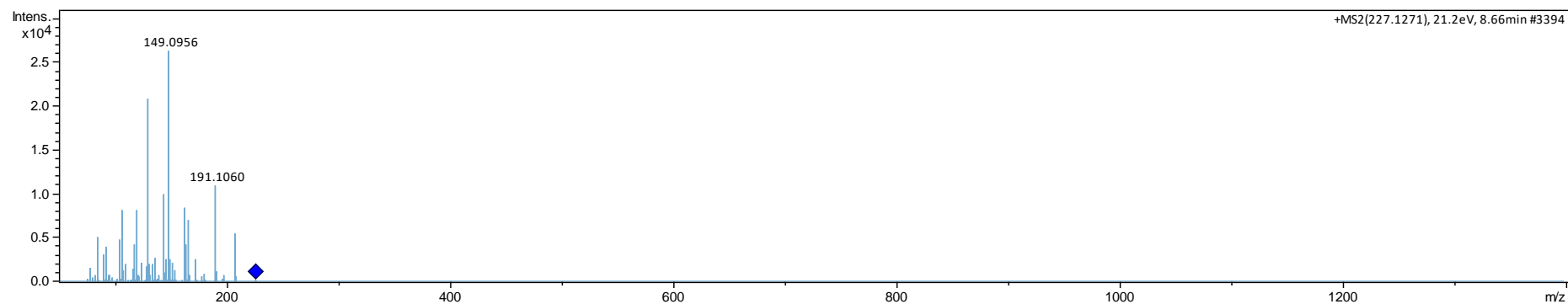


Figura S7

Uridina foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  - com erro de massa de 5,3 ppm.

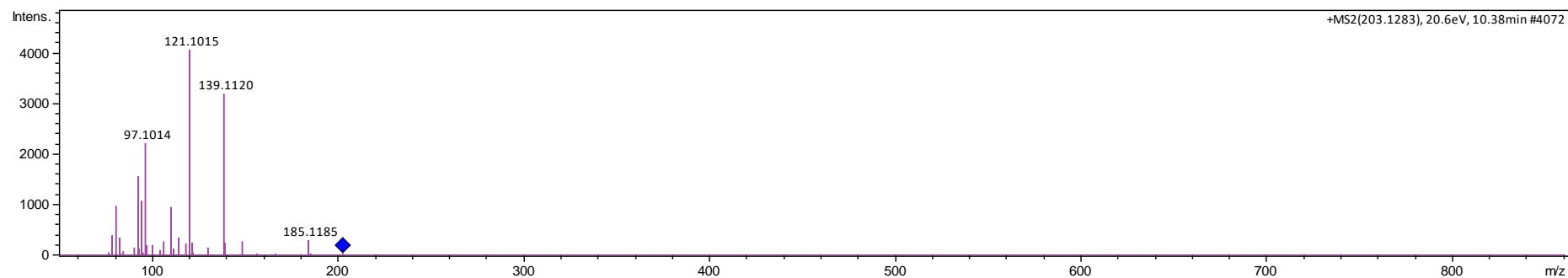


Figura S8

Ácido decanedióico foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -1,15 ppm.

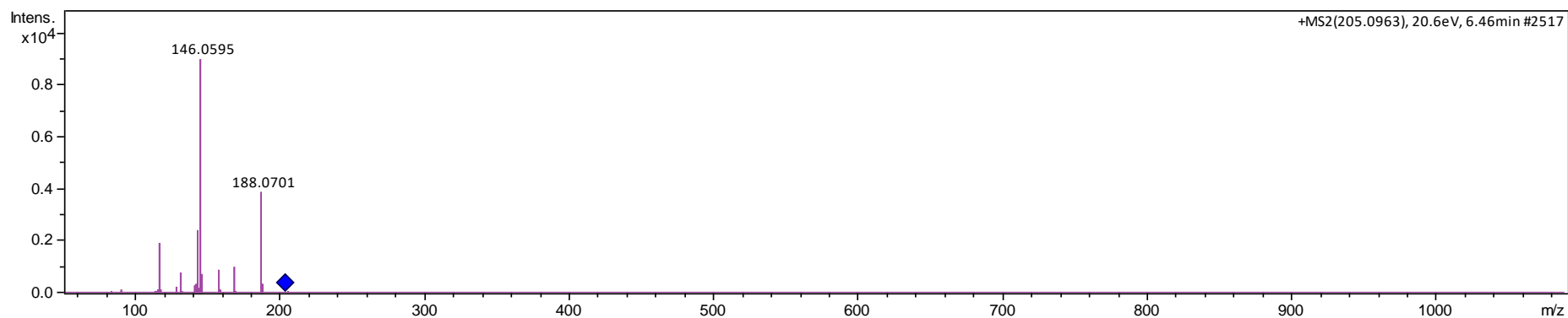


Figura S9

Triptofano a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -6,58 ppm.



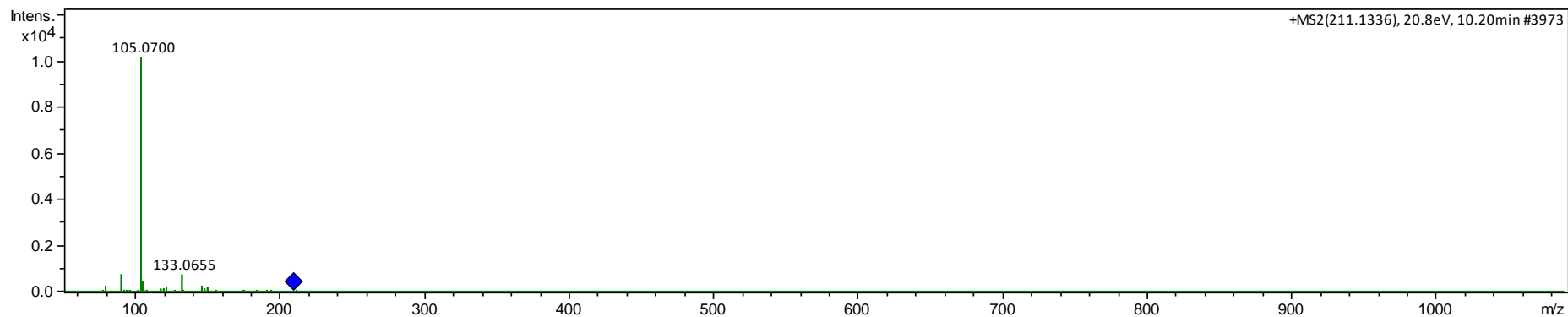


Figura S10

Ácido jasmônico foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de 0,85 ppm.

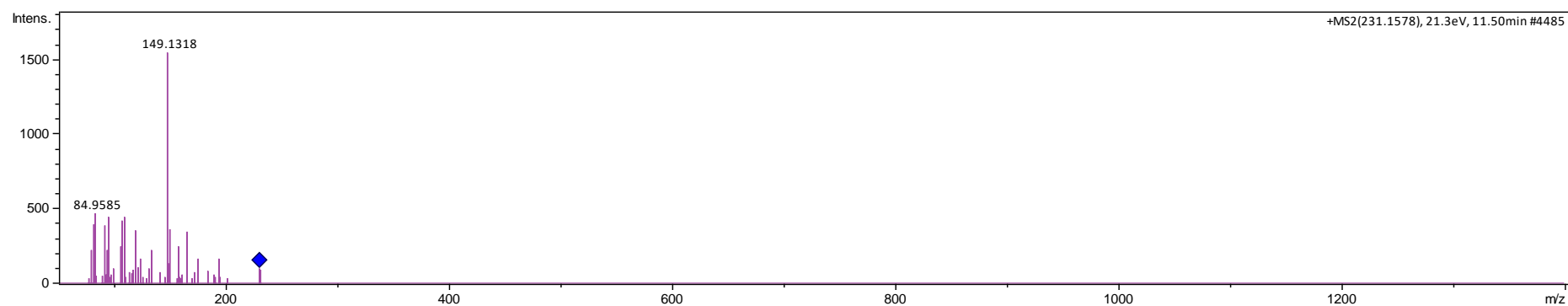


Figura S11

Ácido dodecanodioico foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de 11,74 ppm.

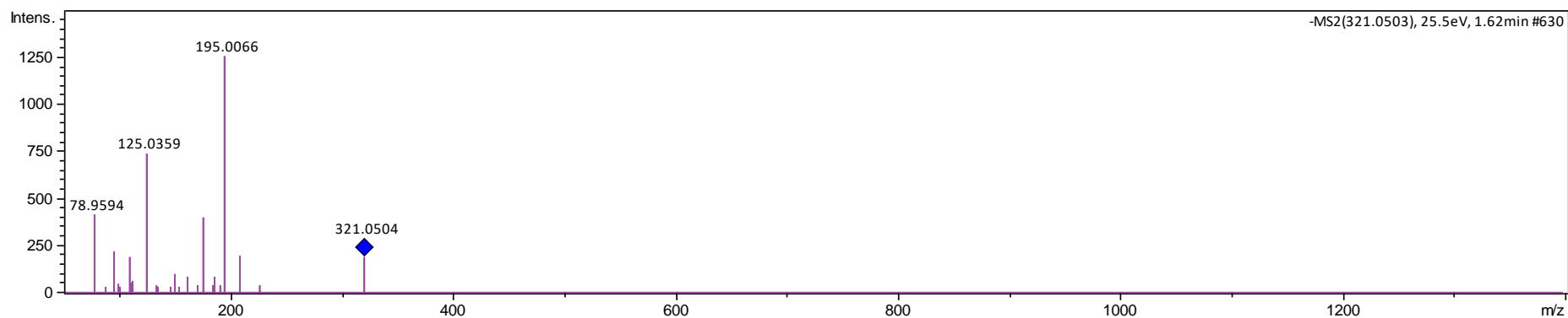


Figura S12

Monofosfato de timidina foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^-$  com erro de massa de 4,74 ppm.

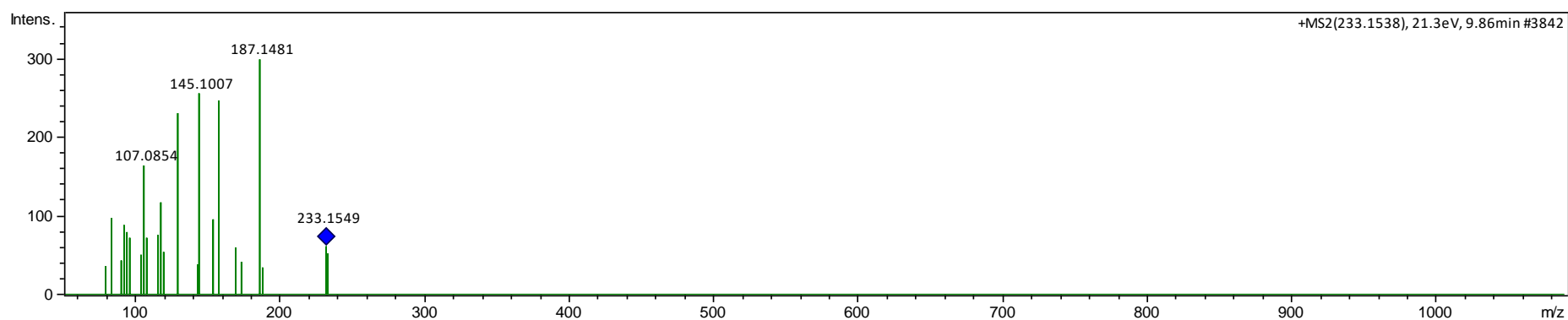


Figura S13

Costunolide foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -5,59 ppm.

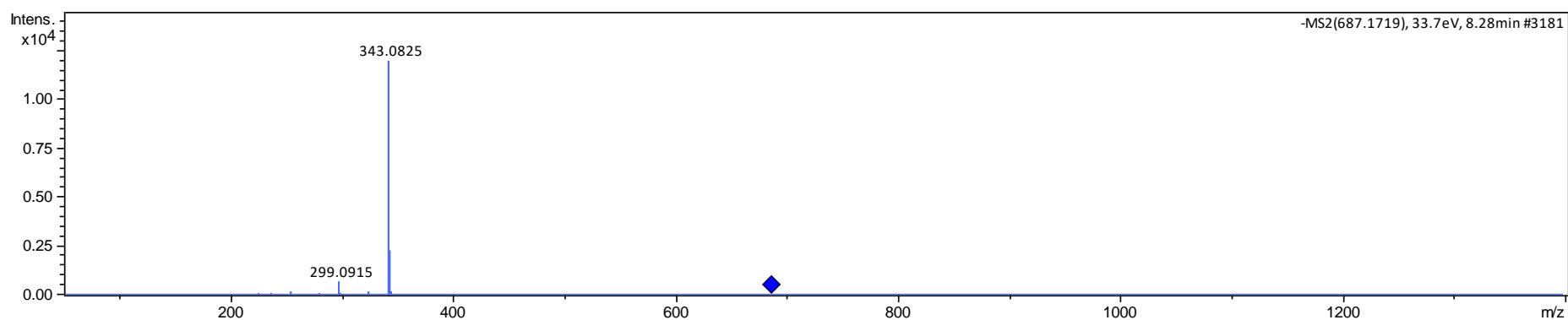


Figura S14

Ácido hipoprotocetrárico foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de 0,75 ppm.

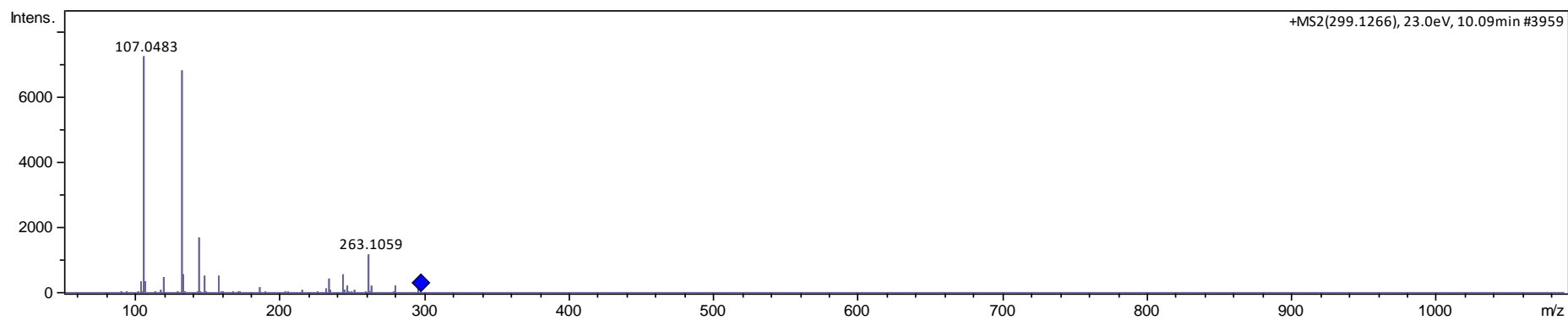


Figura S15

Enterolactona foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -5,59 ppm.

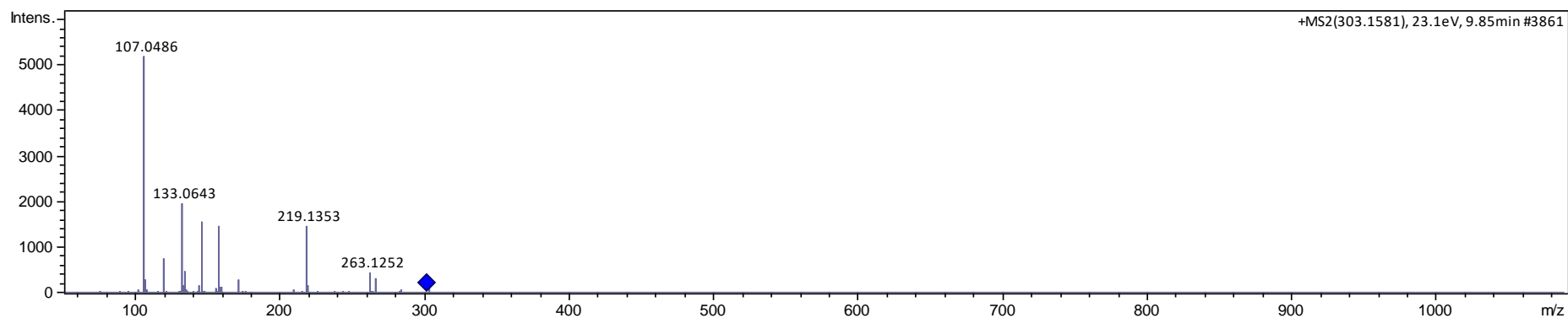


Figura S16

Enterodiol foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -0,82 ppm.

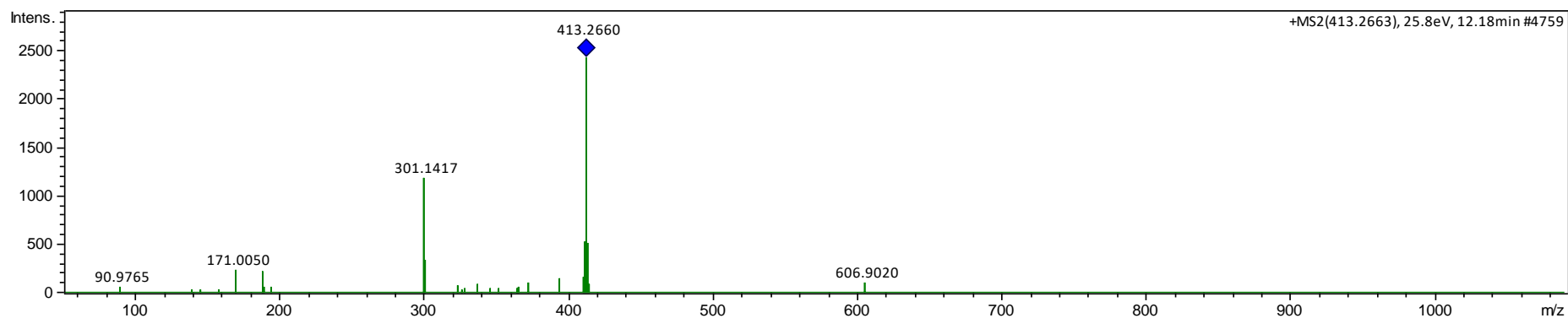


Figura S17

Diocetil benzeno-1,2-dicarboxilato foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -1,15 ppm.



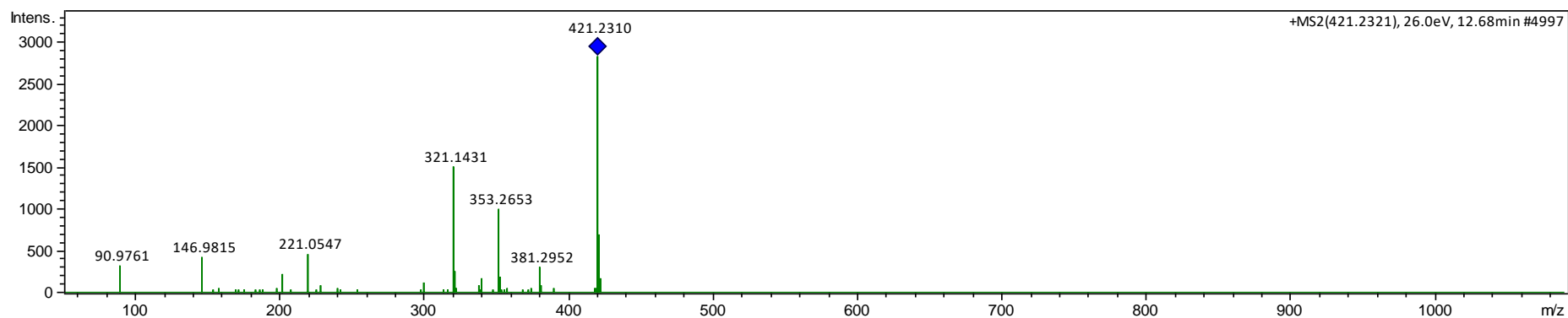


Figura S18

Fosfato de tributoxietila foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -2,39 ppm.

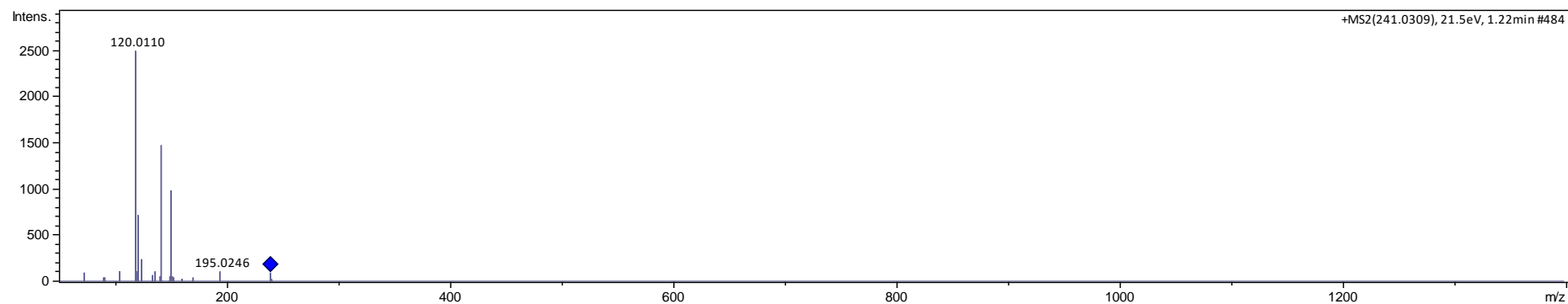


Figura S19

N - [(2S) -2- (2-hidroxi-4-oxoquinazolin-3 (4H) -il) -3-fenilpropanoil] -L-valil-D-prolina foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -8,89 ppm.

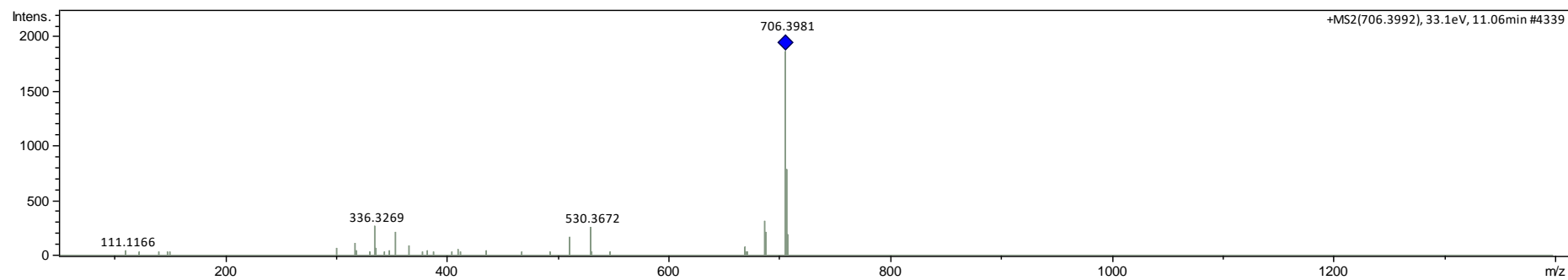


Figura S20

Fumonisina B2 foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]$  - com erro de massa de  $-7,55$  ppm.

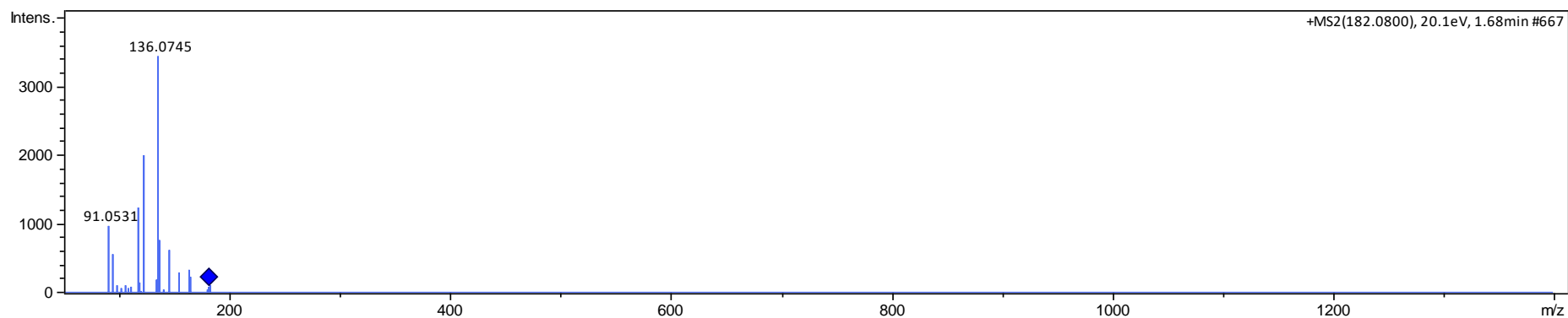


Figura S21

L-tirosina foi identificado a partir do líquido ruminal in vivo de vacas secas sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  - com erro de massa de + 9,43 ppm.

## V - Uso da metabolômica na compreensão do metabolismo ruminal *in vitro* de lignanas da linhaça

Use of metabolism in the understanding of *in vitro* ruminal metabolism of linhaça lignans  
(Scientific reports)

### Resumo

A microbiota ruminal desempenha importante papel na conversão de lignanas vegetais em lignanas mamíferas. O objetivo com o presente estudo foi compreender o metabolismo ruminal das lignanas nas incubações das culturas *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça por meio da metabolômica direcionada e da metabolômica não-direcionada. Quatro vacas Holandesas com cânula ruminal foram distribuídas em dois regimes de alimentação: duas vacas sem e duas vacas com adição de farelo de linhaça (FL) à dieta. Os animais foram alimentados com as respectivas dietas durante 21 dias, e foi realizada uma coleta do líquido ruminal no 21º dia. Foram preparados quatro conjuntos de incubações das culturas usando os líquidos ruminais e a adição ou não de FL ao meio de cultura Van Soest. Os tratamentos foram: 1) contendo líquido ruminal das vacas que não consumiram FL e sem adição de FL ao meio de cultura (CON); 2) contendo líquido ruminal das vacas que não consumiram FL e com adição de FL ao meio de cultura; 3) contendo líquido ruminal das vacas que consumiram FL e sem adição de FL ao meio de cultura; 4) contendo líquido ruminal das vacas que consumiram FL e com adição de FL ao meio de cultura. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 5 e 24h de cada cultura, extraídas com metanol, e submetidas a análises de metabolômica direcionada e não direcionada. Foram quantificados secoisolariciresinol diglucosídeo (SDG), secoisolariciresinol (SECO) e ED no líquido ruminal das vacas que não consumiram FL, e SDG, SECO, ED e EL no líquido ruminal das vacas que consumiram FL. Foram observadas 1351 entidades químicas nas culturas com e sem FL. A maior abundância de entidades químicas foi observada nas culturas com FL, no total de 1221 (90,37% do total). Destas, 44 foram identificadas como ácidos carboxílicos e derivados, ácidos graxos, lignanas, compostos orgânicos de oxigênio, ácidos cinâmicos e derivados, flavonóides, nucleosídeos, alcalóides e um metabólito intermediário da reação de conversão de SECO em ED (MHEND). As culturas sem FL não apresentaram lignanas vegetais e lignanas mamíferas por falta de substrato, as culturas com FL permitiu a

quantificação de SDG, SECO, ED e EL, e os metabólitos produzidos a partir da lignanas vegetais do FL foram o ED e EL e outras entidades químicas como MHEND.

### **Abstract**

The ruminal microbiota plays an important role in the conversion of vegetative lignans into mammalian lignans. The objective of the present study was to understand the ruminal metabolism of lignans in the incubations of in vitro cultures of rumen fluid without and with the addition of flaxseed meal through targeted metabolomics and non-targeted metabolomics. Four Holstein cows with rumen fistulated were distributed in two feeding regimes: two cows without and two cows with addition of flaxseed meal (FM) to the diet. The animals were fed with their respective diets for 21 days, and rumen fluid was collected on the 21st day. Four sets of culture incubations were prepared using the rumen fluids and the addition or not of FM to the Van Soest culture medium. The treatments were: 1) Ruminal fluid from cows that did not consume FM and without addition of FM to the culture medium; 2) Ruminal fluid from cows that did not consume FM and with the addition of FM to the culture medium; 3) Ruminal fluid from cows that consumed FM and without FM addition to the culture medium; 4) Ruminal fluid from cows that consumed FM and with the addition of FM to the culture medium. Samples were collected at times 0, 5 and 24 h of each culture, extracted with methanol, and submitted to targeted and non-targeted metabolomics analysis. Secoisolariciresinol diglucoside (SDG), secoisolariciresinol (SECO) and enterodiol (ED) were quantified in the ruminal fluid of cows that did not consume FM, and SDG, SECO, ED and enterolactone (EL) in the ruminal fluid of cows that consumed FM. 1,351 chemical entities were observed in cultures with and without FM. The highest abundance of chemical entities was observed in cultures with FM, totaling 1,221 (90.37% of the total). Of these, 44 were identified as carboxylic acids and derivatives, fatty acids, lignans, organic oxygen compounds, cinnamic acids and derivatives, flavonoids, nucleosides, alkaloids and an intermediate metabolite of the SECO to ED conversion reaction (MHEND). Cultures without FM did not present the conversion of plant lignans to mammalian lignans due to lack of substrate, cultures with FM allowed the quantification of SDG, SECO, ED and EL, and the metabolites produced from plant lignans of FM are ED and EL and others chemical entities like MHEND.

## Introdução

O consumo de fontes de antioxidantes é amplamente recomendado por profissionais da área da saúde para melhorar a qualidade de vida da população<sup>1</sup>. A melhoria ocorre principalmente pela prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e imunodeficiência<sup>2,3</sup>. Apesar de pouco divulgado, o leite é uma fonte de antioxidantes, sendo seu potencial antioxidativo passível de modificação através da alimentação<sup>4-6</sup>. Isso poderá ocorrer pelo consumo de fontes de antioxidantes pela vaca e a transferência dos metabólitos para o leite.

A degradação dos alimentos no rúmen é um processo dinâmico e contínuo orquestrado por uma grande quantidade de enzimas microbianas<sup>7</sup>. O rúmen é um ambiente anaeróbio e seus habitantes (bactérias, protozoários, fungos, arqueas e bacteriófagos) tornam a compreensão da transferência dos antioxidantes complexa<sup>8</sup>. Compreender os processos microbianos do rúmen, interações e funcionalidade é fundamental para potencializar a transferência de metabólitos com potencial antioxidante<sup>9</sup>.

A linhaça é um alimento com grande potencial antioxidante, sendo rica em uma classe de antioxidantes naturais: as lignanas vegetais<sup>10</sup>. As lignanas vegetais estão presentes principalmente em duas formas, a secoisolariciresinol diglucosídeo (SDG) e a secoisolariciresinol (SECO)<sup>3,11</sup>, estando ambas concentradas na porção fibrosa da linhaça<sup>12</sup>. Em ruminantes, as lignanas vegetais sofrem diversas reações catalíticas: O-deglicosilação, O-demetilação, desidroxilação e desidrogenação, como as relatadas em humanos<sup>13,14</sup>. Quando consumida por mamíferos, essas lignanas vegetais serão precursoras das lignanas mamíferas, também conhecida como enterolignanas: a enterolactona (EL) e o enterodiol (ED)<sup>13,14</sup>, as quais atuaram positivamente protegendo o organismo do animal.

A conversão das lignanas vegetais para mamíferas é realizada por microrganismos intestinais no caso dos humanos e monogástricos, e por microrganismos ruminais e intestinais em ruminantes<sup>9,15</sup>. Alguns microrganismos que realizam esse papel em humanos e monogástricos são conhecidos<sup>14,16</sup>. Em primeiro lugar, SDG passa por um processo de O-deglicosilação formando SECO. O próximo processo é a O-demetilação de SECO, que resulta em um metabólito intermediário chamado 2,3-bis (3,4-dihidroxibenzil) -butano-1,4 diol, através da reação na conversão de SECO em ED. Posteriormente, ocorre um processo de desidroxilação, convertendo o composto ED, que é finalmente convertido em EL após uma desidrogenação da molécula de ED<sup>13,14</sup>. Porém,

em ruminantes, pouco se sabe sobre quem são e quais mecanismos são utilizados para converter lignanas vegetais em lignanas mamíferas<sup>9,17,18</sup>.

Para compreender os mecanismos de conversão das transformações das lignanas vegetais em lignanas mamíferas é necessário procurar ferramentas como a metabolômica, a qual possibilita a caracterização e quantificação de metabólitos para entender as interações entre os genes e o ambiente<sup>19</sup>. A metabolômica tem duas abordagens. Uma é a metabolômica direcionada, a qual quantifica grupos definidos de metabólitos quimicamente caracterizados e bioquimicamente anotados, ou que estejam associados a rotas metabólicas específicas<sup>20</sup>. A outra abordagem é a metabolômica não-direcionada, que é uma análise qualitativa e abrangente, permitindo avaliar o maior número de metabólitos desconhecidos de uma amostra, pertencentes a diversas classes químicas, contidas no sistema biológico em estudo<sup>21</sup>.

Neste estudo, foram usadas a metabolômica direcionada e a metabolômica não-direcionada para a quantificação e identificação do metabolismo das lignanas nas incubações das culturas *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de FL.

## **Materiais e Métodos**

### ***Local, Instalações e Animais***

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) do Departamento de Zootecnia, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), no mês de novembro/2018 e aprovado pelo comitê de ética animal (no. 5668221018) da UEM. Foram utilizadas quatro vacas secas da raça Holandesa canuladas no rúmen, com peso médio de 504±45 kg. Os animais foram alimentados às 07 e 15h para ingestão *ad libitum* e foram alojados em baias individuais do tipo *tie-stall* com livre acesso a água limpa.

### ***Dietas experimentais***

Os animais foram distribuídos em dois tratamentos: dieta sem adição de FL; e dieta com adição de FL. As dietas experimentais foram compostas por silagem de milho (65%) e concentrado (35%) composto milho moído fino, farelo de soja, casquinha de soja, calcário calcítico suplemento mineral e vitamínico. Os animais foram alimentados com as respectivas dietas durante 21 dias. A dieta com FL tinha como objetivo elevar a quantidade de microrganismos com afinidade para degradar FL.

Para estimativa do consumo, foram feitas pesagens das quantidades do volumoso e concentrado fornecidos e das sobras de cada tratamento diariamente. Foi realizado



ajuste do fornecimento da dieta com base no consumo de matéria seca no dia anterior, de forma a ser mantido um percentual de sobras, entre 5 e 10% da matéria natural fornecida, para que não houvesse limitação de consumo.. O balanceamento das rações foi feito de forma a obter uma dieta isoprotéica e isoenergética, atendendo as exigências das vacas seca conforme preconizado pelo NRC (2001; Tabela 1).

**Tabela 1.** Proporção dos ingredientes e composição química das dietas sem e com inclusão de farelo de linhaça

Item <sup>1</sup>	Sem farelo de linhaça	Com farelo de linhaça
<b>Ingrediente (g/kg de MS)</b>		
Silagem de milho	650,0	650,0
Milho moído fino	159,8	159,3
Farelo de soja	103,0	0
Farelo de linhaça	0	174,7
Casquinha de soja	71,2	0
Suplemento mineral e vitaminico <sup>2</sup>	8,0	8,0
Calcário calcítico	8,0	8,0
<b>Nutrientes</b>		
Matéria seca (g/kg de MN)	394,4	397,7
Matéria orgânica (g/kg de MS)	943,4	942,1
Proteína bruta (g/kg de MS)	120,0	120,0
Extrato etéreo (g/kg de MS)	29,7	29,3
Fibra em detergente neutro (g/kg de MS)	416,2	418,3
Carboidratos não fibrosos (g/kg de MS)	375,5	371,1

<sup>1</sup>MS= matéria seca; MN= matéria natural.

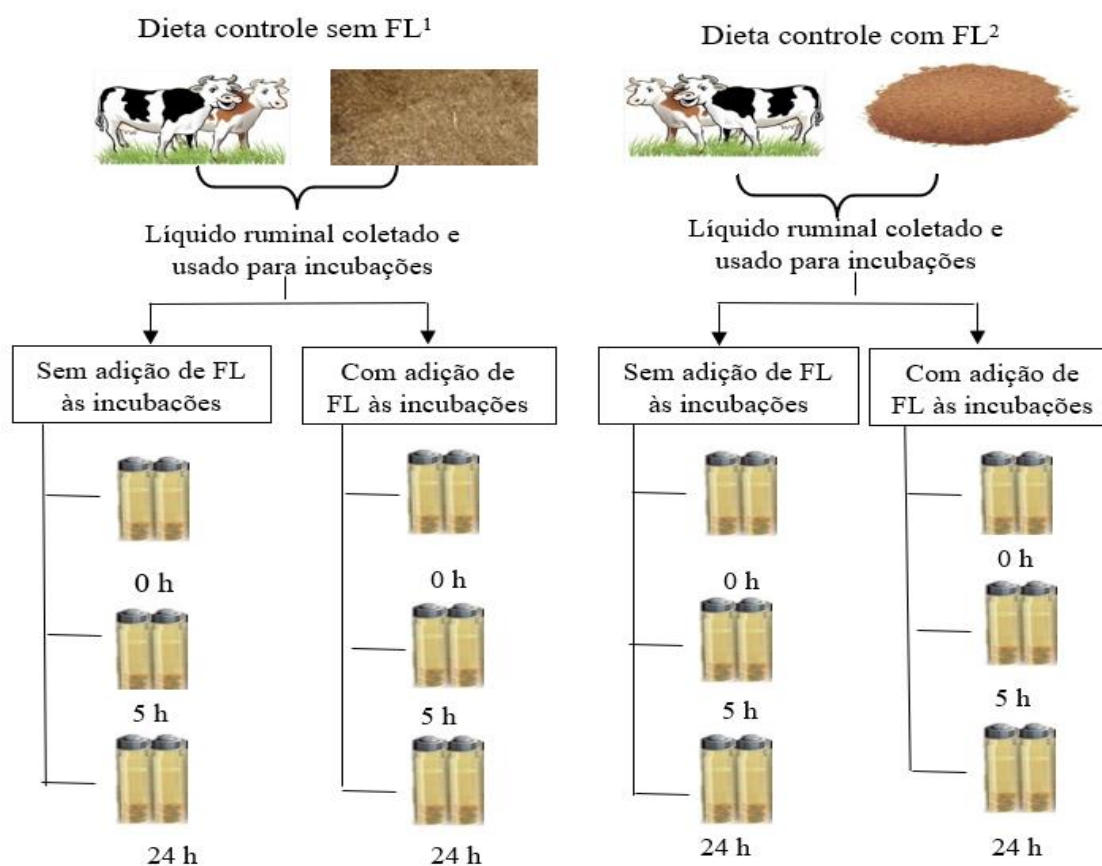
### **Incubações**

No dia 21, o conteúdo ruminal de cada animal foi amostrado (1.000 mL) através de uma cânula ruminal 10 min antes do fornecimento da alimentação. As amostras foram filtradas com uso de três camadas de tecido filtrante. O material foi mantido em recipientes com isolamento térmico, purgados com CO<sub>2</sub> (redução do nível de O<sub>2</sub> no recipiente) e levado à UEM para imediata realização das incubações das culturas.

Uma série de incubações foram realizadas utilizando garrafas Duran de 1.000 mL com 80 mL do líquido ruminal das vacas alimentadas com e sem adição de linhaça (Figura 1). Ao líquido ruminal, foi acrescentado 720 mL de meio anaeróbico de cultura (Van Soest, modificado por Theodorou et al. (1994)) (Tabela 2), e adicionado ou não 40 gramas de FL. As incubações das culturas foram realizadas em duplicata, foram as seguintes quatro conjuntos: 1) Líquido ruminal das vacas que não consumiram FL e sem adição de FL ao

meio de cultura; 2) Líquido ruminal das vacas que não consumiram FL e com adição de FL ao meio de cultura; 3) Líquido ruminal das vacas que consumiram FL e sem adição de FL ao meio de cultura; 4) Líquido ruminal das vacas que consumiram FL e com adição de FL ao meio de cultura.

Foram preparadas as incubações das culturas como controles (720 mL de meio anaeróbico de cultura sem adição de líquido ruminal e FL; e 720 mL de meio anaeróbico de cultura sem adição de líquido ruminal, mas com 40 gramas de FL). Os tempos de incubação das culturas foram: 0h; 5h; e 24h. Imediatamente após a inoculação das garrafas Duran, as incubações das culturas foram transferidas para uma incubadora a 39 °C. As culturas foram removidas da incubadora de acordo com cada tempo de incubação, foram centrifugadas a 800 g x 15 min, se descartou a fração fibrosa. Sobrenadante do das culturas foram centrifugadas a 1.2000 g x 12 min, o sobrenadante foi armazenado a -80 °C.



**Figura 1.** Esquema de incubação das culturas com ou sem adição de farelo de linhaça  
<sup>1</sup> FL; Farelo de linhaça

**Tabela 2. Soluções de meio anaeróbio cultura para incubação**

Produto	Quantidade
Micro minerais	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	13,2 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	10 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 g
FeCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	8 g
H <sub>2</sub> O destilada	100 mL
Solução A (tampão)	
NaHCO <sub>3</sub>	39,253 g
H <sub>2</sub> O destilada	1 L
Solução B (macro minerais)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anidro)	9,45 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anidro)	6,2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,6 g
H <sub>2</sub> O destilada	1 L
Solução C (agente redutor)	
Cisteína HCl	0,625 g
1M NaOH	0,4 mL
H <sub>2</sub> O destilada	95 mL

### *Extração líquido-líquido de metabólitos das culturas*

O sobrenadante das incubações das culturas foi descongelado e centrifugado a 12.000 g x 15 min, filtrado em membrana Durapore de 0,45 µm PVDF com diâmetro de 47 mm; e posteriormente filtrado em membrana Durapore de 0,22 µm PVDF com diâmetro de 47 mm. O material foi diluído na razão 1:1 em metanol, e centrifugado por 4.300 g x 10 min, e novamente diluído 1:20 para análises de metabolômica. Para as análises de metabolômica não-direcionada, o material extraído foi diluído 2:1 em metanol e centrifugado por 12.000 g x 10 min; o sobrenadante do líquido ruminal diluído foi filtrado em membrana de 0,22 PVDF Analítica® com diâmetro de 13 mm.

### *Análise metabolômica direcionada*

Padrões analíticos de secoisolariciresinol diglucosídeo (SDG) (≥ 97%), secoisolariciresinol (SECO) (≥ 95%), enterodiol (≥ 95%) e enterolactona (≥ 95%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Metanol grau HPLC (J.T. Baker), água ultrapura obtida pelo sistema Gehaka, e ácido fórmico (J.T. Baker) foram empregados para as quantificações por UPLC-MS/MS. Soluções estoque dos padrões (10 mg L<sup>-1</sup> de SDG, 5

mg L<sup>-1</sup> de SECO e 2 mg L<sup>-1</sup> enterodiol em metanol, e enterolactona 2 mg L<sup>-1</sup>, em água) foram preparadas e armazenadas em freezer (-20 °C). As curvas analíticas foram preparadas utilizando as culturas, empregando-se 11 pontos em triplicata, envolvendo as faixas de concentração: a) de 1,95 a 2.000 µg L<sup>-1</sup> para SDG, enterolactona e enterodiol; b) de 4,88 a 5.000 µg L<sup>-1</sup> para SECO. As amostras das culturas foram adequadamente diluídas a fim de que as áreas encontradas estivessem contidas dentro da faixa de concentração das curvas analíticas.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo com fonte de ionização por *electrospray* (ACQUITY UPLC – ACQUITY TQD, Waters). Como condições cromatográficas, empregou-se a eluição por gradiente, utilizando os solventes: água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente empregado envolveu as etapas: 10% de B, de 0 a 0,3 min; de 10% a 90% de B, de 0,3 a 8,0 min; de 90% a 10% de B, de 8,0 a 8,5 min; mantendo 10% B de 8,5 a 13,0 min para equilibrar a coluna cromatográfica com a condição inicial do gradiente. Como fluxo de fase móvel, empregou-se 0,15 mL min<sup>-1</sup>. Utilizou-se uma coluna de fase reversa ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS C18 (2,1 x 100 mm, 1,8 µm) em temperatura de 35 °C, e volume de injeção de 2 µL.

No espectrômetro de massas, a fonte de ionização operou em modo negativo (ESI), empregando-se as condições MS/MS: temperatura da fonte de 120 °C, voltagem do capilar de 3,0 kV e temperatura de dessolvatação de 300 °C. Um gerador de nitrogênio (N<sub>2</sub>) de elevado grau de pureza (PeakScientific<sup>®</sup>) foi utilizado, a fim de gerar N<sub>2</sub> empregado como gás de dessolvatação, em fluxo de 800 L h<sup>-1</sup>, e também empregado como *cone gás*, em fluxo de 30 L h<sup>-1</sup>. Argônio (100% pureza, marca Air liquide), utilizado com o gás de colisão, foi empregado em fluxo de 0,12 mL/min. As voltagens do cone empregadas para os compostos SDG, SECO, enterodiol e enterolactona, bem como as energias de colisão empregadas para seus respectivos fragmentos, estão apresentados na Tabela 2. Os cromatogramas de cada transição de quantificação estão apresentados na Figura 2.

#### ***Análise metabolômica não-direcionada:***

Para a análise de metabolômica não-direcionada, os extratos foram analisados usando um cromatógrafo líquido de ultra-alto desempenho (Shimadzu, Nexera X2, Japão) acoplado a um espectrômetro de massa de alta resolução quadrupolo híbrido com tempo

de voo (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray*. A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna de fase reversa ACQUITY UPLC<sup>®</sup> HSS C18 (2,1 x 100 mm, 1,8  $\mu$ m) (Waters, Reino Unido), a uma taxa de fluxo de 0,2 mL min<sup>-1</sup>. A mistura de gradiente de solventes A (H<sub>2</sub>O com 0,1% de ácido fórmico; v:v) e B (acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico; v:v) foi a seguinte: 5% B 0-1 min, 50% B 1-5 min, 95% B 5–10 min, mantido a 95% B 10–16 min, 5% B 16–18 min, e mantido a 5% B 18–21 min a 40 °C. A tensão capilar foi operada nos modos de ionização positivo e negativo, fixados em 4.500 e 3.000 V, respectivamente; com um potencial de definição da placa final de -500 V. Os parâmetros do gás seco foram ajustados para 8 L min<sup>-1</sup> a 180 °C com uma pressão do gás de nebulização de 4 bar. Os dados foram coletados de *m/z* 50 a 1.300 com uma taxa de aquisição de 5 Hz, e os 4 íons de interesse foram selecionados por fragmentação de varredura de MS / MS automática.

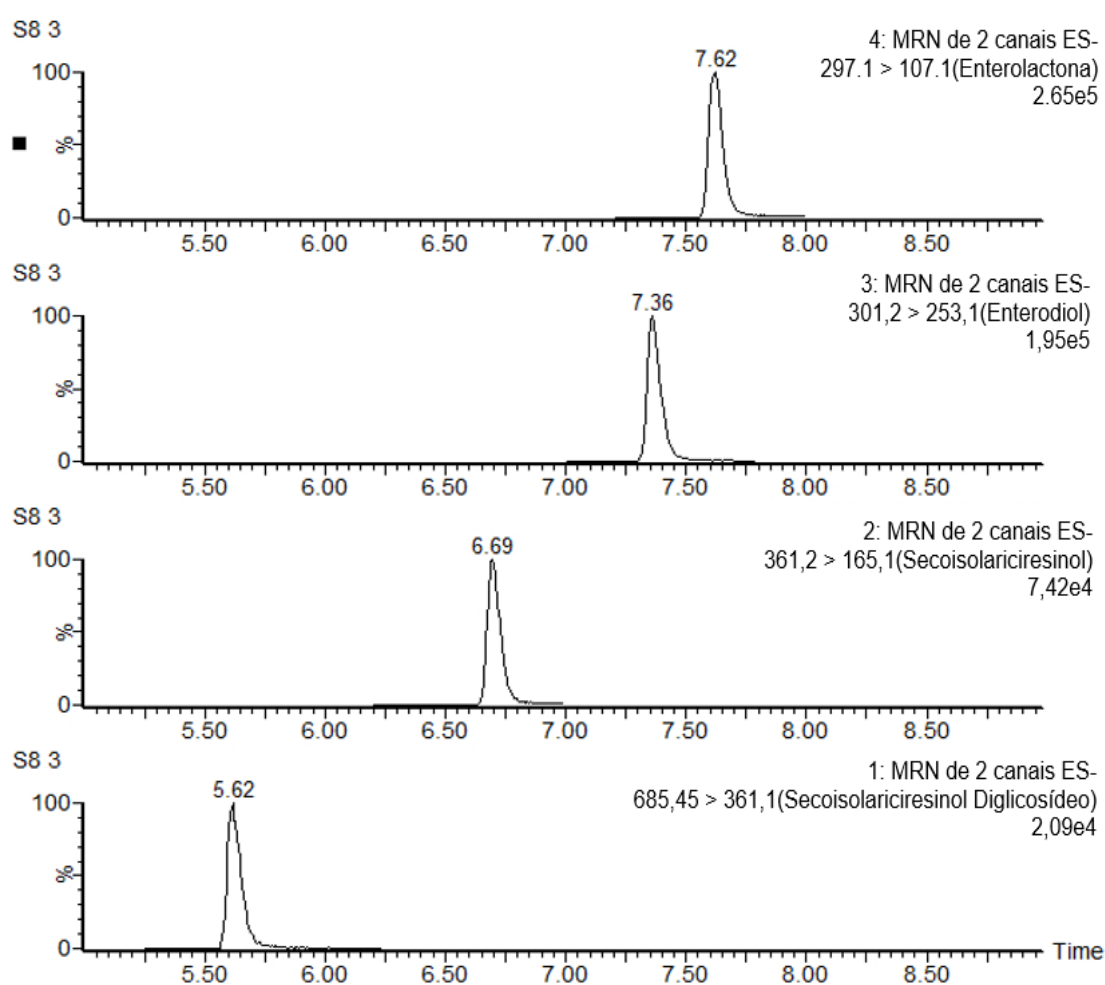
**Tabela 3. Condições empregadas para a determinação de SGD, SECO, enterodiol e enterolactona por UPLC-MS/MS**

Compostos	Massa monoisotópica	Cone (V)	Transição SRM <sup>1</sup>	Energia de colisão (V)	Tempo de retenção (min)	Janela de aquisição (min)
SDG	686,2786	70	6,85 → 361,1 <sup>2</sup>	40	5,62	5,25 - 6,25
			6,85 → 523,3 <sup>3</sup>	30		
SECO	362,1729	45	361,2 → 165,1 <sup>2</sup>	25	6,69	6,20 - 7,00
			361,2 → 346,2 <sup>3</sup>	20		
Enterodiol	302,1518	40	301,2 → 253,1 <sup>2</sup>	21	7,36	7,00 - 7,80
			301,2 → 271,3 <sup>3</sup>	21		
Enterolactona	298,1205	45	297,1 → 107,1 <sup>2</sup>	22	7,61	7,20 - 8,00
			297,1 → 253,13 <sup>3</sup>	20		

<sup>1</sup> Monitoramento de reação única; <sup>2</sup>Transição de quantificação; <sup>3</sup> Transição de confirmação.

### *Análise dos dados de metabolômica não-direcionada pelo GNPS*

Foi utilizada a abordagem de Rede Molecular Social de Produtos Naturais Globais (GNPS) para os dados onde se juntaram os dados dos tratamentos 1 e 2 (sem adição de FL às culturas) e os tratamentos 3 e 4 (com adição FL às culturas) nos tempos 0, 5 e 24 h. Para isso, os dados brutos adquiridos pelo espectrômetro de massas foram convertidos em formato de arquivo mzXML, seguido de *upload* para o GNPS para gerar a rede molecular (MN), de acordo com as diretrizes do GNPS <sup>23</sup>



**Figura 2.** Cromatogramas obtidos para os compostos secoisolariciresinol diglicosídeo, secoisolariciresinol, enterodiol e enterolactona, empregados para a determinação por UPLC-MS/MS.

A rede molecular foi criada usando o fluxo de trabalho online (<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/>) no site do GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>). Os dados foram filtrados removendo todos os íons de fragmento de MS / MS dentro de +/- 17 Da

do precursor  $m/z$ . Os espectros de MS / MS foram filtrados por janela, escolhendo apenas os 6 íons de fragmento superiores na janela +/- 50 Da em todo o espectro. A tolerância de massa do íon precursor foi fixada em 2,0 Da e uma tolerância de fragmento de íon MS / MS de 0,5 Da.

A rede foi então criada onde as bordas foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,65 e mais de 5 picos correspondentes. Além disso, as bordas entre dois nós foram mantidas na rede se, e somente se, cada um dos nós apareceu nos respectivos 10 nós mais semelhantes. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as bordas de pontuação mais baixas foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo desse limite. Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre os espectros da rede e os espectros da biblioteca deveriam ter uma pontuação acima de 0,7 e pelo menos 6 picos correspondidos

A abordagem GNPS consiste em comparar espectros de fragmentação (experimentos de MS/MS) e agrupar moléculas com estruturas químicas semelhantes. Cada espectro é representado como um nó no MN visual, e os alinhamentos espectro a espectro são representados como linhas que conectam nós, evidenciando íons que estão correlacionados uns com os outros. A comunicação entre os nodos está relacionada a semelhanças nos espectros de fragmentação entre os íons, e a semelhança entre os padrões de fragmentação são avaliados via relação vetorial. Moléculas estruturalmente relacionadas exibem padrões de fragmentação semelhantes.

Portanto, as famílias moleculares tendem a se unir em grupos no MN, chamados de *clusters*. Ademais, é possível determinar a diferença de  $m/z$  entre os nodos, definindo a proximidade espectral entre todos os espectros MS/MS em um conjunto de dados. Esta ferramenta permite a comparação de características moleculares com a biblioteca espectral GNPS e todos os dados disponíveis publicamente.

A rede molecular foi visualizada usando o Cytoscape<sup>24</sup>. Metabólitos com correspondência positiva com a biblioteca GNPS tinham íons pai e fragmento manualmente comparados com a biblioteca espectral GNPS e dados disponíveis publicamente (Figuras suplementares S01 – S48). O erro de massa foi inferior a 10 ppm (Tabela suplementar S1). Um diagrama de Venn foi construído no Microsoft Excel a partir de dados de características moleculares exportados usando GNPS.

## Resultados

### *Metabolômica direcionada*

Não foram detectadas as lignanas vegetais e nem as lignanas mamíferos nas amostras sem adição FL (Tabela 3). Quando foi utilizado o líquido ruminal de vacas que receberam FL na dieta, mas que não houve inclusão de FL à incubação, houve detecção das lignanas vegetais, especialmente SDG, nos tempos 0 e 5h, sendo 3,96 e 4,03 mg/L, respectivamente. Para SECO nos tempos 0, 5 e 24h, as concentrações foram 0,20, 0,817 e 80,0 mg/L, respectivamente. Além do que, para o tempo 24 h foi detectado 6,41 mg/L de enterodiol.

Quando o FL foi adicionado às culturas do líquido ruminal de vacas com alimentação de FL, houve detecção de lignanas vegetais, especialmente SDG para os tempos 0 e 5 h de 5,74 e 8,68 mg/L, respectivamente, e SECO para os tempos 0, 5 e 24 h de 0,33, 1,31 e 80,0 mg/L, respectivamente. Além do que, as concentrações de enterodiol e enterolactona no tempo de 24 h foram 6,41 mg/L e 0,05 mg/L.

### *Metabolômica não-direcionada*

Os dados compilados das culturas com e sem adição FL nos modos positivos e negativos, nos três tempos de incubação foram usados para gerar um diagrama de Venn (Figura. 3). Foram observadas 1.351 entidades químicas através do uso de UHPLC-MS / MS, das quais 48 compostos foram identificados usando correspondências moleculares publicamente disponíveis (Tabelas S1 e S2), o que representa 3,55% das características moleculares observadas.

Um total de 89 entidades químicas (6,58% do total) foram observadas nas amostras com e sem adição FL nos três tempos de incubação, dos quais dois foram identificados (Ácido (10E, 12Z)-octadeca-10,12- dienóico e adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico). Um total de 41 entidades químicas (3,03% do total) foram observadas nas amostras sem adição FL nos três tempos de incubação, dos quais dois foram identificados (Ácido azelaico e ácido dodecanodioico).

Nas culturas com adição FL nos três tempos de incubação um total de 1.221 características moleculares (90,37% do total) estiveram presentes, dos quais 44 compostos foram identificados. Dos 44 compostos nas culturas com FL, 15 são da classe de ácidos carboxílicos e derivados (aminoácidos, peptídeos e análogos), 11 são ácidos

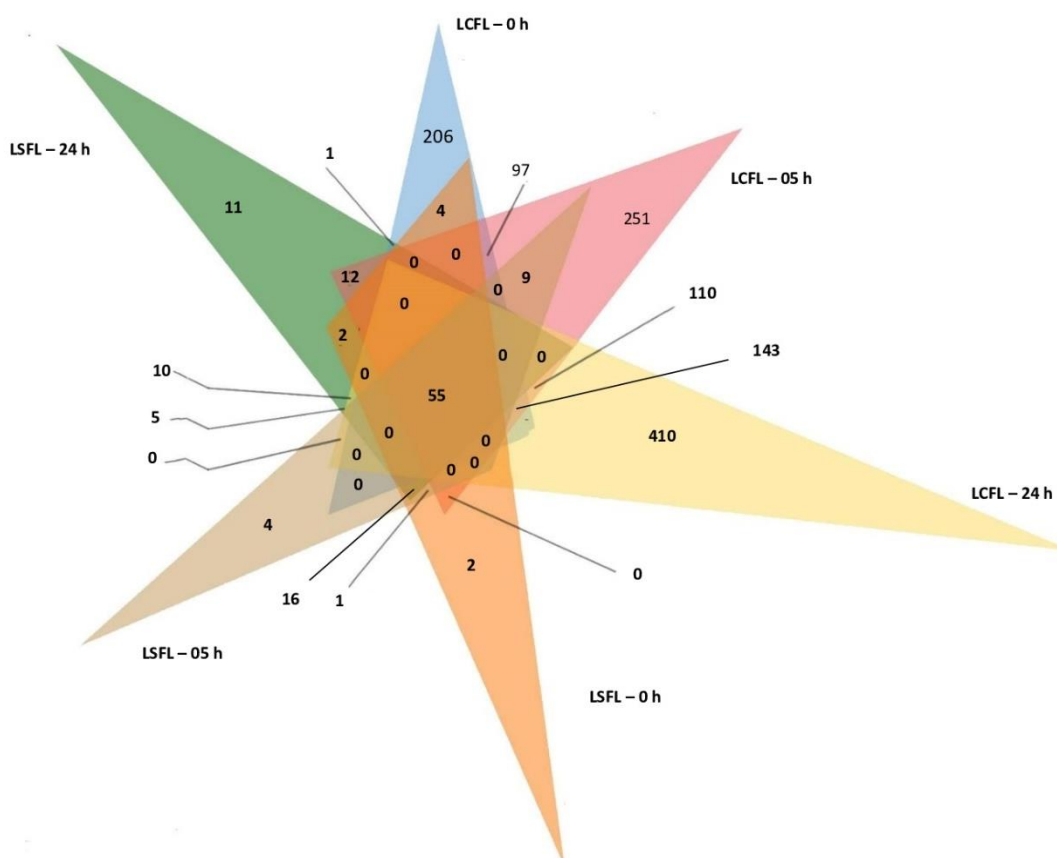


**Tabela 4.** Determinação de lignanas em incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça

Itens	Sem adição de farelo de linhaça						Com adição de farelo de linhaça					
	LQSL <sup>1</sup>			LQCS <sup>2</sup>			LQSL <sup>1</sup>			LQCS <sup>1</sup>		
	Tempo			Tempo			Tempo			Tempo		
	0h	5h	24h	0h	5h	24h	0h	5h	24h	0h	5h	24h
SDG <sup>3</sup> (mg/L)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	3,96	4,03	<LOQ	5,74	8,68	<LOQ
SECO <sup>4</sup> (mg/L)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,20	0,817	80,0	0,33	1,31	94,44
Enterodiol (mg/L)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	6,41	<LOQ	0,15	3,46
Enterolactona (mg/L)	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0,05

<sup>1</sup>LQSL; líquido ruminal de animais alimentos sem farelo de linhaça; <sup>2</sup>Líquido ruminal de animais alimentos com farelo de linhaça; <sup>3</sup>SDG: Secoisolariciresinol diglucosídeo; <sup>4</sup>SECO: Secoisolariciresinol; < LOQ = limite de quantificação baixa.

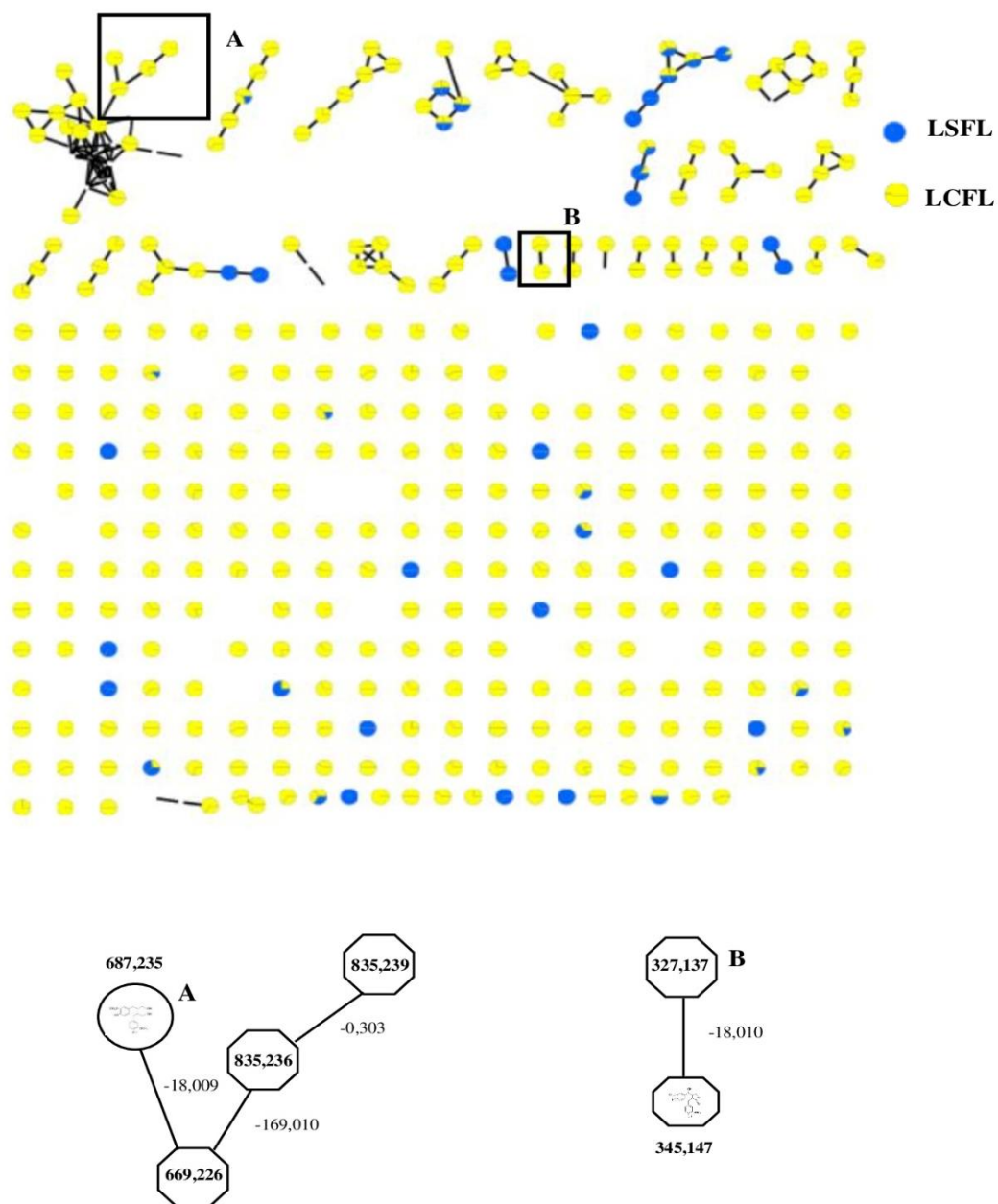
graxos (ácidos graxos conjugados, ácidos linoleicos e derivados, e glicosídeo), quatro são da classe de lignanas, quatro são da classe compostos orgânicos de oxigênio, dois são da classe de ácidos cinâmicos e derivados, dois são da classe flavonoides, dois são da classe nucleotídeos e um é da classe alcalóides. Com respeito às lignanas vegetais que foram identificadas nas culturas com FL o SDG nos tempos 0 e 5 h (Figura 4) e SECO no tempo 5 e 24 h (Figura 4 e 5). As enterolignanas ED e EL foram encontradas no tempo 24 h (Figura 5).



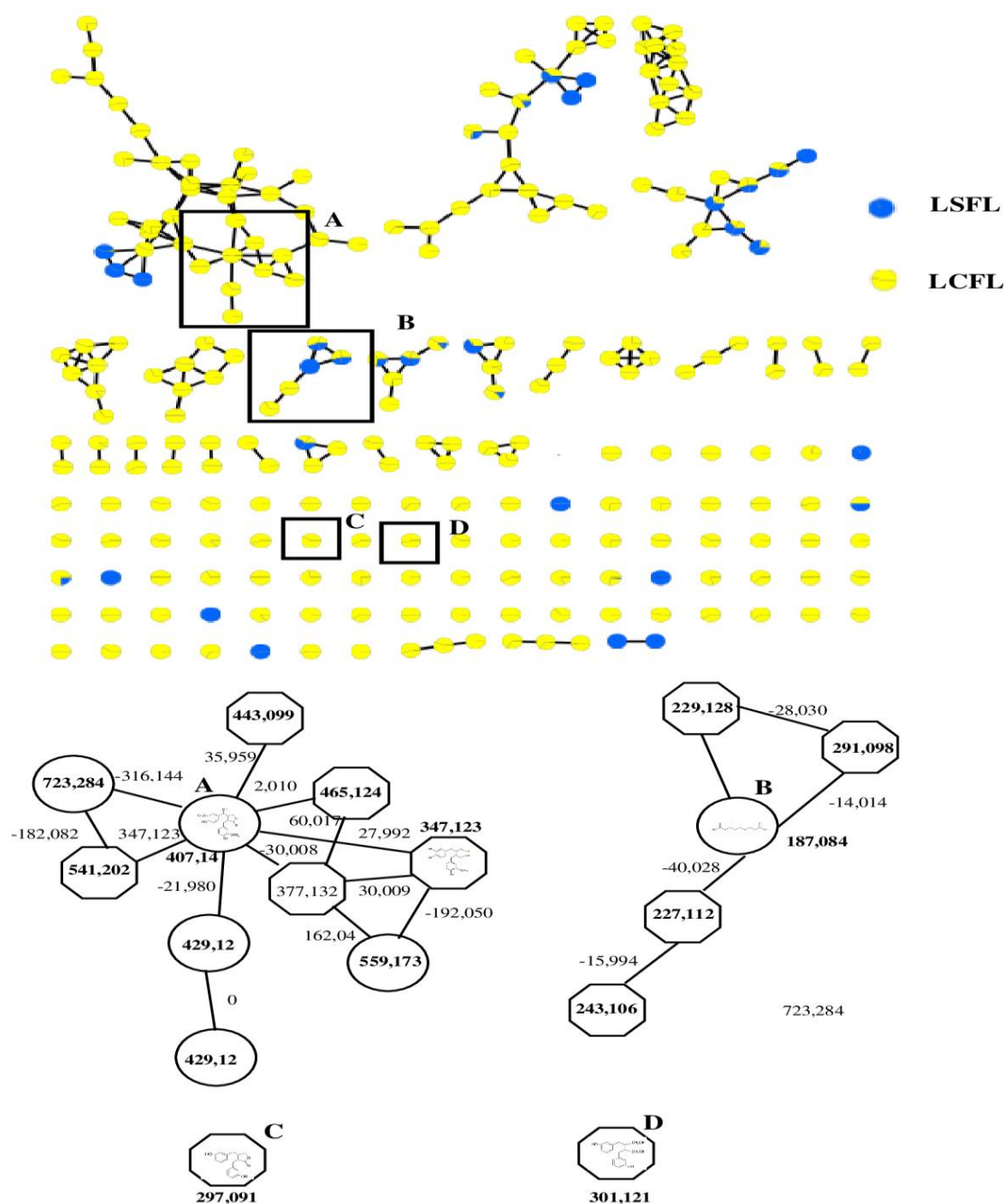
**Figura 3.** Diagrama de Venn compilando entidades químicas extraídas das amostras sem adição de FL (LSFL) e das amostras com adição FL (LCFL) nos tempos 0, 5 e 24h.

### Discussão

No presente estudo não foram observados metabólitos das lignanas vegetais e mamíferos nas culturas sem adição de FL (Tabela 3). Porém, a microbiota do rúmen sem substrato não converte lignanas vegetais a lignanas mamíferas. Houve produção de SECO a partir de SDG nas amostras com adição FL pela microbiota ruminal (Tabela 3) Independente das culturas com líquido ruminal de vacas alimentadas com e sem FL.



**Figura 4.** Rede molecular (MN) gerado com o uso das características moleculares das culturas 1 e 2 sem adição de FL (LSFL) e as culturas 3 e 4 com adição FL (LCFL) no tempo de 5h. (A) O nó indica a correspondência espectral do GNPS do SDG com  $[M-H]^+$ ;  $m/z$  687,245). (B) O nó indica a correspondência espectral do GNPS do SECO com  $[M-H_2O+H]^+$ ;  $m/z$  345,147).



**Figura 5.** Rede molecular (MN) gerado com o uso das características moleculares das culturas 1 e 2 sem adição de FL (LSFL) e as culturas 3 e 4 com adição FL (LCFL) no tempo de 24h. (A) O nó indica a correspondência espectral do GNPS do SECO com ([M+HCOO]<sup>-</sup>; m/z 407,14); [M+H]<sup>-</sup>; 347,123 (2-(3,4-dihydroxybenzyl)-3-(3-hydroxy-4-methoxybenzyl) butane-1,4-diol (MHEND)). (B) O nó indica a correspondência espectral do GNPS do Ácido azelaico com ([M+H]<sup>-</sup>; m/z 187,084). (C) O nó indica a correspondência espectral do GNPS da Entolactona com ([M-H]<sup>-</sup>; m/z 297,031). (D) O nó indica a correspondência espectral do GNPS da Enterodiol com ([M-H]<sup>-</sup>; m/z 301,121).

O resultado da hidrólise de SDG em SECO, é uma reação de deglicosilação catalisada pela enzima  $\beta$ -glucorindase<sup>9,25</sup> produzida pelos microrganismos ruminais. A maior produção líquida de SECO pela microbiota ruminal foi observada com 5h nas culturas com adição FL e com líquido ruminal de vacas alimentadas com FL, teve uma menor produção ao redor -46,42% nas culturas com adição FL e com líquido ruminal de vacas alimentadas sem FL. O resultado da hidrólise de SDG em SECO, é uma reação de deglicosilação catalisada pela enzima  $\beta$ -glucorindase<sup>9,25</sup> produzida pelos microrganismos ruminais. A maior produção líquida de SECO pela microbiota ruminal foi observada com 5h nas culturas com adição FL e com líquido ruminal de vacas alimentadas com FL, teve uma menor produção ao redor -46,42% nas culturas com adição FL e com líquido ruminal de vacas alimentadas sem FL. Sugerindo que a população microbiana não precisa de uma adaptação para a hidrólise das lignanas vegetais, e o primeiro passo na produção de lignanas no rúmen com adição do FL é de SDG a SECO. Em animais não ruminantes, a atividade da  $\beta$ -glucuronidase é de origem da microbiota ruminal, que desempenha um papel importante na deglicosilação de SDG a SECO<sup>326</sup>. Além disso, ajuda na absorção de EL no rúmen<sup>9</sup>.

Um estudo *in vitro* Schogor et al.<sup>27</sup> usando culturas puras selecionadas de bactérias ruminais incubadas com SDG demonstrou que 11 bactérias ruminais (principalmente *Prevotella spp.*) foram capazes de converter SDG em SECO, resultado que afirmar a conversão de SDG a SECO no presente estudo. Os resultado de SECO no tempo 24h foi maior comparado com os tempos 0 e 5h, aumentando ao redor de 98,1% de SECO nas culturas com adição de FL mais líquido ruminal de vacas alimentadas com e sem FL, devido que nas primeiras h de incubação os microrganismos ruminais estão fazendo o processo hidrólise de SDG em SECO, levando a ter maior concentração no tempo de 24h. Por outro lado, o SECO foi o precursor de lignanas mamíferas como ED no tempo 5 e 24h para as culturas com adição de FL. Este resultado está de acordo com os de Borriello et al.<sup>28</sup>, que relataram que a SECO incubada com microbiota fecal humana levou à produção de ED.

Segundo Wang et al.<sup>29</sup> não foram identificados outros metabólitos quando SDG foi convertido em lignanas mamárias (ED + EL) pela microbiota nos humanos. Além disso, Heinonen et al.<sup>30</sup> relataram que SDG foi metabolizado principalmente pela microbiota humana em EL e ED sem nenhum outro metabólito sendo produzido. No presente trabalho, encontrou-se com o uso da metabolômica não-direcionada nas

incubações das culturas com adição de FL, um metabólito intermediário, que foi o SECO (Tabela S1 e S2).

Além disso, se encontrou um metabólito intermediário da reação de conversão de SECO em ED, como o mostra a figura 5, o SECO monodesmetilado chamado 2-(3,4-dihidroxibenzil)-3-(3-hidroxi-4-metoxibenzil) butano-1,4-diol (MHEND), produto que foi identificado na conversão de SECO em ED pela bactéria e *Peptostreptococcus productus*<sup>34</sup>. Na literatura um intermediário similar foi reportado na conversão da O-demetilação do SECO a ED pela por bactérias intestinais dos humanos é o 2,3-bis-(3,4-dihidroxi-benzil) butano-1,4-diol (MHEND)<sup>13,15</sup>, o primer composto intermediário reportado da conversão de SECO em ED em ruminantes.

Vários estudos apresentam evidências de que o produto final da degradação de SDG é o EL<sup>6,25,31,32</sup>. Porém, no presente estudo foi constatado que a degradação do SDG a SECO, posteriormente a transformação de SECO a ED, e ED a EL. Isto pode ser evidenciado nas concentrações de cada metabólito mostrado na Tabela 3. Côrtes et al.<sup>33</sup> encontraram os mesmos resultados, mas a conversão de lignanas vegetais (SDG + SECO) em lignanas mamárias (ED + EL) foram maiores para as incubações com a microbiota fecal comparativamente à microbiota ruminal com casca e semente de linhaça. As culturas com adição de FL e com líquido ruminal de vacas alimentadas sem FL não apresentaram EL, em comparação de vacas alimenta com FL, o precursor da EL e o ED, onde este composto teve uma maior concentração no tempo 5h, assim levando uma rápida conversão de ED a EL para o tempo 24h.

No presente estudo, foram observadas 1.351 entidades químicas, sendo identificadas 48, o que corresponde a 3,55% do total. As fontes dessas entidades químicas não caracterizadas podem variar de moléculas secretadas por microrganismos ruminais, plantas, o hospedeiro e drogas administradas<sup>35</sup>. Artegoitia et al.<sup>36</sup> com o objetivo de identificar marcadores para a função ruminal que pudessem levar a diferenças no ganho médio diário observou 1.429 características moleculares utilizando a abordagem metabolômica não direcionada. De Almeida et al.<sup>35</sup> encontraram que a combinação de cinco métodos de extração resultou em 1.882 características moleculares observadas no líquido ruminal, demonstrando que a metabólica não direcionada é útil para identificar marcadores na função ruminal .

A maior abundância de entidades químicas foi observada nas culturas com adição FL nos três tempos de incubação: um total de 61,96%. Destes, 44 entidades químicas (3,25% do total) foram identificadas, como os ácidos carboxílicos e derivados, os ácidos

graxos, as lignanas, compostos orgânicos de oxigênio, ácidos cinâmicos e derivados, flavonóides, nucleosídeos e alcalóides. Resultados similares foram encontrado por Saleem et al.<sup>37</sup> observaram metabólitos incluindo: fosfolipídios, íons inorgânicos, gases, aminoácidos, ácidos dicarboxílicos, ácidos graxos, ácidos graxos voláteis, glicerídeos, carboidratos e ésteres de colesterol.

Os ácidos carboxílicos e derivados (aminoácidos, peptídeos e análogos) foram entidades químicas identificadas que tiveram sua origem no metabolismo proteico do FL. Segundo Shim et al.<sup>38</sup>, o FL tem 18 aminoácidos, dos quais nove são aminoácidos essenciais e nove são não essenciais. Destes, sete aminoácidos essenciais e sete aminoácidos não essenciais foram identificados nas amostras com adição de FL. O FL tem um % da MS do EE  $11,96 \pm 12,10$ , com presença de ácido mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico. O ácido linoleico representa 12,9% e o ácido  $\alpha$ -linolênico 47%, do total de ácidos graxos do FL<sup>39,40</sup>. Dos 11 ácidos graxos encontrados no líquido ruminal com FL, oito estão relacionados com o metabolismo do ácido linoleico e seus derivados, tanto como ácido linoleico como ácido  $\alpha$ -linolênico sofrem biohidrogenação ruminal<sup>41</sup>.

Outros compostos encontrados nas culturas com FL são derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonoides e alcaloides presente no FL<sup>42</sup>, sendo classificados como compostos fenólicos. Dentro dos compostos fenólicos que foram encontrados, temos os ácidos cinâmicos derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido ferúlico acil-b-D-glucosídeo e ácido glucárico), os flavonoides (flavoccommelitin e quercetina-3,4'-O-di-beta-glucosídeo) e alcaloides (ácido indol-3-láctico). Estes compostos fenólicos estão presente na casca da lignanas<sup>43</sup>, e proporcionam uma defesa antioxidante para proteger a semente de linhaça do estresse oxidativo. A importância dos compostos fenólicos da linhaça que podem fazer parte das lignanas e podem ser liberados durante a degradação dos microrganismos<sup>44</sup>.

## Conclusão

As culturas sem FL não apresentaram lignanas vegetais e lignanas mamíferas por falta de substrato. As culturas com FL permitiram a quantificação de SDG, SECO e ED no líquido ruminal das vacas que não consumiram FL, e SDG, SECO, ED e EL no líquido ruminal das vacas que consumiram. Foram identificadas 1.351 entidades químicas nas amostras com e sem FL analisadas pelo UHPLC-MS / MS. Destas, 48 foram

identificadas, o que correspondeu a 3,55% das características moleculares totais, como ácidos carboxílicos e derivados (aminoácidos, peptídeos e análogos), os ácidos graxos (ácidos graxos conjugados, ácido linoleico e derivados, e glicosídeo), as lignanas, compostos orgânicos de oxigênio, ácidos cinâmicos e derivados, flavonóides, nucleosídeos e alcaloides, e permitiu identificar um intermediário da reação de conversão de SECO em ED (MHEND). Os resultados do presente experimento com o uso de metabolômica direcionada e não-direcionada sugerem que os metabólitos produzidos a partir da lignanas vegetais do FL pela microbiota ruminal foram o enterodiol e enterolactona e outras características moleculares como MHEND.

### **Declaração de disponibilidade de dados:**

O conjunto de dados foi submetido a *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) e está disponível através do identificador de estudo

Tempo 0h;

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=655a001b82aa490d87483eb485a6fed>  
a (Modo positivo)

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=377279f8471d4de48e55db8bbc1eb3b>  
Q (Modo Negativo)

Tempo 5h;

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=670f563b04584c2a98a678607c910ca>  
b (Modo positivo)

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=7ea49463b34a4d90bcea6533dbb7944>  
3 (Modo Negativo)

Tempo 24h;

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=96c2fbd6ad0a48579f7f6c2591e8d402>  
(Modo positivo)

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=8f2e8788f70b4b10beafa66e8feb6e3d>  
(Modo Negativo)



## Referências

1. Wilson, D. W. *et al.* The Role of Food Antioxidants , Benefits of Functional Foods , and Influence of Feeding Habits on the Health of the Older Person : An Overview. 1–20 (2017) doi:10.3390/antiox6040081.
2. Murkies, a L., Wilcox, G. & Davis, S. R. Clinical review 92: Phytoestrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 297–303 (1998).
3. Liu, Z., Saarinen, N. M. & Thompson, L. U. Sesamin is one of the major precursors of mammalian lignans in sesame seed (*Sesamum indicum*) as observed in vitro and in rats. *J. Nutr.* **136**, 906–912 (2006).
4. Petit, H. V. & Gagnon, N. Milk concentrations of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol, milk production, and whole tract digestibility of dairy cows fed diets containing different concentrations of flaxseed meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* **152**, 103–111 (2009).
5. Petit, H. V. & Gagnon, N. Concentration of the mammalian lignans enterolactone and enterodiol in milk of cows fed diets containing different concentrations of whole flaxseed. *Animal* **3**, 1428–1435 (2009).
6. Gagnon, N. *et al.* Ruminal metabolism of flaxseed (*Linum usitatissimum*) lignans to the mammalian lignan enterolactone and its concentration in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Br. J. Nutr.* **102**, 1015–1023 (2009).
7. Mcallister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A. & Cheng, K. Microbial Attachment and Feed Digestion in the Rumenl. *J. Anim. Sci.* **12**, 3004–3018 (2018).
8. Newbold, C. J. Review : Ruminal microbiome and microbial metabolome : effects of diet and ruminant host. *Animal.* **14**, 78–86 (2020) doi:10.1017/S1751731119003252.
9. Schogor, A. L. B., Palin, M. F., Santos, G. T., Benchaar, C. & Petit, H. V.  $\beta$ -glucuronidase activity and enterolactone concentration in ruminal fluid, plasma, urine, and milk of Holstein cows fed increased levels of flax (*Linum usitatissimum*) meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* **223**, 23–29 (2017).
10. Adolphe, J. L., Whiting, S. J., Juurlink, B. H. J., Thorpe, L. U. & Alcorn, J. Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Br. J. Nutr.* **103**, 929–938 (2010).
11. Thompson, L. U., Robb, P., Serraino, M. & Cheung, F. Mammalian Lignan Production From Various Foods. *Nutr. Cancer* **16**, 43–52 (1991).
12. Adlercreutz, H. & Mazur, W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann. Med.* **29**, 95–120 (1997).
13. Clavel, T., Borrmann, D., Braune, A., Doré, J. & Blaut, M. Occurrence and activity of human intestinal bacteria involved in the conversion of dietary lignans. *Anaerobe* **12**, 140–147 (2006).
14. Wang, L.-Q., Meselhy, M. R., LI, Y., Qin, G.-W. & Hattori, M. Human Intestinal Bacteria Capable of Transforming Secoisolariciresinol Diglucoside to Mammalian

- Lignans, Enterodiol and Enterolactone. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **48**, 1606–1610 (2000).
15. Jin, J. S., Kakiuchi, N. & Hattori, M. Enantioselective oxidation of enterodiol to enterolactone by human intestinal bacteria. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 2204–2206 (2007).
  16. Xie, L. H., Akao, T., Hamasaki, K., Deyama, T. & Hattori, M. Biotransformation of pinoresinol diglucoside to mammalian lignans by human intestinal microflora, and isolation of *Enterococcus faecalis* strain PDG-1 responsible for the transformation of (+)-pinoresinol to (+)-lariciresinol. *Chem. Pharm. Bull.* **51**, 508–515 (2003).
  17. Schogor, A. L. B. *et al.* Mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes and oxidative indicators in the blood, milk, mammary tissue and ruminal fluid of dairy cows fed flax meal. *Br. J. Nutr.* **110**, 1743–1750 (2013).
  18. Brito, A. F. & Zang, Y. A review of lignan metabolism, milk enterolactone concentration, and antioxidant status of dairy cows fed flaxseed. *Molecules* **24**, 1–21 (2019).
  19. Allen, J. *et al.* High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat. Biotechnol.* **21**, 692–696 (2003).
  20. Roberts, L. D., Souza, A. L., Gerszten, R. E. & Clish, C. B. Targeted metabolomics. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **1**, 1–24 (2012).
  21. Dunn, W. B. & Ellis, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends Anal. Chem.* **24**, 285–294 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>.
  22. Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., Mcallan, A. B. & France, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* **48**, 185–197 (1994).
  23. Networking, S. M. Perspective Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol.* **34**, 828–837 (2016). Doi: 10.1038/nbt3597.
  24. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504 (2003) doi:10.1101/gr.1239303.metabolite.
  25. Côrtes, C. *et al.* Effects of abomasal infusion of flaxseed (*Linum usitatissimum*) oil on microbial  $\beta$ -glucuronidase activity and concentration of the mammalian lignan enterolactone in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Br. J. Nutr.* **109**, 433–440 (2013).
  26. Day, A. J. *et al.* Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver  $\beta$ -glucosidase activity. *FEBS Lett.* **436**, 71–75 (1998).
  27. Schogor, A. L. B. *et al.* Ruminal *Prevotella* spp. may play an important role in the conversion of plant lignans into human health beneficial antioxidants. *PLoS One*

- 9, (2014).
28. Borriello, S. P., Setchell, K. D. R., Axelson, M. & Lawson, A. M. Production and metabolism of lignans by the human faecal flora. *J. Appl. Bacteriol.* **58**, 37–43 (1985).
  29. Wang Li-Quan, Meselhy Meselhy R, Yan Li, Guo-Wei Qin, M. H. Human intestinal bacteria capable of transforming secoisolariciresinol diglucoside to mammalian lignans, enterodiol and enterolacton. *Chem. Pharm. Bull.* 1606–1610 (2000).
  30. Heinonen, S. *et al.* In vitro metabolism of plant lignans: New precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3178–3186 (2001).
  31. Petit, H. V. *et al.* The interaction of monensin and flaxseed hulls on ruminal and milk concentration of the mammalian lignan enterolactone in late-lactating dairy cows. *J. Dairy Res.* **76**, 475–482 (2009).
  32. De Marchi, F. E., Palin, M. F., Santos, G. T., Benchaar, C. & Petit, H. V. Effects of duodenal infusion of sunflower oil on  $\beta$ -glucuronidase activity and enterolactone concentration in dairy cows fed flax meal. *Anim. Feed Sci. Technol.* **220**, 143–150 (2016).
  33. Côrtes, C. *et al.* In vitro metabolism of flax lignans by ruminal and faecal microbiota of dairy cows. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 1585–1594 (2008).
  34. Struijs, K., Vincken, J. P. & Gruppen, H. Bacterial conversion of secoisolariciresinol and anhydrosecoisolariciresinol. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 308–317 (2009).
  35. De Almeida T. R. *et al.* Exploring the rumen fluid metabolome using liquid mass spectrometry and Molecular Networking. *Sci. Rep.* **9** 1–8 (2018) doi:10.1038/s41598-018-36196-4.
  36. Artegoitia, V. M., Foote, A. P., Lewis, R. M. & Freetly, H. C. Rumen Fluid Metabolomics Analysis Associated with Feed Efficiency on Crossbred Steers. 1–14 (2017) doi:10.1038/s41598-017-02856-0.
  37. Saleem, F., Bouatra, S., Chi, A., Ametaj, B. N. & Wishart, D. S. The Bovine Ruminal Fluid Metabolome. 360–378 (2013) doi:10.1007/s11306-012-0458-9.
  38. Shim, Y. Y., Gui, B., Arnison, P. G., Wang, Y. & Reaney, M. J. T. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **38**, 5–20 (2014).
  39. Kajla, P., Sharma, A. & Sood, D. R. Flaxseed—a potential functional food source. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 1857–1871 (2015).
  40. INRA Feeding System for Ruminants, (2018), Wageningen Academic Publishers, 640
  41. Arrigoni, M. D. B., Martins, C. L. & Factori, M. A. Lipid metabolism in the rumen. *Rumenology* (2016) doi:10.1007/978-3-319-30533-2\_4.
  42. Strandås, C., Kamal-Eldin, A., Andersson, R. & Åman, P. Phenolic glucosides in bread containing flaxseed. *Food Chem.* **110**, 997–999 (2008).

43. Hao, M. & Beta, T. Qualitative and quantitative analysis of the major phenolic compounds as antioxidants in barley and flaxseed hulls using HPLC/MS/MS. *J. Sci. Food Agric.* **92**, 2062–2068 (2012).
44. Senizza, A. *et al.* Lignans and gut microbiota: An interplay revealing potential health implications. *Molecules* **25**, 1–17 (2020).

**Tabela S1**

Identificação, fórmula molecular, massa monoisotópica, m / z observada de íon e erro de metabólitos da incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça

Número dos compostos	Metabólitos	Fórmula	Massa monoisotópica	m/z <sub>Exp</sub> positivo	m/z <sub>Exp</sub> negativo	Erro (ppm)
01	Ácido azelaico	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	188,1049	189,1127	-	-2,03
02	Enterodiol	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	302,1518	-	301,1447	2,38
03	N-acetil-DL-metionina	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> S	191,0616	-	190,0545	3,74
04	ácido (10E, 12Z)-octadeca-10,12- dienóico	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280,24023	281,2475	-	1,97
05	Ácido (9Z, 11E, 13S, 15Z) -13-Hidroxiocetadeca-9,11,15-trienóico	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	276,2042	277,2145	-	8,87
06	Ácido (10E, 15E) -9,12,13-trihidroxiocetadeca-10,15-dienóico	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	328,2249	-	327,2178	1,98
07	Ácido 12-hidroxiasmônico	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	226,1205	227,1271	-	-5,43
08	Ácido 2- [3-oxo-2- [5- [3,4,5-tri-hidroxi-6-(hidroximetil) oxan-2-il] oxipent-2-enil] ciclopentil] acético	C <sub>18</sub> H <sub>27</sub> O <sub>9</sub>	388,1733	-	387,1666	2,82
09	Ácido 3'-adenílico	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	347,0630	348,0687	-	-6,35
10	Ácido 8Z, 11Z, 14Z, 17Z-eicosatetraenóico	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	304,2402	305,2467	-	-4,43
11	Ácido 9,12,13-trihidroxiocetadec-10-enóico	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>5</sub>	330,2406	-	329,2342	4,25
12	Ácido 9,12,13-Triidroxiocetadeca-10,15-dienóico	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	328,2249	-	327,2194	6,87
13	Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> P	329,0525	330,0603	-	-5,59
14	beta-D-glicose (sodio)	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	180,0633	383,1148	-	-4,55
15	Hexosídeo acil graxo	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>	388,1733	-	387,1657	0,49
16	Ácido clorogênico	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	354,0950	355,1029	-	0,82
17	Ácido Cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	192,0270	-	191,0196	-2,97

## Continuação

Número dos compostos	Metabólitos	Fórmula	Massa monoisotópica	$m/z$ Exp positivo	$m/z$ Exp negativo	Erro (ppm)
18	Ácido ciclopentanoacético, 2 - [(2Z) -5-(hexopiranosiloxi) -2-penten-1-il] -3-oxo-, (1R, 2R)	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>	388,1733	389,1800	-	-2,97
19	Cistina	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	240,0238	241,0309	-	-3,21
20	Ácido decanedióico	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	202,1205	203,1279	-	-7,55
21	Ácido dodecanodioico	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	230,1518	231,1586	-	-4,43
22	Enterolactona	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	298,1205	297,1127	-	4,42
23	Ácido ferúlico Acil-b-D-glucosídeo	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	356,1107	-	355,1025	-1,14
24	Flavocommelitin	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	446,1219	-	445,1130	-1,06
25	Gentiobiose	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	324,1009	325,1088	-	9,35
26	Ácido glucárico	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>8</sub>	210,0375	-	209,0303	2,6
27	glutamil fenilalanina	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	294,1215	295,1284	-	-3,37
28	Guanosina	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	283,0916	284,0985	-	-3,46
29	Monofosfato cíclico de guanosina	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	345,0474	346,0531	-	-6,24
30	Ácido indol-3-láctico	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> NaO <sub>7</sub> S	205,0738	-	204,0675	7,01
31	Inosina	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	268,0807	269,0868	-	-6,66
32	Isoleucil-arginina	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	181,0739	182,0810	-	3,94
33	Ácido Jasmônico	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	210,1255	211,1328	-	-2,93
34	Tirosina	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub>	181,0739	182,0809	-	-4,49
35	Tirosina-Leucina	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	294,1579	295,1640	-	-6,03
36	Glutaminol micosporina	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	302,1480	303,1545	-	-4,37
37	Ácido N-acetilglutâmico	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>	189,0637	190,0702	-	-7,09
38	Piroglutamato de N-frutosil	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>8</sub>	291,0954	-	290,0879	1,06
39	Fenilalanil-isoleucina	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	244,1786	245,1846	-	-7,82

Continuação

Número dos compostos	Metabolito	Fórmula	Massa monoisotópica	$m/z$ Exp positivo	$m/z$ Exp negativo	Erro (ppm)
36	Glutaminol micosporina	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	302,1480	303,1545	-	-4,37
37	Ácido N-acetilglutâmico	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>	189,0637	190,0702	-	-7,09
38	Piroglutamato de N-frutossil	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>8</sub>	291,0954	-	290,0879	1,06
39	Fenilalanil-isoleucina	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	244,1786	245,1846	-	-7,82
40	Fenilalanil-leucina	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	278,1630	279,1693	-	-5,62
41	Fenilalanil-fenilalanina	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	312,1473	313,1559	-	2,18
42	Fenilalanil-valina	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	264,1473	265,1530	-	-8,37
43	Quercetina-3,4'-O-di-beta-glucosídeo	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>17</sub>	626,1482	-	625,1407	0,36
44	Secoisolariciresinol	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	362,1730	363,1799	-	-2,25
45	Secoisolariciresinol diglucosídeo	C <sub>32</sub> H <sub>46</sub> O <sub>16</sub>	686,2785	687,2835	-	-4,23
46	Tris (2-butoxietil) fosfato <sup>a</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> O <sub>7</sub> P	398,2433	421,2314	-	-4,06
47	Triptofano	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204,0898	205,0966	-	-5,38
48	Valil-Fenilalanina	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	264,1473	265,1536	-	-6,10

<sup>a</sup> Íon observado com o aduto de sódio [M + Na]<sup>+</sup>.

**Tabela S2**

Identificação e nome da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) dos metabólitos da incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça

Número dos compostos	Metabólitos	Nome IUPAC
01	Ácido azelaico	Ácido nonanodioico
02	Enterodiol	2,3-bis [(3-hidroxifenil) metil] butano-1,4-diol
03	N-acetil-DL-metionina	Ácido 2-acetamido-4-metilsulfanilbutanoico
04	ácido (10E, 12Z)-octadeca-10,12- dienóico	ácido (10E, 12Z)-octadeca-10,12- dienóico
05	Ácido (9Z, 11E, 13S, 15Z) -13-Hidroxiocadeca-9,11,15-trienóico	Ácido (9Z, 11E, 13S, 15Z) -13-Hidroxiocadeca-9,11,15-trienóico
06	Ácido (10E, 15E) -9,12,13-trihidroxiocadeca-10,15-dienóico	Ácido (10E, 15E) -9,12,13-trihidroxiocadeca-10,15-dienóico
07	Ácido 12-hidroxiasmônico	Ácido 2 - [(1R, 2R) -2 - [(Z) -5-hidroxi-pent-2-enil] -3-oxociclopentil] acético
08	Ácido 2- [3-oxo-2- [5- [3,4,5-tri-hidroxi-6-(hidroximetil) oxan-2-il] oxipent-2-enil] ciclopentil] acético	Ácido 2- [3-oxo-2- [5- [3,4,5-tri-hidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il] oxipent-2-enil] ciclopentil]
09	Ácido 3'-adenílico	[(2R, 3S, 4R, 5R) -5- (6-aminopurin-9-il) -4-hidroxi-2-(hidroximetil) oxolan-3-il] di-hidrogenofosfato
10	Ácido 8Z, 11Z, 14Z, 17Z-eicosatetraenóico	Ácido 8Z, 11Z, 14Z, 17Z-eicosatetraenóico
10	Ácido 8Z, 11Z, 14Z, 17Z-eicosatetraenóico	Ácido 8Z, 11Z, 14Z, 17Z-eicosatetraenóico
11	Ácido 9,12,13-trihidroxiocadec-10-enóico	Ácido 9,12,13-trihidroxiocadec-10-enóico
12	Ácido 9,12,13-Trihidroxiocadeca-10,15-dienóico	Ácido 9,12,13-Trihidroxiocadeca-10,15-dienóico
13	Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico	(4aR, 6R, 7R, 7aS) -6- (6-aminopurin-9-il) -2-hidroxi-2-oxo-4a, 6,7,7a-tetrahidro-4H-furo [3,2-d] [1,3,2] dioxafosfinina-7-ol
14	beta-D-glicose (sodio)	(2R, 3R, 4S, 5S, 6R) -6- (hidroximetil) oxano-2,3,4,5-tetrol



Número dos compostos	Metabólitos	Nome IUPAC
15	Hexosídeo acil graxo	3-hidroxi-2-(1,2,2-trihidroxietil)-4-[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi-2H-furan-5-ona
16	Ácido clorogênico	Ácido (1S, 3R, 4R, 5R) -3 - [(E) -3- (3,4-dihidroxifenil) prop-2-enoil] oxi-1,4,5-trihidroxiciclohexano-1-carboxílico
17	Ácido Cítrico	
18	Ácido ciclopentanoacético, 2 - [(2Z) -5-(hexopiranosiloxi) -2-penten-1-il] -3-oxo-, (1R, 2R) -	2 - [(1R, 2R) -3-oxo-2 - [(Z) -5- [3,4,5-trihidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il] oxipent-2-enil] ciclopentil] ácido acético
19	Cistina	2-azaniumil-3 - [(2-azaniumil-2-carboxilatoetil) dissulfanil] propanoato
20	Ácido decanedióico	Ácido decanedióico
21	Ácido dodecanodioico	Ácido dodecanodioico
22	Enterolactona	(3R, 4R) -3,4-bis [(3-hidroxifenil) metil] oxolan-2-ona
23	Ácido ferúlico Acil-b-D-glucosídeo	[3,4,5-trihidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il] 3- (4-hidroxi-3-metoxifenil) prop-2-enoato
24	Flavocommelin	5-hidroxi-2- (4-hidroxifenil) -7-metoxi-6 - [(2S, 3R, 4R, 5S, 6R) -3,4,5-trihidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il] cromen-4-um
25	Gentiobiose	(3R, 4S, 5S, 6R) -6 - [[(2R, 3R, 4S, 5S, 6R) -3,4,5-trihidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il] oximetil] oxano-2 , 3,4,5-tetrol
26	Ácido glucárico	Ácido (2S, 3S, 4S, 5R) -2,3,4,5-tetrahidroxi hexanodioico
27	glutamil fenilalanina	Ácido (2S) -2-amino-5 - [[(1S) -1-carboxi-2-feniletíl] amino] -5-oxopentanóico
28	Guanosina	2-amino-9- [3,4-dihidroxi-5- (hidroximetil) oxolan-2-il] -3H-purin-6-ona
29	Monofosfato cíclico de guanosina	9 - [(4aR, 6R, 7R, 7aS) -2,7-dihidroxi-2-oxo-4a, 6,7,7a-tetrahidro-4H-furo [3,2-d] [1,3,2] dioxafosfinin-6-il] -2-amino-3H-purin-6-ona

## Continuação

Número dos compostos	Metabólitos	Nome IUPAC
30	Ácido indol-3-láctico	Ácido 2-hidroxi-3- (1H-indol-3-il) propanóico
31	Inosina	9 - [(2R, 3R, 4S, 5R) -3,4-dihidroxi-5- (hidroximetil) oxolan-2-il] - 3H-purin-6-ona
32	Isoleucil-arginina	Ácido (2S) -2 - [[(2S, 3S) -2-amino-3-metilpentanoil] amino] -5- (diaminometilidenoamino) pentanóico
33	Ácido Jasmônico	Ácido 2- (3-oxo-2-pent-2-enilciclopentil) acético
34	Tirosina	Ácido (2S) -2-amino-3- (4-hidroxifenil) propanóico
35	Tirosina-Leucina	Ácido (2S) -2 - [[(2S) -2-amino-3- (4-hidroxifenil) propanoil] amino] -4-metilpentanóico
36	Glutaminol micosporina	5-hidroxi-4 - [[5-hidroxi-5- (hidroximetil) -2-metoxi-3-oxociclohexen-1-il] amino] pentanamida
37	Ácido N-acetilglutâmico	Ácido 2-acetamido pentanodioico
38	Piroglutamato de N-frutossil	Ácido 5-oxo-1 - [[2,3,4-trihidroxi-5- (hidroximetil) oxolan-2-il] metil] pirrolidina-2-carboxílico
39	Fenilalanil-isoleucina	(2S, 3S) -2 - [[(2S) -2-azaniumil-4-metilpentanoil] amino] -3-metilpentanoato
40	Fenilalanil-leucina	Ácido 2 - [(2-amino-3-fenilpropanoil) amino] -4-metilpentanoico
41	Fenilalanil-fenilalanina	Ácido 2 - [(2-amino-3-fenilpropanoil) amino] -3-fenilpropanóico
42	Fenilalanil-valina	Ácido 2 - [(2-amino-3-fenilpropanoil) amino] -3-metilbutanóico
43	Quercetina-3,4'-O-di-beta-glucosídeo	5,7-dihidroxi-2- [3-hidroxi-4 - [(2S, 3R, 4S, 5S, 6R) -3,4,5-trihidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il] oxifenil] -3 - [(2S, 3R, 4S, 5S, 6R) -3,4,5-trihidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il] oxi cromen-4-ona
44	Secoisolariciresinol	(2R, 3R) -2,3-bis [(4-hidroxi-3-metoxifenil) metil] butano-1,4-diol

## Continuação

Número dos compostos	Metabólitos	Nome IUPAC
45	Secoisolariciresinol diglucosídeo	2- [2,3-bis [(4-hidroxi-3-metoxifenil) metil] -4- [3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil) oxan-2-il] oxibutoxi] -6- (hidroximetil ) oxano-3,4,5-triol
46	Tris (2-butoxietil) fosfato <sup>b</sup>	tris (2-butoxietil) fosfato
47	Triptofano	Ácido (2S) -2-amino-3- (1H-indol-3-il) propanóico
48	Valil-Fenilalanina	Ácido 2 - [(2-amino-3-metilbutanoil) amino] -3-fenilpropanóico

Tabela Suplementares S3

Perfil de metabólitos identificados a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça

Número dos compostos	Metabólitos	Modo		Tratamentos		Tempo		
		Positivo	Negativo	Com linhaça	Sem linhaça	0h	5h	24h
1	Ácido azelaico	x	x	x	x	x	x	x
2	Enterodiol	x	x	x				x
3	N-acetil-DL-metionina		x	x				x
4	ácido (10E, 12Z)-octadeca-10,12- dienóico	x			x	x	x	x
5	Ácido (9Z, 11E, 13S, 15Z) -13-Hidroxi octadeca-9,11,15-trienóico	x		x		x		
6	Ácido (10E, 15E) -9,12,13-trihidroxi octadeca-10,15-dienóico		x	x		x		
7	Ácido 12-hidroxiasmônico	x		x		x	x	x
8	Ácido 2- [3-oxo-2- [5- [3,4,5-tri-hidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il] oxipent-2-enil] ciclopentil] acético		x	x			x	
9	Ácido 3'-adenílico	x		x		x		
10	Ácido 8Z, 11Z, 14Z, 17Z-eicosatetraenóico	x		x				x
11	Ácido 9,12,13-trihidroxi octadec-10-enóico		x	x			x	x
12	Ácido 9,12,13-Triidroxi octadeca-10,15-dienóico		x	x				x

## Continuação

Número dos compostos	Metabólitos	Modo		Tratamentos		Tempo		
		Positivo	Negativo	Com linhaça	Sem linhaça	0 h	5 h	24 h
13	Adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico	x	x		x	x		
14	beta-D-glicose (sódio)	x		x		x		
15	Hexosídeo acil graxo		x	x		x		
16	Ácido clorogênico		x	x		x		
17	Ácido Cítrico		x	x			x	x
18	Ácido ciclopentanoacético, 2 - [(2Z) - 5- (hexopiranosiloxi) -2-penten-1-il] - 3-oxo-, (1R, 2R) -			x		x	x	
19	Cistina	x		x			x	
20	Ácido decanedióico	x		x		x	x	
21	Ácido dodecanodioico	x		x	x	x	x	x
22	Enterolactona		x	x				x
23	Ácido ferúlico Acil-b-D-glucosídeo		x	x		x	x	x
24	Flavocommelitin		x	x		x		
25	Gentiobiose	x		x		x		
26	Ácido glucárico		x	x		x	x	
27	glutamil fenilalanina	x		x			x	
28	Guanosina	x	x	x			x	
29	Monofosfato cíclico de guanosina	x		x		x	x	
30	Ácido indol-3-láctico	x	x	x		x	x	x
31	Inosina	x	x	x		x	x	

## Continuação

Número dos compostos	Metabólitos	Modo		Tratamentos		Tempo		
		Positivo	Negativo	Com linhaça	Sem linhaça	0h	5h	24h
32	Isoleucil-arginina	x		x				x
33	Ácido Jasmônico	x		x				x
34	Tirosina	x		x		x	x	x
35	Tirosina-Leucina	x		x				x
36	Glutaminol micosporina	x		x				x
37	Ácido N-acetilglutâmico	x		x		x		
38	Piroglutamato de N-frutossil		x	x			x	x
39	Fenilalanil-isoleucina	x		x				x
40	Fenilalanil-leucina	x		x		x	x	x
41	Fenilalanil-fenilalanina	x		x		x	x	
42	Fenilalanil-valina	x		x				x
43	Quercetina-3,4'-O-di-beta-glucosídeo		x	x		x		
44	Secoisolariciresinol	x	x	x			x	x
45	Secoisolariciresinol diglucosídeo	x	x	x		x	x	
46	Tris (2-butoxietil) fosfatob	x		x				x
47	Triptofano	x					x	x
48	Valil-Fenilalanina	x		x				x

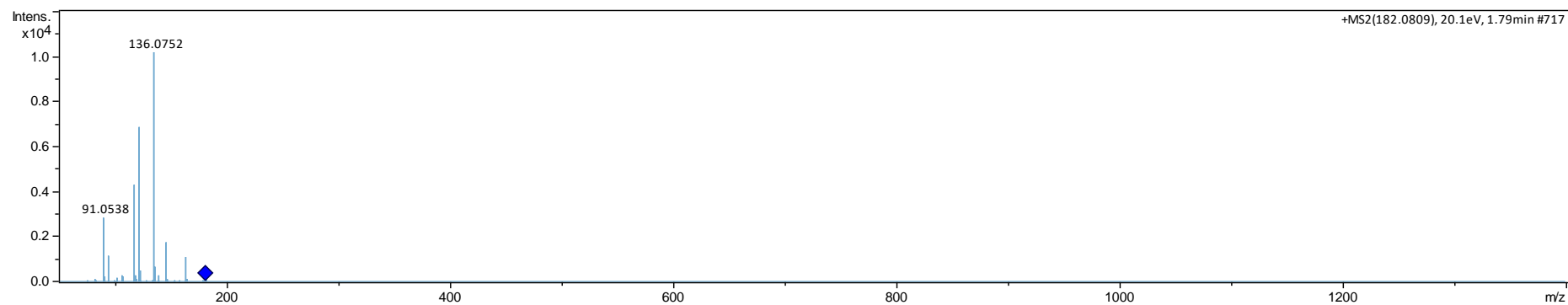


Figura S1

Ácido azelaico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -2,03 ppm

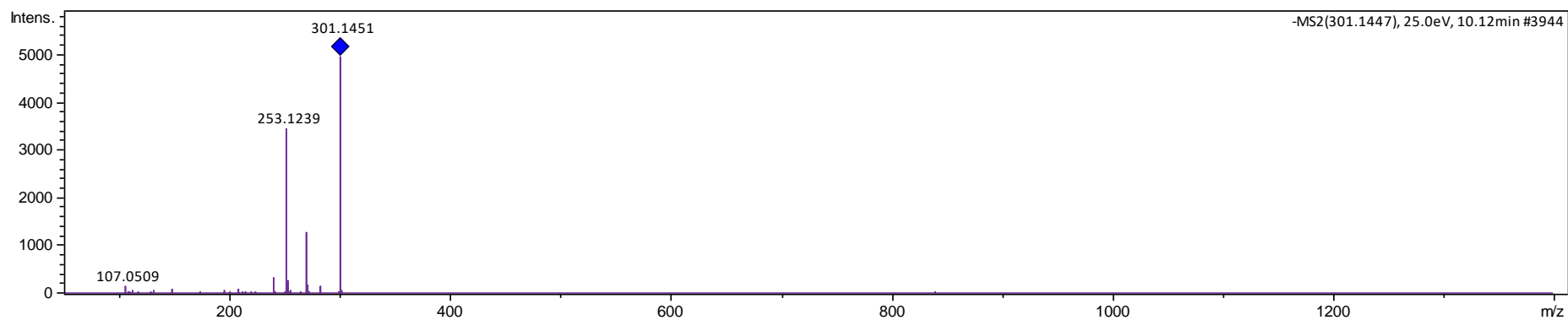


Figura S2

Enterodiol foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]$  - com erro de massa de 2,38 ppm



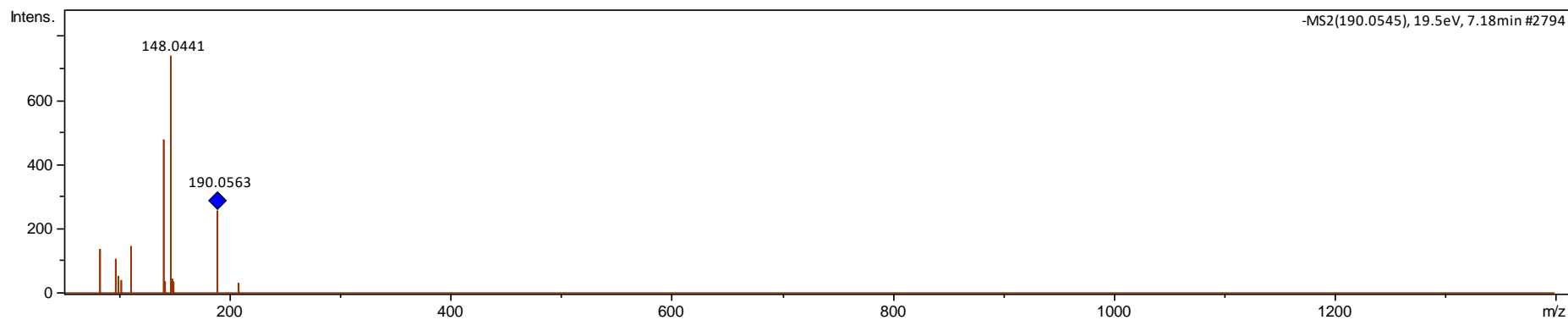


Figura S3

N-acetil-DL-metionina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H] - com erro de massa de 3,74 ppm

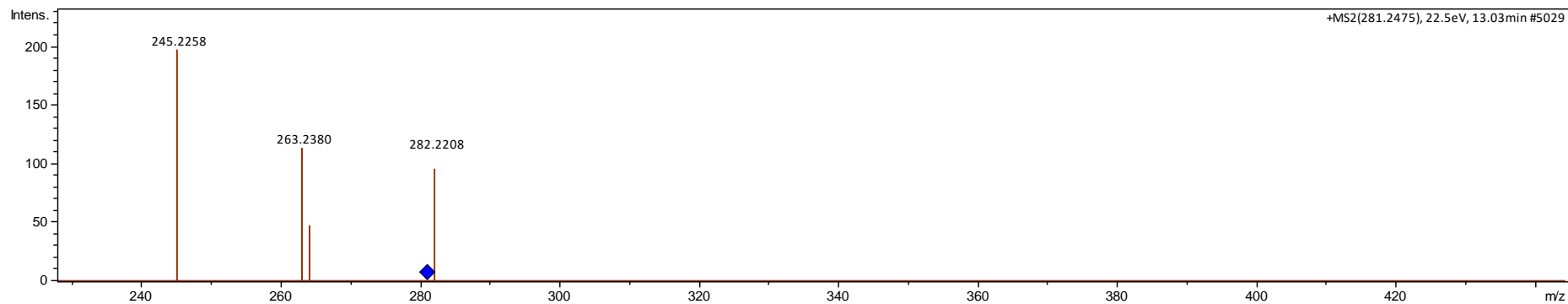


Figura S4

Ácido (10E, 12Z)-octadeca-10,12- dienóico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de 1,97 ppm.

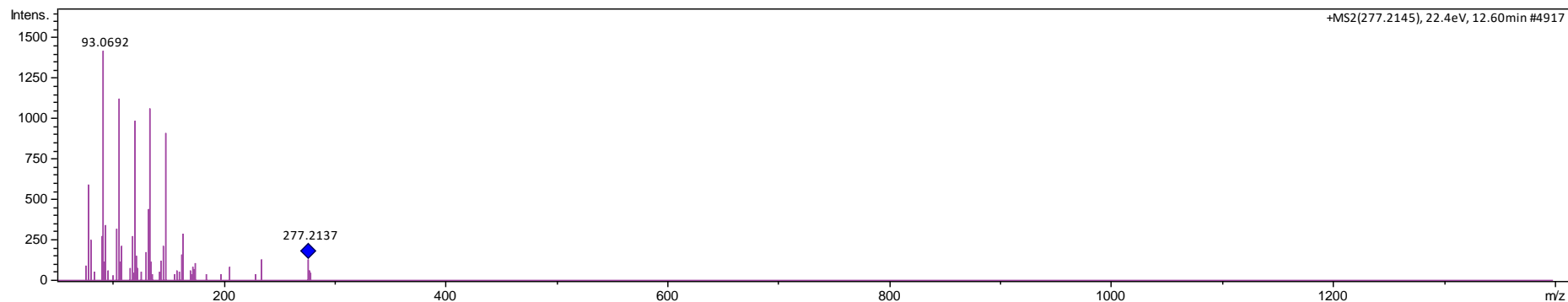


Figura S5

Ácido (9Z, 11E, 13S, 15Z) -13-Hidroxiocetadeca-9,11,15-trienóico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de 8,87 ppm.

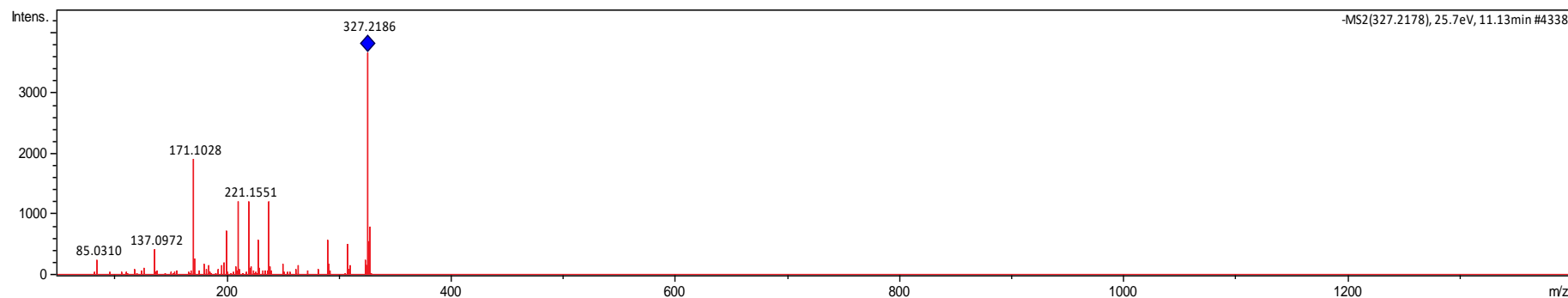


Figura S6

Ácido (10E, 15E) -9,12,13-trihidroxiocetadeca-10,15-dienóico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H] - com erro de massa de 1,98 ppm.

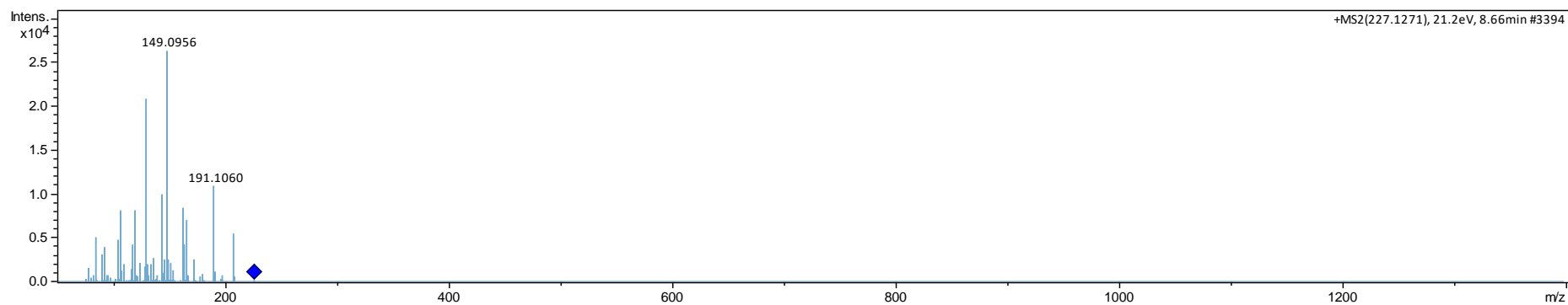


Figura S7

Ácido 12-hidroxiasmônico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H]<sup>+</sup> com erro de massa de -5,43 ppm.

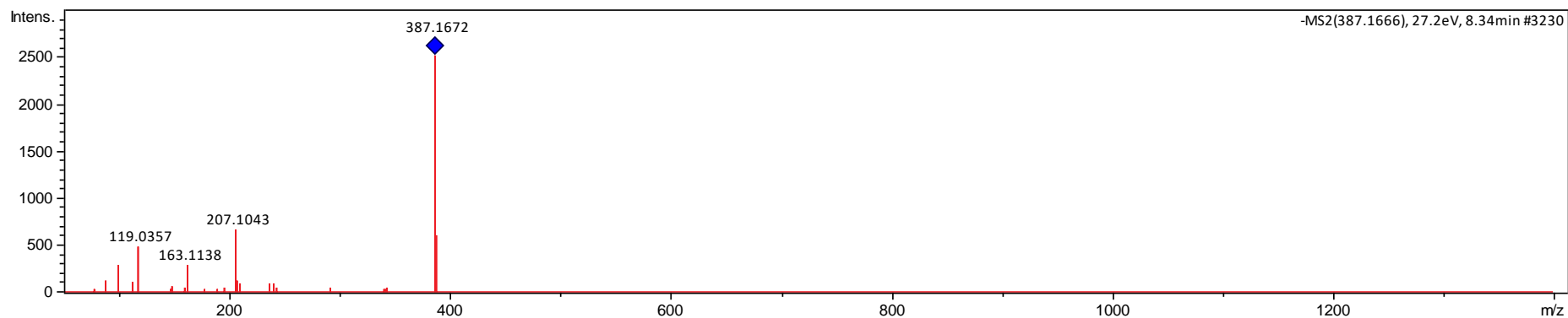


Figura S8

Ácido 2- [3-oxo-2- [5- [3,4,5-tri-hidroxi-6- (hidroximetil) oxan-2-il] oxipent-2-enil] ciclopentil] acético foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H] - com erro de massa de 2,82 ppm.

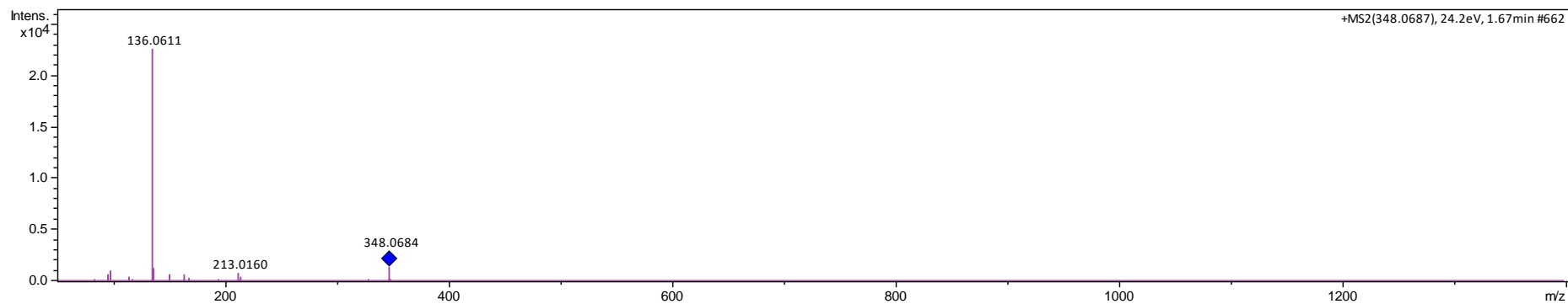


Figura S9

Ácido 3'-adenílico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H]<sup>+</sup> com erro de massa de -6,35 ppm.

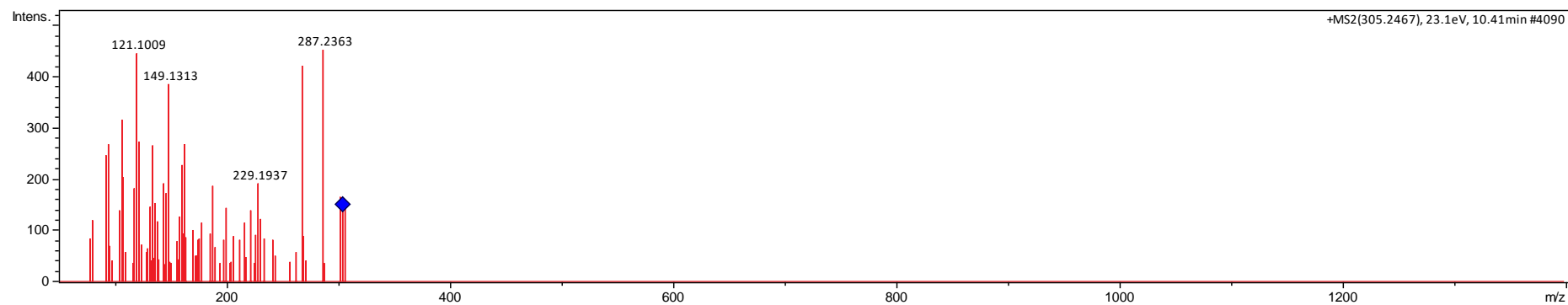


Figura S10

Ácido 8Z, 11Z, 14Z, 17Z-eicosatetraenóico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -4,43 ppm.



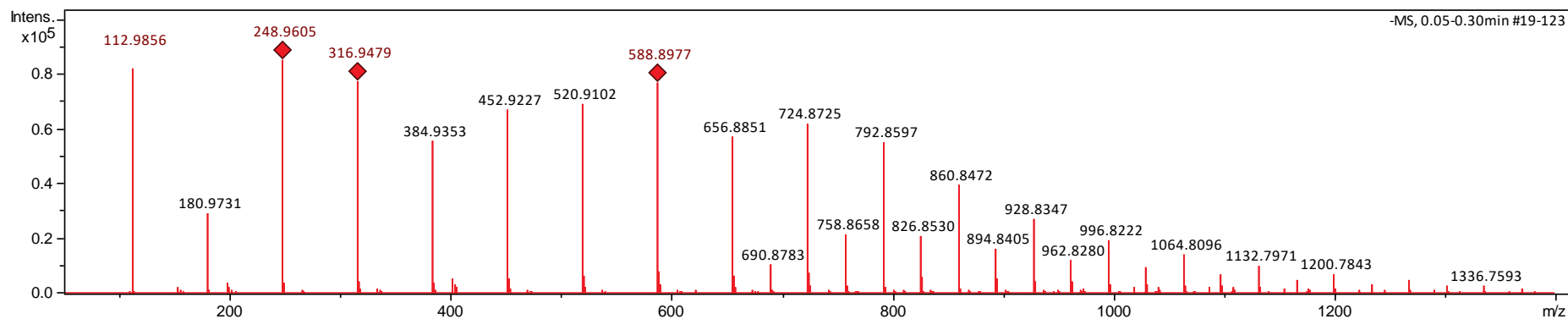


Figura S11

Ácido 9,12,13-trihidroioctadec-10-enóico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]$  - com erro de massa de 4,25 ppm.

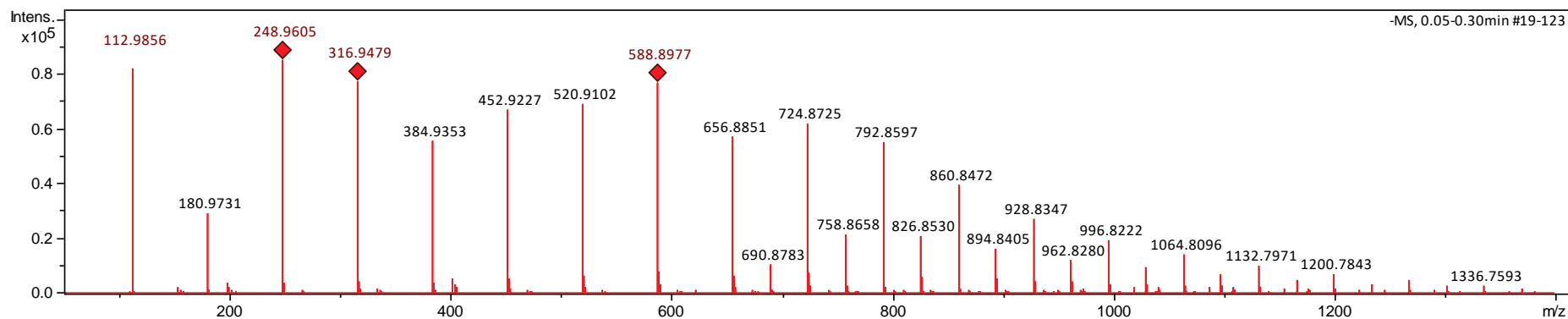


Figura S12

Ácido 9,12,13-Trihidroioctadeca-10,15-dienóico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H] - com erro de massa de -6,87 ppm.

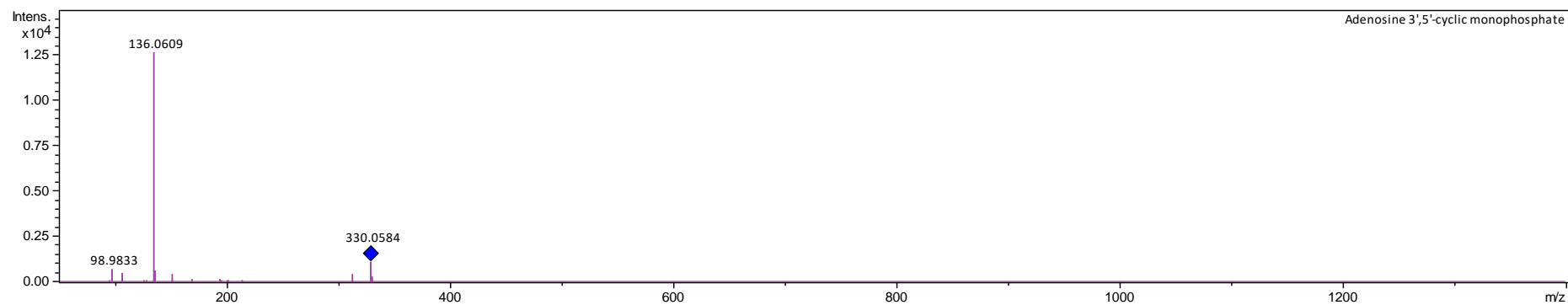


Figura S13

Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H]<sup>+</sup> com erro de massa de -5,59 ppm.

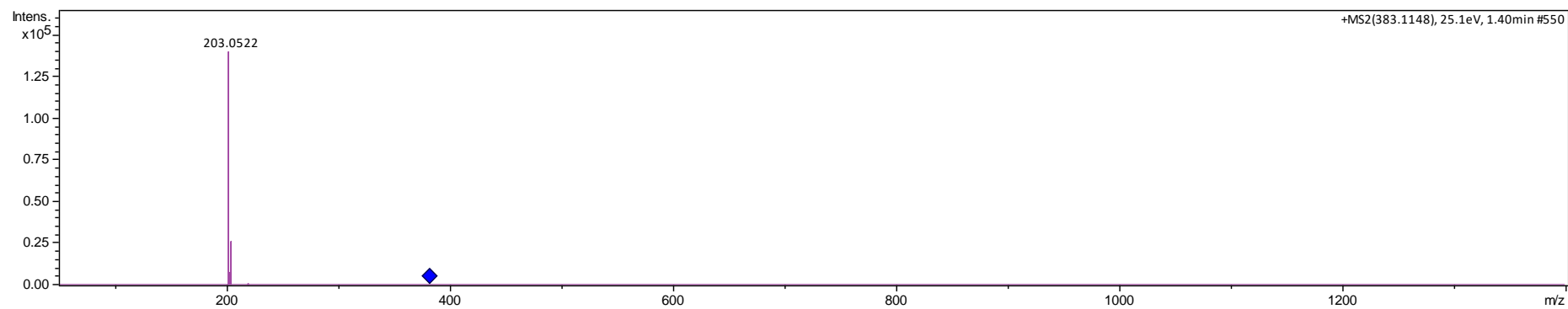


Figura S14

Beta-D-glicose (sódio) foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H] - com erro de massa de + 4,45 ppm.

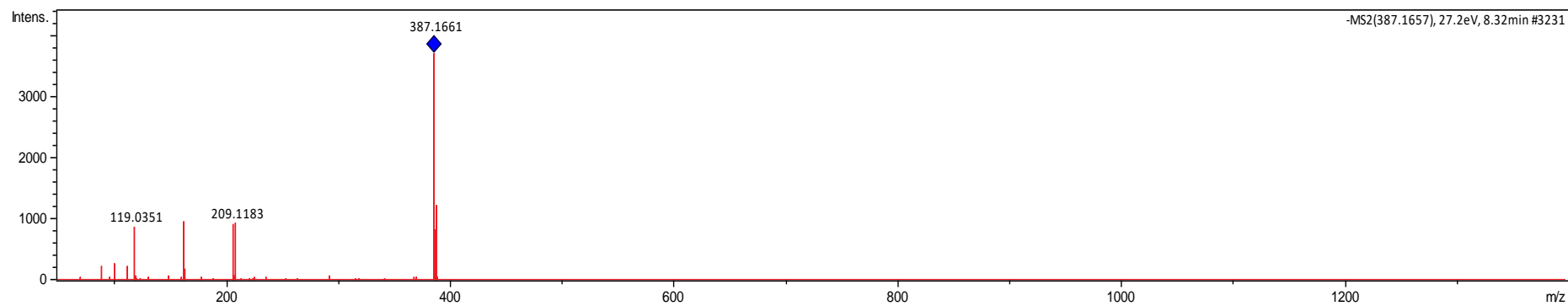


Figura S15

Hexosídeo acil graxo foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H] - com erro de massa de -0,49 ppm.

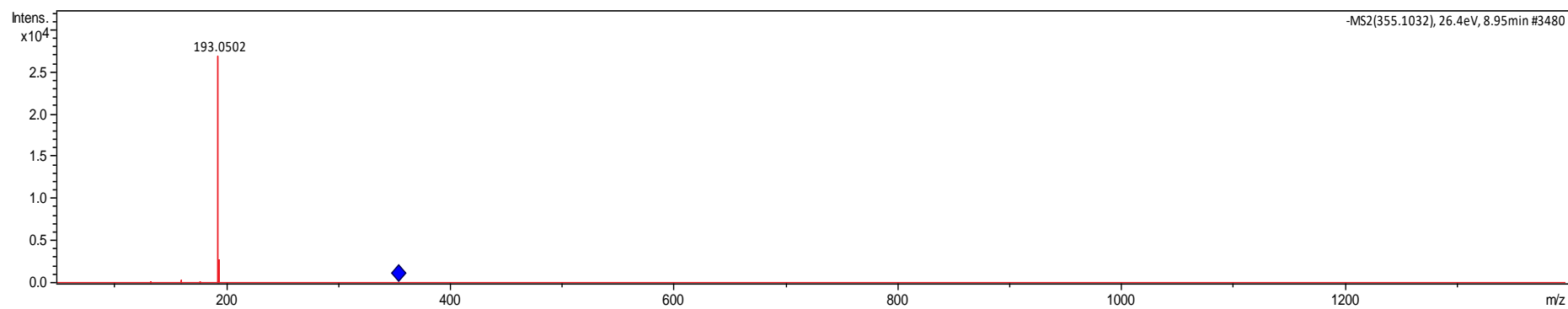


Figura S16

Ácido clorogênico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -0,82 ppm.

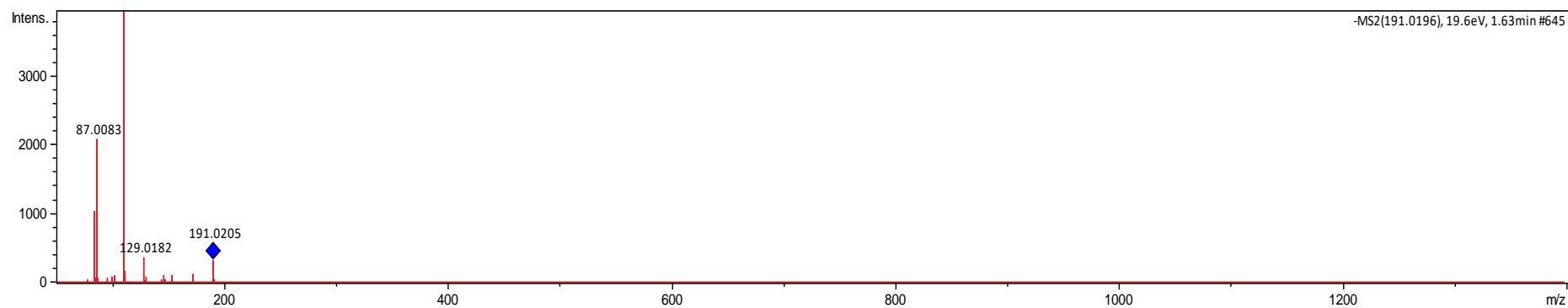


Figura S17

Ácido Cítrico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]$  - com erro de massa de -2,97 ppm.

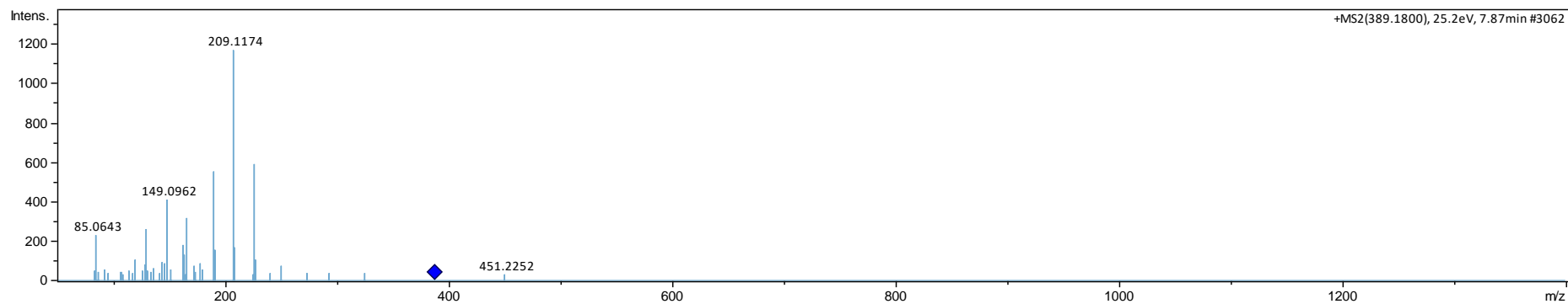


Figura S18

Ácido ciclopentanoacético, 2 - [(2Z) -5- (hexopiranosiloxi) -2-penten-1-il] -3-oxo-, (1R, 2R) - foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H] - com erro de massa de -2,97 ppm.



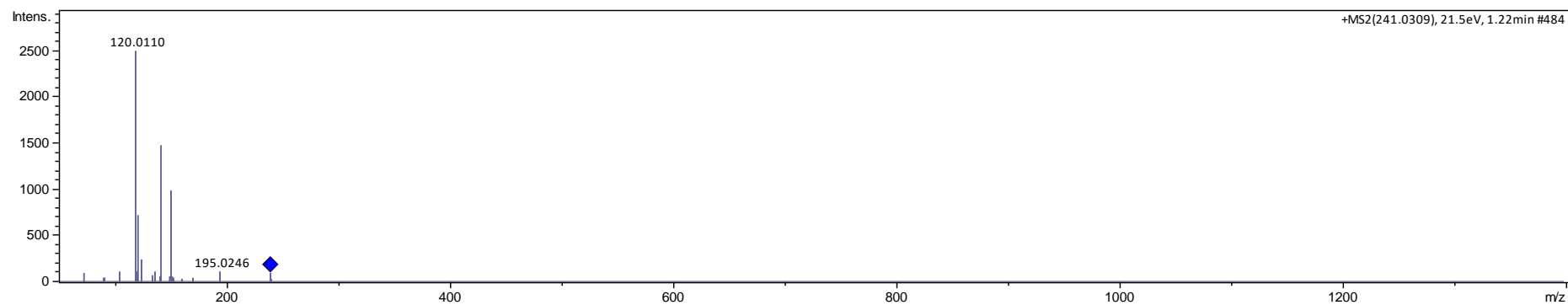


Figura S19

Cistina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]$  - com erro de massa de -3,21 ppm.

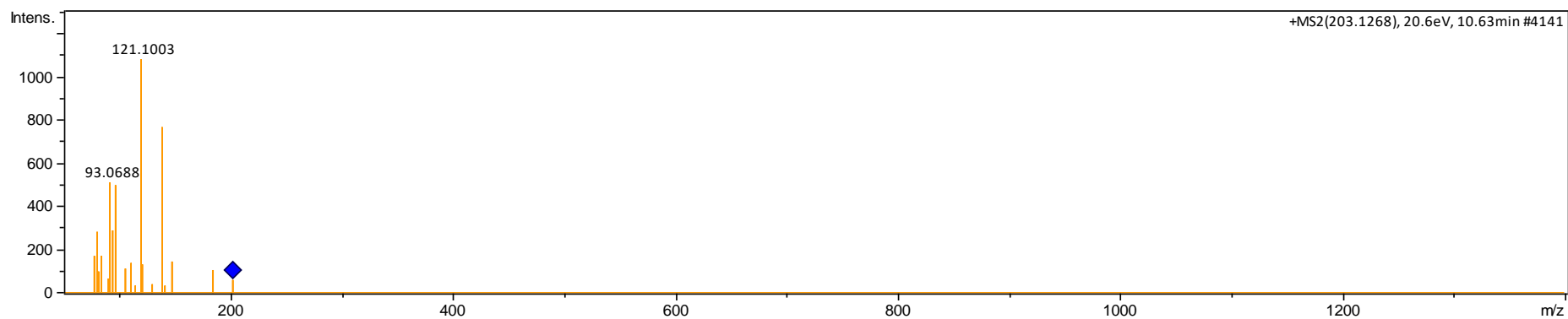


Figura S20

Ácido decanedióico foi identificado a partir de *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H] - com erro de massa de -7,55 ppm.

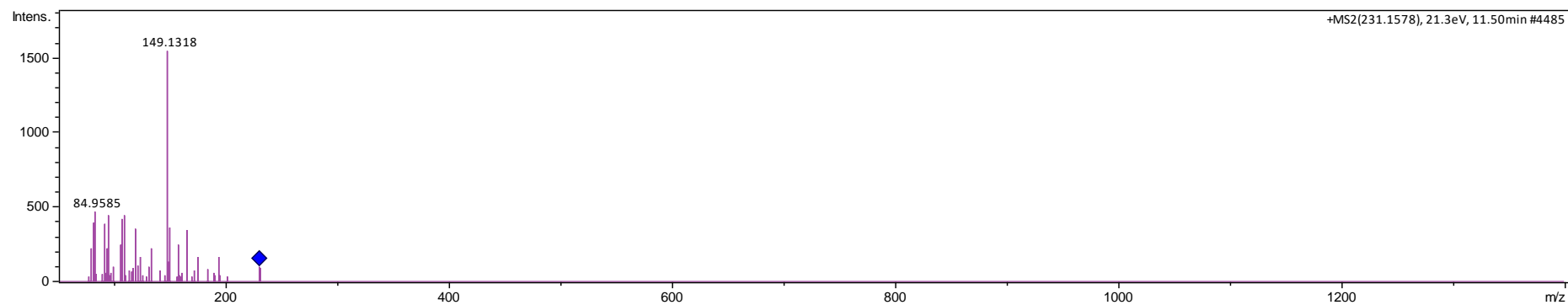


Figura S21

Ácido dodecanodioico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -4,43 ppm.

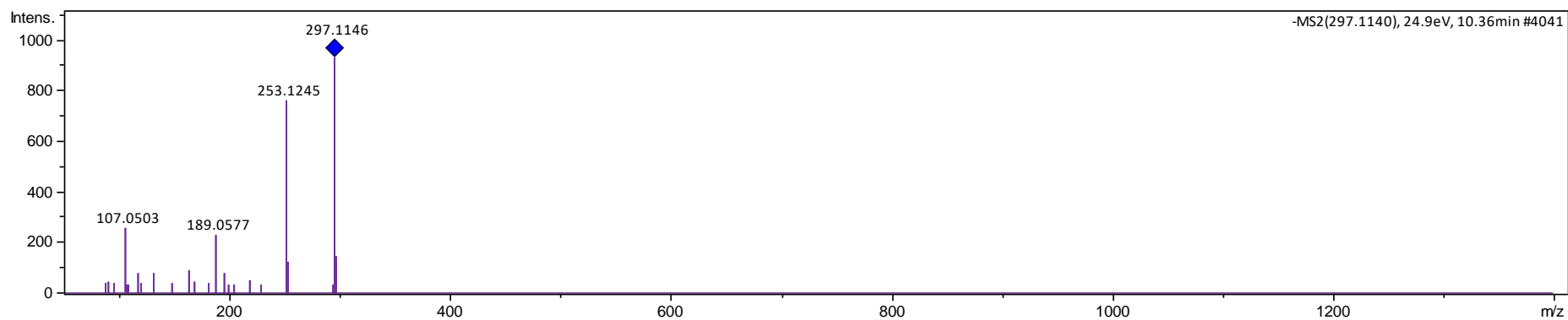


Figura S22

Enterolactona foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de 4,42 ppm.

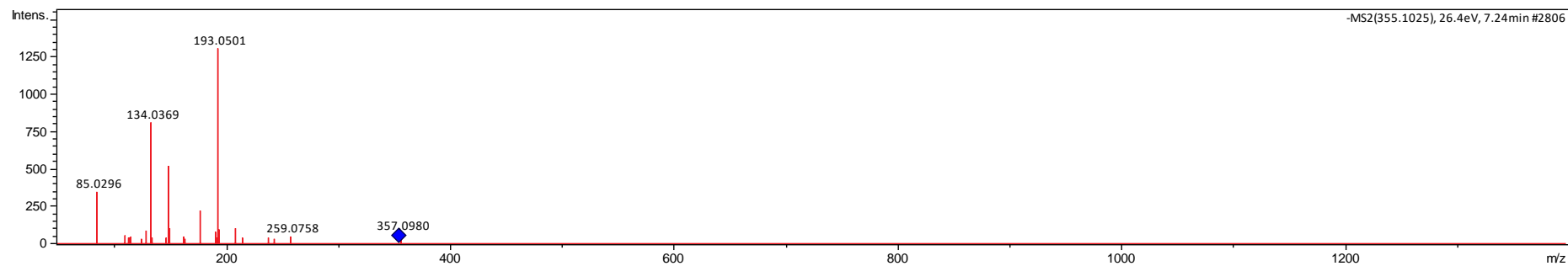


Figura S23

Ácido ferúlico Acil-b-D-glucosídeo foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]$  - com erro de massa de -1,14 ppm.

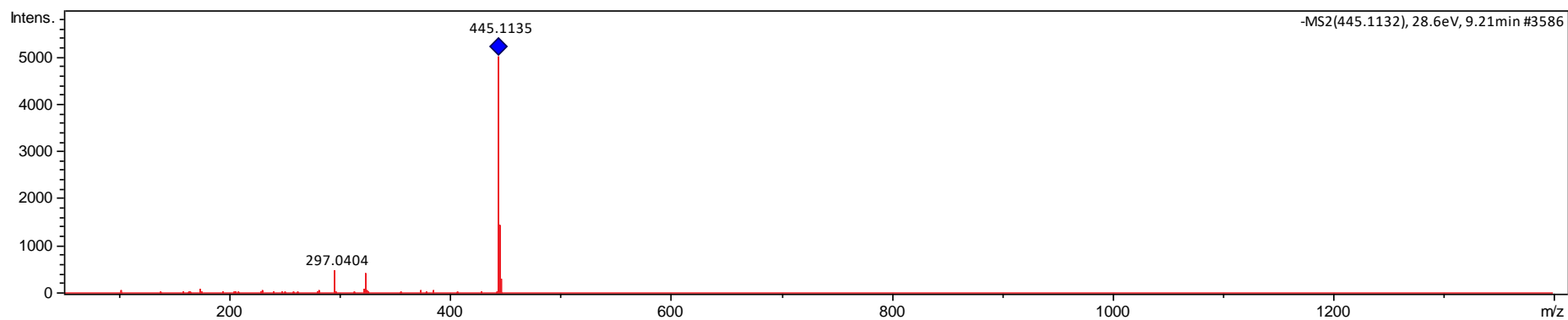


Figura S24

Flavocommelin foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H] - com erro de massa de -1,06 ppm.

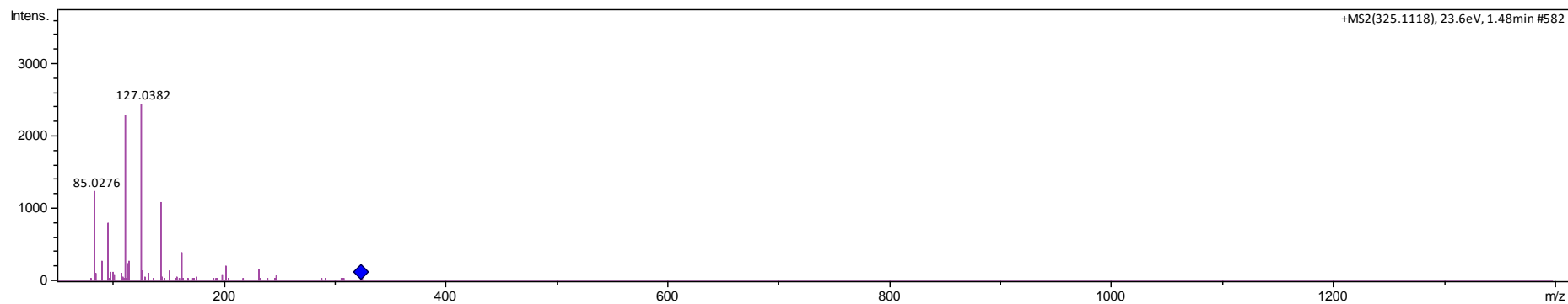


Figura S25

Flavoccommelitin foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de 9,35 ppm.

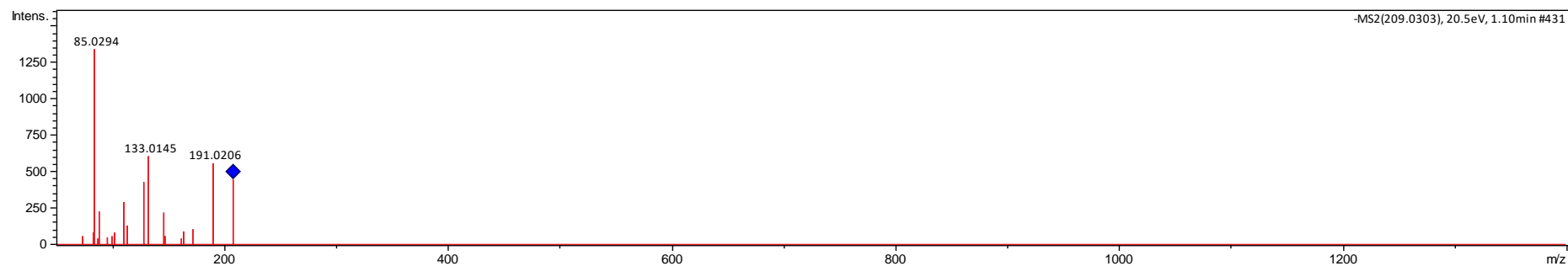


Figura S26

Ácido glucárico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de 9,35 ppm.



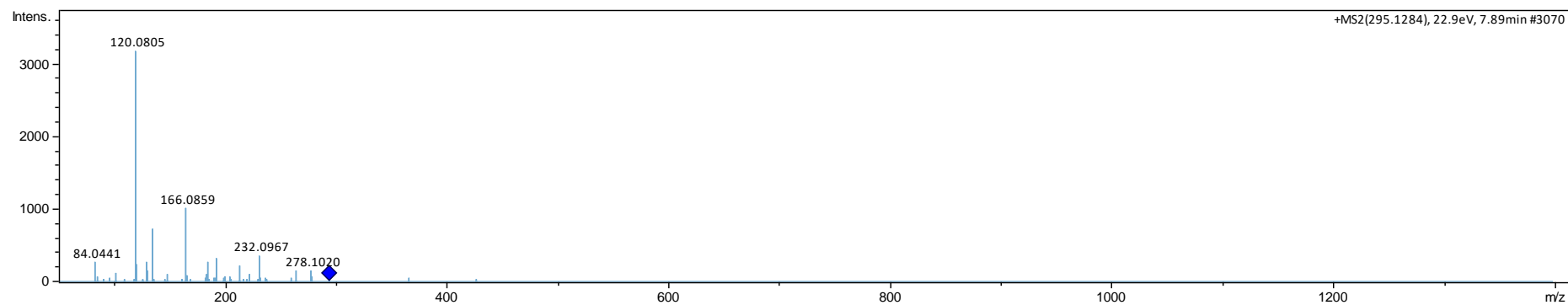


Figura S27

Glutamil fenilalanina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de 9,35 ppm.

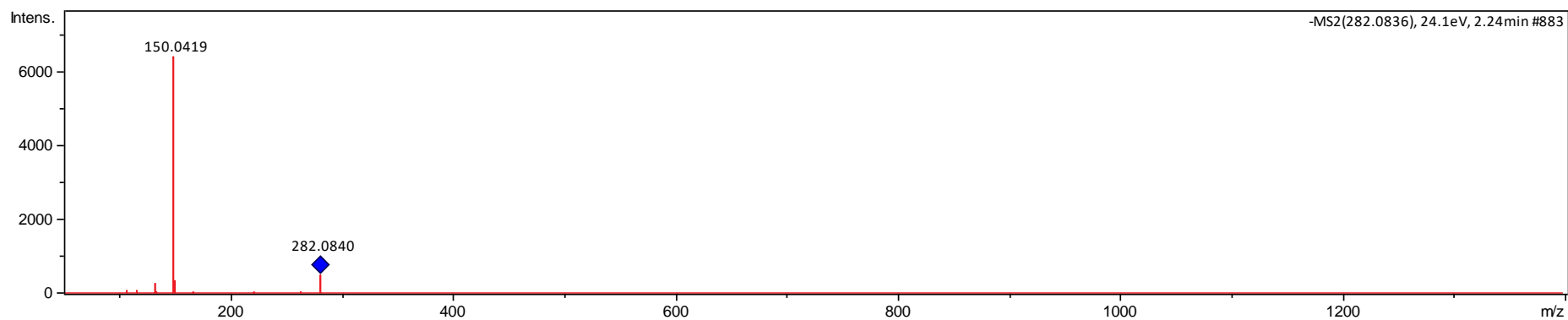


Figura S28

Guanosina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -3,46 ppm.

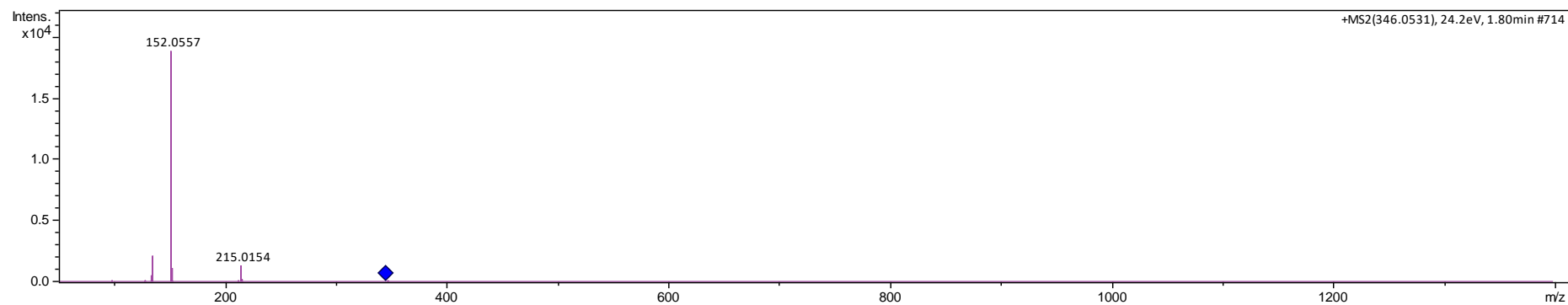


Figura S29

Monofosfato cíclico de guanosina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H]<sup>+</sup> com erro de massa de -6.24 ppm.

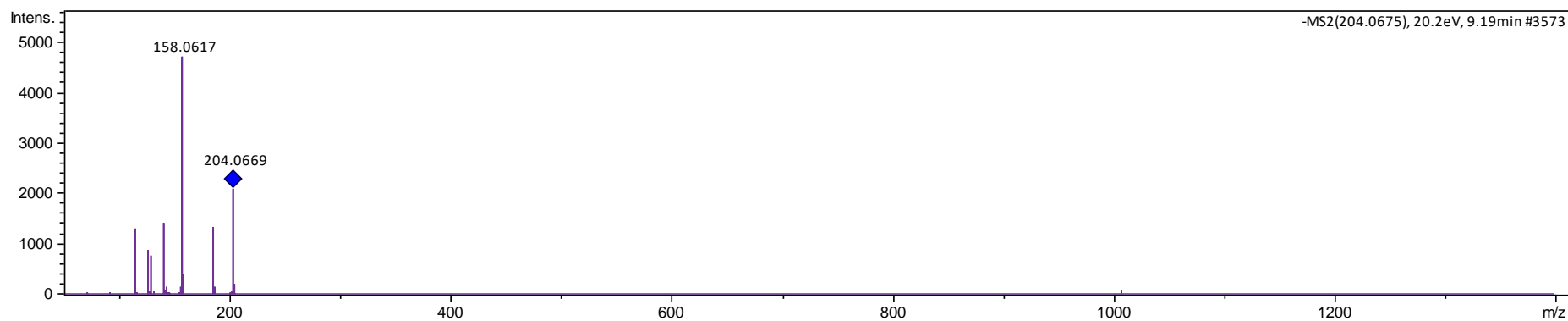


Figura S30

Ácido indol-3-láctico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de 7,01 ppm.

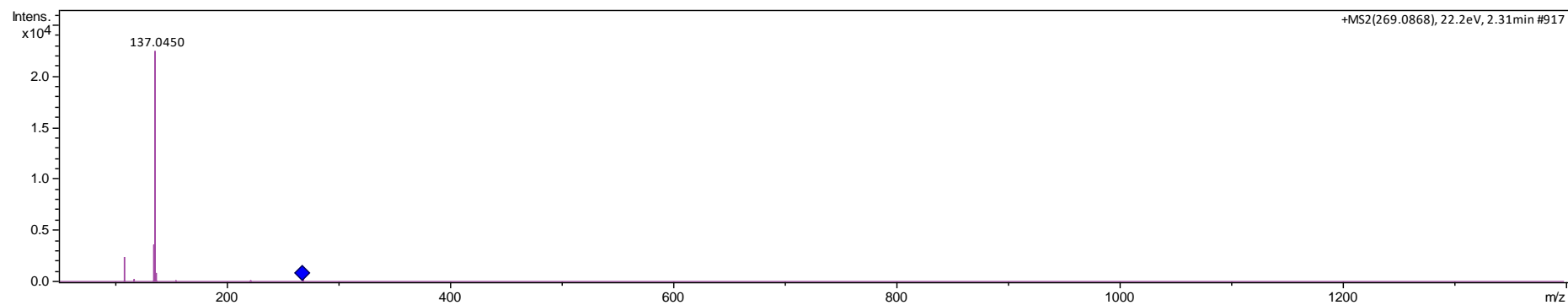


Figura S31

Inosina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de- 6,66 ppm.

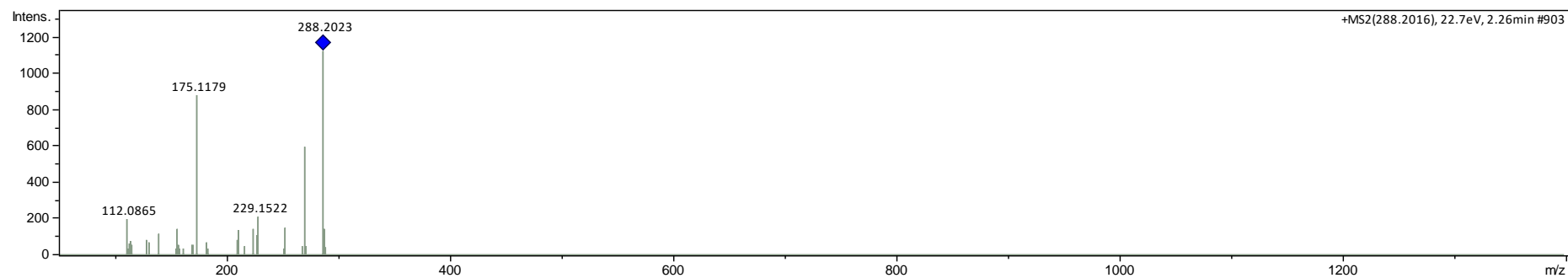


Figura S32

Isoleucil-arginina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de 3,94 ppm.

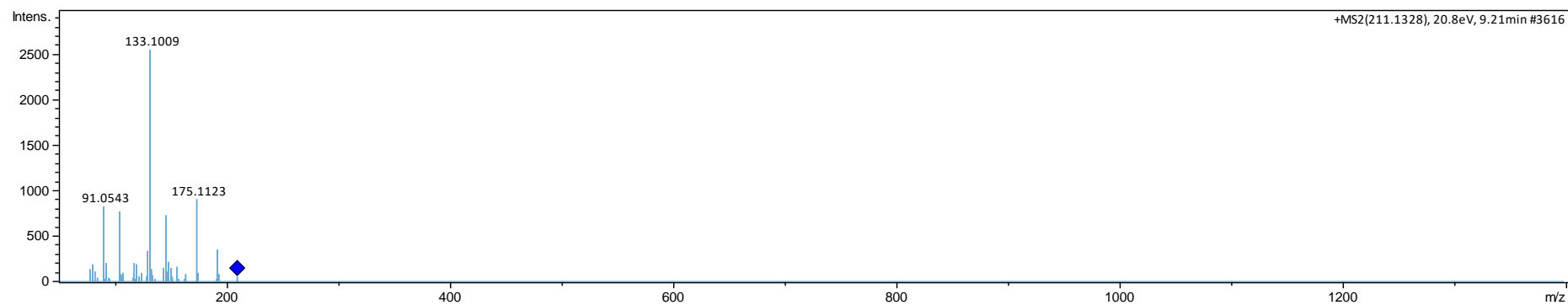


Figura S33

Ácido Jasmônico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -2,93 ppm.

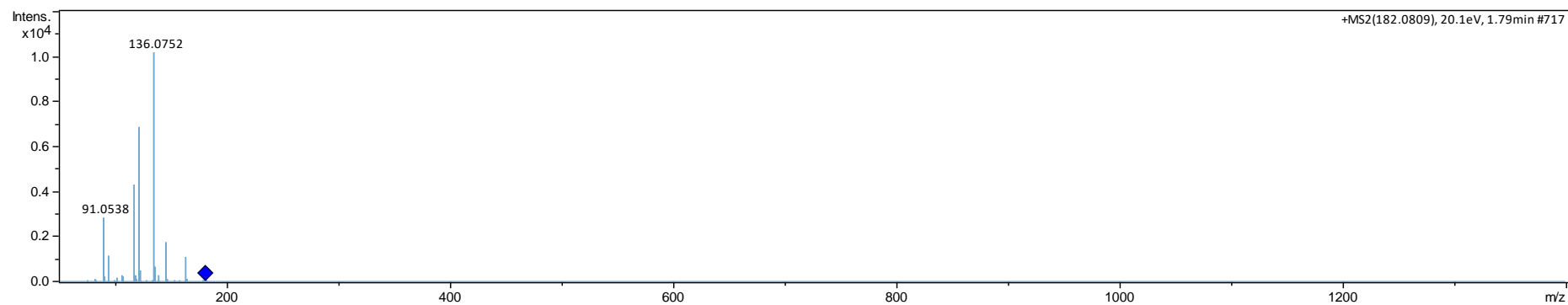


Figura S34

Tirosina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H]<sup>+</sup> com erro de massa de -4,49 ppm.



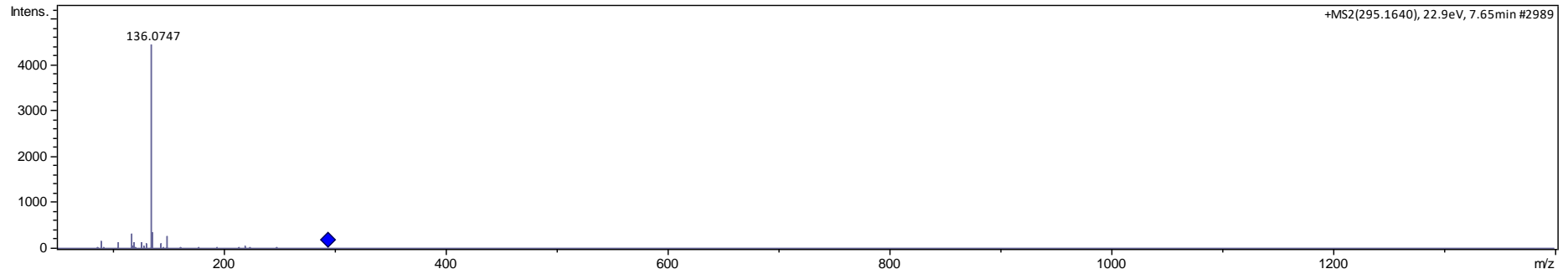


Figura S35

Tirosina-Leucina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -6,03 ppm.

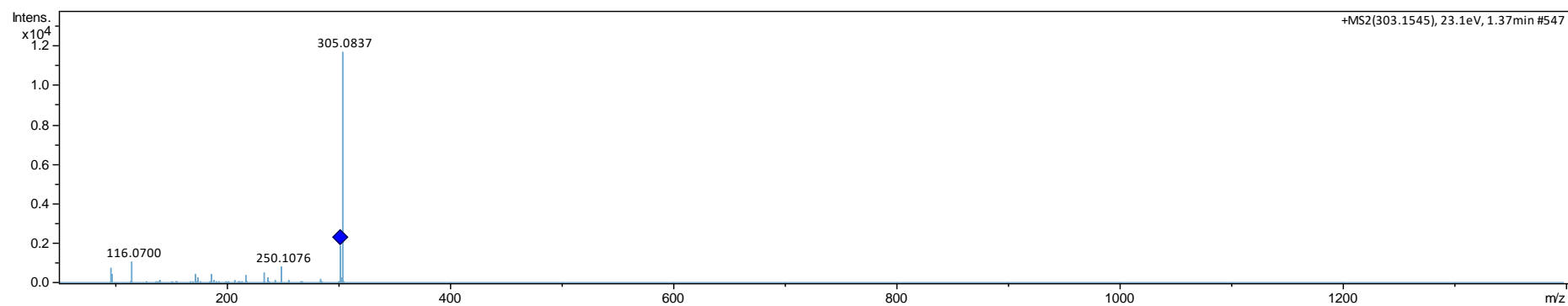


Figura S36

Glutaminol micosporina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H]<sup>+</sup> com erro de massa de -4,73 ppm.

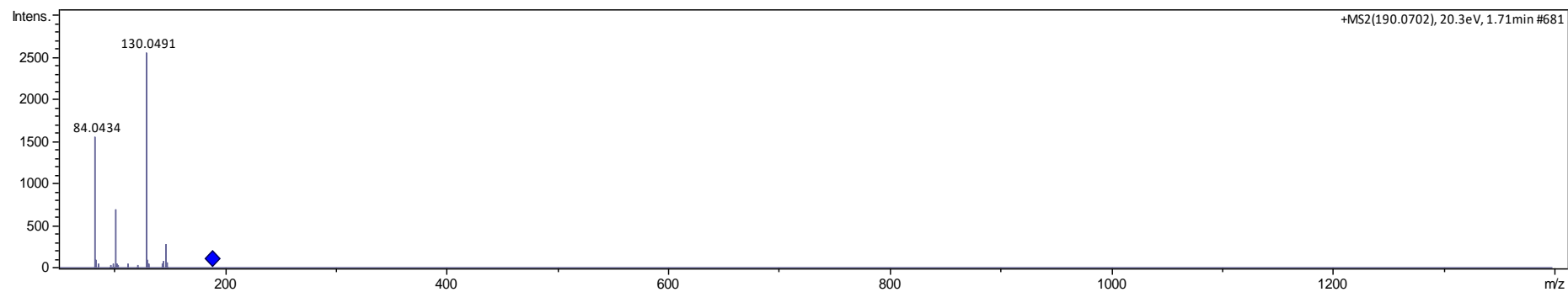


Figura S37

Ácido N-acetilglutâmico foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -7,09 ppm.

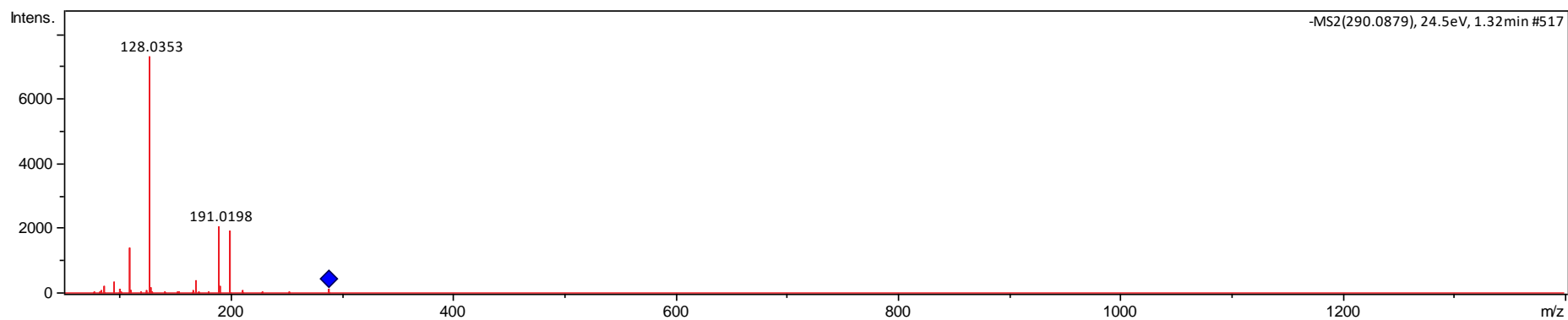


Figura S37

Piroglutamato de N-frutossil foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]$  - com erro de massa de 1,06 ppm.

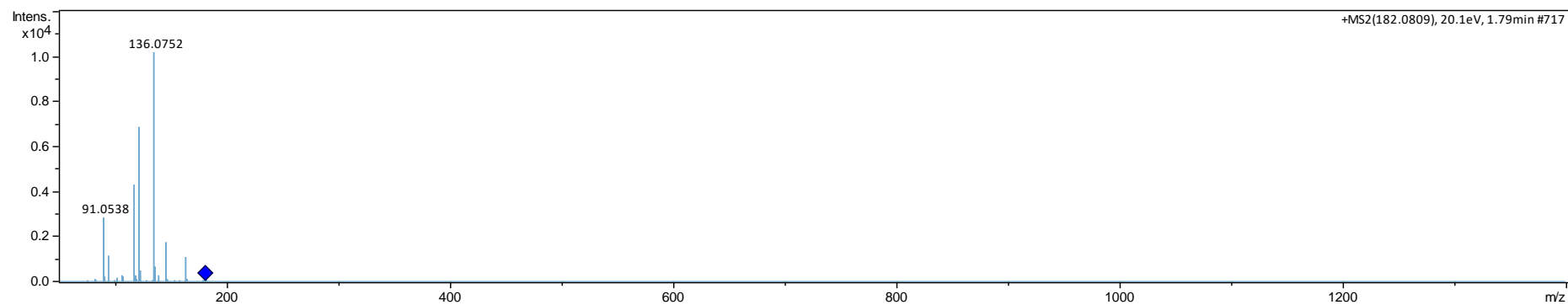


Figura S39

Fenilalanil-isoleucina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H] - com erro de massa de -7,82 ppm.

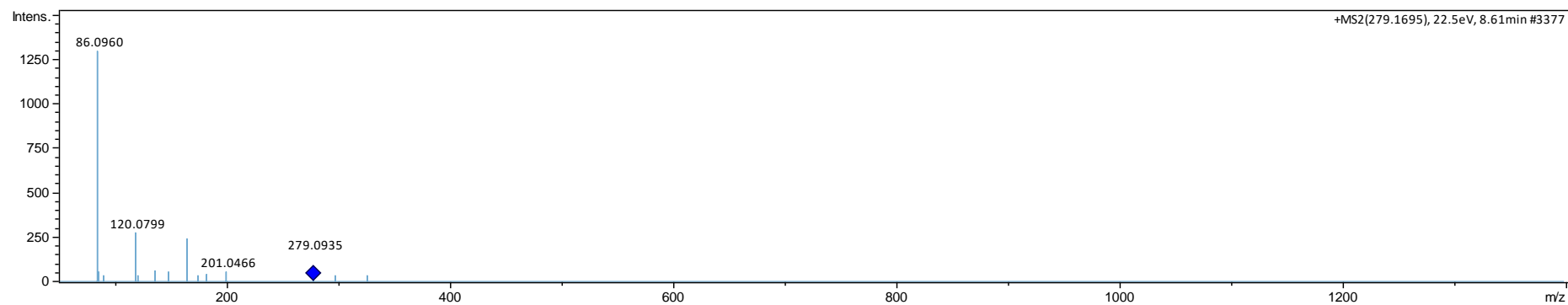


Figura S40

Fenilalanil-leucina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -5,62 ppm.

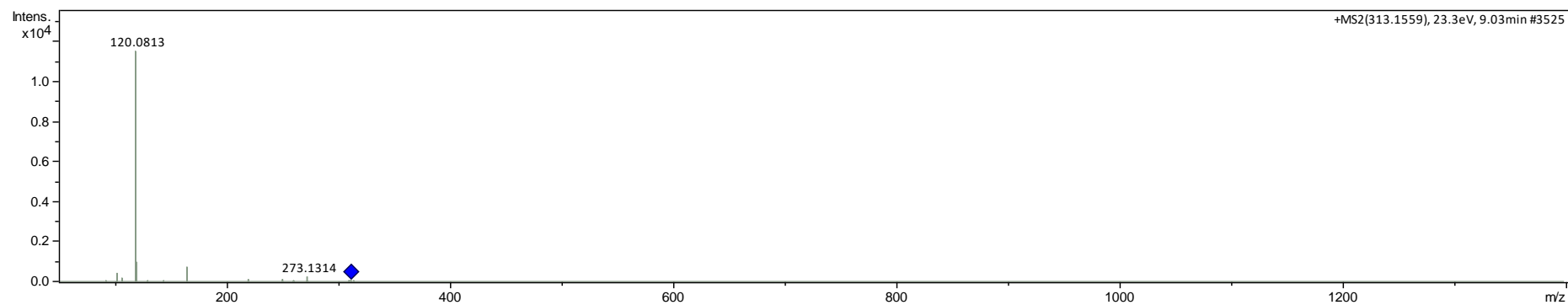


Figura S41

Fenilalanil-fenilalanina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H]<sup>+</sup> com erro de massa de -2,18 ppm.

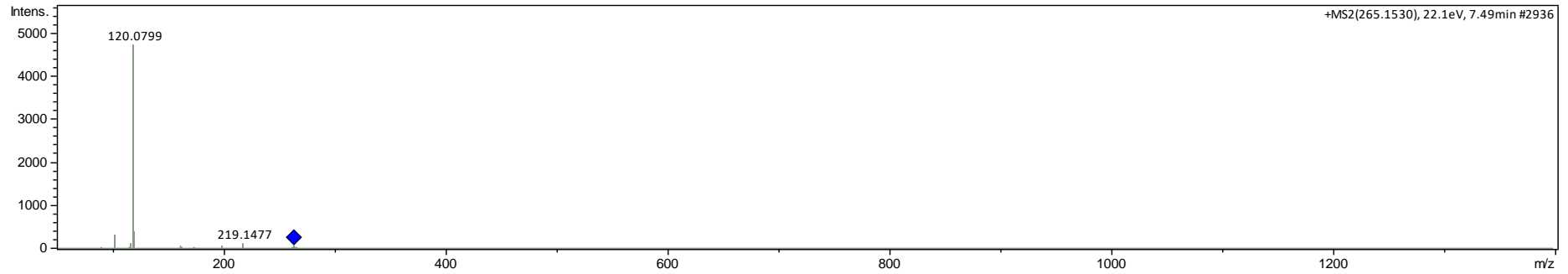


Figura S42

Fenilalanil-valina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -8,37 ppm.



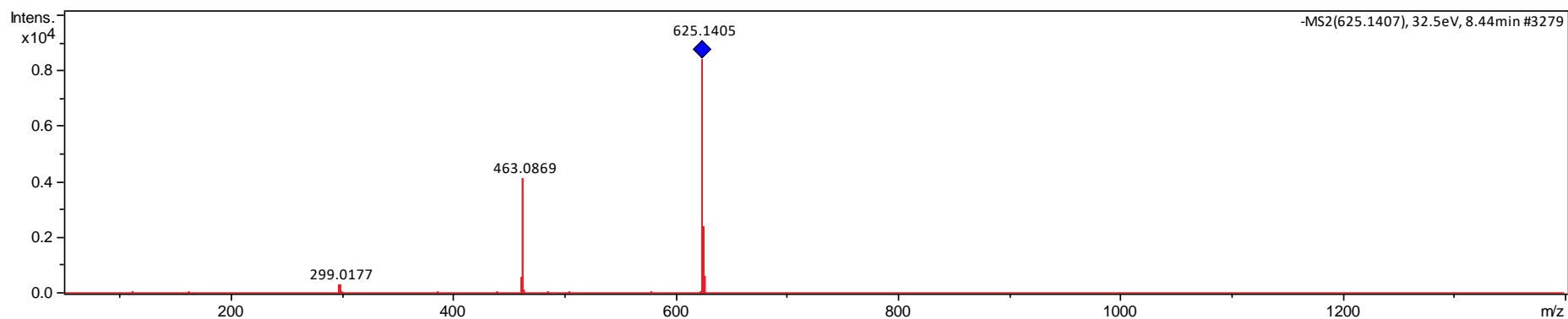


Figura S43

Quercetina-3,4'-O-di-beta-glucosídeo foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H] - com erro de massa de 0,36 ppm.

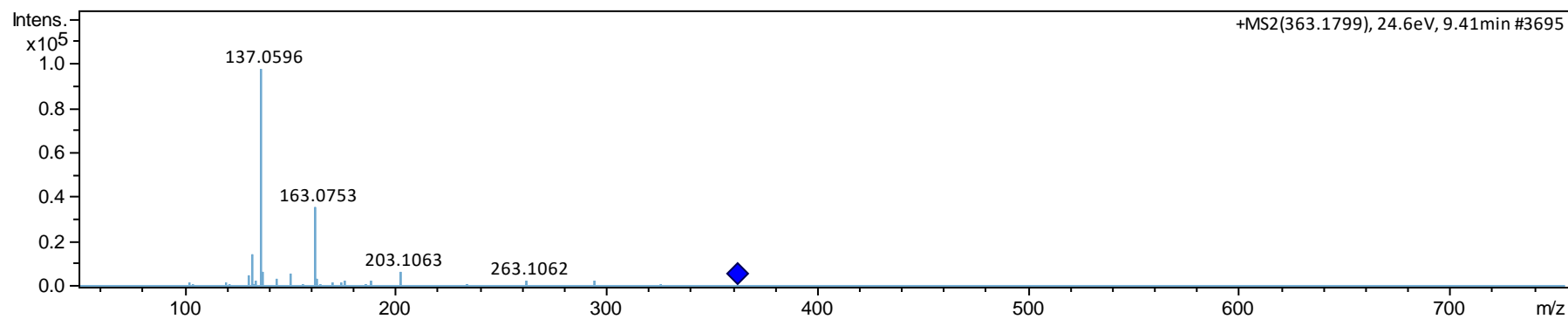


Figura S44

Secoisolariciresinol foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -2,25 ppm.

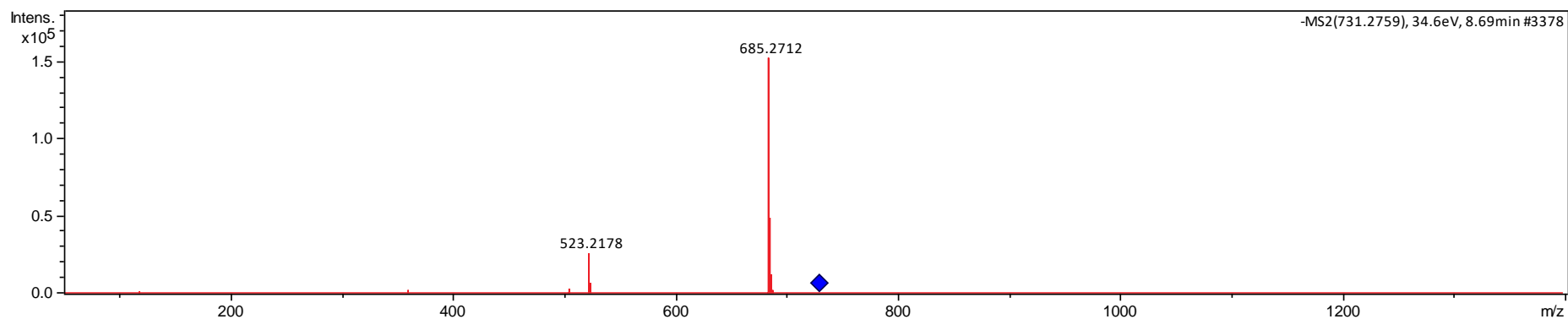


Figura S45

Secoisolariciresinol diglucosídeo foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como [M + H]<sup>+</sup> com erro de massa de -4,23 ppm.

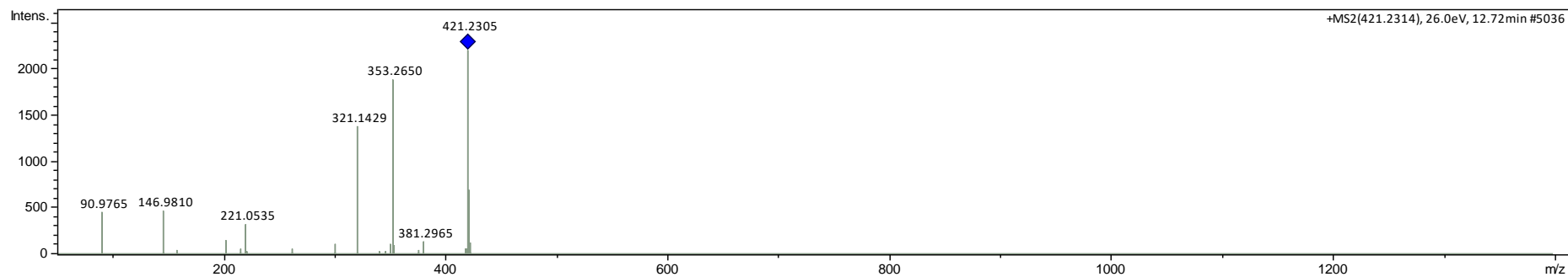


Figura S46

Tris (2-butoxietil) fosfato foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -4,06 ppm.

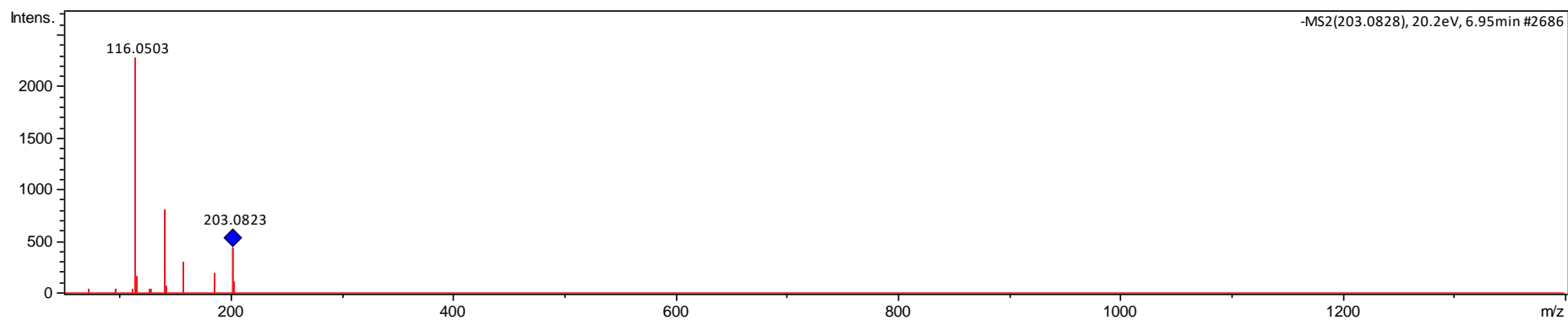


Figura S47

Triptofano foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -5,38 ppm.

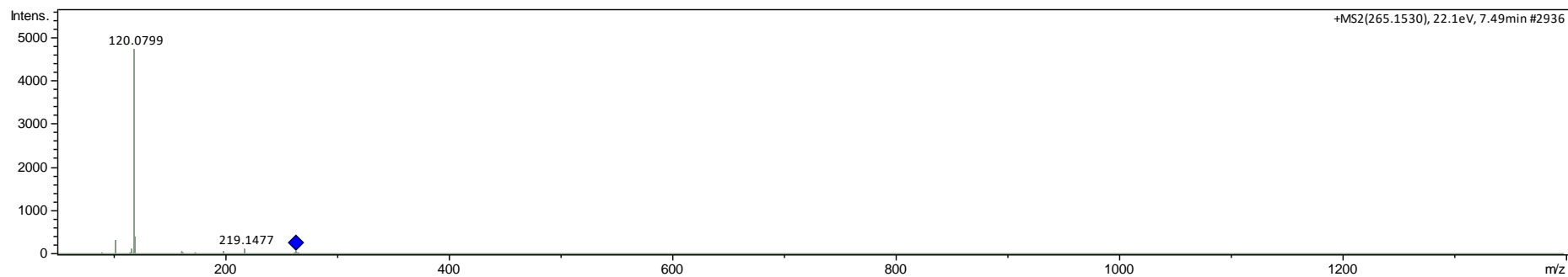


Figura S48

Valil-Fenilalanina foi identificado a partir de incubação *in vitro* de líquido ruminal sem e com adição de farelo de linhaça usando cromatografia líquida de ultra-alta performance - espectrometria de massa em tandem e a Rede Global Molecular Social de Produtos Naturais. O íon foi identificado como  $[M + H]^+$  com erro de massa de -6,10 ppm.