

HENRIQUE VALENTIM NUNES MACHADO

**SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA PARA VACAS EM LACTAÇÃO: PERFIL DE
ÁCIDOS GRAXOS E TEOR DE ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO NA
GORDURA DO LEITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M149s
2012

Machado, Henrique Valentim Nunes, 1982-

Suplementação lipídica para vacas em lactação: perfil de ácidos graxos e teor de ácido linoléico conjugado na gordura do leite / Henrique Valentim Nunes Machado. – Viçosa, MG, 2012.

xi, 104f. : il. ; 29cm.

Orientador: José Carlos Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 83-104

1. Bovino de leite - Alimentação e rações. 2. Ácidos graxos. 3. Leite - Produção. 4. Desempenho. 5. Proteínas microbianas. 6. Nitrogênio. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.2084

HENRIQUE VALENTIM NUNES MACHADO

**SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA PARA VACAS EM LACTAÇÃO: PERFIL DE
ÁCIDOS GRAXOS E TEOR DE ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO NA
GORDURA DO LEITE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 30 de março de 2012.

Fernando de Paula Leonel

Giovanni Ribeiro de Carvalho

Ricardo Augusto Mendonça Vieira

Marcelo Teixeira Rodrigues
(Coorientador)

José Carlos Pereira
(Orientador)

Aos meus pais Antônio Lira Nunes Machado e Águeda Valentim Nunes Machado por terem me proporcionado suporte para todas realizações de minha vida, e por terem me dedicado muito amor e carinho.

À todos os meus familiares e amigos, os quais nos momentos bons e ruins estavam por perto.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG- Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da UFV, pelo apoio.

Ao professor José Carlos Pereira, pela orientação, pela amizade, pelos ensinamentos e confiança depositada.

Aos professores co-orientadores Marcelo Teixeira Rodrigues e Fernando de Paula Leonel pelas valiosas contribuições.

Aos membros da Banca Examinadora, Professor Ricardo Augusto Mendonça Vieira e Giovanni Ribeiro de Carvalho, pelo enriquecimento sugerido ao trabalho.

Aos funcionários e amigos da Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite e do Laboratório de Nutrição Animal.

À Vitor por ter compartilhado a condução do experimento de campo sempre com muita responsabilidade.

A todos os estagiários que me acompanharam e me ajudaram ao longo do experimento.

Às secretárias de Pós-graduação Fernanda e Celeste, pela paciência e dedicação.

Aos inúmeros amigos que fizeram parte diretamente ou indiretamente do processo de confecção deste trabalho, Eric Balbino, Igor Assis, Rafael Bastos,

Cláudia Sampaio, Karina Zorzi, Tiago Figueiredo, Rafael Tonucci, Paulo Fortes, Cristina Bonafé e tantos outros.

Ao meu irmão Guilherme Valentim que mesmo distante sempre demonstrou confiança e positividade ao meu sucesso profissional.

Aos meus pais, que por ter proporcionado um sentimento de reciprocidade em mim, me fez ter entusiasmo para conduzir o Doutorado.

A todos aqueles que não estão nominalmente citados e que fizeram parte da minha vida.

Minha eterna gratidão!

BIOGRAFIA

Henrique Valentim Nunes Machado, filho de Antônio Lira Nunes Machado e Águeda Valentim Nunes Machado, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 23 de outubro de 1982.

Em março de 2001, iniciou o curso de graduação de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, concluindo em março de 2006.

Em outubro de 2006, ingressou no curso de Mestrado em Zootecnia, na área de Produção e Nutrição de Ruminantes, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo em julho de 2008.

Em agosto de 2008, ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia, na área de Produção e Nutrição de Ruminantes, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese no dia 30 de abril de 2012.

ÍNDICE

	Págs.
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	IX
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
RESULTADOS.....	51
DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

RESUMO

MACHADO, Henrique Valentim Nunes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2012. **Suplementação lipídica para vacas em lactação: perfil de ácidos graxos e teor de ácido linoléico conjugado na gordura do leite.** Orientador: José Carlos Pereira. Coorientador: Marcelo Teixeira Rodrigues.

A pesquisa foi conduzida com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes fontes lipídicas em dietas de vacas em lactação, sobre os seguintes parâmetros: consumos de matéria seca e nutrientes; coeficientes de digestibilidade aparente; produção e composição do leite; teor de CLA na gordura do leite; perfil geral de ácidos graxos na gordura do leite; níveis sanguíneos de uréia, triglicerídeos, HDL, LDL, VLDL, colesterol total e glicose; balanço de compostos nitrogenados; síntese de proteína microbiana; concentração de ácidos graxos voláteis e nitrogênio amoniacal do líquido ruminal. Foram utilizadas 5 vacas primíparas da raça holandesa, PO (puro de origem) e PC (puro por cruz), distribuídas em um quadrado latino 5 x 5. Os tratamentos foram caracterizados pelas seguintes dietas experimentais: controle (sem adição de lipídio); dieta com grão de soja cru moído; dieta com caroço de algodão; dieta com óleo de soja; dieta com sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac[®] E). A maioria dos valores para consumo e digestibilidade, de matéria seca e frações do alimento não apresentaram diferenças entre as dietas, o consumo de fibra em detergente neutro indigestível (FDNI) foi superior para a dieta com caroço de algodão, assim como, a digestibilidade da proteína se mostrou superior no tratamento com óleo de soja. Nos parâmetros produtivos, houve maior produção em kg/dia de leite, lactose do leite e extrato seco desengordurado do leite, quando o sabão de cálcio foi usado como suplemento. No âmbito de perfil de ácidos graxos contidos na gordura do leite, os tratamentos com sabão de cálcio e grão de soja cru moído, deram origem às maiores concentrações de ácidos graxos poliinsaturados e C_{18:2}. A suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos foi responsável pela maior produção diária de ácido linoléico conjugado (CLA), apresentando valores praticamente o dobro dos demais tratamentos. A concentração de CLA na gordura do leite, apesar de não ter apresentado significância estatística,

também foi superior para este suplemento. Em relação ao metabolismo de compostos nitrogenados, a excreção de nitrogênio via urina foi superior em vacas que receberam dietas com suplemento de óleo de soja. Os suplementos lipídicos, com exceção do sabão de cálcio, incrementaram a síntese de proteína microbiana. Já para concentração de amônia no líquido ruminal obteve-se valor superior para o tratamento controle e valor inferior para o tratamento com grão de soja cru e moído, enquanto os parâmetros sanguíneos mantiveram-se inalterados. O suplemento lipídico, sabão de cálcio (Megalac® E), apresentou influência positiva sobre o perfil de ácidos graxos contidos na gordura do leite, principalmente no que diz respeito à quantidade de CLA. Por outro lado, aspectos de produção e composição do leite não foram afetados negativamente por esse suplemento.

ABSTRACT

MACHADO, Henrique Valentim Nunes, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, march, 2012. **Lipid supplement for lactating cows: profile of fatty acids and conjugated linoleic acid content in milk fat.** Adviser: José Carlos Pereira. Co-adviser: Marcelo Teixeira Rodrigues.

The study was conducted to evaluate the effects of different lipid sources in diets of lactating cows on the following parameters: dry matter intake and nutrients apparent digestibility, milk production and composition, fat content of CLA in milk; general profile of fatty acids in milk fat, blood levels of urea, triglycerides, HDL, LDL, VLDL, total cholesterol and glucose, nitrogenous compounds balance, microbial protein synthesis, concentration of volatile fatty acids and ammonia concentration of rumen fluid. We used five primiparous Holstein, PO (pure source) and PC (pure by crosses), distributed in a 5 x 5 Latin square. The treatments were characterized by the following experimental diets: control (no added lipid) diet with raw ground soybean, cottonseed diet, diet with soybean oil diet with calcium salts of fatty acids (Megalac® E). Most values for intake and digestibility of dry matter and food fractions showed no differences between diets, consumption of indigestible neutral detergent fiber (INDF) was higher for diet with cottonseed, as well as the digestibility protein seems to be higher in treatment with soybean oil. Productive performance, there was increased production in kg / day of milk, lactose in milk and nonfat dry milk, when the soap was used as calcium supplement. Within the profile of fatty acids contained in milk fat, treatment with calcium soap and raw ground soybean, led to higher concentrations of polyunsaturated fatty acids and C18: 2. Supplementation with calcium salts of fatty acids was responsible for the higher production of conjugated linoleic acid (CLA), with values nearly double the other treatments. The concentration of CLA in milk fat, although not shown statistically significant, was also higher for this supplement. Regarding the metabolism of nitrogenous compounds, nitrogen excretion via urine was higher in cows fed diets supplemented with soybean oil. The fat supplements, with the exception of calcium soap, increased the microbial protein synthesis. As for the ammonia concentration in rumen fluid was obtained upper value for the control

treatment and lower value for the treatment of raw soy beans and ground coffee, while blood parameters remained unchanged. The fat supplement, calcium soap (Megalac ® E), positive influence on the profile of fatty acids contained in milk fat, especially with regard to the amount of CLA. Moreover, aspects of production and milk composition were not affected by this supplement.

Introdução

Em geral, a sociedade de todo o mundo, em virtude de alguns processos sociais, econômicos e ambientais, que proporcionam desconforto físico, psicológico e fisiológico às pessoas, busca de forma cada vez mais crescente, qualidade de vida. Essa por sua vez, está ligada a aspectos relacionados à saúde, educação, poder aquisitivo, assim como a inter-relação destes. Nessa conjuntura de procura por bem estar, se enquadra um agente de fundamental importância, a alimentação. Esta, de certa forma, é influenciada por todos os aspectos ligados à qualidade de vida. Sendo assim, o alimento, tem sido observado numa nova perspectiva utilitária, além de sua função nutritiva, já que, é cada vez mais significativa a identificação de compostos contidos nos diversos alimentos com propriedades benéficas aos seres humanos, abrindo um novo nicho no contexto alimentício, o de alimentos funcionais.

Alimento funcional pode ser definido como alimento semelhante em aparência ao alimento convencional, consumido como parte da dieta usual, capaz de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos úteis e comprovados na manutenção da saúde, podendo auxiliar, na redução do risco de doenças e funções nutricionais básicas. Esse conceito tem ganhado inserção na consciência dos consumidores, principalmente em relação ao valor de certas frutas e vegetais. Os produtos alimentícios de origem animal também são conhecidos por conterem componentes que proporcionam efeitos positivos sobre a saúde humana e prevenção de doenças, além de seus valores nutricionais tradicionais (Milber, 1999).

Produtos de origem animal contribuem significativamente no fornecimento de nutrientes na alimentação humana (NRC, 1988). São responsáveis por contribuir em quantidades expressivas na ingestão de proteína, além de ser fonte primordial de muitas vitaminas e minerais, incluindo a vitamina B₁₂, B₆, riboflavina, niacina, zinco, fósforo e cálcio.

Detectar aspecto funcional nos alimentos oriundos dos animais possibilita prover expectativas de agregar valores aos mesmos, tornando-os

diferenciados e conseqüentemente mais atrativos ao consumo. Neste contexto, pode-se enquadrar o leite bovino, que tem como constituinte de sua gordura relevante quantidade de ácido linoléico conjugado (CLA), um ácido graxo *trans*, o qual vem sendo alvo de estudos que evidenciam sua ação benéfica à saúde dos seres humanos.

O ácido linoléico conjugado (CLA) apresenta indícios de atuação anticarcinogênica e na melhoria na composição corporal, dentre outros. Este fato coloca o setor de produção animal em um patamar de emissor de agentes responsáveis por qualidade de vida, nesse caso específico, o leite. Nesse sentido, faz-se necessário somar aos objetivos quantitativos da produção de alimentos de origem animal, aspectos qualitativos intrínsecos, como elevar teor de compostos, vinculados à preservação da saúde de quem o consome.

Por outro lado, o leite, assim como outros alimentos produzidos por animais ruminantes são ricos em outros ácidos graxos de isomeria *trans*, além do CLA. Nas últimas décadas, uma crescente preocupação advinda da comunidade científica, provocou inúmeros questionamentos sobre os possíveis efeitos maléficos dos ácidos graxos *trans*. Os principais efeitos prejudiciais à saúde humana atribuídos aos ácidos graxos *trans* estão relacionados com doenças cardiovasculares e saúde materno-infantil.

É importante considerar o elevado consumo de alimentos manufaturados produzidos pelas indústrias, que contêm ácidos graxos *trans* em suas composições. Estes podem estar relacionados de forma mais predominante aos prejuízos à saúde humana.

A suplementação lipídica em dietas de vacas em lactação apresenta relevante potencial para incrementar o teor de CLA no leite, além de melhorar o perfil da gordura do mesmo. Dessa forma, estudos direcionados a este âmbito, interagem veementemente com setores ligados à saúde das pessoas como, medicina e nutrição humana, em busca de melhoria na qualidade de vida por meio dos alimentos de origem animal, no qual se enquadra o leite.

Dessa forma, este trabalho foi conduzido para avaliar os efeitos de diferentes suplementos lipídicos como componentes de dietas de vacas em

lactação, com base nos seguintes parâmetros: consumos de matéria seca e nutrientes; coeficientes de digestibilidade aparente; produção e composição do leite; teor de CLA na gordura do leite; perfil geral de ácidos graxos na gordura do leite; níveis sanguíneos de uréia, triglicerídeos, HDL, LDL, VLDL, colesterol total e glicose; balanço de compostos nitrogenados; síntese de proteína microbiana; concentração de ácidos graxos voláteis e nitrogênio amoniacal do líquido ruminal.

Revisão de Literatura

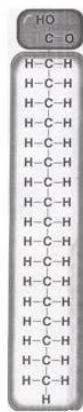
Aspectos Gerais dos Lipídeos

As gorduras e óleos utilizados para armazenamento de energia nos organismos vivos e contidos nos alimentos, de forma geral são quase que em totalidade, derivados de ácidos graxos. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias de hidrocarbonetos que variam, em comprimento, de 4 a 36 carbonos. Alguns ácidos graxos possuem a cadeia completamente saturada (sem nenhuma dupla ligação entre os átomos de carbono) e outros, contêm uma ou mais duplas ligações (cadeias insaturadas), denominados monoinsaturados ou poliinsaturados, respectivamente. Os ácidos graxos poliinsaturados, em sua grande maioria, apresentam suas duplas ligações separadas por um grupo metileno, ou seja, o átomo de carbono que participa de uma dupla ligação não é ligado ao outro participante de dupla ligação. Quando existe essa seqüência de duplas ligações o ácido graxo passa a ser denominado conjugado. Outra predominância dentre os ácidos graxos insaturados é a configuração *cis*, na qual, os átomos de hidrogênio ligados aos carbonos que participam da dupla ligação, estão do mesmo lado da cadeia. Porém existe a configuração *trans*, caracterizada pelo posicionamento oposto desses hidrogênios.

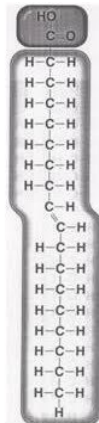
As propriedades físicas dos ácidos graxos e dos compostos que os contêm, são fortemente determinadas pelo comprimento e grau de insaturação da cadeia de hidrocarboneto. Essa cadeia tem caráter apolar e o grupo carboxílico polar, desta forma quanto maior o comprimento da cadeia e menor número de insaturações, menor será a solubilidade em água do ácido graxo. O ponto de fusão dos ácidos graxos também é determinado pelo comprimento e grau de insaturação da cadeia. Em temperatura ambiente (25°C), ácidos graxos saturados com 12 a 26 carbonos possuem consistência cerácea, enquanto os insaturados são líquidos oleosos. As cadeias de hidrocarbonetos saturadas possuem simetria e linearidade capaz de promover livre rotação ao

redor dos átomos de carbono, dando maior flexibilidade e estabilidade à cadeia. Essas moléculas, por possuírem grande superfície para ligações, podem se complexar firmemente em matrizes quase cristalinas, suportadas por forças de van der Waals. Nos ácidos graxos insaturados, dupla ligação *cis* promove uma torção na molécula, desconfigurando a linearidade da mesma e consequentemente dando maior instabilidade para cadeia, dificultando o encaixe para com outros complexos.

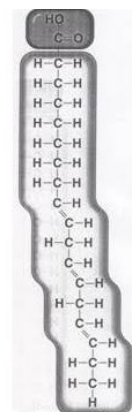
Em seguida são demonstrados ácidos graxos de diversas configurações para melhor visualização de suas estruturas.



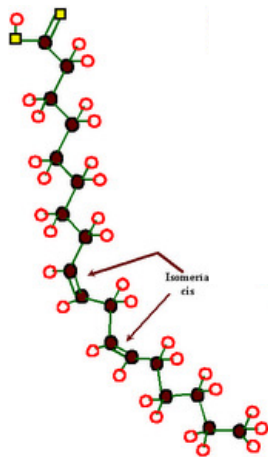
Ácido Esteárico
(saturado)



Ácido oléico
(insaturado)

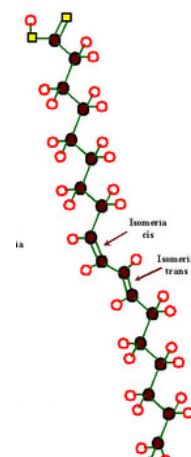


Ácido alfa-linolênico
(poli-insaturado)



Ácido linoleico (9*cis*-12*cis*)

isomeria *cis*



Ácido linoleico conjugado (9*cis*-11*trans*)

isomeria *cis* e *trans*

Muitos alimentos usados na alimentação humana e animal, assim como, as reservas corporais de gordura, contêm ácidos graxos, e esses, estão complexados na forma de triglicerídeos, que são os lipídeos mais comuns construídos a partir desses ácidos graxos. Triglicerídeo é uma estrutura composta por uma molécula de glicerol ligada a três moléculas de ácidos graxos. Os ácidos graxos de cada triglicerídeo podem ter o mesmo tamanho de cadeia e mesmo grau de insaturação, caracterizando triglicerídeo simples e os que possuem ácidos graxos com perfis variados são denominados mistos.

Ácidos Graxos e Alimentos Produzidos por Ruminantes

Os efeitos metabólicos e fisiológicos das gorduras consumidas são determinados pelo perfil de ácidos graxos que as compõem. Nas últimas décadas, uma crescente preocupação advinda da comunidade científica, provocou inúmeros questionamentos sobre os possíveis efeitos maléficos dos ácidos graxos *trans*, e até mesmo sobre benefícios do consumo de um tipo específico desses compostos.

O aumento dos níveis de consumo dos ácidos graxos *trans*, além das implicações apresentadas, pode ter como conseqüência direta a redução da ingestão de ácidos graxos essenciais, favorecendo o desenvolvimento de síndromes relacionadas à deficiência desses ácidos graxos (Martin et al., 2004).

Os ácidos graxos *trans* são originados naturalmente, através da biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados no rúmen dos animais ruminantes, e estão presentes na carne, no leite e seus derivados, produzidos por esses animais. Outra fonte de ácidos graxos *trans* é a produção industrial de gordura parcialmente hidrogenada, a qual, ao longo do século XX, apresentou um significativo aumento, devido ao seu baixo custo e capacidade para ser utilizada em produtos que necessitam do processo de fritura ou que requerem gordura no processamento (Costa et al., 2006).

O metabolismo de ácidos graxos no rúmen tem grande influência sobre a composição de ácidos graxos da carne e leite de ruminantes. Ácidos graxos insaturados, incluindo ácido α -linolênico (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C_{18:3}) e linoléico (*cis*-9, *cis*-12 C_{18:2}), estão presentes em consideráveis concentrações nas gramíneas e outros alimentos destinados a ruminantes, porém esses ácidos graxos estão em baixas concentrações na carne e no leite desses animais. Sabe-se a bastante tempo que lipídeos de tecidos de animais ruminantes têm maior quantidade de ácidos graxos saturados que os de não ruminantes (Bank and Hilditch, 1931).

Assim, os ácidos graxos ingeridos pelos animais ruminantes sofrem transformações no rúmen que alteram o grau de insaturação da cadeia e a organização das moléculas, modificando a estrutura física e conseqüentemente o comportamento metabólico e os efeitos fisiológicos desses ácidos graxos. Os dois principais processos que sustentam essas alterações dos ácidos graxos insaturados são a lipólise e a hidrogenação (Jenkins et al., 2007). A operacionalização desses processos é realizada pelos microrganismos presentes no rúmen, e o grau de eficiência é fortemente influenciado pela quantidade e perfil de ácidos graxos que chegam ao rúmen (Beam et al., 2000), além do pH do ambiente ruminal (Fuentes et al., 2009).

Transformação Ruminal dos Ácidos Graxos Insaturados

Lipólise

Lipases microbianas iniciam o processo ruminal hidrolisando as ligações ésteres dos lipídeos dietéticos, o que provoca liberação dos ácidos graxos. A demanda de grupo carboxílico para ocorrer hidrogenação estabelece a ordem dos processos, ou seja, a lipólise dos lipídeos deve preceder a hidrogenação dos ácidos graxos insaturados (Hawke and Silcock, 1970). Dawson et al. (1977), ao inativarem lipases ruminais e lipases da forragem ofertada aos

animais, em momentos separados, tanto *in situ* quanto *in vitro*, e após incubação em líquido ruminal, observaram que lipases produzidas por microrganismos ruminais são fundamentais ao processo de lipólise, no qual, sem as mesmas, os lipídeos da dieta sofreram hidrólise não representativa dos principais lipídeos consumidos por ruminantes: triglicerídeos, galactolipídeos e fosfolipídeos.

Biohidrogenação

De forma simples, nesse passo os ácidos graxos sofrem isomerização para ácidos graxos *trans* e em seguida hidrogenação das ligações duplas (Bauman et al., 2000).

As primeiras evidências de biohidrogenação no rúmen foram observadas quando óleo de linhaça foi incubado com conteúdo ruminal de ovinos e o resultado foi uma diminuição de 30 para 5% de ácido linolênico (C_{18:3}) e um simultâneo aumento de 18:2 (Reiser, 1951). Shorland et al. (1955), Wood et al. (1963) e Ward et al. (1964) obtiveram resultados que seguiram a mesma tendência de Reiser (1951), nos quais os ácidos linoléico e linolênico em grande parte foram convertidos a ácido esteárico e outros ácidos intermediários.

Existe uma grande gama de microrganismos no rúmen responsáveis pelos processos de hidrólise e biohidrogenação, no entanto existe uma especificidade de atuação dos mesmos em relação aos diversos perfis de ácidos graxos. White et al. (1970) observou que 80% do ácido oléico (C_{18:1}) foi convertido a ácido esteárico, também sendo encontrado traços de outros C_{18:1}, quando esse ácido graxo foi incubado em cultura de microrganismos gram-negativos anaeróbios. Para o ácido linoléico (C_{18:2}), o resultado foi transformação de 80% a ácido esteárico encontrando traços de C_{18:2} e C_{18:1}. Já para ácido linolênico (18:3), 80% foram convertidos a uma mistura de C_{18:1} mais traços de C_{18:2}, não havendo formação de ácido esteárico.

A população microbiana do rúmen é constituída principalmente por protozoários ciliados, bactérias anaeróbicas e fungos anaeróbicos, de maneira que essa cadeia de microrganismos digere os alimentos consumidos pelos animais fornecendo a maioria dos nutrientes requeridos (Jenkins et al., 2007).

Recentemente estudos foram realizados com o objetivo de identificar as bactérias envolvidas na biohidrogenação, principalmente as que convertem *trans*-11 C_{18:1} a ácido esteárico. As concentrações de ácidos graxos utilizadas para tal fim foram elevadas o suficiente para revelar padrões quantitativos não só do metabolismo, mas também de toxicidade, relevante à ecologia microbiana e aspectos nutricionais do animal. Os estudos revelaram a especificidade das espécies bacterianas em converter ácido linoléico em *cis*-9, *trans*-11 C_{18:2}, *trans*-11 C_{18:1} e C_{18:0}. Attwood et al., (1996), Kopecny et al., (2003) e Paillard et al., (2007), observaram que três cepas de *Butyrivibrio*, as quais são, *Butyrivibrio hungatei*, *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Pseudobutyrvibrio* spp., predominantemente converteram ácido linoléico em *trans*-11 C_{18:1}. Duas cepas de *Clostridium proteoclasticum* também foram responsáveis pela formação de *trans*-11 C_{18:1}, e foi a única espécie a gerar ácido esteárico. Devido ao ácido vacênico (*trans*-11 C_{18:1}) ser considerado precursor do CLA, as bactérias que o produzem também são consideradas como produtoras de ácido linoléico conjugado. O CLA foi produto final da transformação do ácido linoléico apenas através da ação de *Clostridium proteoclasticum* (Bryant and Robison, 1961). Interessante aspecto foi verificado por Wallace et al., (2006), no qual, todas as bactérias promotoras de ácido vacênico e CLA, a partir do ácido linoléico, são produtoras de butirato, no entanto, nem todas as bactérias produtoras de butirato formam tais ácidos graxos. Dessa forma, atenção especial deve ser dada às cepas de *Clostridium proteoclasticum*, formadoras de C_{18:0}, no sentido de tentar minimizar o último passo da biohidrogenação, já que os ácidos graxos saturados tornaram-se foco de preocupação para saúde humana.

Em relação à sensibilidade das bactérias ruminais aos ácidos graxos poliinsaturados, Maia et al. (2007) realizou experimento utilizando 50µg ml⁻¹ de AGPI, o qual foi incubado no meio M2, descrito por Hobson (1969). A maioria das espécies de bactérias ruminais cresceram na presença de 50µg ml⁻¹ de AGPI, no entanto, metade desses espécies apresentaram diminuição no

crescimento, induzida pelo ácido linoléico. Duas espécies *Ruminococcus*, celulolíticas, não foram capazes de crescer na presença de qualquer AGPI, enquanto outras espécies celulolíticas como, *F. succinogenes*, cresceram a uma densidade de células muito menor na presença de ácido linoléico (AL; *cis*-9,*cis*-12 C_{18:2}) e docosaheξανóico (ADH; C_{22:6} (n – 3)) e foram incapazes de crescer em meios contendo ácido α-linolênico (ANL; *cis*-9,*cis*-12,*cis*15 C_{18:3}) e eicosapentanóico (AEP; C_{20:5} (n – 3)). Outras bactérias que apresentaram sensibilidade foram: *B. hunatei*, *E. ruminantium* e *C. proteoclastcum*. À sensibilidade das bactérias ruminais, relacionada a outros AGPI, seguiram tendência semelhante à sensibilidade para ácido linoléico. Maia et al. (2007), classificou os AGPI em uma seqüência decrescente de toxicidade da seguinte forma: AEP>ADH>ANL>AL. Observa-se que quanto mais insaturado for o ácido graxo, maior será o seu nível de toxicidade.

Uma cuidadosa ponderação deve ser feita no uso de ácidos graxos poliinsaturados na dieta de ruminantes, visto que, ao mesmo tempo que esses ácidos graxos podem aumentar o fluxo de ácidos graxos insaturados para o intestino, aumentando o teor dos mesmos na carne e leite desses animais, também podem deprimir a digestibilidade da fibra, através da sua toxicidade às bactérias celulolíticas. Dessa forma, estudos devem ser realizados com o intuito de descobrir a quantidade e perfil de ácidos graxos poliinsaturados da dieta, para promover o equilíbrio entre esses dois aspectos, que envolvem tanto a qualidade do produto advindo de ruminantes, quanto à eficiência produtiva dos mesmos.

Os protozoários, que podem ser responsáveis por até 50% da biomassa de microrganismos no rúmen (Williams and Coleman, 1992), podem conter cerca de três quartos dos ácidos graxos microbianos presentes no rúmen (Keeney, 1970). Dawson and Kemp, (1969), Girard and Hawke (1978) e Singh and Hawke (1979), sugeriram que os protozoários apesar de conter uma expressiva quantidade de CLA e ácido vacênico, têm um papel insignificante para a biohidrogenação, e esse elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados são advindos da associação ou ingestão de bactérias pelos protozoários. Dessa maneira o fluxo de protozoário para o intestino parece ser de fundamental importância para a incorporação de ácidos graxos insaturados

na carne e no leite de ruminantes. No entanto, alguns protozoários ciliados são retidos seletivamente no rúmen, segundo Abe et al. (1981) e Ankrah et al. (1990). Apesar dessa retenção, de 30 a 43% do fluxo de CLA e 40% do fluxo de trans C_{18:1} que chegam ao duodeno são originados dos protozoários (Yanez-Ruiz et al., 2006).

Os protozoários, apesar de não produzirem os CLA e ácido vacênico incorporados a si, exercem importante influência no aporte desses compostos ao organismo do hospedeiro. Em ovinos defaunados de protozoários, as concentrações sanguíneas de C_{18:3} e C_{18:2} foram maiores quando da presença de protozoários.

Já, em relação aos fungos, foi detectado presença relativamente alta de C_{18:1} nos mesmos (Kemp et al., 1984b; Body and Bauchop, 1985) e também conversão de ácido esteárico a C_{18:1}, através da atividade da enzima Δ^9 -dessaturase em *Piromyces communis* (Kemp et al., 1984b). Em experimento realizado com o objetivo de identificar a atividade e eficiência de biohidrogenação do ácido linoléico por colônias mistas e isoladas de fungos, Nam and Garnsworthy (2007) verificaram que a biohidrogenação dos fungos é mais lenta que a de bactéria e o produto final dessa, quase que na totalidade, é o ácido vacênico (trans-11 C_{18:1}). Também descobriram que a colônia de fungos mais eficiente nesse processo pertencia ao gênero *Orpinomyces*. Assim, os fungos, com biomassa no rúmen bem menor que bactérias têm papel, ainda que pequeno na biohidrogenação e produção de CLA, não pela produção direta desse, mas por gerar o seu precursor (trans-11 C_{18:1}).

Ácidos graxos insaturados e suas vias de biohidrogenação

Na Figura 1 são apresentadas as vias de biohidrogenação dos principais ácidos graxos insaturados.

O ácido oléico sofre biohidrogenação de sua cadeia através de isomerização e hidrogenação de sua dupla ligação. Conversão de ácido oléico

a trans-18:1 foi estudada por Mosley et al. (2002), Proell et al. (2002) e Abu-Ghazaleh et al. (2005), utilizando ácido oléico com carbono marcado ^{13}C . Em lotes de culturas ruminais, a incubação de ácido oléico resultou na detecção de ^{13}C em ácido esteárico e vários isômeros de *trans* C_{18:1} com insaturações nos C₆ a C₁₆. Abu-Ghazaleh et al. (2005), observaram que isomerização à alguns isômeros do ácido oléico foi limitada quando o pH foi diminuído de 6,5 para 5,5. A eficiência de hidrogenação a ácido esteárico vai depender da posição da dupla ligação, assim como do tipo de isômero envolvido (Kemp et al., 1984b). Outros estudos identificaram outros intermediários da biohidrogenação do ácido oléico, incluindo os derivados do ácido esteárico (Hudson et al., 1995; Morvan and Jobin, 1999; Jenkins et al., 2006). Jenkins et al. (2006), propôs uma via de conversão direta de ácido oléico a ácido esteárico por microrganismos ruminais, através de uma hidrogenação direta.

A biohidrogenação de ácido linoléico a ácido esteárico ao longo de muito tempo vem sendo caracterizada por apresentar apenas dois intermediários, *cis*-9, *trans*-11 C_{18:2} (CLA) e *trans*-11 C_{18:1} (ácido vacênico), como indicado por Garton (1977). No entanto uma série de isômeros do CLA foram encontrados no conteúdo digestivo de bovinos ou em conteúdo *in vitro* (Teter and Jenkins, 2006). Kim et al. (2002) demonstraram significativa produção de *trans*-10, *cis*-12-CLA por cepas isoladas de *Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus* e *Lactobacillus. Butyrivibrio fibrisolvens*. Segundo Wallace et al. (2007), *Butyrivibrio Fibrisolvens* produz *trans*-9, *trans*-11-CLA em quantidade dez vezes menor do que a produção de *cis*-9, *trans*-11-CLA.

Biohidrogenação de ácido graxos poliinsaturados com mais de duas duplas ligações foram menos estudadas e ainda não há nada conclusivo sobre as vias e intermediários desse processo. Inicialmente, a biohidrogenação do ácido α -linolênico foi demonstrada como na Figura 1, na qual o primeiro intermediário seria um conjugado com três insaturações, seguido da formação de um não-conjugado C_{18:2}. Loo et al. (2004) relataram fluxo duodenal de três isômeros C_{18:3} (*cis*-9, *trans*-12, *cis* 15 C_{18:3}; *cis*-9, *trans*-12, *trans*-15 C_{18:3}; *trans*-9, *trans*-12, *trans*-15 C_{18:3}) em vacas de leite recebendo dieta convencional. Nesse estudo, a suplementação com óleo de linhaça, rico em ácido linolênico, promoveu maior fluxo duodenal de todos os três isômeros, ficando implícito que

tais ácidos graxos tiveram como origem a biohidrogenação do ácido linolênico, supondo que somente são produzidos isômeros C_{18:3}, a partir de ácidos graxos com três ou mais insaturações. Destailats et al. (2005) sugeriram isômeros como sendo intermediários da biohidrogenação de ácido linolênico: *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2}, *cis*-9, *trans*-13 C_{18:2}, *cis*-9, *trans*-11-CLA e *trans*-13, *cis*-15-CLA. Já Wasowska et al. (2006), propôs o acúmulo, oriundo da biohidrogenação de ácido linolênico, de *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 C_{18:3}, *trans*-9, *trans*-11, *cis*-15 C_{18:3}, *trans*-11, *cis*-15 C_{18:2}, não detectando *cis*-9, *trans*-11-CLA. Biohidrogenação de ácidos graxos com mais de três duplas ligações é muito pouco conhecida e pesquisas ainda não fornecem explicações claras sobre o processo e seus intermediários.

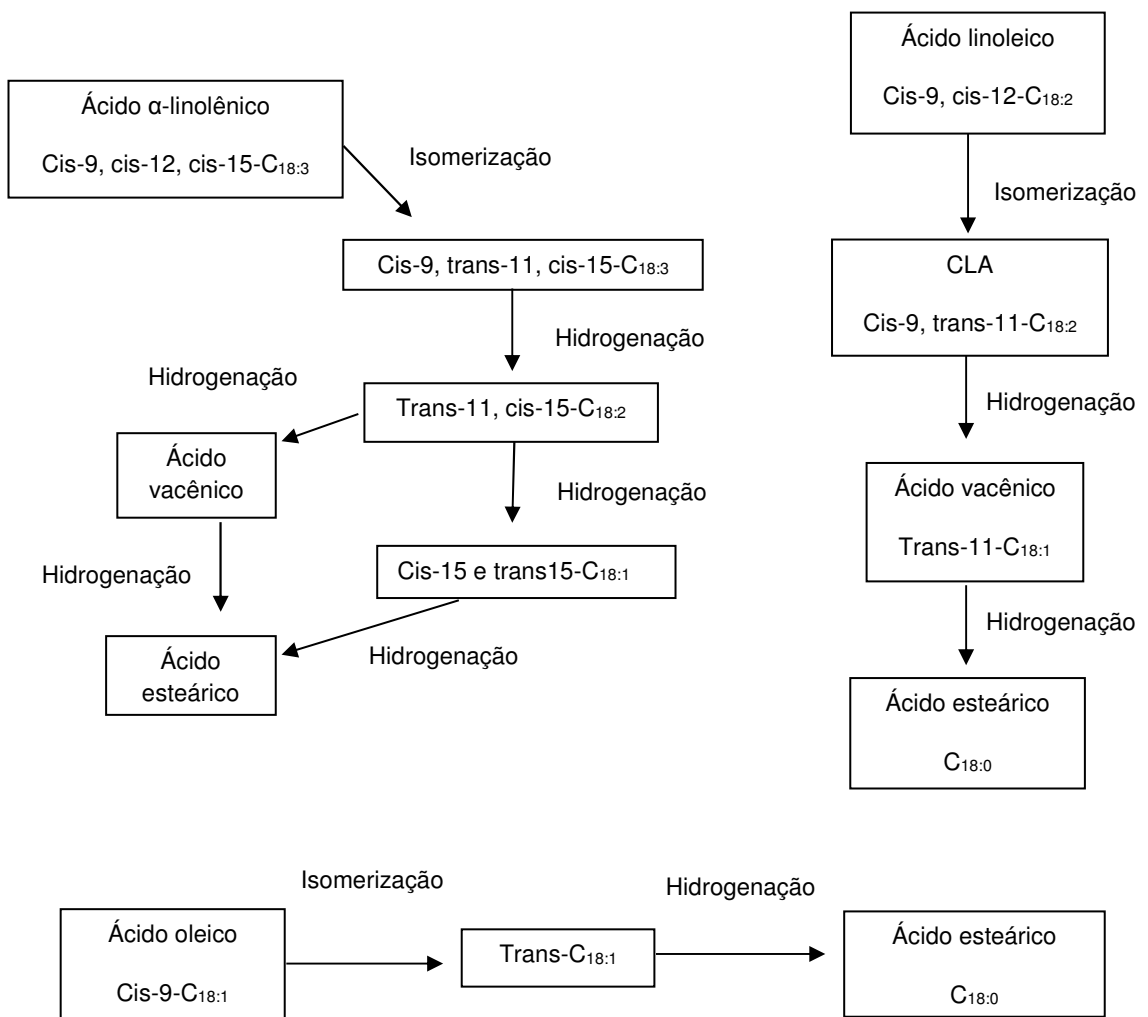


Figura 1. Vias da biohidrogenação do ácido linolênico, linoléico e oléico. Adaptado de Harfoot and Hazlewood (1988).

Influência do pH na biohidrogenação ruminal

Em estudo conduzido com incubação *in vitro*, variando o pH e as quantidades de ácido linoléico e linolênico inseridas no meio, Troegeler-Meynadier et al. (2003) verificaram que em mesmas quantidades iniciais de ácido linoléico, houve menor desaparecimento do mesmo no pH 6,0, em relação ao pH 6,5. Esse mesmo evento ocorreu quando a concentração de ácido linolênico foi aumentada. Isso sugere uma inibição do primeiro passo da biohidrogenação, a isomerização, provavelmente por afetar a atividade da enzima isomerase. Quando houve aumento das concentrações de ácido linoléico, foi observado menor desaparecimento do mesmo, no entanto, a quantidade desaparecida foi maior, sugerindo um limite para o processo de isomerização. Assim, de acordo com Troegeler-Meynadier et al. (2003), o pH em torno da neutralidade e maiores quantidade de *cis*-C_{18:2} podem ser benéficos no sentido de proporcionar maiores fluxos de CLA para incorporação no leite e carne de ruminantes.

Outro experimento *in vitro*, foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento da biohidrogenação sob diferentes pHs. Neste, foi utilizado um fatorial 2x2 para avaliar relação volumoso:concentrado (30:70 ou 70:30) e pH do líquido ruminal (5,6 ou 6,4). O menor pH foi responsável por um maior acúmulo de *trans*-10 C_{18:1} e *trans*-10, *cis*-12 CLA e a maior quantidade de concentrado possibilitou maior acúmulo de *trans*-10, *cis*-12 CLA, porém em menores quantidades que em baixo pH, lembrando que dietas com altos valores de concentrado diminuem o pH do ambiente ruminal. Assim, Fuentes et al. (2009) conclui que o pH é um fator que afeta o processo de biohidrogenação.

Seguindo a mesma linha, AbuGhazaleh et al. (2005) usando carbono marcado ¹³C, testou a biohidrogenação de ácido oléico em pH 5,5 e 6,5. Com o menor pH, houve uma diminuição significativa da variedade de isômeros *trans*-C_{18:1} e aumento na quantidade de ácido esteárico. Com isso, faz-se pensar em uma inibição do processo de isomerização pelo baixo pH, não havendo inibição sobre a hidrogenação. Devido a presença de C_{18:0}, uma via direta de

biohidrogenação do ácido oléico a ácido esteárico, sem precisar da isomerização, argumenta o fato, como proposto por Jenkins et al. (2006).

Existem duas teorias para explicar a existência da biohidrogenação. A primeira sugere que a biohidrogenação seria um meio de minimizar o poder de redução do ambiente ruminal, com a captura de H⁺ para realizar a hidrogenação dos ácidos graxos (Lennarz, 1966). A segunda propõe que a biohidrogenação é um mecanismo de desintoxicação utilizado pelas bactérias ruminais em resposta às suas sensibilidades em relação aos ácidos graxos insaturados (Kemp e Lander, 1984b; Kemp et al., 1984a). O fato é que esse mecanismo gera uma diferenciação no perfil dos ácidos graxos consumidos pelos animais ruminantes. Essa, nova variedade de ácidos graxos formam lipídeos que são incorporados na carne e no leite desses animais e conseqüentemente os efeitos fisiológicos e metabólicos gerados pelo consumo desses produtos afetam a saúde humana, de forma positiva ou negativa. Sendo assim, o conhecimento do processo de transformação dos ácidos graxos insaturados, nos animais ruminantes, pode proporcionar melhoria nos aspectos qualitativos, em termos de perfil de gordura, dos produtos advindos da cadeia produtiva dos ruminantes em geral.

Conhecendo o CLA

O ácido linoléico conjugado (CLA), comumente chamado de ácido rumênico, é um termo que descreve os isômeros de posição e geométricos do ácido linoléico (18:2, *cis*-9, *cis*-12), um ácido graxo dienóico, pertencente ao grupo n-6 (Santos *et al.*, 2001; Sanhueza *et al.*, 2002; Wang e Jones, 2004). Os isômeros predominantes são os *trans*-10, *cis*-12 e o *cis*-9, *trans*-11, sendo esse último 80 a 90% do total de CLA.

Pesquisas sobre as funções e benefícios do CLA iniciaram por volta de 1980 com a observação de que o CLA isolado de carne bovina grelhada, ou de isomerização catalisada do ácido linoléico, inibia quimicamente a indução de uma neoplasia de pele em camundongo (HA *et al.*, 1987). Essa descoberta

estimulou outros estudos para avaliar os efeitos benéficos do CLA sobre: câncer, função imune, efeito anti-diabético, arteriosclerose, ganho de peso, ingestão energética e de alimento, bem como, composição corporal (Wang e Jones, 2004).

De fato o CLA é um composto com propriedades nobres de interesse para os cientistas de produção animal, nutricionistas humanos e profissionais da área médica.

O consumo médio de CLA nas populações ocidentais está entre 150 e 200 mg/dia, no entanto, Medeiros (2002), avaliando dados de Kenekt et al. (1996), sugere que a redução do risco de câncer de mama é conferida com o consumo diário de 350 mg de CLA. Observa-se uma lacuna no consumo diário de CLA de 150 a 200 mg que para ser preenchida, sem fazer uso de suplementos de CLA isolado, pode-se proceder de duas formas: aumentar o consumo de alimentos ricos em CLA e/ou aumentar o teor de CLA nesses alimentos. Obter o nível de consumo de CLA sugerido, com aumento no consumo de alimentos ricos no mesmo, muitas vezes torna-se inviável, pois extrapola os níveis de consumo desses alimentos, em virtude da grande variedade de hábitos alimentares observados nas diversas regiões do mundo e do Brasil. Sendo assim, proporcionar incrementos no teor de CLA dos alimentos que o contem torna-se uma alternativa com maiores possibilidades de sucesso para aumentar a ingestão de ácido linoléico conjugado pelas pessoas.

Os produtos alimentares de ruminantes são as principais fontes de CLA na dieta humana (Chin et al., 1992; Fritsche and Steinhart, 1998; McGuire and McGuire, 2000), sendo assim, cria-se um forte vínculo entre a ciência de produção animal e a saúde humana, tendo como elo, produtos de origem animal com propriedades funcionais e benéficas às pessoas que o consomem. A carne bovina e o leite de vaca são importantes fontes de ácido linoléico conjugado, assim como, os derivados do leite. Uma série de investigações tem sido feitas em produtos alimentícios oriundos de ruminantes, no sentido de avaliar a concentração de CLA após práticas de fabricação e armazenamento. Resultados de pesquisas demonstraram que o processamento e o

armazenamento têm mínimos efeitos, indicando que o CLA é relativamente estável (Shantha et al., 1995; Banni and Martin, 1998). Dessa forma, a concentração de CLA nos alimentos crus determina o teor do mesmo nos alimentos derivados. As concentrações de CLA são usualmente expressas em percentagem da gordura total e produtos lácteos e carne de ruminantes geralmente têm concentrações na faixa de 3 a 7 mg/g de gordura (Chin et al., 1992; Lin et al., 1995; Banni and Martin, 1998).

Produção do CLA

O CLA encontrado na gordura da carne e leite de ruminantes é proveniente de duas fontes (Griinari e Bauman, 1999). A primeira é através da biohidrogenação ruminal incompleta dos ácidos graxos insaturados da dieta e a segunda é através da síntese no tecido do animal, a qual utiliza como substrato o ácido vacênico (*trans*-11 C_{18:1}), um intermediário da biohidrogenação.

Síntese de CLA nos tecidos

Foi observada uma estreita relação entre *cis*-9, *trans*-11 CLA e *trans*-11 C_{18:1} em amostras de manteiga, no Canadá (Bartlett e Chapaman, 1961). Posteriormente estudos demonstraram essa co-relação positiva entre esses dois ácidos graxos (Jiang et al., 1996; Jahreis et al., 1997; Precht and Molkentin, 1997; Griinari and Bauman, 1999). Com base nessa relação e na cinética de biohidrogenação ruminal, supõe-se que o *trans*-11 C_{18:1} produzido no rúmen seja disponível para absorção e que esse seja substrato para uma síntese endógena de CLA (Griinari et al., 1997). Segundo Bauman et al. (2000) a hipótese de produção endógena de CLA é sustentada pela dessaturação do *trans*-11 C_{18:1} através da ação da enzima Δ^9 -dessaturase.

Em experimento, fazendo-se infusão de *trans*-11 C_{18:1} no abomaso, no final de três dias observou-se aumento de 40% no teor de CLA do leite, indicando a síntese endógena de CLA (Corl et al., 1998). Para revelar a possível importância da Δ^9 - dessaturase para a produção de CLA, foi infundido no abomaso, ácido sterculic, um forte inibidor da Δ^9 - dessaturase (Corl et al., 1998). O resultado foi uma acentuada diminuição no teor de CLA do leite. A partir de então, considera-se que a síntese endógena representa a principal fonte de *cis*-9, *trans*-11 CLA para incorporação no leite e acredita-se que para o teor deste, na carne, a síntese endógena apresente similar importância (Bauman et al., 2000).

O tecido adiposo parece ser o principal sítio de produção endógena de *cis*-9, *trans*-11 CLA, dentre o qual, a glândula mamária destaca-se como principal local, com base na atividade da enzima Δ^9 - dessaturase (Bickerstaffe e Annison, 1970; Kinsella, 1972). Bickerstaffe e Johnson (1972) demonstraram que infusão intravenosa de ácido sterculic provocou acentuada diminuição na relação ácido oléico/ácido esteárico na gordura do leite e pequena alteração foi encontrada no plasma sanguíneo, sugerindo a glândula mamária como principal local de produção endógena de *cis*-9, *trans*-11 CLA.

Ácidos graxos trans e seus efeitos na saúde humana

Os ácidos graxos *trans* estão presentes na dieta diária da grande maioria da população em todo o mundo. Estes estão contidos em alimentos originados de animais ruminantes como: carne, leite e seus derivados. Entretanto a indústria, desde 1960 passou a produzir óleos vegetais parcialmente hidrogenados para serem utilizados no processo de confecção dos alimentos industrializados e assim incorporados nos mesmos (Martins et al., 2004). Com o advento da industrialização somado a um estilo de vida mais dinâmico, o consumo de alimentos industrializados e conseqüentemente o consumo de ácidos graxos *trans*, nas últimas décadas, passou a gerar

preocupação na comunidade científica ligada à saúde, pois os mesmos passaram a ser correlacionados a riscos de manifestação de algumas doenças.

Por outro lado, inúmeras pesquisas, estão revelando uma série de efeitos benéficos à saúde humana promovido pelo ácido linoléico conjugado (CLA). As maiores fontes naturais de CLA são os produtos de animais ruminantes, os quais muitas vezes são tidos como vilões para uma vida saudável.

Ácidos graxos trans e seus malefícios

Devido ao processo de hidrogenação, os ácidos graxos essenciais podem ser convertidos a novos isômeros, que se assemelham estruturalmente aos ácidos graxos saturados (AGS). Essa mudança provoca alteração metabólica dos ácidos graxos (AG) e conseqüentes efeitos fisiológicos a quem consome esses novos compostos, que passaram a apresentar isomeria *trans*. Os efeitos como, risco de doenças cardiovasculares, retardo no crescimento intra-uterino e retardo no desenvolvimento cerebral podem ser atribuídos aos AG *trans* (Costa et al. 2006).

Ácidos graxos trans e doenças cardiovasculares

Para esclarecer os mecanismos que levam os AG *trans* a terem papel no risco de doenças cardiovasculares (DCV), é importante conhecer a ação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) no transporte de colesterol do organismo. A LDL é responsável por transportar o colesterol do fígado para os tecidos periféricos e a HDL por fazer o transporte reverso, levar colesterol dos tecidos extra-hepáticos até o fígado para ser excretado juntamente com a bile ou redistribuídos para outros tecidos (Costa et al. 2006). Uma disfunção desses transportes pode gerar acúmulo de colesterol no sangue e provocar obstruções, causadoras de DCV.

Por apresentar uma estrutura semelhante aos AGS, os *trans*, podem exercer ações parecidas em relação à saúde cardiovascular. É comprovada a ação dos AGS em reduzir a expressão do mRNA para receptores de LDL nos tecidos, causando acúmulo do complexo LDL-colesterol, no sangue. No entanto, AGS parece não influenciar as concentrações de HDL.

De acordo com Ross et al. (2002), os AG *trans* promovem uma redução dos níveis de HDL, diferentemente dos AGS. Somado a isso, esses mesmos autores sugerem um papel dos *trans* na inibição da atividade da enzima paraoxonase, uma enzima que está envolvida na prevenção da oxidação lipídica e conseqüentemente do risco de DCV. Chardigny et al. (2008), observaram que os ácidos graxos *trans* de fontes industriais apresentaram atividade no sentido de reduzir HDL, efeito não detectado para AG *trans* de origem natural, revelando possíveis diferenças da ação dos *trans* sobre DCV de acordo com a fonte desses ácido graxos. Motard-Bélangier et al. (2008) observaram que ingestões moderadas de ácidos graxos *trans* de ruminantes tem efeito neutro sobre lipídeos do plasma e outros fatores de risco de DCV. Provavelmente as duas fontes de ácidos graxos *trans* apresentam diferenças em relação aos seus perfis. Essas diferenças devem ser consideradas quando se investiga efeitos sobre a saúde humana e as intervenções para diminuir o consumo de gorduras *trans* (Micha et al., 2010).

Por outro lado dados de um estudo realizado em quatorze países europeus não encontraram associação dos ácidos graxos *trans* e os níveis séricos de LDL, HDL ou a razão LDL/HDL (Aron et al, 1998). No entanto, o estudo não descarta outros mecanismos de aumentar riscos de DCV provocados por AG *trans*. Países do norte europeu apresentam maiores incidências de DCV que os países mediterrâneos (Mann, 1994). Esse fato, aliado ao comprovado menor consumo de AG *trans*, do segundo grupo de países, incita atribuir a esses isômeros um efeito a favor do risco de doenças cardiovasculares. No entanto, estudos mais específicos devem ser realizados, até mesmos, com a preocupação de descobrir que tipo de ácidos graxos *trans* (tamanho de cadeia e número de insaturações) estão envolvidos com o risco de DCV.

Ácidos graxos *trans* e saúde materno-infantil

Em recém nascidos, os isômeros *trans* têm sido inversamente proporcional ao peso ao nascimento, embora em experimentos com animais, não há correlação entre o peso ao nascimento, crescimento e consumo de ácidos graxos *trans* pela mãe (Larqué et al., 2001).

Em geral, as concentrações de ácidos graxos *trans* ingeridos pela lactante estão associadas às concentrações encontradas no leite materno em dose-dependente (Larqué et al., 2000). Dessa forma, os recém-nascidos que ingerem leite com altas concentrações de AG *trans* são alvos dos possíveis prejuízos a saúde causados por esses compostos. Chiara et al. (2002), expõem que os AG *trans* podem interferir na saúde materno-infantil devido a possível transferência desses, consumidos pela gestante para o feto, via placenta.

Em estudo realizado por Innis & King, (1999), as concentrações de AG *trans* da dieta materna, do leite materno e dos níveis de *trans* nos triacilgliceróis plasmáticos de lactentes, tiveram relação positiva. Elias e Innis (2001) observaram que o maior consumo de ácidos graxos *trans* no período gestacional promoveu aumento nas concentrações dos mesmos nos triacilgliceróis dos recém-nascidos e esse aumento teve uma relação inversa com o comprimento ao nascer.

O menor desenvolvimento intra-uterino pode estar relacionado com a inibição da biossíntese de ácido araquidônico e docosahexaenóico, especialmente pela inibição da Δ^6 -dessaturase (Chiara et al., 2002).

Larqué et al. (2000), pesquisaram os efeitos dos ácidos graxos *trans* sobre a atividade da Δ^6 -dessaturase em ratas prenhes. Foram oferecidas três concentrações de AG *trans* na gordura da dieta (0, 15 e 30%). Foram observadas altas concentrações de *trans* na placenta e nos tecidos, materno e fetal, exceto no cérebro, apesar de ser encontrada reduzida quantidade no cérebro fetal. Isso sugere que houve uma baixa transferência desses isômeros para o sistema nervoso central durante o desenvolvimento inicial e a possibilidade de um mecanismo protetor. Em relação à atividade da enzima Δ^6 -

dessaturase, o resultado foi uma inibição da mesma no fígado da mãe pelos isômeros *trans*.

CLA e seus benefícios a saúde humana

Os produtos alimentícios derivados de animais ruminantes são a principal fonte de CLA para o consumo humano (Chin et al., 1992; Fritsche and Steinhart, 1998; McGuire, 2000). Inúmeras pesquisas demonstraram benéficos efeitos do CLA sobre a saúde humana, inserindo a carne, leite e derivados de animais ruminantes no grupo de alimentos funcionais. Alimento funcional pode ser definido como alimento semelhante em aparência ao alimento convencional, consumido como parte da dieta usual, capaz de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos úteis e comprovados na manutenção da saúde, podendo auxiliar na redução do risco de doenças e funções nutricionais básicas.

A Academia Nacional de Ciência, afirmou que “o ácido linoléico conjugado (CLA) é o único ácido graxo demonstrado de forma inequívoca para inibir carcinogênese em experimentos animais” (NRC, 1994). Pesquisas sobre as funções e benefícios do CLA iniciaram por volta de 1980 com a observação de que o CLA isolado de carne bovina grelhada, ou de isomerização catalisada do ácido linoléico, inibia quimicamente a indução de uma neoplasia de pele em camundongo. Essa descoberta estimulou outros estudos para avaliar os efeitos benéficos do CLA sobre: câncer, função imune, efeito anti-diabético, arteriosclerose, ganho de peso, ingestão energética e de alimento, bem como, composição corporal (Wang and Jones, 2004).

Existem evidências da atuação do CLA no aumento da lipólise e/ou diminuição da lipogênese em benefício da composição corporal de seres humanos, na qual o isômero *trans*-10, *cis*-12 CLA seria o responsável. Em modelos experimentais utilizando animais foi observado que a adição de CLA na dieta dos mesmos possibilitou diminuição do LDL, não havendo esse efeito sobre o HDL. Somado a isso, houve também aumento na proporção de

antioxidante/colesterol total do plasma sanguíneo, possibilitando maior ação contra formação de placas ateroscleróticas, responsáveis pela arteriosclerose. Na perspectiva da prevenção contra o diabetes, o CLA apresenta uma possível diminuição dos níveis de glicose e aumento da sensibilidade à insulina, relacionados ao isômero *trans*-10, *cis*-12 CLA (Khanal, 2004). As ações sobre o sistema imune atribuídos ao CLA estão intimamente relacionadas ao seu efeito na prevenção do desenvolvimento de determinados cânceres.

O CLA está usualmente entre os compostos anti-carcinogênicos que atuam reduzindo, tanto a incidência de tumor em modelos experimentais de carcinogênese em ratos, quanto agentes citotóxicos existentes nas células cancerígenas. Esses resultados foram também demonstrados em estudos *in vitro* de células cancerígenas de melanoma, carcinoma de cólon, carcinoma de próstata, leucemia, carcinoma de ovário e tumor mamário (Chin et al., 1993; IP et al., 1994; Mcintosh et al., 1994; Parodi, 1994; NRC, 1994).

De fato o CLA é um composto com propriedades nobres de interesse para os cientistas da produção animal, nutrição humana e médicos.

O consumo médio de CLA nas populações ocidentais está entre 150 e 200 mg/d, no entanto, Medeiros (2002), avaliando dados de Kenekt et al. (1996), sugere que a redução do risco de câncer de mama é conferida com o consumo diário de 350 mg de CLA. Observa-se uma lacuna no consumo diário de CLA de 150 a 200 mg que para ser preenchida, sem fazer uso de suplementos de CLA isolado, pode-se proceder de duas formas: aumentar o consumo de alimentos ricos em CLA e/ou aumentar o teor de CLA nesses alimentos. Obter o nível de consumo de CLA sugerido, com aumento no consumo de alimentos ricos no mesmo, muitas vezes torna-se inviável por extrapolar os níveis de consumo desses alimentos, em virtude da grande variedade de hábitos alimentares observados nas diversas regiões do mundo e do Brasil. Sendo assim, proporcionar incrementos no teor de CLA dos alimentos que o contém, torna-se uma alternativa com maiores possibilidades de sucesso para aumentar a ingestão de ácido linoléico conjugado pelas pessoas.

Influência da Dieta Sobre o Teor de CLA na Gordura do Leite

O teor de CLA no leite é alterado em virtude da alimentação a que os animais são submetidos. Perfil da gordura dos ingredientes e/ou da dieta, suplementação lipídica, relação volumoso/concentrado e até mesmo suplemento de CLA influenciam a percentagem de CLA na gordura do leite bovino. No entanto, estudos com vacas em lactação demonstraram que mesmo em condições gerais de manejo há ainda uma variação no teor de CLA na gordura (Jiang et al, 1996;. Kelly et al. 1998b), sugerindo fator de variação de ordem genética.

O conhecimento desses agentes de variação é essencial para manipulações de alternativas que visam aumentar o teor desse constituinte da gordura do leite.

A singularidade da geração de CLA em produtos alimentícios derivados de ruminantes refere-se à biohidrogenação incompleta dos ácidos graxos insaturados da dieta no rúmen. Ironicamente, essa biohidrogenação de lipídeos que ocorre no rúmen também é responsável pelos altos níveis de ácidos graxos saturados na gordura de ruminantes, uma característica considerada indesejável para alguns aspectos da saúde humana (Bauman, 1999).

O teor de CLA na gordura do leite e carne de ruminantes pode variar em função de fatores de manejo e intrínsecos ao animal, e esses são dependentes da produção ruminal de CLA e *trans*-11C_{18:1}, assim como da atividade tecidual da Δ^9 -desaturase (Bauman, 1999). Os fatores que afetam o teor de CLA na gordura do leite agem da mesma maneira na carne de ruminantes em crescimento.

Existe uma ampla variação no teor de CLA na gordura do leite entre rebanhos, até mesmo entre os que possuem mesmo grau de sangue dos animais. Isso sugere que essa quantidade de CLA pode ser influenciada tanto por fatores genéticos e fisiológicos, quanto por aspectos relacionados ao ambiente, no qual, a dieta exerce relevante influência. Há diversas formas de manipular a dieta com a finalidade de aumentar o teor de CLA na gordura do

leite, das quais, podemos citar, segundo Griinari e Bauman (1999): substrato lipídico, no qual, gorduras insaturadas incrementam o CLA; óleos vegetais, nos quais, tipo de óleo (contendo maior quantidade de gordura insaturada), sais de cálcio de óleos vegetais, assim como o aumento no nível de suplementação desses, são positivos para elevar o CLA na gordura do leite; grãos de oleaginosas crus não têm efeito, mas quando processados são benéficos para o aumento de CLA; relação volumoso:concentrado, restrição alimentar e fornecimento de ionóforos, possuem efeitos variados; suplemento de CLA incrementa o teor do mesmo de forma dose dependente.

As fontes de lipídeos que podem ser usadas para a suplementação de vacas leiteiras se enquadram nas seguintes categorias, segundo Palmquist (1989): sementes inteiras de oleaginosas (soja, girassol, algodão, canola, etc.), óleos e gorduras livres (óleos vegetais, sebo e misturas de gordura animal e vegetal) e gorduras inertes (sais de cálcio de ácidos graxos).

No entanto, uma especificidade dos processos ruminais que geram o CLA causa conflito no âmbito da tentativa de interferir a nível de rúmen no incremento desse ácido graxo, pois, o mesmo fenômeno que propicia a formação direta ou indireta de CLA, a biohidrogenação, também é responsável pela saturação completa dos ácidos graxos insaturados até ácido esteárico, inviabilizando a formação de CLA. Dessa forma, ao mesmo tempo que fontes lipídicas devem possuir disponibilidade à biohidrogenação, para a obtenção de intermediários como o CLA e *trans*-11C_{18:1}, devem também ser capazes de resistir à completa biohidrogenação.

No contexto de suplementos lipídicos para fins de melhora no perfil de ácidos graxos do leite, as sementes de oleaginosas apresentam características potenciais, por apresentarem elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados. Essas fontes apresentam considerável quantidade de ácido linoléico que é um dos principais precursores do ácido linoléico conjugado. A proteção contra a biohidrogenação, oferecida pelos grãos ricos em óleos, apresentaram resultados variados em estudos científicos até o presente momento, até mesmo quando os mesmos são submetidos a processamento. No entanto,

acredita-se que quando ofertados de forma intacta, são capazes de conferir uma discreta proteção.

Ressalva deve ser feita ao uso dessas sementes na alimentação de ruminantes, relacionada a fatores anti-nutricionais ou tóxicos apresentados pelas mesmas, quando fornecidos na forma crua. A soja, por exemplo, possui fator anti-tripsina, além da lipase, que pode contribuir para rancificação de seu óleo e também da urease que, em contato com a uréia, a converte em amônia, liberando um odor característico. Quando os grãos são submetidos a processamentos, praticamente se elimina tais empecilhos.

Os sais de cálcio de ácidos graxos são obtidos através da reação de ácidos graxos de cadeia longa com sais de cálcio. Isso caracteriza uma menor disponibilidade dos grupos carboxílicos dos componentes da gordura dietética para sofrer biohidrogenação, no entanto essa proteção contra a biohidrogenação, que denomina tais suplementos como gordura inerte, não é plena, e parte dos ácidos graxos insaturados acabam sendo biohidrogenados. Ácidos graxos poliinsaturados, mesmo complexados com sais de cálcio, ainda são biohidrogenados devido ao maior poder de dissociação desses sais, conferido pelos próprios ácidos graxos poliinsaturados.

Contudo, gorduras em níveis não apropriados nas dietas podem acarretar distúrbios como, a depressão na produção de gordura do leite que pode trazer prejuízos, por interferir nas características qualitativas do leite e seus derivados, aliado ao fato do teor de gordura no leite ser um dos critérios de diferenciação para o pagamento do leite em muitos países, inclusive o Brasil. Recomendações de 15 a 20% da energia da dieta providas de fontes lipídicas foram feitas por Palmquist & Weiss (1994). Isso significa aproximadamente 8% da dieta.

Suplementação lipídica: produção e composição do leite

A gordura é acrescentada à dieta de vacas em lactação para aumentar o aporte de energia oferecido pelos alimentos consumidos pelas mesmas. Além do incremento energético a suplementação lipídica tem o potencial para aumentar a absorção de nutrientes solúveis em gordura, assim como reduzir pulverulência das rações (NRC, 2001). O principal resultado esperado ao realizar suplementação lipídica é o aumento na produtividade dos animais em lactação, conseqüência do maior aporte energético. No entanto, possíveis mudanças na composição do leite, assim como no perfil de ácidos graxos da gordura do leite, podem ser observadas com o incremento de gordura na dieta de vacas em lactação.

Processos metabólicos dos lipídios

Uma característica intrínseca da digestão de gordura em ruminantes é a presença do processo de biohidrogenação no rúmen, realizado pelos microrganismos ruminais. Isso ocorre, após a hidrólise ruminal de lipídeos da dieta, principalmente triglicerídeos, a ácidos graxos livres. A biohidrogenação é composta basicamente por duas etapas, isomerização e hidrogenação, e essas etapas sofrem influencia tanto da quantidade, quanto do perfil de ácidos graxos contidos na dieta. De maneira geral, estima-se que de 60 a 90% dos ácidos graxos poliinsaturados dietéticos são biohidrogenados (Bickerstaffe et al., 1972; Mattos and Palmquist, 1977) e quando se trata de gordura “protegida” (sais de cálcio) esses valores caem para 30 a 40% (Klusmeyer and Clark, 1991). Com isso, os principais ácidos graxos que saem do rúmen são, esteárico (C_{18:0}) e vários isômeros C_{18:1}, produzidos pela biohidrogenação. Dessa forma, observa-se que o perfil de ácidos graxos incorporados no leite de vacas leiteiras não é fiel ao perfil de ácidos graxos consumidos pelas mesmas.

No rúmen também há produção de ácidos graxos pelos microrganismos, e esses, em sua maioria são incorporados em fosfolipídios. Assim coeficientes de digestibilidade de ácidos graxos totais no rúmen são negativos, devido à síntese microbiana. De 85 a 90% dos ácidos graxos que saem do rúmen são na forma livre e 10 a 15% são fosfolipídios microbianos. Apesar de muito pouco triglicerídeos atingir o intestino delgado, lipases pancreáticas e biliares são necessárias para absorção de lipídeos. Lipase pancreática parece não ser induzida pela presença de substrato (Johnson et al., 1974), assim, a mesma pode se tornar limitante quando há chegada de uma maior quantidade de triglicerídeos no intestino delgado, ou pela oferta de gordura “protegida” ou por altos níveis de lipídeos na dieta, que proporcionam maiores saídas de triglicerídeos do rúmen, sem sofrer hidrólise, para o intestino.

Com a relação à digestibilidade de gorduras, essa pode ser influenciada pelo consumo de matéria seca, quantidade de gordura consumida e características da gordura da dieta basal e suplementar (NRC, 2001). O grau de insaturação é, provavelmente, a característica que mais influencia a digestão de lipídeos (Grummer, 1995).

Outros aspectos relevantes relacionados à suplementação lipídica são seus efeitos sobre a fermentação ruminal. Embora ácidos graxos insaturados tenham efeitos positivos sobre a digestibilidade da gordura, esses também são responsáveis por possíveis alterações na fermentação ruminal (Jenkins, 1993). Reduções no consumo de matéria seca, percentual de gordura do leite e digestão de fibra, são indicadores de fermentação ruminal alterada (NRC, 2001). Essa influência sobre a fermentação está vinculada com a quantidade de ácidos graxos insaturados contidos nos lipídeos da dieta, assim como, da taxa de liberação desses, no líquido ruminal. À medida que o limite de hidrogenação dos ácidos graxos pelos microrganismos é ultrapassado, a fermentação ruminal passa a se tornar mais vulnerável a alterações, devido ao fator tóxico dos ácidos graxos insaturados sobre os microrganismos fermentadores.

Suplementação lipídica e produção de leite

Os resultados de pesquisas relacionadas à produção de vacas leiteiras submetidas à alimentação com suplementação lipídica são variáveis e as respostas a tais suplementações são verificadas, possivelmente, de acordo com o nível de suplementação, grau de insaturação dos ácidos graxos do suplemento, assim como, a possível proteção aos processos ruminais, atribuídas a algumas fontes de gordura. Desta forma, esse conjunto de aspectos relacionados à suplementação lipídica pode modular o resultado esperado, que é o aumento na produção de leite. Assim, a influência de cada um desses aspectos sobre a produção de leite deve ser investigada para fazer-se bom uso da suplementação lipídica. Segundo o NRC (2001), as respostas à suplementação lipídica podem variar também de acordo com a dieta basal, estágio de lactação e balanço energético.

A resposta à suplementação lipídica é variável de acordo com o aporte de todos os outros nutrientes disponibilizados pela dieta total, ou seja, deve haver equilíbrio nas proporções dos nutrientes dietéticos para que nenhum desses se torne limitante, não havendo desperdício ou acúmulo corporal do nutriente não limitante.

Nesse sentido, Weiss and Pinos-Rodríguez (2009) trabalharam com vacas em lactação recebendo duas proporções volumoso:concentrado, ambas com ou sem suplementação lipídica. As proporções volumoso:concentrado utilizadas foram de 60:40 ou 40:60 e o adicional de gordura foi de 2,25% da dieta total em ácidos graxos livres saturados comparados com 0% de suplementação lipídica. Os animais com menor proporção de volumoso na dieta e suplementados com gordura produziram em média 2,6 kg a mais de leite, já as vacas que receberam maior proporção de volumoso e suplemento lipídico não tiveram aumento na produção, porém, foi observado aumento no escore corporal desses animais, devido à sobra de energia originada do suplemento, e essa foi incorporada na forma de gordura corporal, ou seja, outro nutriente foi o limitante.

Vacas no início da lactação tendem a obter menores respostas produtivas à suplementação com gordura, muito provavelmente devido à produção de leite ser prioridade nessa fase e o uso de reservas corporais para suprir a demanda energética camufla um possível resultado. Sendo assim, vacas em início de lactação recebendo suplementação lipídica podem não responder em produção de leite, mas por outro lado, podem amenizar a perda de peso, comum nessa fase, devido ao balanço energético negativo.

Em estudo realizado por Chilliard (1993), vacas no início da lactação, recebendo 4,5% a mais de extrato etéreo, não obtiveram aumento na produção de leite em relação aos animais não suplementados. Já, para a suplementação realizada no pico de lactação (aumento de 3,6% de extrato etéreo) e do meio para o final da lactação (aumento de 3,4% de extrato etéreo), o aumento na produção de leite foi de 0,72 e 0,65 kg/dia, sendo significativamente diferente do controle.

A resposta na produção de leite para a suplementação lipídica é curvilínea, assim, aumentos na suplementação diminuem a intensidade da resposta produtiva (Palmquist, 1983; Jenkins, 1994). Kronfeld (1976) sugeriu que a o máximo incremento na produção de leite é atingido quando 16% da energia metabolizável é advinda de ácidos graxos. Para tanto, cerca de 600 a 700g de suplemento de gordura se faz necessário (Jenkins, 1997).

De maneira geral, vários estudos verificaram aumento na produção de leite quando suplementação lipídica foi ofertada às vacas.

Segundo Kronfeld (1982), a quantidade de glicose na glândula mamária é determinante do volume de leite produzido. O aumento da extração de AG de cadeia longa do sangue pela glândula mamária decresce a síntese de AG de cadeias curta e média. Esta síntese de ácidos graxos à nível de glândula mamária requer a utilização de glicose como fornecedora de agentes redutores NADPH, via ciclo das pentoses (Costa et al., 2007). Desta forma, a utilização de suplementação lipídica pode propiciar a redução na utilização da glicose (Cant et al., 1993), disponibilizando maior quantidade de glicose para outros processos metabólicos como a produção de leite (Palmquist & Jenkins, 1980).

No entanto, respostas a essa linha de pesquisa são variáveis e também foram observadas depressões na produção de leite com paralela diminuição do consumo de alimentos com a adição de gordura na dieta. Drackley et al. (1992), Christensen et al. (1994), Firkins and Eastridge (1994) e Bremmer et al. (1998), sugeriram que os ácidos graxos insaturados são os maiores responsáveis pela depressão no consumo de alimentos, por vacas leiteiras recebendo suplemento lipídico. Esta depressão pode estar associada com a toxicidade dos ácidos graxos insaturados sobre os microrganismos ruminais. Dessa forma, decréscimo na microflora fermentadora, responsável pela digestão da fibra, pode ocasionar menor taxa de passagem da fibra e conseqüentemente menor consumo de matéria seca por efeito de enchimento. Além disso, maior quantidade de gordura na dieta pode promover barreira física nos alimentos, dificultando a colonização microbiana.

Santos et al. (2009), ao fornecer dieta suplementada com 3%, da MS total, de óleo de soja, que apresenta em média 70% de ácidos graxos insaturados, não observaram alteração no consumo de matéria seca e nem na produção de leite, em relação à dieta controle, com 2,5% de gordura. Porém, a maior densidade energética da dieta suplementada provocou melhoras no balanço de nutrientes, no início da lactação caracterizado pelo balanço energético negativo.

Já, Harvantine and Allen (2005), testaram o fornecimento de gordura suplementar através de sais de cálcio de óleo de palma e ácidos graxos livres hidrogenados, como representantes de gordura insaturada e saturada, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, não houve diferença na produção de leite, mas sim para o consumo de matéria seca, que foi menor para os animais que receberam suplementação lipídica com fonte insaturada. Dessa forma, observa-se que nem sempre o menor consumo de matéria seca, está relacionado com menor produção de leite. Uma possível explicação para esse fato seria a maior digestibilidade da gordura de fonte insaturada. Assim, apesar da ação negativa para consumo de matéria seca, os ácidos graxos insaturados apresentam maior facilidade de digestão e absorção.

Em contrapartida, Avila et al. (2000), observaram aumento da produção de leite com o fornecimento de suplementação lipídica, mas não detectaram diferença para o grau de insaturação do suplemento.

Segundo Allen (2000), a fonte de gordura suplementar influencia as alterações no consumo de matéria seca, uma vez que a magnitude de redução no consumo com a utilização de óleos vegetais é menor que a observada com outras fontes de gordura, como os sais de cálcio de ácidos graxos e gorduras não processadas. De modo geral, apesar das reduções no consumo quando são utilizadas fontes de gordura suplementar em rações para vacas leiteiras, especialmente em lactação, não são observadas diferenças no consumo quando a fonte de gordura é misturada no concentrado de forma satisfatória ou quando os animais são adaptados previamente ao fornecimento da fonte de gordura suplementar (NRC, 2001). Assim, a adaptação dos animais às dietas contendo gordura suplementar pode auxiliar na manutenção de níveis adequados de consumo e na obtenção dos benefícios da utilização de gordura dietética (Staples et al., 1998).

Somado ao grau de insaturação de uma fonte lipídica, está o seu aspecto de disponibilização à ação de enzimas contidas no ambiente ruminal, que está relacionada à quebra das ligações ésteres para liberação de ácidos graxos. Assim, um comportamento inerte conferido por determinadas fontes de lipídeos, o qual gere menor extensão da lipólise, pode influenciar a digestibilidade e o consumo dos alimentos.

Santos et al. (2001) realizaram estudo com vacas em lactação suplementadas com dois tipos de fontes lipídicas: grão de soja, como forma mais protegida, e óleo de soja. Não foi verificado aumento de produção em nenhum dos dois tratamentos em relação ao tratamento controle, sem adição de gordura. Entretanto, produção de leite diminuída foi constatada com suplementação lipídica a base de grão de soja, por Mora et al. (1996) e Silva (1997).

Resultados positivos em relação à suplementação lipídica foram encontrados por Costa et al. (2007). Em experimento realizado com vacas Jersey recebendo adicional de gordura na forma de sais de cálcio de óleo de

palma, farelo de arroz + óleo de arroz ou farelo de arroz + sebo bovino, não foi detectada diminuição de consumo entre os tratamentos em relação ao controle, sem adição suplementar de gordura. Somado a esse ponto positivo, houve maior produção de leite corrigido para 3,5% de gordura nos animais suplementados, não havendo diferença de produção entre esses tratamentos.

Em suma, inúmeros estudos revelaram incremento de produção de leite em vacas submetidas à suplementação lipídica, e ainda que tenham ocorrido resultados que indiquem ausências desses aumentos, a adequação ao tipo de gordura e à quantidade fornecida de suplemento pode trazer benefícios não somente na perspectiva de produção de leite, mas também na melhoria do balanço energético de vacas recém paridas, de alta produção, as quais mobilizam reservas corporais para manter o nível produtivo.

Na maioria das situações, a gordura na dieta total não deve exceder 6 a 7% da matéria seca. Assim, já que misturas de grãos de cereais e forragens possuem em média 3% de gordura, a suplementação lipídica deve ser feita entre 3 e 4% da matéria seca total ingerida (NRC, 2001).

Suplementação lipídica e composição do leite

Os ácidos graxos presentes no leite de ruminantes possuem duas origens, a captação da corrente sanguínea e síntese de novo, dentro das células epiteliais mamárias. Nos ruminantes, cerca de metade dos ácidos graxos são derivados da síntese de novo na glândula mamária (Bauman and Davis, 1974). Ao invés da glicose, os ruminantes utilizam acetato, produzido pela fermentação ruminal, como fonte de carbono para síntese de novo de ácidos graxos. Além disso, hidroxibutirato, produzido pelo epitélio do rúmen a partir do butirato absorvido, fornece metade dos primeiros quatro carbonos dos ácidos graxos produzidos por essa via.

Nos ruminantes, os ácidos graxos tomados da circulação sanguínea são originados da absorção intestinal da gordura da dieta e dos microrganismos e

também da mobilização de gordura corporal, essa última é mais significativa quando as vacas se encontram em balanço energético negativo, no início da lactação.

Um dos grandes desafios da suplementação lipídica é aumentar a produção de leite e melhorar o perfil de ácidos graxos do mesmo, sem comprometer o teor total de gordura no leite. Por outro lado, um nicho de mercado específico pode surgir reunindo as características induzidas ao leite pela suplementação lipídica. Do ponto de vista da nutrição humana, o menor consumo de gordura aliado a um melhor perfil de ácidos graxos, incluindo aumento de ácido linoléico conjugado, um composto ao qual vem sendo atribuído inúmeros efeitos benéficos à saúde humana, pode gerar um novo produto com o apelo de marketing de alimento saudável e funcional. Ou seja, além do aspecto nutricional, esse alimento possuiria adicional efeito de gerar mais saúde a quem o consome. No entanto, o leite com tais características, por diminuir o rendimento de produção de seus derivados, deveriam ser comercializados como bebida, justificando o maior preço pago pelo mesmo, através do valor agregado oferecido.

Por se tratar de uma novidade para o mercado, o leite com menor teor de gordura, a curto e médio prazo, ainda será depreciado devido aos baixos rendimentos industriais. Sendo assim a síndrome do baixo teor de gordura do leite, como é chamado o efeito causador da diminuição do teor de gordura no leite, vem sendo estudada, com o objetivo de determinar a quantidade e perfil de ácidos graxos oferecidos às vacas em lactação que não comprometam a composição do leite.

A síndrome do baixo teor de gordura do leite tem como principal agente causador a alimentação a que o animal é submetido e segundo Davis & Brow (1970) essa causa pode ser dividida em dois grandes grupos. Um grupo está relacionado com o fornecimento de dietas com alta concentração de grãos que fornecem grande quantidade de carboidratos facilmente digeríveis e o outro grupo é representado por suplementos lipídicos de óleos poliinsaturados. De fato, a presença de ácidos graxos poliinsaturados é um pré-requisito para que

haja diminuição no teor de gordura do leite em dietas com baixo teor de fibras (Bauman and Griinari, 2003).

De maneira geral, a presença de óleos vegetais (poliinsaturados) na dieta em quantidades adequadas não deprime teor de gordura do leite se a função normal do rúmen for mantida. Para tanto, a proporção volumoso:concentrado deve ser suficiente para que a fibra mantenha o normal funcionamento dos processos ruminais.

A base para explicar a síndrome do baixo teor de gordura do leite é sustentada por alterações nos processos microbianos do rúmen, causadas pela dieta (Bauman and Griinari, 2003). As principais alterações que podem ocorrer envolvem fermentação microbiana dos carboidratos e biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados da dieta, provocando diminuição da proporção acetato:propionato e acúmulo de intermediários da biohidrogenação, respectivamente. Existem algumas teorias que propõem as causas da síndrome do baixo teor de gordura no leite, no entanto, ainda é indefinido se somente uma base teórica condiz com a realidade ou se um conjunto de processos sustentados por mais de uma teoria está mais próximo das verdadeiras causas.

A produção ruminal de acetato e butirato é um efeito causado pela dieta e pode estar relacionado com redução do teor de gordura do leite. Oldham & Emmans (1988) encontraram estreita correlação entre precursores de gordura (acetato + butirato + ácidos graxos de cadeia longa) e o teor de gordura do leite. Dietas com baixo teor de fibra provocam diminuição na proporção acetato:propionato. No entanto, Annison et al. (1974) quantificaram ácidos graxos voláteis através do método de diluição isotópica envolvendo dietas com baixo teor de fibra e verificaram que a taxa de produção de acetato não é diminuída e sim sua proporção molar, devido ao aumento de produção de propionato. Na perspectiva quantitativa de butirato, também não foram encontradas menores produções sob dietas com baixo teor de fibra (Palmquist et al., 1969).

Dessa forma, se considerarmos que há uma limitação de precursor, essa não é devido à menor produção e sim por uma menor utilização desses pela

glândula mamária. A diminuição do pH ruminal causada por dietas com baixo teor de fibras afeta as taxas relativas de absorção individual dos ácidos graxos voláteis podendo refletir em menor disponibilidade de acetato e butirato para glândula mamária (Dijkstra et al., 1993). Por outro lado, se existe uma inibição da captação de precursores e formação de gordura na glândula mamária, a demanda desses substratos diminuem, e esses passam a não ser o ponto limitante para produção de gordura do leite. Assim, não podemos afirmar que alterações na produção ruminal de acetato e butirato provocam síndrome do baixo teor de gordura do leite induzida pela dieta.

A teoria da insulina-gliconeogênese é baseada em uma competição por nutrientes entre a glândula mamária e os demais tecidos corporais e também nas diferenças de sensibilidade à insulina dentre esses tecidos (Bauman and Griinari, 2003). Dietas com baixo teor de fibras resultam em aumento na produção de propionato no rúmen e nas taxas de gliconeogênese hepática e como consequência maior liberação de insulina pelo pâncreas. Somado a isso, dietas com baixa fibra aumentam o balanço energético das vacas e esse conjunto de eventos provoca elevação na concentração sanguínea de insulina.

O aumento de insulina circulante promove maior captação de acetato, hidroxibutirato e ácidos graxos de cadeia longa pelo tecido adiposo, já que o tecido mamário é menos responsivo à presença de insulina, além disso, aumento nas concentrações de insulina induz menor mobilização de ácidos graxos de cadeia longa das reservas corporais como consequência da inibição da lipólise. Em suma, essas mudanças na taxas de síntese de lipídios e lipólise direcionam o canal de nutrientes preferencialmente para o tecido adiposo, causando escassez de precursores para síntese de gordura do leite na glândula mamária.

Outra teoria que busca explicar a síndrome do baixo teor de gordura do leite é a teoria dos ácidos graxos *trans*. Essa é fundamentada na correlação positiva entre ácidos graxos *trans*, intermediários da biohidrogenação incompleta dos ácidos graxos insaturados da dieta, presentes no leite, e a diminuição do teor de gordura do mesmo. Os intermediários *trans* C_{18:1} foram os primeiros a serem identificados como participantes dessa correlação, de

acordo com alguns dados de pesquisa (Gaynor et al., 1995; Erdman, 1999). Somando a essa descoberta, Griinari et al. (1998) observou que o baixo teor de gordura do leite estava relacionado com um intermediário da biohidrogenação específico, o *trans*-10 C_{18:1}.

Griinari and Bauman, (1999) propuseram uma via de biohidrogenação, na qual a formação do *trans*-10 C_{18:1} passa pela hidrogenação do *trans*-10, *cis*-12 CLA, ou seja, muito provavelmente, as concentrações desses dois intermediários da biohidrogenação ruminal estão vinculadas com a diminuição do teor de gordura do leite.

Estudos com infusão abomasal de outros isômeros puros do *trans* C_{18:1} (*trans*-9 C_{18:1}; *trans*-11 C_{18:1}; *trans*-12 C_{18:1}) não detectaram efeito sobre a síntese de gordura do leite (Rindsig and Schultz, 1974; Griinari et al. 2000). Resposta a uma pesquisa constatou que a infusão pós-ruminal de isômeros puros de CLA, identificou o *trans*-10, *cis*-12 CLA como isômero exclusivo causador de uma diminuição no teor de gordura do leite, descartando outros isômeros como o *cis*-9, *trans*-11 CLA (Baumgard et al., 2000). No entanto, a infusão pós-ruminal de *trans*-10 C_{18:1} faz-se necessário para detectar se esse também exerce influência sobre a queda no teor de gordura do leite, mas tal procedimento é dificultado pela ausência desse isômero puro.

Com avançar das idéias e propostas, Bauman and Griinari (2001) propuseram a teoria da biohidrogenação para suprir algumas falhas da teoria dos ácidos graxos *trans*, na tentativa de explicar o fenômeno da síndrome do baixo teor de gordura do leite. Esses autores salientaram que sob certas condições alimentares, como dieta com baixa fibra suplementada com lipídio, há modificação no ambiente ruminal que provoca alteração no processo de biohidrogenação no sentido de produzir determinados intermediários capazes de inibir a síntese de gordura do leite. As maiores evidências giram em torno do *trans*-10, *cis*-12 CLA e *trans*-10 C_{18:1} como agentes inibidores, oriundos dos processos ruminais modificados, da síntese de novo na glândula mamária.

Algumas dúvidas ainda permanecem sobre os mecanismos responsáveis pela diminuição do teor de gordura do leite. Estudos verificaram que as proporções de ácidos graxos de cadeia curta, média e longa não foram

alteradas na gordura do leite que sofreu síndrome do baixo teor de gordura induzida por dieta. A maioria das elucidações sobre esse assunto aponta a inibição da síntese de novo na glândula mamária como sendo o principal centro na formação da gordura do leite. No entanto, sabe-se que a síntese de novo predominantemente forma ácidos graxos de cadeia curta. Assim, outras vias, de direcionamento de gordura para o leite parecem ser afetadas pelos isômeros produzidos pela biohidrogenação alterada.

Em relação a outros componentes do leite, a lactose se mostra invariável à suplementação lipídica, já a proteína pode sofrer redução em sua percentagem no leite, segundo observações de alguns autores.

O uso de alguns tipos de gorduras suplementares tem aumentado a produção de leite, mas, ao mesmo tempo, tem diminuído a percentagem de proteína do leite. Quando há substituição de carboidratos disponíveis no rúmen pelo lipídio, esse tem efeito tóxico sobre os microrganismos do rúmen, causando redução no crescimento microbiano e efeito sobre o transporte de aminoácidos para glândula mamária (Santos et al., 2001). As bactérias ruminais durante a fermentação geram compostos nitrogenados e carbonos que abastecem a maior parte dos aminoácidos usados pelas vacas na síntese de proteína do leite (Maiga and Schingoethe, 1997). Desta forma, a adição de fontes lipídicas em dietas de vacas em lactação pode promover decréscimo no teor de proteína do leite.

Perspectivas

Os ácidos graxos *trans* apresentam uma imagem negativa relacionada à saúde humana e leva essa conjuntura aos alimentos que os contém. A carne e leite de ruminantes muitas vezes estão inseridos em um contexto de depreciação da saúde humana, por apresentarem além de ácidos graxos saturados, os de isomeria *trans*. Verificar ausência de efeitos negativos à saúde, dos ácidos graxos *trans* de ruminantes, somado aos efeitos positivos

dos CLAs, pode gerar melhoria na percepção do consumidor em relação à carne e leite produzidos por ruminantes.

Sendo assim, suplemento lipídico é uma recomendação promissora para o rebanho do sistema leiteiro. No entanto, as limitações de uso devem ser respeitadas e o tipo de gordura ofertada, assim como, o objetivo da suplementação devem ser cuidadosamente analisados.

Em suma, pesquisas realizadas até o momento não apresentaram conclusões concretas de quais seriam as melhores fontes lipídicas para aumentar a concentração de CLA no leite, qual seria a magnitude de resposta e quais os efeitos adversos apresentados por esse tipo de suplementação. Sendo assim, a produção de leite que visa melhorar o teor de ácido linoléico conjugado, através do fornecimento de fontes lipídicas, a vacas leiteiras, torna-se uma estratégia interessante.

Conseqüentemente, medidas que visam aumentar o teor de CLA no leite, também atuam de forma positiva no perfil geral de ácidos graxos com possível aumento de gordura insaturada e diminuição da gordura saturada, tão condenada pelo campo da medicina. Outro aspecto relevante é a perspectiva de obter produtos lácteos diferenciados, e conseqüentemente, com maior valor agregado.

No entanto, para evidenciar os possíveis aspectos positivos da suplementação lipídica, além de averiguar o caráter qualitativo do leite, no qual se enquadra o teor de CLA, as conseqüências refletidas no âmbito de eficiência de produção devem ser cuidadosamente avaliadas.

Material e Métodos

O experimento foi realizado na Unidade de Pesquisa, Ensino e Extensão em Gado de Leite (UEPE-GL) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizada na Região da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, a 20° 45' 20" de latitude sul e 42° 52' 40" de longitude oeste, com altitude média de 651 metros.

Foram utilizadas 5 vacas primíparas da raça Holandesa, PO puro de origem e PC puro por cruz, pesando em média 500 kg, com média de período de lactação e produção de leite de 85 dias e 25 litros, respectivamente, distribuídas em um quadrado latino 5 x 5. O experimento foi constituído de 5 períodos com duração de 21 dias cada, sendo os quatorze primeiros dias para a adaptação e os demais para coleta de amostras dos ingredientes das rações sobras, fezes, urina, leite e sangue, além dos dados de consumo, produção de leite e peso vivo dos animais.

Os tratamentos consistiram de quatro dietas com diferentes fontes de suplementação lipídica e a dieta controle, conforme o seguinte esquema:

Tratamento 1 – concentrado controle (sem adição de gordura);

Tratamento 2 – concentrado com adição de grão de soja cru moído;

Tratamento 3 – concentrado com adição de caroço de algodão;

Tratamento 4 – concentrado com adição de óleo de soja;

Tratamento 5 – concentrado com adição de gordura “protegida”.

Foi utilizado como volumoso a silagem de milho, e as dietas foram ajustadas visando serem isoprotéicas e conterem 5,0% de extrato etéreo na dieta total, suplementadas com fontes lipídicas. Além dos suplementos lipídicos, os ingredientes usados na feitura da ração concentrada foram: fubá de milho, farelo de soja, farelo de trigo, uréia/sulfato de amônio e mistura mineral. Após análise dos ingredientes disponíveis, as dietas foram formuladas de acordo com as exigências nutricionais constantes do NRC-Gado de Leite

(2001). Na Tabela 1 é apresentada a composição bromatológica dos alimentos utilizados no experimento e nas Tabelas 2 e 3 são apresentadas as proporções dos ingredientes utilizados na formulação dos concentrados e a composição bromatológica estimada dos concentrados, respectivamente. Nas tabelas 4 e 5 são apresentadas as proporções dos ingredientes utilizados nas dietas e a composição bromatológica média das dietas, respectivamente.

Tabela 1 - Composição bromatológica dos ingredientes das dietas

Alimento	% MS						
	MS%	MO	PB	EE	CNF	FDN ^{cp}	MM
Silagem de milho	33,43	93,64	5,76	3,61	24,10	60,17	6,36
Milho grão	88,89	98,35	9,32	3,40	71,33	12,93	1,65
Soja grão crua	93,83	92,50	37,92	20,20	13,08	21,30	7,50
Farelo de soja	88,88	93,65	49,06	2,32	28,22	14,05	6,35
Sais de cálcio	97,04	83,50	0,00	85,00			16,50
Caroço de algodão	94,05	96,35	19,92	20,00	6,84	49,59	3,65
Óleo de soja	99,88	100,00		100,00			
Farelo de trigo	88,00	94,27	18,45	4,05	25,28	46,49	5,73

Matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidrato não fibroso (CNF); fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteínas (FDN^{cp}); matéria mineral (MM).

Tabela 2 – Proporção de alimentos utilizados das dietas experimentais (%MS)

Ingrediente	Concentrados				
	C	GS	CA	OS	SC
Milho grão	54,88	53,33	46,66	55,55	55,55
Soja grão crua	0,00	26,66	0,00	0,00	0,00
Farelo de soja	26,66	13,33	24,44	33,33	33,33
Sais de cálcio	0,00	0,00	0,00	0,00	5,55
Caroço de algodão	0,00	0,00	22,22	0,00	0,00
Óleo de soja	0,00	0,00	0,00	4,44	0,00
Uréia/Suf. de amônio (9:1)	2,88	2,22	2,22	2,22	2,22
Farelo de trigo	11,11	0,00	0,00	0,00	0,00
Bicarb. Na/Óx Mg (2:1)	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88
Vit ADE	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
Mist mineral ¹	3,33	3,33	3,33	3,33	2,22
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

C = Controle (sem adição de fonte lipídica); GS = Grão de soja; CA = Caroço de algodão; OS = Óleo de soja; SC = Sais de cálcio (Megalac-E®).

Os animais foram manejados em baias individuais onde receberam alimentação fornecida duas vezes ao dia, às 7:00 e às 17:00 horas. As rações foram fornecidas em mistura completa, misturando-se manualmente o concentrado ao volumoso. Diariamente foram feitas pesagens das quantidades das rações fornecidas e das sobras de cada tratamento para estimativa do consumo. O consumo diário foi monitorado de maneira a manter as sobras de alimentos em torno de 10% (MS). No momento da alimentação, durante o período experimental, foram feitas amostragens dos alimentos fornecidos e sobras que foram acondicionadas em sacos plásticos e congeladas para posteriores análises, e periodicamente foram feitas análises dos ingredientes utilizados para possíveis ajustes das dietas ao longo dos períodos experimentais.

Tabela 3 – Composição bromatológica dos concentrados utilizados

Ítems	Concentrados				
	C	GS	CA	OS	SC
MS	85,14	88,00	88,33	87,89	87,42
MO	93,44	92,94	93,54	93,64	93,64
PB	27,04	26,85	26,05	26,76	26,76
EE	2,93	7,51	6,60	7,10	7,38
CNF	51,38	47,00	43,36	50,75	50,46
FDNcp	16,76	15,18	21,13	12,63	12,63
MM	6,56	7,06	6,46	6,36	6,36

C = Controle (sem adição de fonte lipídica); GS = Grão de soja; CA = Caroço de algodão; OS = Óleo de soja; SC = Sais de cálcio (Megalac-E®). Matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidrato não fibroso (CNF); fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteínas (FDNcp); matéria mineral (MM).

Foi realizado o preparo das amostras compostas dos alimentos fornecidos, das sobras diárias e fezes, de cada animal. As análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), compostos nitrogenados (N), extrato etéreo (EE) seguiram especificações descritas por Silva e Queiroz (2002). Análises de fibra em detergente neutro (FDN) bem como as correções no tocante aos teores de cinzas e proteínas contidos na FDN foram realizadas conforme recomendações de Mertens (2002).

Os valores de energia das dietas expressos em NDT foram calculados segundo Weiss (1999), a partir dos resultados de digestibilidade aparente obtidos no experimento, conforme a seguinte expressão:

$NDT (\%) = PBd + FDNd + CNFd + (EEd * 2,25)$; em que “d” representa a digestibilidade aparente dos componentes.

Tabela 4 – Composição da dieta

Ingredientes	Diets				
	C	GS	CA	OS	SC
Silagem de milho	55,0	55,0	55,0	55,0	55,0
Milho grão	24,7	24,0	21,0	25,0	25,0
Soja grão crua	0,0	12,0	0,0	0,0	0,0
Farelo de soja	12,0	6,0	11,0	15,0	15,0
Sais de cálcio	0,0	0,0	0,0	0,0	2,5
Caroço de algodão	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0
Óleo de soja	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0
Uréia/Suf. de amônio (9:1)	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0
Farelo de trigo	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Bicarb. Na/Óx MG (2:1)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Vit ADE	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Mist mineral ¹	1,5	1,5	1,5	1,5	1,0
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

C = Controle (sem adição de fonte lipídica); GS = Grão de soja; CA = Caroço de algodão; OS = Óleo de soja; SC = Sais de cálcio (Megalac-E®).

¹ Composição em 100kg: 42,5 kg de fosfato bicálcico, 25 kg de calcário, 21 kg de sal comum, 7,5 kg de cloreto de potássio, 2,5 kg de sulfato de amônio, 1,25 kg de sulfato de zinco, 250 g de sulfato de cobre, 15 g de sulfato de cobalto e 5 g de selenito de sódio.

Considerando as dietas conterem uréia, os carboidratos não-fibrosos (CNF) foram calculados segundo Hall (2000), de acordo com a seguinte expressão:

$$\text{CNF} = 100 - [(\%PB - \%PB_{\text{uréia}} + \%uréia) + \%EE + \%Cinzas + \%FDN_{\text{cp}}]$$

Tabela 5 – Composição bromatológica das dietas experimentais

Iténs	Dietas				
	C	GS	CA	OS	SC
MS	58,69	59,30	59,22	58,93	58,83
MO	93,57	93,57	93,64	93,44	93,28
PB	15,92	16,00	15,80	15,66	15,66
EE	3,30	5,36	5,00	5,10	5,30
CNF	38,24	36,05	34,78	37,62	37,26
FDNcp	38,00	37,60	39,50	36,50	36,50
MM	6,43	6,43	6,36	6,56	6,72

C = Controle (sem adição de fonte lipídica); GS = Grão de soja; CA = Carço de algodão; OS = Óleo de soja; SC = Sais de cálcio (Megalac-E®). Matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidrato não fibroso (CNF); fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteínas (FDNcp); matéria mineral (MM).

Para a determinação da digestibilidade aparente dos alimentos, a quantidade total de matéria seca fecal excretada foi estimada utilizando a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), como indicador (Casali et al., 2009). Um grama de amostras de alimentos, sobras e fezes foram acondicionados em sacos confeccionados em tecido não tecido (TNT) (100g/m²) com dimensões de 4 x 5 cm. Posteriormente os sacos foram incubados por 144 horas no rúmen de animais fistulados. Após período de incubação os sacos foram retirados lavados com água corrente e submetidos à extração em detergente neutro (Mertens, 2002).

As fezes foram coletadas diariamente no reto, na quantidade média de 200g, do segundo ao sexto dia de cada período de coleta, sempre antes das ordenhas da manhã e tarde, sendo as mesmas acondicionadas em sacos plásticos devidamente etiquetados, armazenadas em freezer a - 15°C, e ao final do período de coleta foi feita uma amostra composta de cada animal com base no peso seco ao ar.

As vacas foram ordenhadas mecanicamente, duas vezes ao dia, fazendo-se o registro da produção de leite. Foi coletada amostra de leite, no terceiro dia de coleta de cada período experimental, na ordenha da manhã e da tarde, fazendo-se amostra composta, proporcional à produção em cada ordenha, de aproximadamente 300 ml para fins de análise de composição do leite, compostos nitrogenados totais e alantoína. Parte desta amostra foi utilizada para determinação da composição do leite, outra parte foi desproteínada com ácido tricloroacético (10 ml de leite foram misturados com 5ml de ácido tricloroacético a 25%), filtrada em papel-filtro e armazenada a - 20°C, sendo as análises de alantoína e uréia realizadas no filtrado conforme Chen e Gomes (1992).

A produção de leite corrigida (PLC) para teor de gordura de 3,5% foi estimada segundo Sklan et al. (1992), pela seguinte equação:

$$PCL = (0,432 + 0,1625 \times \% \text{ gordura do leite}) \times \text{produção de leite em kg/dia.}$$

No quarto dia do período de coletas, uma alíquota de 2% da produção de leite foi retirada e congelada para posterior análise e obtenção de perfil de ácidos graxos, segundo metodologia descrita por Feng et al. (2004). Alíquotas de 30 ml foram centrifugadas a 17.800 x G por 20 minutos a 4°C (HIMAC-CR21) formando um creme de leite sobrenadante (“fat cake”), o qual foi retirado ainda congelado com auxílio de palhetas plásticas. Aproximadamente 1 g de fat cake foi transferido para tubos “ependorfs” de 1,5 mL e centrifugados a 17.500 X G por 20 minutos em temperatura ambiente (centrífuga Force 14 – Denver Instrument Company). Após a centrifugação, a fração lipídica permaneceu na parte superior do tubo onde foi retirada com uso de micropipetas e acondicionadas em ependorfs de 1 mL, que foram congelados a - 10°C até a etapa de preparação dos ésteres metílicos.

A preparação dos ésteres metílicos foi realizada por meio da modificação do método proposto por Hartman & Lago (1986). Alíquotas de 40µl da gordura foram transferidas para tubos de ensaio com tampa rosqueada. Os lipídeos foram hidrolisados com adição de 2,5 mL de solução de NaOH a 0,5 N em metanol sob aquecimento de 70°C por 15 minutos para obtenção dos

ésteres metílicos. Após o resfriamento foi acrescentado 2 mL de solução de NaOH 20% e 2 mL de hexano (grau HPLC). O tubo foi agitado em vortex e aproximadamente 1 mL da fase superior contendo os ésteres metílicos foi coletado. Mais 1 mL de Hexano (grau HPLC) foi adicionado ao tubo de onde extraiu-se novamente aproximadamente de 1mL da fase superior. Os ésteres metílicos foram estocados em frascos de vidro cor âmbar e congelados a -18 °C para posteriores análises.

Na amostra do óleo de soja, os ésteres metílicos foram preparados conforme procedimento descrito acima somente a partir da saponificação. Considerando que o SCAGCL é saponificado com cálcio, apenas o processo de esterificação foi realizado para sabão de cálcio.

As análises dos ésteres metílicos de ácidos graxos da gordura do leite foram realizadas em cromatógrafo a gás (GCMS QP 5000 – Gás Chromatography Mass Spectrometer - Shimadzu® no departamento de Química da UFV. Os componentes dos ésteres metílicos foram separados em uma coluna Carbowax (30 m x 0,25 mm).

A cromatografia seguiu as seguintes condições: temperatura do injetor de 220 °C; temperatura da interface de 240 °C; fluxo de gás na coluna de 1,3 mL/minuto; pressão na coluna de 67,7 kpa; velocidade linear na coluna de 40,6 cm/segundo; Vazão de abertura de 3; volume injetado de 1 µL; Hélio como gás de arraste (gás inerte).

Programação da coluna:

Rampa	Temperatura	Tempo de parada
-----	40 °C	10 minutos
3 °C	240 °C	6 minutos

Condições de massa:

Iniciar

Finalizar

40 (m/z)

300 (m/z)

Tempo total de corrida: 82,67 minutos.

A identificação dos picos dos ácidos graxos foi realizada por comparação com os tempos de retenção de uma mistura de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco™ 37FAME Mix). A identificação do pico do CLA foi realizada por diferença comparando-se os tempos de retenção dos metil-ésteres da mistura dos ácidos graxos conjugados *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 de um padrão comercial puro (05632 – SIGMA).

Amostra “spot” de urina foi coletada no primeiro dia do período de coleta, quatro horas após a alimentação matinal. Depois de devidamente homogeneizadas e filtradas, foram obtidas alíquotas de 10 ml das amostras que foram diluídas em 40 ml de ácido sulfúrico 0,036 N. Estas amostras tiveram seu pH ajustado para abaixo de três e posteriormente foram acondicionadas em recipientes plásticos, devidamente identificados e congeladas a -20°C para posteriores análises de creatinina, uréia, alantoína e ácido úrico. Foram coletados também, 40 mL de urina pura sem conservante e mantidos em congelamento a -20°C para posterior determinação do teor de nitrogênio.

As análises de alantoína da urina e leite foram feitas pelo método colorimétrico, segundo Fujihara et al. (1987). As determinações de creatinina, ácido úrico e uréia da urina, assim como uréia do leite desproteinado, foram realizadas utilizando kits comerciais (labtest®).

O volume urinário total diário foi estimado a partir da proposição de excreção de 29,00 mg/kg de peso vivo (PV) de creatinina (Valadares et al. 1999).

Para obtenção da excreção total de derivados de purinas (DP) foi usado o somatório das quantidades de alantoína e ácido úrico excretados na urina e da quantidade de alantoína excretada no leite, expressas em mmol/dia.

As purinas absorvidas (X, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de DP (Y, mmol/dia), por meio da equação $Y = 0,85X + 0,385 PV^{0,75}$, em que 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purinas e 0,385 $PV^{0,75}$ a contribuição endógena para excreção de purinas (Verbic et al. 1990).

A síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen (Y, gN/dia) foi calculada em função das purinas absorvidas (X, mmol/dia) por meio da equação $Y = (70X) / (0,83 \times 0,116 \times 1000)$, em que 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mgN/mmol); 0,83, a digestibilidade das purinas microbianas e 0,116, a relação N-purina:Ntotal nas bactérias (Chen e Gomes, 1992).

Amostras de sangue foram coletadas, utilizando agulhas e tubos especiais com vácuo (“vacumtainer”), contendo gel acelerador de coagulação quatro horas após a alimentação matinal do 19º dia do período experimental. Logo após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas (5000 rpm por 10 minutos), sendo então coletadas amostras de soro sanguíneo, que foram acondicionadas em recipientes de vidro, os quais foram devidamente identificados e congelados. Nas amostras de soro sanguíneo foram determinados os teores de uréia, lipoproteína de alta densidade (HDL), triacilglicerídeo (TGA), colesterol total (CT) e glicose por meio de Kits comerciais (IN VITRO DIAGNÓSTICO®). Os teores de lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) foram estimados a partir dos valores de TAG e HDL por meio das equações:

$$VLDL = TAG/5$$

$$LDL = CT - (VLDL + HDL)$$

O balanço de compostos nitrogenados (N) foi obtido pela diferença entre o total de N ingerido e o total de N excretado nas fezes, no leite e na urina. A determinação do N total, no leite e na urina, foi realizada conforme Silva e Queiroz (2002).

O cálculo para quantificação de nitrogênio retido (Nret) foi realizado descontando-se do balanço de compostos nitrogenados (BCN) o valor estimado (AFRC, 1993) da exigência para nitrogênio endógeno basal (NEB), que considera o N endógeno tecidual e as perdas dérmicas de N como 0,35 e 0,018 do peso metabólico, respectivamente.

$$NEB \text{ (g/dia)} = (0,35 + 0,018) \times PV^{0,75}$$

Deste modo, o valor do Nret foi expresso como:

$N_{ret} \text{ (g/dia)} = N_{consumido} - \text{fezes} - \text{Nurina} - \text{Nleite} - \text{NEB}$

No 17º dia de cada período experimental, amostras de líquido ruminal (200ml) foram coletadas quatro horas após a alimentação matinal, por meio de sonda esofágica, segundo metodologia de Ortoloni (1981). As leituras de pH foram feitas imediatamente após as coletas, utilizando-se pHgâmetro digital. Para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), amostras de aproximadamente 50 ml de líquido ruminal foram filtradas em gaze e adicionadas em recipientes contendo 1 ml de ácido sulfúrico 1:1, que foram armazenadas a -10°C para análises posteriores do teor de N-NH₃. Após o descongelamento, foram retiradas alíquotas de 10 ml, as quais foram adicionadas 1 ml de ácido tricloroacético 10% e centrifugadas por 15 minutos a 5000 rpm. Então, das amostras centrifugadas foram obtidas alíquotas de 2 ml do sobrenadante que foram destiladas com solução de KOH 2N (132g de KOH/L de H₂O destilada) e tituladas com ácido apropriado.

Uma alíquota de 50 mL do líquido ruminal filtrado em gaze, sem adição de ácido sulfúrico, também foi armazenada a - 10°C, para determinação da concentração dos ácidos graxos voláteis (AGVs) acético, propiônico, butírico. Após o descongelamento das amostras, foram retiradas alíquotas de 2 ml, nas quais foram adicionadas 1 ml de ácido metafosfórico a 20% e 0,2 ml de ácido fênico a 1% (como padrão interno). Em seguida foram centrifugadas a 17000 rpm, por 15 minutos, sendo o sobrenadante utilizado para as leituras das concentrações. As leituras dos AGVs foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho (HPLC), marca SHIMADZU SPD-10 A VP, detector Ultra Violeta (UV) e comprimento de ondas de 210 nm. A coluna usada foi C18 (fase reserva). Foi utilizado como fase móvel o ácido fórmico 0,1% em água, fluxo de 1,5 ml/minuto, pressão na coluna de 168 Kgf e volume injetado 20 µl.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e teste de médias, utilizando-se o procedimento GLM do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 1999), aplicando-se o teste Tukey para comparação entre médias e adotando o nível de 5% para o erro tipo I.

Resultados

Consumo e digestibilidade dos alimentos e suas frações

Como observado na Tabela 6, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os suplementos lipídicos, nem mesmo em relação ao controle, para consumo em kg/dia de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos não fibrosos (CNF), matéria orgânica digestível, fibra em detergente neutro digestível (FDND), nutrientes digestíveis totais (NDT). Em relação ao consumo de extrato etéreo, esse foi maior ($P < 0,05$) para dietas suplementadas com lipídeos em relação ao tratamento controle, não havendo diferença entre os tratamentos com dietas suplementadas. Já o consumo de fibra em detergente neutro indigestível, foi maior ($P < 0,05$) em animais que receberam dieta suplementada com caroço de algodão.

Os consumos em gramas, relativo à kg de peso corporal (g/kg PC), de MS, FDN e NDT, apresentados na Tabela 6, não diferiram entre si. O consumo de FDN em g/kg PC seguiu a mesma tendência para consumo de FDN em kg/dia, sendo que foi maior ($P < 0,05$) para o suplemento de caroço de algodão.

Não houve diferença para consumo de MS e NDT proporcionalmente ao peso metabólico (Tabela 6).

Tabela 6 - Médias de quadrados mínimos para consumos diários de matéria seca e frações da dieta

Itém	Tratamento					EPM	Valor-P
	C	GSC	CA	OS	SC		
kg/dia							
MS	17,09	17,10	16,59	16,73	17,1	0,78	0,932
MO	16,09	16,23	15,63	15,76	15,94	0,74	0,899
PB	3,18	2,92	3,01	3,22	3,08	0,18	0,339
EE	0,43a	0,73b	0,72b	0,71b	0,71b	0,04	0,000
FDNcp	6,04	5,78	6,07	5,71	5,16	0,26	0,066
CNF	6,44	6,81	5,83	6,12	6,92	0,38	0,102
MOD	11,11	11,78	10,86	11,01	11,11	0,53	0,316
FDND	3,41	3,31	3,25	3,08	2,76	0,20	0,152
NDT	11,31	12,25	11,31	11,89	12,13	0,49	0,172
FDNI	1,49 ab	1,40 b	1,68 a	1,42 ab	1,38 b	0,08	0,029
g/kg PC							
MS	34,72	34,29	33,26	33,44	33,42	1,95	0,825
FDN	12,28	11,60	12,19	11,38	10,30	0,64	0,070
NDT	22,98	24,56	22,68	23,72	24,25	1,24	0,278
FDNI	3,04 ab	2,81 ab	3,36 a	2,83 ab	2,76 b	0,18	0,029
g/kg PC ^{0.75}							
MS	163,50	162,02	157,14	158,10	158,86	8,73	0,859
NDT	108,23	116,04	107,16	112,21	114,67	5,55	0,248

C = Controle (sem adição de fonte lipídica); GSC = Grão de soja cru e moído; CA = Caroço de algodão; OS = Óleo de soja; SC = Sabão de cálcio (Megalac-E®);

Matéria seca (MS); matéria orgânica (MO); proteína bruta (PB); extrato etéreo (EE); fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteínas (FDNcp); carboidrato não fibroso (CNF); matéria orgânica digestível (MOD); fibra em detergente neutro digestível (FDND); nutrientes digestíveis totais (NDT); fibra em detergente neutro indigestível (FDNI);

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância;

EPM = erro padrão médio.

Na Tabela 7 são apresentados os coeficientes de digestibilidade para MS, MO, EE, FDNcp e CNF, os quais foram estatisticamente iguais ($P>0,05$), comparando-se todos os tratamentos. No entanto, houve efeito ($P<0,05$) de tratamento sobre o coeficiente de digestibilidade aparente da PB. Esse efeito é referente à maior digestibilidade aparente da PB da dieta suplementada com óleo de soja em relação à dieta controle.

Tabela 7 - Médias de quadrados mínimos para coeficientes de digestibilidade aparente

Itém	Tratamento					EPM	Valor-P
	C	GSC	CA	OS	SC		
MS	67,47	71,09	67,91	68,96	69,03	1,04	0,1740
MO	69,04	72,45	69,15	70,15	69,60	1,08	0,2068
PB	73,15 b	76,48 ab	75,69 ab	77,13 a	73,65 ab	0,92	0,0150
EE	72,55	76,75	75,67	78,09	83,71	2,61	0,0806
FDNcp	56,24	57,03	52,62	54,36	53,20	2,38	0,6390
CNF	78,72	83,32	81,64	79,87	78,10	1,67	0,1927

C = Controle (sem adição de fonte lipídica); GSC = Grão de soja cru e moído; CA = Caroço de algodão; OS = Óleo de soja; SC = Sabão de cálcio (Megalac-E®);
 Matéria seca (MS); matéria orgânica (MO); proteína bruta (PB); extrato etéreo (EE); fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteínas (FDNcp); carboidrato não fibroso (CNF);
 Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância;
 EPM = erro padrão médio.

Produção e composição do leite

Os teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais (ST), extrato seco desengordurado (ESD) no leite, não apresentaram diferença ($P>0,05$) entre as dietas suplementadas e a dieta controle (Tabela 8).

Tabela 8 - Médias de quadrados mínimos para produção diária, composição do leite, eficiência de conversão de MS e NDT em litros de leite e eficiência de conversão de nitrogênio da dieta em nitrogênio de leite

Itém	Tratamento					EPM	Valor-P
	C	GSC	CA	OS	SC		
Composição (%)							
Gordura	3,78	3,19	3,77	3,74	3,31	0,22	0,187
Proteína	3,19	3,30	3,20	3,26	3,01	0,13	0,087
Lactose	4,44	4,75	4,49	4,45	4,53	0,09	0,127
ST	12,52	12,36	12,56	12,57	11,95	0,36	0,520
ESD	8,74	9,18	8,80	8,84	8,64	0,21	0,098
Produção (kg/dia)							
Leite	18,48 b	19,89 ab	19,08 ab	18,70 b	21,90 a	2,46	0,024
Leite 3,5%G	19,29	18,23	19,84	19,54	21,21	2,42	0,423
Gordura	0,70	0,59	0,71	0,71	0,72	0,09	0,489
Proteína	0,58	0,64	0,60	0,61	0,65	0,06	0,264
Lactose	0,82 b	0,93 ab	0,86 ab	0,83 b	0,99 a	0,11	0,008
ST	2,30	2,39	2,38	2,35	3,60	0,27	0,272
ESD	1,60 b	1,79 ab	1,67 ab	1,65 ab	1,88 a	0,19	0,038
Eficiência							
Leite (L)/kg MS	1,07	1,15	1,13	1,11	1,28	0,11	0,064
Leite (L)/kg NDT	1,69	1,71	1,70	1,65	1,87	0,18	0,226
g NL/g NI	0,18	0,21	0,19	0,18	0,20	0,01	0,082

C = Controle (sem adição de fonte lipídica); GSC = Grão de soja cru e moído; CA = Caroço de algodão; OS = Óleo de soja; SC = Sabão de cálcio (Megalac-E®);

ST (sólidos totais); ESD (extrato seco desengordurado); Leite 3,5%G (leite corrigido pra 3,5% de gordura); Leite(L)/kg MS (produção de leite por kg de matéria seca ingerida); Leite (L)/kg NDT (produção de leite por kg de NDT ingerido); g NL/NI (gramas de nitrogênio do leite produzido por grama de nitrogênio ingerido);

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância;

EPM = erro padrão médio.

As produções diárias de leite em kg/dia para animais recebendo SC, GSC e CA não diferiram entre si ($P>0,05$) e foram superiores ($P<0,05$) às dos animais alimentados com OS e C, que também não diferiram entre si (Tabela 8). Mesma tendência foi observada para produção diária de lactose. Valor de produção diária de extrato seco desengordurado foi maior ($P<0,05$) para o tratamento com sabão de cálcio, mas somente em relação ao tratamento controle.

As produções diárias em kg, de leite corrigido para 3,5% de gordura (Leite 3,5%G) e de gordura, proteína e sólidos totais do leite não apresentaram diferença ($P>0,05$) em função dos cinco tratamentos oferecidos. Outros parâmetros que também não sofreram efeitos ($P>0,05$) de tratamentos foram as eficiências de produção de leite por kg de MS ingerida (Leite/kg MS) e produção de leite por NDT consumida (Leite/kg NDT) (Tabela 8).

Perfis de ácidos graxos e CLA na gordura do leite

Dos perfis de ácidos graxos da gordura do leite, classificados de acordo com o tamanho da cadeia e número de duplas ligações, AGPI foi o único a apresentar diferença entre os tratamentos. Maior teor ($P<0,05$) de AGPI, foi atribuído aos efeitos do sabão de cálcio e do grão de soja cru e moído, sendo o tratamento com caroço de algodão responsável pelo menor ($P<0,05$) teor de AGPI na gordura do leite (Tabela 9). Todos os demais perfis de ácidos graxos, apresentados na Tabela 9, não sofreram efeito ($P>0,05$) de suplementação lipídica.

Não foi observado efeito ($P>0,05$) de dieta sobre a maioria dos ácidos graxos, como demonstrado na Tabela 10. No entanto, a gordura do leite produzido por animais consumindo caroço de algodão apresentou maior ($P<0,05$) teor de ácido esteárico ($C_{18:0}$) em relação ao tratamento controle. Já para ácido linoléico ($C_{18:2}$), maior ($P<0,05$) teor na gordura do leite, foi detectado sobre influência do tratamento com grão de soja cru e moída, enquanto, menor valor ($P<0,05$) foi proporcionado pela dieta com caroço de algodão.

Tabela 9 - Médias de quadrados mínimos para perfil de ácidos graxos do leite, separados pelo tamanho da cadeia e número de duplas ligações

Itém	Tratamento					EPM	Valor-P
	C	GSC	CA	OS	SC		
AGCC	6,35	5,41	5,87	5,93	5,63	0,43	0,561
AGCM	54,55	49,04	51,37	50,55	49,05	2,51	0,439
AGCL	35,60	42,02	39,92	39,80	41,84	2,58	0,405
AGCI	3,17	3,10	2,91	2,93	2,61	0,15	0,191
AGS	71,54	67,76	71,80	69,26	65,96	2,20	0,299
AGI	27,94	31,53	27,74	29,90	33,33	2,15	0,298
AGMI	25,31	28,13	25,62	26,83	29,92	2,08	0,515
AGPI	2,61 bc	3,46 a	2,11 c	3,09 ab	3,39 a	0,22	0,000

C = Controle (sem adição de fonte lipídica); GSC = Grão de soja cru e moído; CA = Carço de algodão; OS = Óleo de soja; SC = Sabão de cálcio (Megalac-E®);

AGCC (ácido graxo de cadeia curta); AGCM (ácido graxo de cadeia média); AGCL (ácido graxo de cadeia longa); AGCI (ácido graxo de cadeia ímpar); AGS (ácido graxo saturado); AGI (ácido graxo insaturado); AGMI (ácido graxo monoinsaturado); AGPI (ácido graxo poliinsaturado);

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância;

EPM = erro padrão médio.

O teor de ácido linoléico conjugado (CLA), na gordura do leite, foi positivamente afetado pela dieta na qual o sabão de cálcio foi o suplemento lipídico. Dessa maneira, esse suplemento ocasionou maior valor ($P < 0,05$) para teor de CLA (Tabela 10). Os tratamentos com grão de soja cru e moído e com caroço de algodão apresentaram os menores valores ($P < 0,05$) para teor de CLA na gordura do leite. Essa mesma tendência foi observada para a quantidade em gramas de CLA por litro de leite (Tabela 10).

A quantidade de CLA produzido por dia (g/dia) foi maior ($P < 0,05$) quando os animais foram tratados com dieta contendo suplemento de sabão de cálcio, em comparação aos outros tratamentos (Tabela 10).

Tabela 10 - Médias de quadrados mínimos para teores de ácidos graxos do leite (g/100g de gordura)

Itém	Tratamento					EPM	Valor-P
	C	GSC	CA	OS	SC		
C _{6:0}	2,68	2,43	2,70	2,67	2,77	0,13	0,369
C _{8:0}	1,50	1,07	1,21	1,20	0,93	0,21	0,430
C _{10:0}	3,66	2,94	2,79	3,32	2,78	0,25	0,122
C _{12:0}	4,41	3,55	3,26	3,97	0,35	0,27	0,076
C _{13:0}	0,11	0,09	0,08	0,09	0,08	0,00	0,080
C _{14:0}	12,77	11,19	10,94	12,14	11,50	0,51	0,065
C _{15:0}	1,25	1,27	1,06	1,16	0,92	0,09	0,100
C _{16:0}	31,04	28,85	32,11	28,72	29,06	1,71	0,418
C _{16:1}	1,31	1,15	1,13	1,15	1,16	0,12	0,603
C _{17:0}	0,82	0,77	0,81	0,74	0,85	0,05	0,579
C _{17:1}	0,17	0,11	0,19	0,14	0,16	0,03	0,310
C _{18:0}	10,16 b	12,64 ab	13,93 a	12,31 ab	10,84 ab	0,85	0,030
C _{18:1}	22,29	25,58	23,21	24,10	27,22	2,02	0,479
C _{18:2}	2,15 bc	2,92 a	1,78 c	2,51 abc	2,91 ab	0,21	0,003
CLA*	0,33 ab	0,25 b	0,20 b	0,33 ab	0,61 a	0,06	0,008
Outros	5,67	5,43	4,80	5,78	5,28	0,23	0,061
CLA (g/dia)	2,30 b	1,51 b	1,41 b	2,34 b	4,47 a	0,39	0,003
CLA (g/L)	0,13 ab	0,08 b	0,08 b	0,12 ab	0,19 a	0,02	0,015

C = Controle (sem adição de fonte lipídica); GS = GSC = Grão de soja cru e moído; CA = Caroco de algodão; OS = Óleo de soja; SC = Sabão de cálcio (Megalac-E®);

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância;

EPM = erro padrão médio;

*Isômeros *cis*-9, *trans*-11 CLA e *trans*-10, *cis*-12 CLA.

Metabolismo de compostos nitrogenados

Como observado na Tabela 11, dentre os valores de consumo e excreções médias diárias de nitrogênio e balanço de nitrogênio, o único parâmetro que apresentou diferença significativa em relação aos tratamentos foi a excreção média diária de nitrogênio através da urina (NU). Para esse parâmetro, o maior valor ($P < 0,05$) foi obtido no tratamento com suplementação

de óleo de soja. No outro extremo, está o resultado gerado pelo tratamento controle, o qual apresentou o menor ($P < 0,05$) valor para nitrogênio na urina.

Tabela 11 - Médias de quadrados mínimos para consumo, excreções médias diárias e balanço dos compostos nitrogenados em g/dia

Itém	Tratamento					EPM	Valor-P
	C	GSC	CA	OS	SC		
NI	508,32	467,34	481,88	515,01	503,96	28,23	0,339
NF	136,31	109,24	115,25	118,62	133,64	8,84	0,069
NU	150,96 d	155,64 cd	179,39 ab	190,76 a	163,79 bc	6,69	0,000
NL	90,75	100,15	94,42	94,93	102,38	9,54	0,269
BN	130,3	102,32	92,82	110,70	104,15	13,19	0,304
NEB	38,50	38,83	38,93	39,23	39,02	-	-
NR	91,81	63,49	53,49	71,47	65,13	-	-

C = Controle (sem adição de fonte lipídica); GS = GSC = Grão de soja cru e moído; CA = Carvão de algodão; OS = Óleo de soja; SC = Sabão de cálcio (Megalac-E®); NI (nitrogênio ingerido); NF (nitrogênio nas fezes); NU (nitrogênio na urina); NL (nitrogênio no leite); BN (balanço de nitrogênio); NEB (nitrogênio endógeno basal); NR (nitrogênio retido); Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância; EPM = erro padrão médio.

Não foram detectados efeitos ($P > 0,05$) de suplementação lipídica sobre as concentrações de N-uréia sérica (NUS) e N-uréia no leite, assim como, sobre a relação NUL/NUS (Tabela 12). Já os valores de excreções diárias de alantoína na urina (ALAU), apresentaram diferenças ($P < 0,05$), sendo o maior e menor valores identificados para os tratamentos com óleo de soja e sabão de cálcio, respectivamente. Tendência contrária à de ALAU foi encontrada para excreções de alantoína no leite (ALAL), a qual foi maior ($P < 0,05$) para sabão de cálcio e menor ($P < 0,05$) para óleo de soja. Os suplementos lipídicos de grão de soja cru e moído e óleo de soja foram responsáveis pelos maiores ($P < 0,05$) valores de excreções de ácido úrico na urina (AU), enquanto a menor ($P < 0,05$) excreção foi identificada no dado gerado pelo sabão de cálcio (Tabela 12).

Na Tabela 12 também são apresentados os valores de nitrogênio microbiano (Nmic) e produção de proteína microbiana (Pbmic), os quais foram

superiores ($P < 0,05$) para os tratamentos com grão de soja crua e moída, caroço de algodão e óleo de soja, enquanto o menor valor ($P < 0,05$) foi gerado pela suplementação com sabão de cálcio. Os parâmetros, purinas totais (PT) e purinas absorvidas (PA) seguiram a mesma tendência de comparação dos Nmic e Pbmic. Os tratamentos com grão de soja cru e moído e com sabão de cálcio, foram responsáveis pelo maior e menor ($P < 0,05$) valor, respectivamente, sobre a proporção de Nmic em relação ao nitrogênio ingerido (NI).

Tabela 12 - Médias de quadrados mínimos para excreções diárias de alantoína na urina (ALAU) e no leite (ALAL), ácido úrico na urina (AU), purinas totais (PT), purinas absorvidas (PA), compostos nitrogenados microbianos (Nmic), produção de proteína bruta microbiana (Pbmic), relação Nmic/N ingerido (Nmic/NI), concentração de N-uréia sérica (NUS), concentração de N-uréia no leite (NUL) e relação NUL/NUS

Itém	Tratamento					EPM	Valor-P
	C	GSC	CA	OS	SC		
ALAU ¹	252,93 ab	284,40 ab	283,15ab	291,73 a	237,12 b	14,50	0,020
ALAL ¹	1,91 ab	1,95 ab	1,93 ab	1,48 b	2,20 a	0,28	0,047
AU ¹	39,93 ab	48,00 a	41,49 ab	49,07 a	34,05 b	4,50	0,006
PT ¹	294,77 ab	334,34 a	326,57 ab	342,28 a	273,37 b	17,4	0,005
PA ¹	299,41 ab	345,56 a	336,28 a	354,40 a	273,59 b	20,90	0,005
Nmic ²	217,69 ab	251,24 a	244,49 a	257,66 a	198,91 b	15,20	0,005
Pbmic ³	12,44 ab	13,75 a	13,99 a	14,09 a	10,69 b	0,67	0,007
Nmic/NI	0,43 bc	0,55 a	0,52 ab	0,49 abc	0,40 c	0,02	0,002
NUS ⁴	22,96	22,87	20,91	21,47	22,78	0,58	0,062
NUL ⁴	11,59	11,20	12,20	12,57	12,85	0,69	0,434
NUL/NUS	0,51	0,49	0,59	0,59	0,57	0,04	0,217

C = Controle (sem adição de fonte lipídica); GS = GSC = Grão de soja cru e moído; CA = Caroço de algodão; OS = Óleo de soja; SC = Sabão de cálcio (Megalac-E®);

¹valores dados em (mmol/dia); ²valor dado em (g/dia); ³valor dado em (g/100gNDT); ⁴valores dados em (mg/dL);

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância;

EPM = erro padrão médio.

Parâmetros sanguíneos e ruminais

Dos parâmetros sanguíneos visualizados na Tabela 13, nenhum sofreu efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos.

Tabela 13 - Médias de quadrados mínimos para concentrações de glicose (GLI), colesterol total (CT), triacilglicerídeos (TAG), e os valores de colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL)

Itém	Tratamento					EPM	Valor-P
	C	GSC	CA	OS	SC		
GLI (mg/dL)	76,60	71,40	73,80	76,40	72,60	2,59	0,550
CT (mg/dL)	208,31	175,44	167,44	191,23	166,19	16,42	0,362
TAG (mg/dL)	22,61	20,44	19,55	21,21	18,80	1,35	0,369
LDL (mg/dL)	81,08	56,92	55,28	70,96	55,64	9,68	0,269
HDL (mg/dL)	121,79	115,11	108,19	115,54	107,57	9,57	0,822
VLDL (mg/dL)	4,52	4,09	3,91	4,24	3,76	0,27	0,369

C = Controle (sem adição de fonte lipídica); GS = GSC = Grão de soja cru e moído; CA = Caroço de algodão; OS = Óleo de soja; SC = Sabão de cálcio (Megalac-E®); EPM = erro padrão médio.

As quantidades de ácidos graxos voláteis do líquido ruminal, tanto em mmol/dl, quanto em mmol/100mmol não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelos suplementos lipídicos, assim como a relação entre ácido acético e ácido propiônico (AA/AP). Já para as concentrações de amônia no líquido ruminal, foi detectado efeito ($P < 0,05$) de tratamento, no qual, o tratamento controle foi o extremo superior e o tratamento com grão de soja cru e moído o extremo inferior. Os valores de pH do líquido ruminal não diferenciou ($P > 0,05$) para todos os tratamentos.

Tabela 14 - Médias de quadrados mínimos para ácidos graxos voláteis, amônia e pH do líquido ruminal

Itém	Tratamento					EPM	Valor-P
	C	GSC	CA	OS	SC		
Ácidos Graxos Voláteis (mmol/dL)							
AA	3,00	3,12	3,35	2,48	2,83	0,38	0,5647
AP	0,75	0,77	0,76	0,61	0,83	0,06	0,1350
AB	0,05	0,05	0,06	0,05	0,06	0,00	0,4534
Ácidos Graxos Voláteis (mmol/100mmol)							
AA	77,31	78,13	80,05	76,65	74,48	2,13	0,4764
AP	21,31	20,42	18,54	21,77	23,80	2,12	0,5270
AB	1,38	1,45	1,41	1,59	1,72	0,17	0,5556
Parâmetros Ruminais							
AA/AP	4,40	3,93	4,59	3,84	3,49	0,62	0,7283
Amônia ¹	17,45 a	10,77 b	11,22 ab	13,32 ab	16,00 ab	1,53	0,0266
pH	6,43	6,45	6,49	6,45	6,36	0,07	0,7707

C = Controle (sem adição de fonte lipídica); GS = GSC = Grão de soja cru e moído; CA = Carvão de algodão; OS = Óleo de soja; SC = Sabão de cálcio (Megalac-E®);

Ácido acético (AA); Ácido propiônico (AP); Ácido butírico (AB); proporção entre ácido acético e ácido propiônico (AA/AP);

¹Valores expressos em mg/dL;

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância;

EPM = erro padrão médio.

Discussão

Consumo e digestibilidade dos alimentos e suas frações

As propriedades físico-químicas dos ácidos graxos e dos compostos que os contêm, são fortemente determinadas pelo comprimento e grau de insaturação da cadeia de hidrocarboneto. Dessa forma, o grau de insaturação dos suplementos lipídicos utilizados na alimentação de vacas em lactação, a disponibilidade dessas gorduras aos processos ruminais, assim como, a quantidade de suplemento lipídico incluída na dieta, podem influenciar de forma marcante o comportamento ingestivo e produtivo desses animais.

No presente estudo, as quantidades de suplementos lipídicos das dietas suplementadas foram estabelecidas para promover teores em torno de 5% de lipídeo na matéria seca da dieta total. Essa proporção de lipídeo, possivelmente, não foi suficiente para influenciar o consumo de matéria seca das vacas, mesmo tendo os suplementos, expressiva quantidade de ácidos graxos poliinsaturados.

Estudo realizado por Harvatine & Allen (2006b), testando o grau de insaturação de suplementos lipídicos sobre o consumo de matéria seca e nutrientes, verificou que a adição de suplemento lipídico à dieta fez diminuir o consumo de matéria seca (CMS) e o aumento no grau de insaturação da fonte lipídica ingerida provocou diminuição linear no CMS, enquanto ácidos graxos saturados não afetaram. Nesse experimento as dietas suplementadas continham em torno de 8% de ácidos graxos totais. Weiss e Wyatt (2004) também só observaram diminuição no CMS, quando houve alta suplementação lipídica e essa apresentava maior quantidade de ácidos graxos insaturados.

Outros estudos realizados por Avila et al (2000), Salla et al (2003), Loor et al (2005), Costa et al (2007), Huang et al (2008), Weis e Pinos-Rodríguez (2009) e Santos et al (2009), não detectaram influência de suplemento lipídico, independentemente do perfil do mesmo, sobre o consumo de matéria seca.

De forma geral, a tendência de interferência no CMS é verificada quando a quantidade de suplemento é mais alta, enquanto níveis de suplementação até valores próximos de 6% da MS ingerida não afetariam o CMS. Palmquist e Conrad (1978) não constataram alterações no consumo de vacas em lactação com níveis de suplementação lipídica até 6,8%.

No entanto, resultados obtidos por Costa (2008), não corroboram com o até aqui discutido sobre CMS. Usando quatro diferentes tipos de suplemento lipídico, aumentando o teor de extrato etéreo da dieta de 2,8 para 5,2% em média, esse autor observou menor consumo de matéria seca quando as vacas recebiam adicional de gordura, em relação ao tratamento sem adicional, independentemente do suplemento. Em outro estudo, detectando resultado de maneira mais específica, houve diminuição no consumo de MS quando gordura protegida de sais de cálcio suplementou a dieta, totalizando 5,5% de extrato etéreo (Ganj Khanlou et al., 2009)

As proporções dos nutrientes nas dietas (tabela 5) de todos os tratamentos foram semelhantes, assim como o consumo de matéria seca (Tabela 6), conseqüentemente o consumo de MO, PB, FDN e CNF (Tabela 6) foram iguais. Exceção foi verificada para o consumo de extrato etéreo, o qual foi determinado pela superioridade na concentração de lipídio nas dietas dos tratamentos com adição de lipídeos. Em relação ao consumo de FDNi, o maior valor verificado para o tratamento com caroço de algodão pode ser explicado pela maior quantidade de FDN da dieta que continha este ingrediente (Tabela 5).

Harvatiné & Allen (2006b) verificaram diminuição no consumo de FDN, quando adição de lipídeo às dietas, independente do grau de insaturação da fonte lipídica. Já Avilla et al (2000) e Salla et al (2003) não obtiveram essa redução. Assim como para consumo de matéria seca, o nível de suplementação possivelmente dita alterações no consumo de FDN.

Da mesma maneira que para a maioria dos resultados obtidos para consumo de matéria seca e nutrientes, as digestibilidades aparentes destes parâmetros não foram modificadas quando os diferentes tipos de suplementos foram incluídos nas dietas, com exceção para a digestibilidade da proteína.

Bateman II e Jenkis (1998) observaram que a inclusão de até 8% de óleo de soja na dieta não exerce influência sobre a digestibilidade aparente de MS, MO, nitrogênio e FDN.

Como os microrganismos ruminais não fazem uso de lipídeos como fonte de energia, a possível explicação para o maior valor de digestibilidade aparente encontrado para proteína, quando óleo de soja foi usado como suplemento em relação ao tratamento controle, pode ser baseada em eventos pós ruminais. Dessa maneira, o maior aporte energético, oferecido pelo óleo de soja em relação ao controle, possivelmente tenha favorecido as deposições de proteína nos tecidos e no leite e conseqüentemente os mecanismos de absorção de proteína a nível de intestino.

As diferenças encontradas para a digestibilidade da proteína (Tabela 7), assim como as diferenças no consumo de extrato etéreo (Tabela 6), não foram suficientes para provocar diferenças entre os tratamentos, em relação ao consumo de nutrientes digestíveis totais (NDT).

Contrastando com os resultados obtidos para digestibilidade de proteína, Silva et al (2007) sugeriram maior escape da proteína dietética, aumentando a quantidade de proteína dietética nas fezes dos animais, e assim, reduzindo o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína. Somado a isso, Silva (2005) atribuiu reduções na digestibilidade da PB, a uma possível redução na atividade proteólítica dos protozoários pelo fato de os óleos serem agentes defaunadores, com conseqüente diminuição da concentração de amônia ruminal.

Os ácidos graxos poliinsaturados, altamente presentes em fontes lipídicas usadas na alimentação de ruminantes, possuem efeitos tóxicos às bactérias celulolíticas conforme Maia et al. (2007). Esse autor sugere que a toxicidade é mais pronunciada quando a fonte de gordura possui maior número de insaturações. Dessa maneira, suplementos lipídicos podem interferir de forma negativa sobre o coeficiente de digestibilidade da FDN, através da depressão na população de bactérias celulolíticas.

Como observado na Tabela 7, a digestibilidade da FDN, permaneceu inalterada com a presença dos suplementos nas dietas experimentais. Isso deve-se provavelmente à concentração de lipídios das dietas (5%), usada nesse estudo, a qual, possivelmente não foi suficiente para exercer toxicidade sobre as bactérias celulolíticas.

Com a relação à digestibilidade de gorduras, essa pode ser influenciada pelo consumo de matéria seca, quantidade de gordura consumida e características da gordura da dieta basal e suplementar (NRC, 2001). O grau de insaturação é, provavelmente, a característica que mais influencia a digestão de lipídeos (Grummer, 1995). Dessa forma, suplementos mais ricos em ácidos graxos poliinsaturados tendem a proporcionar maior digestibilidade dos lipídios.

Segundo Costa (2008), óleo de soja e sabões de cálcio apresentam maior potencial em elevar a digestibilidade do extrato etéreo, justamente por serem mais ricos em ácidos graxos poliinsaturados, os quais apresentam maior digestibilidade intestinal. O sabão de cálcio ainda seria mais eficiente por ser mais resistente a biohidrogenação ruminal, elevando o teor de ácidos graxos insaturados que chegam ao intestino. Essa tendência foi verificada por esse autor em experimento com vacas em lactação recebendo diferentes fontes lipídicas.

Apesar da diferença de onze unidades percentuais entre os coeficientes de digestibilidade de extrato etéreo dos tratamentos com sabão de cálcio e controle, observados na Tabela 7, não foi comprovada diferença estatística para esse parâmetro. No entanto, em valores numéricos, os resultados corroboram com as tendências supracitadas.

Produção e composição do leite

Existe uma grande preocupação com a depressão nos teores dos componentes dos sólidos totais do leite, principalmente em relação à

concentração de gordura. O nível de suplementação não foi suficiente para promover alterações significativas na composição do leite, e os leites produzidos em todos os tratamentos atenderam as exigências da Instrução Normativa n° 51 (Brasil, 2002), a qual estabelece teores mínimos no leite de 3,0%, 2,9% e 8,4% de gordura, proteína e extrato seco desengordurado respectivamente.

No entanto, Harvatine & Allen (2006), testando suplementos lipídicos com diferentes graus de insaturação, constataram que o teor de gordura do leite diminui linearmente com o aumento de ácidos graxos insaturados na dieta. AbuGhazaleh et al. (2003) observou essa mesma tendência. Segundo Bauman & Griinari (2003) e posteriormente sugerido por Harvatine et al. (2009), a síntese de gordura do leite é inibida por ácidos graxos intermediários formados pelo processo de biohidrogenação ruminal, dos quais *trans*-10, *cis*-12 CLA e *trans*-10 C_{18:11} são os intermediários com maiores evidências em deprimir gordura no leite. Sendo assim, dietas contendo concentrações mais elevadas de ácidos graxos poliinsaturados estão mais relacionadas com a síndrome do baixo teor de gordura no leite.

Dessa maneira, alguns pesquisadores, dentre eles, Eifert et al. (2006) e Huang et al. (2008), observaram decréscimo no teor de gordura do leite produzidos por vacas recebendo óleo de soja

Por outro lado, corroborando com os resultados obtidos no presente experimento, Avila et al. (2000), Santos et al. (2001), Vargas et al. (2002), Boken et al. (2005) e Ganjkhanlou et al. (2009) não encontraram efeitos de suplementos lipídicos sobre teor de gordura e proteína no leite.

Alguns resultados evidenciaram depressão na concentração de proteína no leite, como os de Costa (2008), quando utilizou grão de soja tratado com formaldeído e Harvatine & Allen (2005) quando utilizaram sabão de cálcio. Explicações para depressão de proteína no leite sustentam-se na inabilidade dos microrganismos em utilizar lipídeos como fonte de energia, prejudicando a síntese de proteína microbiana ou pela deficiência de glicose, como comentado por Garnsworthy (2002). Emery (1978) relatou que a adição de lipídeos à dieta animal normalmente diminui a porcentagem de proteína no leite em 0,1 a 0,3

unidades percentuais ou cerca de 0,07% para cada 450g de lipídeos adicionados. O acréscimo de gordura da atual pesquisa foi inferior aos 450g indicado.

A dieta suplementada com sabão de cálcio foi eficiente em aumentar a produção de leite em relação aos tratamentos controle e suplementação com óleo de soja. Esse fato se deve provavelmente à menor disponibilidade, dos ácidos graxos insaturados contidos no sabão de cálcio, aos processos ruminais de interação com os microrganismos, incluindo a biohidrogenação. Dessa forma, o menor contato da microflora ruminal com os AGI evita efeitos tóxicos causados por esses ácidos, e assim, não afetam a digestibilidade da fibra e a síntese de proteína microbiana. Somado a esse aspecto, o suplemento ainda aumenta a densidade energética da dieta, possibilitando aumentos na produção de leite.

Resultados de pesquisas não são conclusivos em direcionar aumentos de produção de leite à suplementação lipídica, muito menos a algum tipo específico de suplemento. Dessa forma, resultados positivos para produção de leite com dietas suplementadas com gordura podem ser verificados pelos trabalhos de Avila et al. (2000) e Costa et al. (2007) e ausência de respostas, pelos estudos de Santos et al. (2001), Vargas et al. (2002), Boken et al. (2005), Harvatine e Allen (2005), Eifert et al. (2006), Huang et al. (2008) e Ganjkhanlou et al. (2009).

Os resultados obtidos para produção de leite ajustada para 3,5% de gordura não seguiram a mesma tendência verificada para produção de leite. A produção superior obtida pelo tratamento com sabão de cálcio, quando ajustada para 3,5% de gordura passou a ser semelhante aos demais tratamentos. Esse fato sugere que um menor teor de gordura no leite produzido por esse suplemento tenha deprimido o valor de produção, acarretando nessa igualdade, apesar de as concentrações de gordura do leite não terem apresentado diferenças significativas.

Já Costa (2008), verificou maior produção de leite corrigido para 3,5% de gordura para o tratamento controle em relação aos suplementos lipídicos, o que não havia acontecido para produção sem o ajustamento. Nesse caso,

houve reduções significativas do teor de gordura do leite originado dos tratamentos com lipídeos e conseqüente ajustamento (3,5% de gordura) para baixo, dos valores de produção de leite. Houve exceção para a suplementação com grão de soja, a qual manteve a tendência do tratamento controle.

As produções em kg/dia de gordura, proteína e sólidos totais não acompanharam os valores obtidos para produção de leite, e mantiveram-se iguais para todos os tratamentos. Dessa forma, poderíamos sugerir um efeito de diluição, já que houve maior produção de leite para o tratamento com sabão de cálcio, caracterizando menor relação entre produção dos componentes e produção de leite, em kg/dia. No entanto, as concentrações em % desses mesmos componentes não apresentaram diferenças, como verificado na Tabela 8.

Na perspectiva de produções diárias em kg, de lactose e extrato seco desengordurado, os efeitos acompanharam os resultados obtidos para produção de leite. Dessa forma a lactose mostrou-se ser um componente do leite que independente da produção, manteve suas concentrações estáveis e provavelmente tenha influenciado no mesmo comportamento verificado para extrato seco desengordurado, já que a lactose faz parte desse último parâmetro.

Apesar de ter havido diferenças em relação à produção de leite e paralelamente, semelhança no consumo de MS e NDT entre os tratamentos, assim como na digestibilidade da MS, não houve maior rendimento de MS e NDT para cada litro de leite produzido, do tratamento com maior produção de leite. A mesma propensão foi observada para valores de eficiências de uso do nitrogênio (N do leite/N ingerido). Dessa forma, o maior aporte energético oferecido pelas suplementações lipídicas não trouxeram melhores aproveitamentos dos alimentos e seus constituintes. Resultados obtidos por Eifert et al. (2005) e Costa et al. (2007) corroboram com os parâmetros de eficiência aqui apresentados.

Perfis de ácidos graxos e CLA na gordura do leite

Segundo Harvatine et al. (2006), a gordura do leite é especialmente sensível ao manejo nutricional, dessa forma, tal manejo torna-se uma prática ferramenta para alterar o rendimento e composição da gordura. No entanto, tentativas de mudar a proporção de uma categoria de ácidos graxos, muitas vezes induzem alterações em outros ácidos graxos e até mesmo em parâmetros de desempenho como, consumo de MS, produção de leite e concentração de gordura e proteína no leite, (Chilliard et al., 2007).

Predominantemente a origem dos ácidos graxos da gordura do leite são a síntese de novo dentro das células do epitélio mamário e a absorção de ácidos graxos de cadeia longa pré-formados. Ácidos graxos de cadeia curta (C₄ a C₈) e média (C₁₀ a C₁₄) vêm basicamente da síntese de novo (acetato e em menor parte do β-hidroxibutirato). Ácidos graxos de cadeia longa (>C₁₆) são derivados da absorção de lipídeos circulantes (da dieta ou da mobilização das reservas corporais). Os ácidos graxos de 16 carbonos são originados de ambos os processos (Chilliard et al., 2000)

Em estudo de meta-análise, realizado por Glasser et al. (2008), foi avaliado os efeitos de diversos suplementos lipídicos sobre a composição de ácidos graxos do leite de vacas, baseado em 145 experimentos. Todos os ácidos graxos contendo de 6 a 16 carbonos sofreram reduções por quase todos os suplementos, devido à inibição da síntese de novo na glândula mamária por vários isômeros *trans* C₁₈, como previsto por Shingfield & Griinari (2007). Os menores valores na gordura do leite para os ácidos graxos C₆ a C₁₆ foram compensados por uma maior concentração de C₁₈, com a manutenção do teor de gordura do leite.

Sendo assim, ácidos graxos de cadeia curta e média tendem a diminuir, enquanto os de cadeia longa tendem a aumentar, de acordo com os resultados obtidos pela meta-análise. Já os valores encontrados, para esses três perfis de ácidos graxos, na presente pesquisa, foram iguais entre os suplementos e o controle, muito provavelmente devido à menor quantidade de suplemento

lipídico das dietas, em torno de 380g, em relação às quantidades utilizadas nos experimentos pertencentes à meta-análise, que variou de 484 a 868g.

Santos et al. (2001) verificou diminuição nos AGCC e AGCM na gordura do leite de vacas suplementadas com grão de soja e óleo de soja . Mesma constatação foi observada por Eifert et al. (2006), para óleo de soja. Já Allen et al. (2000), além de obter menores e maiores concentrações de AGCC + AGCM e AGCL, respectivamente, observou que esses efeitos foram mais pronunciados a medida que o suplemento continha mais ácidos graxos insaturados.

No âmbito de grau de saturação, houve superioridade dos suplementos com sabão de cálcio e grão de soja em relação aos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) encontrados no leite. Três aspectos interagem para explicar esse evento, a quantidade de gordura da dieta, grau de insaturação dos ácidos graxos do suplemento e disponibilidade dos lipídeos ao processo de biohidrogenação ruminal. Sendo assim, o grão de soja e o sabão de cálcio, além de aumentarem a concentração de lipídeos da dieta, são ricos em AGPI e muito provavelmente apresentam maiores resistências ao processo de biohidrogenação ruminal e conseqüentemente provocam maiores escapes de ácidos graxos insaturados para o intestino, para serem incorporados na gordura do leite.

AbuGhazaleh et al. (2003) obtiveram maiores teores de ácidos graxos insaturados (AGI) na gordura do leite quando suplementos lipídicos continham maiores quantidades desse ácido graxo, e paralelamente obteve também menores quantidades de ácidos graxos saturados (AGS). Seguindo a mesma tendência, Harvatine & Allen (2006) observaram aumento linear na proporção de AGI/AGS com o aumento no teor de insaturações dos suplementos lipídicos, sendo essa proporção maior nos tratamentos suplementados em relação ao tratamento não suplementado.

Esperava-se, dessa forma, que as concentrações de ácidos graxos insaturados dos leites produzidos por vacas suplementadas com grão de soja e sabão de cálcio, também fossem superiores em relação aos demais tratamentos, assim como para AGPI. No entanto, mesmo os AGPI fazendo

parte dos ácidos graxos insaturados, esse não foi suficiente para promover diferenças nos teores de AGI, apesar de ter havido uma superioridade numérica provocada justamente pelos dois suplementos que aumentaram o teor de AGPI.

Na Tabela 10, a qual apresenta os resultados obtidos para concentração dos perfis de ácidos graxos contidos no leite, os valores de dois ácidos graxos chamam atenção, além dos valores obtidos para o ácido linoléico conjugado (CLA). A gordura do leite de vacas suplementadas com caroço de algodão apresentou os maiores e menores valores para $C_{18:0}$ e $C_{18:2}$ respectivamente. A provável explicação para esse resultado baseia-se no perfil de ácidos graxos contidos nesse tipo de suplemento, o qual possivelmente apresenta ácidos graxos mais amplamente biohidrogenados no rúmen, gerando dessa forma, maior quantidade de ácido esteárico e conseqüentemente diminuindo a quantidade de $C_{18:2}$ que passa para o intestino. Com isso, a incorporação de ácidos graxos na gordura do leite tende a seguir o perfil de ácidos graxos de cadeia longa que passam para o intestino.

Além disso, a disponibilidade para o processo de biohidrogenação também pode contribuir para o aumento de ácido esteárico contido no leite. Dessa maneira, os ácidos graxos insaturados contidos no caroço de algodão podem ser mais disponíveis que os de outros suplementos, para o processo de biohidrogenação, ou seja, possuem menor proteção contra as modificações ruminais. A dieta controle apresentou o menor valor para $C_{18:0}$ e a provável origem desse resultado é a maior quantidade de ácidos graxos de cadeia longa contidos nos suplementos lipídicos utilizados, os quais, dependendo da extensão de suas biohidrogenações, dão origem ao ácido esteárico.

Maior concentração de ácido esteárico na gordura do leite de vacas suplementadas com fontes de gordura também foi encontrada pelos seguintes autores: Avila et al. (2000), Boken et al. (2005), Costa (2008), Huang et al. (2008), Santos et al. (2001), Weiss & Pinos-Rodríguez (2008). Resultados de estudo de meta-análise realizado por Glasser et al. (2008), revelou que a porcentagem de ácidos graxos com dezoito carbonos foi maior no leite de vacas suplementadas com lipídeos, assim como para ácido esteárico.

Nesse mesmo estudo de meta-análise, foi detectado que C_{18:2} contidos nos alimentos são amplamente biohidrogenados, e concentrações desses, na gordura do leite, sofrem muito pouco efeito quando animais são suplementados com lipídeos, a não ser que os lipídeos ofertados sejam protegidos. Dessa forma o resultado apresentado para C_{18:2} na Tabela 10, corrobora com as observações de Glasser et al. (2008), no qual, grão de soja e sabão de cálcio, por apresentarem possíveis maiores resistências à biohidrogenação de seus ácidos graxos poliinsaturados, tiveram maiores deposições de C_{18:2} na gordura do leite.

As fontes fisiológicas de ácido linoléico conjugado são a biohidrogenação, a qual o CLA é um intermediário, e a dessaturação do ácido vacênico provocada pela atividade da enzima Δ^9 -dessaturase na glândula mamária. Dessa forma, tanto o CLA, quanto o *trans*-11 C_{18:1} que escapam do processo de biohidrogenação, são responsáveis pela deposição de ácido linoléico conjugado na gordura do leite de vacas. Consequentemente, suplementos lipídicos que apresentam comportamento ruminal favorável a maiores passagens de ácido vacênico e ácido linoléico conjugado para o intestino podem ser eficazes em aumentar o teor de CLA no leite.

No apanhado de resultados de estudos, realizado por Glasser et al. (2008), todas as observações sugeriram que a grande maioria do *cis*-9, *trans*-11 CLA teve como origem, a dessaturação mamária realizada pela Δ^9 -dessaturase (Griinari et al., 2000; Shingfield et al., 2007; Glasser et al., 2008a).

Nesse estudo, o suplemento Megalac[®] (sabão de cálcio), de acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, apresentou o comportamento supracitado, proporcionando maiores valores de CLA no leite. Apesar da diferença em relação ao tratamento controle e óleo de soja não apresentarem significância estatística, a concentração de CLA na gordura do leite encontrada para o Megalac[®] foi praticamente duas vezes às concentrações encontradas para esses suplementos. Já em relação aos suplementos grão de soja cru e moído e caroço de algodão a diferença foi significativa, sendo o sabão de cálcio responsável por um aumento maior que 140% na concentração de CLA.

Não somente foram encontrados resultados positivos no incremento de CLA no leite, com sabão de cálcio. Outros autores verificaram esse aumento com óleo de soja (Huang et al., 2008), óleo de soja, sabão de cálcio e grão de soja cru e moído (Costa, 2008), subproduto do refinamento do óleo de soja (Boken et al., 2005) e óleo de soja (Santos et al., 2001).

Harvantine & Allen (2006) quando compararam o fornecimento de suplementos lipídicos saturados e insaturados, observaram que somente suplementos ricos em ácidos graxos insaturados foram capazes de incrementar valores de concentração de ácido linoléico conjugado na gordura do leite. Esse resultado se insere coerentemente no contexto de formação de CLA no organismo do ruminante, pois ácidos graxos saturados não sofrem biohidrogenação e conseqüentemente não geram intermediários base para a formação do CLA e nem mesmo o próprio CLA.

Dessa forma, os resultados de diversos experimentos não apontam um único suplemento lipídico responsável por dar suporte ao incremento de CLA no leite. No entanto, houve uma característica em comum, ou seja, esses suplementos devem ser ricos em ácidos graxos poliinsaturados.

Além dos valores de concentração de CLA na gordura do leite, na Tabela 10, também se encontram valores de CLA em gramas/litro de leite, o qual apresentou a mesma tendência das concentrações desse ácido graxo na gordura do leite. Outro resultado é produção diária de CLA em gramas por dia, na qual, tanto as concentrações de *cis*-9, *trans*-11 CLA na gordura, quanto a produção de leite obtida para o tratamento com sabão de cálcio, foram responsáveis pela maior quantidade produzida de CLA observada nesse tratamento.

Metabolismo de compostos nitrogenados

As dietas experimentais de todos os tratamentos foram formuladas de maneira que não houvesse diferença no teor de proteína bruta das mesmas, ou

seja, as dietas possuíam caráter isoprotéico. Essa informação, aliada ao resultado não significativo para consumo de matéria seca diário, demonstrado na Tabela 6, gera o efeito de causa em relação aos valores encontrados para a quantidade de nitrogênio diária ingerida (Tabela 11), os quais, também foram iguais. A diferença encontrada para excreção diária de nitrogênio através da urina não foi suficiente em promover diferença também no balanço de nitrogênio. No entanto, os valores de N perdidos na urina podem inferir sobre a eficiência de utilização desse composto no rúmen.

A energia utilizada pelos microrganismos, quase que na totalidade, é originada dos carboidratos, e poucas espécies são capazes de retirar energia de proteína, sendo nula a participação dos lipídeos para esse fim. Dessa maneira, os suplementos lipídicos adicionadas às dietas experimentais não forneceram energia para o crescimento microbiano.

Um caráter essencial no rendimento de produção microbiana é o sincronismo entre a degradação ruminal de carboidratos e proteína. Para isso, uma ponderação deve ser feita em relação às taxas de degradação de cada fração contida nos carboidratos e proteínas ingeridos e assim tentar sincronizar o tempo de disponibilidade ruminal desses substratos aos microrganismos, maximizando o uso da proteína degradada no rúmen (PDR) e minimizando as perdas de amônia através da parede ruminal.

As maiores quantidades de nitrogênio excretada via urina verificada para dietas com óleo de soja, sugere que esse suplemento interferiu negativamente no sincronismo entre degradação protéica e de carboidratos, no qual, a energia produzida no rúmen não teria sido suficiente em promover um eficiente aproveitamento dos composto nitrogenados no rúmen, e conseqüentemente havendo maior absorção de amônia pela parede ruminal, direcionada para excreção através da urina.

Por outro lado, Doreau & Chilliard (1997), relataram efeito defaunatório sobre os protozoários quando gorduras insaturadas são adicionadas às dietas, principalmente as ricas em ácido linoléico e linolênico. A conseqüência principal da defaunação é a queda na concentração de amônia no rúmen, decorrente da redução da atividade proteolítica dos protozoários (Doreau & Farley, 1995).

Resultado com cabras em lactação, obtido por Silva et al. (2007) corrobora com essa perspectiva. Valores de nitrogênio excretado via urina foram menores quando cabras foram suplementadas com óleo de soja, grão de soja ou sabão de cálcio, em relação ao tratamento sem adição de lipídeo.

No entanto, outros parâmetros ruminais, como produção de proteína microbiana (Tabela 12) e concentração de amônia no líquido ruminal (Tabela 14), não dão suporte para essas inferências. Dessa forma, menor eficiência no aproveitamento de compostos nitrogenados pode ter ocorrido após a absorção intestinal, provendo maior quantidade de nitrogênio na urina de vacas consumindo óleo de soja.

A técnica de determinação de derivados de purina (DP) para estimar a síntese microbiana assume que todos os ácidos nucleicos de origem dietética são degradados no rúmen e que, portanto, todos os ácidos nucleicos que deixam o rúmen são essencialmente de origem microbiana (Serrano et al., 2011). Segundo Chen & Gomes (1992) a excreção de derivados de purina é diretamente proporcional à absorção de purinas. Dessa forma, a partir do conhecimento da relação entre N das purinas e N total dos microrganismos ruminais, obtêm-se a síntese de proteína microbiana.

A seqüência de reduzidos valores encontrados para alantoína e ácido úrico da urina, purinas totais e purinas absorvidas, do tratamento com sabão de cálcio em relação aos demais tratamentos, proporcionou o menor valor de N microbiano, assim como eficiência de produção de proteína microbiana também para esse tratamento. Assim, uma possível interferência negativa sobre o padrão de fermentação ruminal, provocada pelo consumo de sabão de cálcio, pode ser responsável pela menor formação de proteína microbiana. Esse suplemento por ser rico em ácidos graxos poliinsaturados, apesar de ser considerado como inerte no rúmen, possivelmente apresentou considerável solubilização no fluido ruminal, exercendo efeito tóxico sobre os microrganismos ruminais, como mencionado por Maia et al. (2007).

Sendo assim, a conseqüência provocada pela menor produção de N microbiano e menor eficiência de produção de proteína microbiana verificada no efeito do tratamento com suplemento a base de sabão de cálcio, foi um menor rendimento do nitrogênio microbiano em relação ao nitrogênio ingerido,

o que provavelmente provocou um maior escape do rúmen de proteína não degradada no rúmen (PNDR).

Em pesquisa realizada por Costa (2008), houve menor produção de nitrogênio microbiano nos animais alimentados com qualquer um dos suplementos lipídicos utilizados, em relação ao controle. No entanto a eficiência da síntese de proteína microbiana foi menor apenas para a dieta adicionada de sabão de cálcio, o que coincide com os resultados aqui obtidos.

A proteína microbiana possui o melhor valor nutricional quando comparada com a proteína contida nos diversos alimentos destinados aos ruminantes, sendo equilibrada na maioria dos aminoácidos essenciais em relação à proteína do leite e do tecido muscular. Dessa forma, otimizar a produção de proteína microbiana é de suma importância para um melhor desempenho produtivo do animal (Santos, 2006).

No entanto, apesar do tratamento com sabão de cálcio ter apresentado os menores valores para síntese de N microbiano e eficiência de produção de proteína microbiana, nem produção de leite e nem o teor de proteína do leite foram afetados negativamente.

Em outra perspectiva, Pehrson (2002), analisando resultados de vários estudos, demonstrou uma relação não linear entre alantoína do leite e produção de leite. No presente estudo, tanto o valor de produção de leite (Tabela 8) quanto o valor de alantoína do leite (Tabela 12), apresentados para a dieta suplementada com sabão de cálcio, foram os valores que isoladamente se mostraram superiores.

Também na Tabela 12, estão contidos os resultados para nitrogênio uréico tanto do plasma sanguíneo, quanto do leite. De acordo com Contreras (2000) valores de nitrogênio uréico sérico, devem se enquadrar entre 7,28 a 19,59 mg/dl. Já Oliveira et al. (2001), sugeriu que valores de NUS superiores a 19 mg/dl representam o limite para perdas de nitrogênio dietético. Normalmente, altas concentrações de NUS estão associadas a dietas com elevados níveis de proteína degradável no rúmen, juntamente com a falta de quantidades de matéria orgânica fermentável no rúmen (Vasconcelos et al., 2010).

Tanto concentrações de NUS de animais suplementados com lipídeos, quanto de animais submetidos ao controle, sem adição de lipídeo, foram

superiores às referências supracitadas, indicando perda de nitrogênio dietético. Esse fato poderia ser explicado por algum tipo de influência negativa dos suplementos lipídicos sobre a degradação ruminal de carboidratos e proteínas, prejudicando diretamente a utilização de proteína degradada no rúmen ou indiretamente através da diminuição do aporte energético ruminal, importante para o sincronismo de degradação entre energia e proteína.

No entanto, o valor de NUS encontrado para o tratamento controle, manteve o mesmo padrão dos demais tratamentos, não responsabilizando os suplementos lipídicos pelos valores acima das referências. Avila et al. (2000) também não encontrou diferenças nas concentrações de NUS para dietas com ou sem suplementos lipídicos. Já Costa (2008) observou menores valores de NUS quando vacas foram suplementadas com grão de soja cru e moído. Em ambos os estudos, os valores de NUS não ultrapassaram os 20 mg/dl, ao contrário do verificado na Tabela 12.

Apesar de maiores concentrações de NUS, parâmetros relacionados à eficiência de utilização da proteína, como digestibilidade da proteína, porcentagem de proteína no leite, excreções de N, síntese de proteína microbiana, mantiveram-se em padrões normais.

Segundo Costa (2008), o nível de nitrogênio uréico no leite reflete o nível de nitrogênio no sangue. Pehrson (2002) também sugeriu forte correlação entre as concentrações de uréia no sangue e no leite. Da mesma maneira que para concentrações de NUS, os valores de NUL também são influenciados pelo nível de proteína e energia da dieta, assim como pelo sincronismo de degradação ruminal desses.

Na maioria dos resultados de pesquisas, concentrações de nitrogênio uréico no leite assumiram valores na faixa de 10 a 17 mg/dl (Jonker et al., 1999; Ferguson, 2001; Machado & Cassoli, 2002, Costa, 2008; Vasconcelos et al., 2010). Sendo assim, os valores apresentados na Tabela 12, ao contrário dos valores para NUS, estão dentro da faixa considerada normal pela literatura consultada.

No aspecto de efeito de tratamento, as concentrações de NUL tiveram a mesma tendência verificada para NUS. Os resultados encontrados por Costa (2008), analisando os mesmos suplementos aqui utilizados, também foram isentos de efeitos significativos.

Weiss & Pinos-Rodríguez (2009) obtiveram maiores concentrações de NUL em animais suplementados com lipídeos. Esse autor sugeriu que uma provável diminuição de matéria orgânica fermentável no rúmen, provocada pela fonte lipídica, diminuiu a captura de PDR em proteína microbiana.

Avila et al. (2000), não detectaram diferenças nos valores de NUL quando comparou os resultados com ou sem suplemento lipídico, no entanto observou, que dentro dos suplementos lipídicos, a fonte mais saturada apresentou o menor valor para NUL. Possível explicação para esse fato pode ser sustentada por um maior prejuízo à população microbiana ruminal, causado por uma maior quantidade de ácidos graxos insaturados, provocando menor formação de proteína microbiana e menor rendimento da proteína degradada no rúmen e assim elevando os valores de nitrogênio uréico no leite.

Usando o mesmo padrão de comparação, Harvantine and Allen (2006) não identificou diferenças nas concentrações de NUL, nem em relação à presença de suplementos lipídicos, nem em relação ao grau de insaturação dos suplementos.

Devido aos altos valores obtidos para NUS, as razões NUL/NUS foram menores do que as constatadas em uma série de estudos, nos quais, essa proporção variou de 0,7 a 0,9 (Rodriguez et al., 1997; Kauffman & St-Pierre, 2001; Chizzotti et al., 2007; Costa, 2008; Vasconcelos et al., 2010).

Parâmetros sanguíneos e ruminais

Com relação aos valores de parâmetros sanguíneos apresentados na Tabela 13, não houve diferença do tratamento controle em relação aos tratamentos com suplementação lipídica, assim como não houve diferença dentre os suplementos lipídicos. Já Costa (2008), identificou maiores teores de colesterol total (CT) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) em dietas suplementadas com lipídeos em relação a dietas sem suplementação.

De acordo com Costa (2008) a influência lipídica sobre os níveis de glicose no sangue parece pouco provável, devido ao eficiente controle homeostático que os ruminantes possuem a fim de manter suprimento adequado de glicose para os tecidos chave que só utilizam glicose como fonte

de energia, como a glândula mamária e o cérebro. Os resultados obtidos por Harvantine & Allen (2006), para teores de glicose, corroboram com os valores da Tabela 13, assim como com os resultados de Costa (2008).

No entanto, Avila et al. (2000) obtiveram uma tendência decrescente para glicose sanguínea a medida que o grau de insaturação dos suplementos aumentavam, mas de maneira geral, as concentrações de glicose proporcionadas por dietas com ou sem suplementação lipídica foram iguais.

Avila et al. (2000) também encontraram maiores teores de triacilglicerídeos (TAG) em animais consumindo dietas munidas de suplementos lipídicos.

De fato, na maioria dos estudos, esses parâmetros sanguíneos não são afetados pela presença de suplemento lipídico na dieta, caracterizando um eficiente controle dos níveis sanguíneos de glicose, colesterol, lipoproteínas e triacilglicerídeos pelos ruminantes, independente de suplementação lipídica. Mesmo assim, quantidades exageradas de lipídeos em dietas para vacas em lactação possivelmente podem alterar os padrões desses parâmetros no sangue.

De acordo com Pogliani (2006), vacas primíparas com 24 a 48 meses de idade em média apresentam valores séricos de glicose, colesterol total e triacilglicerídeos de 65,75 mg/dl, 127,74 mg/dl e 24,49 mg/dl, respectivamente. As médias no presente estudo foram de 74,16 mg/dl, 181,72 mg/dl e 20,52 mg/dl.

Os principais substratos para formação de ácidos graxos voláteis (AGV's) através da fermentação ruminal são os carboidratos contidos na dieta dos ruminantes. No rúmen, os lipídeos não são utilizados como fonte de energia e sim, sofrem lipólise e biohidrogenação, para em processos pós-ruminais, serem metabolizados.

Dessa forma, adição de lipídeo na dieta de vacas em lactação não deve influenciar os valores de AGV's ruminais, se não houver substituição na dieta, de carboidratos fermentáveis no rúmen, por fontes lipídicas. Outro ponto relevante para isentar os lipídeos de possíveis influências nas concentrações de AGV's é que as quantidades e perfis desses suplementos não interfiram na eficiência fermentativa do rúmen.

Assim, justifica-se a ausência de resultados significativos obtidos para as concentrações ruminais e proporções dos ácidos graxos voláteis, demonstrados na Tabela 14, já que, como mencionado anteriormente, digestibilidade dos carboidratos e produção microbiana não foram afetadas pelos tratamentos com adição de lipídeos, mantendo padrões fermentativos equivalentes entre todos os tratamentos.

Avila et al. (2000) e Vagas et al. (2002), da mesma maneira que nos resultados aqui apresentados, não detectaram diferença nas proporções molares dos ácidos acético, propiônico e butírico, assim como nas relações acetato/propionato, independentemente dos tipos e perfis dos lipídeos contidos nas dietas dos animais.

Por outro lado, Boken et al. (2005) e Harvantine & Allen (2006), verificaram aumento e diminuição nas percentagens molares de propionato e acetato, respectivamente, no ambiente ruminal de vacas suplementadas com lipídeos, enquanto as proporções de butirato permaneceram inalteradas. Um possível favorecimento às bactérias fermentadoras de carboidratos não fibrosos, provocado por uma possível mudança no ambiente ruminal de vacas suplementadas com lipídeo, poderia provocar maiores proporções de ácido propiônico em relação ao ácido acético.

Outro parâmetro que reflete a conjuntura fermentativa do rúmen é a concentração de amônia ruminal, principalmente no que diz respeito à fermentação de aminoácidos. Dessa forma, menor concentração ruminal de amônia pode ser indicativo de desequilíbrio na proporção energia/proteína, oriunda da dieta, ou algum tipo de efeito negativo sobre os microrganismos, que fazem uso do nitrogênio dietético, produzindo amônia.

Com isso, o menor valor da concentração de amônia ruminal encontrada para o tratamento com grão de soja cru e moído deveria ser acompanhado por menor síntese de proteína microbiana. Como observado na Tabela 12, o valor apresentado para produção de proteína microbiana referente ao tratamento com grão de soja cru e moído não referenciou o valor encontrado para concentração de amônia.

Dessa forma, outro aspecto parece ter influenciado no inferior valor da concentração de amônia no rúmen para a dieta com grão de soja cru e moído, como um possível atraso na degradação da proteína contida no grão de soja

cru comparado com a degradação da proteína contida nas demais dietas. Isso provocaria uma formação mais gradativa de amônia, permitindo um saldo menos positivo nas concentrações de amônia em relação a absorção ou utilização pelos microrganismos, desse composto.

Avila et al (2000) não detectaram alterações nas concentrações ruminais de amônia quando dietas foram acrescidas de fontes lipídicas. Da mesma forma, ocorreu em pesquisa conduzida por Vargas et al. (2002), na qual um dos suplementos foi o grão de soja moído.

Ainda sobre parâmetros ruminais, o pH é um importante item no que diz respeito à modulação do aspecto fermentativo ruminal. Um menor pH pode ser indicativo de diminuição na proporção molar de acetato, além de poder indicar declínio na população de bactérias celulolíticas produtoras de ácido acético (Boken et al., 2005).

Assim como Boken et al. (2005), outros pesquisadores como Bateman & Jenkins (1998) e Abel-Caines et al. (1998b) verificaram diminuição no pH ruminal quando dietas dos animais eram acrescidas de suplementos lipídicos.

Em contrapartida, Avila et al. (2000) e Harvantine & Allen (2006) obtiveram resultados que corroboram com os da Tabela 14, ou seja, suplementos lipídicos não alteraram os valores de pH ruminal.

Conclusão

O lipídeo “protegido”, apresenta influência positiva sobre o perfil de ácidos graxos contidos na gordura do leite, proporcionando maiores teores de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente no que diz respeito ao ácido linoléico conjugado (CLA) e além disso, a produção e composição do leite não foram afetados negativamente por esse suplemento. Assim, o leite produzido por vacas alimentadas com esta fonte lipídica pode estar relacionado com aspectos positivos relacionados à saúde humana.

Referências Bibliográficas

- ABEL-CAINES, S. F., R. J. GRANT, T. J. KLOPFENSTEIN, T. WINOWISKI, AND N. BARNEY. 1998b. Influence of nonenzymatically browned soybeans on ruminal fermentation and lactational performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 81:1036–1045.
- ABE, M.; IRIKI, T.; TOBE, N.; SHIBUI, H. Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, p.758-765, 1981.
- ABU-GHAZALEH, A. A.; RILEY, M. B.; THIES, E. E.; JENKINS, T. C. Dilution rate and pH effects on the conversion of oleic acid to *trans* C18:1 positional isomers in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4334-4341, 2005.
- ABU-GHAZALEH, A. A.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A. R.; KALSCHEUR, K.F. Milk Conjugated Linoleic Acid Response to Fish Oil Supplementation of Diets Differing in Fatty Acid Profiles. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.944-953, 2003.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1958– 1624, 2000.
- ANKRAH, P.; LOERCH, S. C.; DEHORITY, B. A. Sequestration, migration and lysis of protozoa in the rumen. **Journal of General Microbiology**, v.136, p.1869-1875, 1990.
- ANNISON, E. F.; BICKERSTAFFE, R.; LINZELL, J.L. Glucose and fatty acid metabolism in cows producing milk of low fat content. **The Journal of Agricultural Science (camb)**, v.82, p.87–95, 1974.
- ARO, A.; van AMELSVOORT, J.; BECKER, W.; van ERP-BAART, M.A.; KAFATOS, A.; LETH, T.; van POPPEL, G. Trans fatty acids in dietary fats and oils from 14 European Countries: The TRANSFAIR study. **J. Food Comp Anal** 1998; 11(2):137-49.

- ATTWOOD, G. T.; REILLY, K.; PATEL, B. K. C. *Clostridium prteoclastium* sp. Nov., a novel proteolytic bacterium from the bovine rumen. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.46, p.753-758, 1996.
- AVILA, C. D.; DEPETERS, E. J.; PREZ-MONTI, H.; TAYLOR, S. J.; ZINN, R. A. Influences of saturation ratio of supplemental dietary fat on digestion and milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1505-1519, 2000.
- BANKS, A.; HILDITCH, T. P. The glyceride structure of beef tallows. **Biochemical Journal**, v.25, p.1168-1182, 1931.
- BANNI, S.; MARTIN, J. C. Conjugated linoleic acid and metabolites. In: SEBEDIO, J. J.; CHRISTIE, W. W. (Ed.) **Trans Fatty Acids in Human Nutrition**. pp 261-30, 1998. Oily Press, Dundee, Scotland.
- BARTLETT, J.C.; CHAPMAN, D.G. Detection of hydrogenation fats in butter fat by measurement of *cis-trans* conjugated unsaturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.9, p.50-53, 1961.
- BATEMAN, H. G., II, AND T. C. JENKINS. 1998. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to nonlactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**. 81:2451–2458.
- BAUMAN, D.E.; BAUMGAR, L.H.; CORL, B.A.; GRIINARI, J.M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, 1999. 15p.
- BAUMAN, D.E.; BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; GRIINARI, J.M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1-15, 2000.
- BAUMAN, D. E.; DAVIS, C. L. Biosynthesis of milk fat. In **Lactation: A Comprehensive Treatise**, ed. BL Larson, VR Smith, v.2, p.31–75, New York: Academic, 1974.

- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock production Science**, v.70, p.15–29, 2001.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v.23, p.203-227, 2003.
- BAUMGARD, L.H.; CORL, B. A.; DWYER, D.A.; SÆBØ, A.; BAUMAN, D. E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology**, v.278, p.179–84, 2000.
- BEAM, T. M.; JENKINS, P. J.; MOATE, R. A. et al. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2564-2573, 2000.
- BICKERSTAFFE, R.; NOAKES, D. E.; ANNISON, E. F. Quantitative aspects of fatty acid biohydrogenation, absorption and transfer of milk fat in the lactating goat, with special reference to the cis- and trans isomers of octadecenoate and linoleate. **Biochemical Journal**, v.120, p.607– 609, 1972.
- BRASIL, Leis, decretos, etc. Instrução Normativa Nº 51 de 18 de setembro de 2002 da Secretaria de defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial** (República Federativa do Brasil) Brasília, p. 7-12, Jun/2002.
- BICKERSTAFFE, R.; ANNISON, E. F. The desaturase activity of goat and sow mammary tissue. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.35, p.653-665, 1970.
- BICKERSTAFFE, R. JOHNSON, A.R. The effect of intravenous infusions os sterculic acido n milk fat sythesis. **British Journal of Nutrition**, v.27, p.561-570, 1972.
- BORY, D. R.; BAUCHOP, T. lipid composition of an obligately anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* isolated from a bovine rumen. **Canadian Journal of Microbiology**, v.5, p.463-466, 1985.

- BOKEN, S. L.; STAPLES, C. R.; SOLLENBERGER, L. E.; JENKINS, T. C.; THATCHER, W. W. Effect of Grazing and Fat Supplementation on Production and Reproduction of Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4258-4272, 2005.
- BRYANT, M. P.; ROBINSON, I. M. Na improved nonselective culture médium for ruminal bactéria and its use in determining the diurnal variation in number of bacteria in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.44, p.1446-1456, 1961.
- BREMMER, D. R.; RUPPERT, L. D.; CLARK, J. H.; DRACKLEY, J. K. Effects of chain length and unsaturation of fatty acid mixtures infused into the abomasum of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.176–188, 1998.
- CANT, J.P.; DEPETERS, E.J.; BALDWIN, R.L. Mammary uptake of energy metabolites in dairy cows fed fat and its relationships to milk protein depression. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.8, p.2254-2265, 1993.
- CASALI, A. O.; DETMAN, E.; VALADARES FILHO, S. C. et al. Estimação de terres de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.1, p.130-138, 2009.
- CHARDIGNY, J.M.; DESTAILLATS, F.; MALPUECH-BRUÈRE, C. et al. Do *trans* fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the *trans* Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, p.558-566, 2008.
- CHEN, X.B., GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of technical details. **INTERNATIONAL FEED RESEARCH UNIT**. Rowett Research Institute. Aberdeen, UK. (occasional publication). 21p., 1992.
- CHIARA, V.L.; SILVA, R.; JORGE, R.; BRASIL, A.P. Ácidos graxos *trans*: doenças cardiovasculares e saúde materno-infantil. **Revista de Nutrição**, v.15, p.341-149, 2002.

- CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em vacas de diferentes níveis de produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.1, p.138-146, 2007.
- CHILLIARD, Y. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: a review. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3897– 3931, 1993.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, R.J.; DOREAU, M. Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. **Annales de Zootechnie**, V.49, P.181–205, 2000.
- CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A.; BERNARD, L.; ROUEL, J.; DOREAU, M. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.109, p.828–855, 2007.
- CHIN, S. F.; LIU, W.; STORKSON, J. M. et al. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognised class of anticarcinogens. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.5, p.185-197, 1992.
- CHIN, S.F.; STORKSON, J.M.; LIU, W. et al. Conjugated linoleic acid (9,11-and 10, 12-octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid. **Journal of Nutrition**, v.124, p.694-701, 1993.
- CHRISTENSEN, R. A.; DRACKLEY, J. K.; LACOUNT, D. W.; CLARK, J. H.. Infusion of four long-chain fatty acid mixtures into the abomasums of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.1052– 1069, 1994.
- CONTRERAS, P.A. Indicadores do metabolismo protéico utilizados nos perfis metabólicos de rebanhos. In: GONZÁLES, F.H.D. (Ed.) **Perfil metabólico em ruminantes**: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: UFRGS, 2000. p.23-30.
- CORL, B.A.; CHOUINARD, P.Y.; BAUMAN, D.E. et al. Conjugated linoleic acid in milk fat of dairy cows originates in part by endogenous synthesis from

trans-11 octadecenoic acid. **Journal of Dairy Science**, v.81(Suppl. 1), p.233(Abstr.), 1998.

COSTA, A.G.V.; BRESSAN, J.; SABARENSE, C.M. **Ácidos graxos *trans*: alimentos e efeitos na saúde**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, v.56, n.1, p.12-24, Caracas, 2006.

COSTA, P. B.; JUNIOR, W. S.; NÖRNBERG, J. L.; FISCHER, V. et al. Suplementação de lipídeos de diferentes fontes em dietas para vacas Jersey na fase inicial de lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.888-895, 2007.

COSTA, M.G. **Rações com diferentes fontes de gordura para vacas em lactação**. 2008. 119p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

DAVIS, C. L.; BROWN, R. E. Low-fat milk syndrome. In **Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant**, ed. AT Phillipson, p.545–65, Newcastle upon Tyne, UK: Oriel, 1970.

DAWSON, R. M. C.; HEMINGTON, N.; HAZLEWOOD, G. P. On the role of higher plant and microbial lipases in the ruminal hydrolysis of grass lipids. **British Journal of Nutrition**, v.38, p.225–232, 1977.

DAWSON, R. M. C.; KEMP, P. The effect of defaunation on the phospholipids and on the hydrogenation of unsaturated fatty acids in the rumen. **Biochemical Journal**, v.115, p.351-352, 1969.

DESTAILLATS, F.; TROTTIER, J. P.; GALVEZ, J. M. G.; ANGERS, P. Analysis of α -linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk with emphasis on conjugated linoleic acids. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.3231-3239, 2005.

DETMANN, E.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T. et al. Cromo e indicadores internos na determinação do consume de novilhos mestiços, suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1600-1609, 2001.

- DIJKSTRA, J.; BOER, H.; VAN BRUCHEM, J.; BRUINING, M.; TAMMINGA, S. Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH and rumen liquid volume. **British Journal of Nutrition**, v.69, p.385–396, 1993.
- DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, v. 78, suppl 1, p. 15 – 35, 1997.
- DOREAU, M.; FERLAY, A. Effect of dietary lipidson the ruminal metabolism in the rumen: A review. **Livestock Production Science**, v. 43, p. 97 –110, 1995.
- DRACKLEY, J. K.; KLUSEMEYER, T. H.; TRUSK, A. M.; CLARK, J. H. Infusion of long-chain fatty acids varying in saturation and chain length into the abomasum of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1517– 1526, 1992.
- EIFERT, E.C., LANNA, R.P., LEÃO, M.I., et al. Efeito da combinação de óleo de soja e monensina na dieta sobre o consumo de matéria seca e a digestão de vacas lactantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 297 – 308, 2005.
- EIFERT, E.C., LANA, R.P., LANNA, D.P.D. et al. Perfil de ácidos graxos e conteúdo de ácido linoléico conjugado no leite de vacas alimentadas com a combinação de óleo de soja e fontes de carboidratos na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n.4, p. 1829 – 1837, 2006.
- ELIAS, S.L.; INNIS, S.M. Infant plasma trans, n-6, and n-3 fatty acids and conjugated linoléico acids are related to maternal plasma fatty acids, length of gestation, and birth weight and length. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p. 807-814, 2001.
- EMERY, R. S. Feeding For Increased Milk Protein. **Journal of Dairy Science**, v.61, p.825-828, 1978.
- ERDMAN, R. Trans fatty acids and fat synthesis in milk. **Proc. Southwest Nutrition and Management Conference**, p.113–25, Univ. Arizona, Tucson, 1999.
- FENG, S., LOCK, A.L., GARNSWORTHY, P.C. Technical note: A rapid lipid separation method for determining fatty acid composition in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3785 – 3788, 2004.
- FERGUSON, J.D. [2001]. **Milk urea nitrogen**. Disponível em: <http://cahpwww.vet.upenn.edu/mun/mun_info.html>. Acesso: 22/6/2007.

- FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L. Assessment of the effects of iodine value on fatty acid digestibility, feed intake, and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.2357– 2366, 1994.
- FRITSCHKE, J.; STEINHART, H. Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* v.206, p.77-82, 1998.
- FUENTES, M. C.; CALSAMIGLIA, S.; CARDOZO, P. W.; VLAEMINCK, B. Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of bihydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.4456-4466, 2009.
- FUJIHARA, T.; ÆRSKOV, E.R.; REEDS, P.J. et al. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal Agriculture Science**, v.109, p.7-12, 1987.
- GANJKHANLOU, M.; REZAYAZDI, K.; GHORBANI, G. R.; DEGHAN BANADAKY, M.; MORRAVEG, H.; YANG, W. Z. Effects of protected fat supplements on production of early lactation Holstein cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.154, p.276-283, 2009.
- GARNSWORTHY, P.C. **Fat in dairy cow diets**. In: Recent Developments in Ruminant Nutrition 4, J. Wiseman, PC Garnsworthy, Nottingham University Press, 600p, 2002.
- GARTON, G. A. Fatty acid metabolism in ruminants. In: GOODWIN, T. W. (Ed.) **Biochemistry of Lipids II**. Vol.14, University Park Press, Baltimore, MD, 1977, p.337-370.
- GAYNOR, P. J.; WALDO, D. R.; CAPUCO, A.V.; ERDMAN, R. A.; DOUGLASS, L. W.; TETER, B. B. Milk fat depression, the glucogenic theory, and trans-C18:1 fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.2008–2015, 1995.
- GIRARD, V.; HAWKE, J. C. The role of holotrichs in the metabolism of dietary linoleic acid in the rumen. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.528, p. 17-27, 1978.

- GLASSER, F.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. Oilseed Lipid Supplements and Fatty Acid Composition of Cow Milk: A Meta-Analysis. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.4687-4703, 2008.
- GRIINARI, J.M.; CHOUINARD, P.Y.; BAUMAN, D.E. *Trans* fatty acid hypothesis of milk fat depression revisited. In: **Proc. Cornell Nutrition**, Conf., Ithaca, NY, 1997, p.208-216.
- GRIINARI, J. M.; DWYER, D.A.; MCGUIRE, M.A.; BAUMAN, D. E.; PALMQUIST, D. L.; NURMELA, K. V. V. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1251–1261, 1998.
- GRIINARI, J. M.; BAUMAN, D.E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In **Advances in Conjugated Linoleic Acid Research**, ed. YURAWECZ, M. P.; MOSSOBA, M. M.; KRAMER, J. K. G.; PARIZA, M. W.; NELSON, G.J. v1, p.180–200, Champaign, IL: AOCS Press, 1999.
- GRIINARI, J. M.; BAUMAN, D. E.; CHILLIARD, Y.; PERAJOKI, P.; NURMELA, K. Dietary influences on conjugated linoleic acids (CLA) in milk fat. **Proc. Mtg. European Section AOCS**, p.97 (Abstr.), 2000.
- GRUMMER, R. R. Ruminant inertness vs. intestinal digestibility of fat supplements: can there be harmony. **Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers**, p.13-14, Cornell University, Ithaca, NY, 1995.
- HA, Y.L.; GRIMM, N.K.; PARIZA, M.W. Anticarcinogens from fried ground beef: health-altered derivatives of linoleic acid. **Carcinogenesis**, 8, 1881- 1887. 1987.
- HALL, M. B. Neutral detergent-soluble carbohydrates: nutritional relevance and analysis. **A laboratory manual**. University of Florida Cooperative Extension Bulletin 339, 2000.
- HARFOOT, C. G.; HAZLEWOOD, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. Elsevier Science Publishing, New York, NY, p.285-322, 1988.
- HARTMAN, L., LAGO, L.C.A. Rapid separation of fatty acid methylesters. London: **Laboratory practice**, v. 22, p. 475 – 476, 1986.
- HARVATINE T, K. J.; ALLEN, M. S. The effect of production level on feed intake, milk yield, and endocrine responses to two fatty acid supplements in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4018-4027, 2005.

- HARVANTINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of Fatty Acid Supplements on Feed Intake, and Feeding and Chewing Behavior of Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p1104-1112, 2006.
- HARVANTINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of Fatty Acid Supplements on Ruminant and Total Tract Nutrient Digestion in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1092-1103, 2006.
- HARVANTINE, K. J.; BOISCLAIR, Y. R.; BAUMAN, D. E. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. **Cambridge Journal**, v.3, p.40-54, 2009.
- HAWKE, J. C.; SILCOCK, W. R. The in vitro rates of lipolysis and biohydrogenation in rumen contents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.218, p.201-212, 1970.
- HOBSON, P. N. Rumen bacteria. In: NORRIS, J.R.; RIBBONS D. W. (eds) **Methods in Microbiology**, vol 3B. London, Academic Press, 1969.
- HUANG, Y.; SCHOONMAKER, J. P.; BRADFORD, B. J.; BEITZ, D.C. Response of Milk Fatty Acid Composition to Dietary Supplementation of Soy Oil, Conjugated Linoleic Acid, or Both. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.260-270, 2008.
- HUDSON, J. A.; MACKENZIE, C. A. M.; JOBLIN, K. N. Conversion of oleic acid to 10-hydroxystearic acid by two species of ruminal bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.44, p.1-6, 1995.
- INNIS, S.M.; KING D.J. Trans fatty acids in human milk are inversely associated with concentrations of essential all-*cis* n-6 and n-3 fatty acids and determine trans, but not n-6 and n-3, fatty acids in plasma lipids of breast-fed infants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p.383-390, 1999.
- IP, C.; SINGH, M.; THOMPSON, H.J. et al. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. **Cancer Research**, v.54, p.1212-1215, 1994.

- JAHREIS, G.; FRITSCHE, J.; STEINHART, H. Conjugated linoleic acid in milk fat: high variation depending on production system. **Nutrition Research**, v.17, p.1479-1484, 1997.
- JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3851– 3863, 1993.
- JENKINS, T. C. Feeding fat to dairy cattle. in Proc. **Dairy Herd Management Conference University of Georgia**, p.100-109, Athens, GA, 1994.
- JENKINS, T. C. Success of fat in dairy rations depends on the amount. **Feedstuffs** v.69(2), p.11– 12, 1997.
- JENKINS, T.C.; ABUGHAZALEH, A.A.; FREEMAN, S.; THIES, E.J. The production of 10, hydroxystearic acid and 10-ketostearic acid is an alternate route of oleic acid transformation by the ruminal microbiota in cattle. **Journal of Nutrition**, v.136, p.926-931, 2006.
- JENKINS, T. C.; WALLACE, R. J.; MOATE, P. J.; MOSLEY, E. E. BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v.86, p.397-412, 2007.
- JIANG, J.; BJOERCK, L.; FONDEN, R.; EMANUELSON, M. Occurrence of conjugated *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.438-445, 1996
- JOHNSON, T. O.; MITCHELL G. E.; TUCKER, R. E.; SCHELLING, O. T. Pancreatic lipase secretion by sheep. **Journal of Animal Science**, v.39, p.947– 951, 1974.
- JONKER, J.S.; KOHN, R.A.; ERDMAN, R.A. Milk urea nitrogen target concentrations for lactating dairy cows fed according to national research council recommendations. **Journal of Animal Science**, v.82, n.6, p.1261-1273, 1999.

- KHANAL, R.C. Potential health benefits of conjugated linoleic acid (CLA): A review. Asian – **Australasian Journal of Animal Science**, 17, 1315 – 1328, 2004.
- KAUFFMAN, A.J.; ST-PIERRE, N.R. The relationship of milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.10, p.2284-2294, 2001.
- KEENEY, M. Lipid metabolism in the rumen. In: PHILLIPSON, A. T. (Ed.) **Physiology of digestion and metabolism in the ruminant**. Oriel Press Limited, Newcastle upon Tyne, UK, 1970, p.489-503.
- KELLY, M. L.; KOLVER, E.S.; BAUMAN, D. E.; VAN AMBURGH, M. E.; MULLER, L. D. Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1630-1636, 1998b.
- KEMP, P.; LANDER, D.J.; GUNSTONE, F.D. The hydrogenation of some *cis*- and *trans*-octadecenoic acids to stearic acid by a rumen *Fusocillus* sp. **British Journal of Nutrition**, v.52, p.165-170, 1985a.
- KEMP, P.; LANDER, D.J.; ORPIN, C.G. The lipids of the rumen fungus *Piromonas communis*. **Journal of General Microbiology**, v.130, p.27-37, 1984b.
- KIM, Y. J.; LIU, R. H.; RYCHLIK, J. L.; RUSSELL, J. B. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p. 976-982, 2002.
- KINSELLA, J.E. Stearyl CoA as a precursor of oleic acid and glycerolipids in mammary microsomes from lactating bovine: possible regulatory step in milk triglyceride synthesis. **Lipids**, v.7, p.349-355, 1972.
- KLUSMEYER, T. H.; CLARK, J. H. Effects of dietary fat and protein on fatty acid flow to the duodenum and in milk produced by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3055– 3067, 1991.

- KNEKT, P.; JARVINEN, R.; SEPPANEN, R.; PUKKALA, E.; AROMAA, A. Intake of dairy products and the risk of breast cancer. **British Journal of Cancer**, v.73, p.687-691, 1996.
- KOPECNY, J.; ZOREC, M.; MRAZEK, J. et al. Butyrivibrio hungatei sp. nov. and Pseudobutyrvibrio xylanivorans sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.201-209, 2003.
- KRONFELD, D.S. Major metabolic determinants of volume, mammary efficiency and spontaneous ketosis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.65, n.11, p.2204-2212, 1982.
- KRONFELD, D. S. The potential of the proportions of glucogenic, lipogenic, and aminogenic nutrients in regard to the health and productivity of dairy cows. **Advances in Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.7, p.5– 26, 1976.
- LARQUÉ, E.; PÉREZ-LLAMAS, F.; PUERTA, F. et al. Dietary trans fatty acids affect docosahexanoic acid concentrations in plasma and liver but not brain of pregnant and fetal rats. **Pediatric Research**, v.47, p.278-283, 2000.
- LARQUÉ, E.; ZAMORA, S.; GIL, A. Dietary trans fatty acids affect the essential fatty-acid concentration of rat milk. **Journal of Nutrition**, v.130, p.847-851, 2000.
- LARQUÉ, E.; ZAMORA, S.; GIL, A. Dietary trans fatty acids in early life: a review. **U. S. National Library of Medicine National Institutes of Health**, suppl.65, p.31-41, 2001.
- LENNARZ, W.J. Lipid metabolism in the bacteria. **Advances in Lipid Research**, v.4, p.175-225, 1966.
- LIN, H.; BOYLSTON, T. D.; CHANG, M. J.; LUEDECKE, L. O.; SHULTZ, T. D. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.2358-2365, 1995.

- LOOR, J. J.; FERLAY, A.; OLLIER, A.; DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Relationship Among *Trans* and Conjugated Fatty Acids and Bovine Milk Fat Yield Due to Dietary Concentrate and Linseed Oil. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.726-740, 2005.
- LOOR, J. J.; UEDA, K.; FERLAY, Y. et al. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acid and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.2472-2485, 2004.
- MANN, G.V. Metabolic consequences of dietary *trans* fatty acids. **The Lancet**, v.343, p.1268-1271, 1994.
- MCGUIRE, M. A.; MCGUIRE, M. K. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. **Proceedings of the American Society of Animal Science**. 1999 [online publication].
- MACHADO, P.F.; CASSOLI, L.D. In: SINLEITE – SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE LEITE, 2002, Lavras. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. p.161-179.
- MAIA, M.R.G.; CHAUDHARY, L.C.; FIGUERES, L.; WALLACE R.J. Metabolismo de polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.97, p.303-314, 2007.
- MAIGA, H.A.; SCHINGOETHE, D.J. Optimizing the utilization of animal fat and ruminal bypass proteins in the diets of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.80(2), p.343-352, 1997.
- MARTIN, C.A.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E. Ácidos graxos *trans*: implicações nutricionais e fontes na dieta. **Revista de Nutrição**, v.17, n.3, p.361-368, 2004.
- MATTOS, W.; PALMQUIST, D. L. Biohydrogenation and availability of linoleic acid in lactating cows. **Journal of Nutrition**, v.107, p.1755– 1761, 1977.

- MCINTOSH, G.H.; REGISTER, G.O.; LEU, R.K.L. et al. Dairy proteins protect against dimethylhydrazine-induced intestinal cancers in rats. **Journal of Nutrition**, v.125, p.809-816, 1994.
- MEDEIROS, S.R. **Ácido linoleico conjugado: teores nos alimentos e seu uso no aumento da produção de leite com maior proteína e perfil de ácidos graxos modificados.** Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Piracicaba, SP, 98p., 2002.
- MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, p.1217 – 1240, 2002.
- MICHA, R.; KING, I.B.; LEMAITRE, R.N. et al. Food sources of individual plasma phospholipid *trans* fatty acid isomers: the Cardiovascular Health Study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, p.883-893, 2010.
- MILBER, J. A. 1999. Functional foods and health promotion. **J. Nutr.** 129:1395S-1397S.
- MORA, P.J.G.; LEÃO, M.I.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Grão de soja em rações para vacas lactantes: Consumo dos nutrientes, produção e composição do leite. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.25(2), p.369-381, 1996.
- MORVAN, B.; JOBLIN, K. N. Hydration of oleic acid by *Enterococcus gallinarum*, *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus* sp. Isolated from the rumen. **Anaerobe**. Elsevier, v.5, p.605-611, 1999.
- MOSLEY, E. E; POWELL, G. L.; RILEY, M. B.; JENKINS, T. C. Microbial biohydrogenation of oleic acid to *trans* isomers in vitro. **The Journal of Lipid Research**, v.43, p. 290-296, 2002.
- MOTARD-BÉLANGER, A.; CHAREST, A.; GRENIER, G. et al. Study of the effect of *trans* fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, p.593-599, 2008.

NAM, I. S.; GARNSWORTHY, P. C. Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.551-556, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient of requirements of dairy cattle**. 7. Ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 362., 2001.

NRC. 1988. Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace. **National Academy Press, Washington, DC**.

NRC. 1994. Opportunities in the Nutrition and Food Sciences. **National Academy Press, Washington DC**.

OLDHAM, J. D.; EMMANS, G. C. Prediction of responses to protein and energy yielding nutrients. In **Nutrition and Lactation in the Dairy Cow**, ed. PC Garnsworthy, p.76–96. London: Butterworths, 1988.

OLIVEIRA, A.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Produção de proteína microbiana e estimativa das excreções de derivados de purinas e de ureia em vacas lactantes alimentadas com rações isoprotéicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1621-1629, 2001.

ORTOLONI, E.L. **Considerações técnicas sobre o uso da sonda esofágica na colheita do suco de rúmen de bovinos para mensuração do pH**. Arquivo da Escola de Veterinária da UFMG, v.33, n.2, p.269-275, 1981.

PAILLARD, D.; MCKAIN, N, CHAUDHARY, L. C. et al. Relation between phylogenetic position, lipid metabolism and butyrate production by different *Butyrivibrio*-like bacteria from the rumen. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.91, p.417-422, 2007.

PALMQUIST, D.L.; CONRAD, H.R. High fat rations for dairy cows. Effects on feed, milk production and plasma metabolites. **Journal of Dairy science**, v.61, p. 890-901, 1978.

- PALMQUIST, D. L.; DAVIS, C. L.; BROWN, R. E.; SACHAN, D.S. Availability and metabolism of various substrates in ruminants. V. Entry rate into the body and incorporation into milk fat of D(-) β - hydroxybutyrate. **Journal of Dairy Science**, v.52, p.633–638, 1969.
- PALMQUIST, D.L.; JENKINS, T.C. Fat in lactation rations: review. **Journal of Dairy Science**, v.63, n.1, p.1-14, 1980.
- PALMQUIST, D. L. Use of fats in diets for lactating dairy cows. p.357– 381 in Proc. **37th Easter School in Agriculture**, J. Wiseman, ed. London: Butterworth, 1983.
- PALMQUIST, D.L; WEISS, W.P. Blood and hydrolyzed feather meals as source of undergradable protein em hight fat diets for cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 56, n. 2, p. 134-137, 1994.
- PARODI, P.W. Conjugated linoleic acid: an anticarcinogenic fatty acid present in milk. **Australian of Dairy Technology**, v.49, p.93-97, 1994.
- PEHRSON, B Milk analysis, nutritional and disease status of dairy cows. **In: Recent Developments in Ruminant Nutrition 4**, J. Wiseman, PC Garnsworthy, Nottingham University Press, 600p., 2002.
- POGLIANI, F. C. **Valores de referência e influência dos fatores etários, sexuais e da gestação no lipidograma de bovinos da raça Holandesa criados no Estado de São Paulo**. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- PRECHT, D.; MOLKENTIM, J. Effect of feeding on conjugated cis- Δ^9 , trans- Δ^{11} octadecadienoic acid and other isomers of linoleic acid in bovine milk fats. **Nahrung**, v.41, p.330-335, 1997.
- PROELL, J. M.; MOSLEY, E. E.; POWELL, G. L.; JENKINS, T. C. Isomerization of stable estopically labeled elaidic acid to *cis* and *trans* monoenes by ruminal microbes. **The Journal of Lipid Research**, v.43, p.2072-2076, 2002.

- REISER, R. Hydrogenation of polyunsaturated fatty acids by the ruminants. **Federation Proceedings**, v.10, p.236, 1951.
- RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D; VALADARES FILHO, S.C. et al.. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purinas na urina em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1223-1234, 2000.
- RINDSIG, R. B.; SCHULTZ, L. H. Effects of abomasal infusions of safflower oil or elaidic acid on blood lipids and milk fat in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.57, p.1459–1466, 1974.
- RODRIGUEZ, L.A.; STALLINGS, C.C.; HERBEIN, J.H. et al. Effect of degradability of dietary protein and fat on ruminal blood and milk components of Jersey and Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.2, p.353-363, 1997.
- ROSS, N.M.; SIEBELINK, E.; BOTS, M.L. et al. Trans monounsaturated fatty acids and saturated fatty acids have similar effects on postprandial flow-mediated vasodilation. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56(7), p.674-679, 2002.
- SALLA, L. E.; FISCHER, V.; FERREIRA, E. X.; MORENO, C. B.; JUNIOR, W. S.; DUARTE, L. D. Comportamento Ingestivo de Vacas Jersey Alimentadas com Dietas Contendo Diferentes Fontes de Gordura nos Primeiros 100 Dias de Lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.3, p.683-689, 2003.
- SHANTHA, N. C.; RAM, L. N.; O'LEARY, J.; HICKS, C. L.; DECKER, E. A. Conjugated linoleic acid concentrations in dairy products as affected by processing and storage. **Journal of Food Science**. v.60, p.695-697, 1995.
- SANHUEZA, J.C. et al. Conjugated linoleic acid: a trans isomer fatty acid potentially beneficial. **Revista Chilena de Nutricion**, v.29, n.2, p.98-105, 2002.
- SANTOS, F. A. P. Metabolismo de Proteínas. In: **Nutrição de Ruminantes**, Ed. BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Jaboticabal: Funep, 2006, 583p, SP.

SANTOS, F. L.; LANA, R. P.; SILVA, M. T. C.; BRANDÃO, S. C. C.; VARGAS, L.H. Produção e composição do leite de vacas submetidas a dietas contendo diferentes níveis e formas de suplementação de lipídios. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30(4), p.1376-1380, 2001.

SANTOS, A. D. F.; TORRES, C. A. A.; RENNÓ, F. P.; DRUMOND, M. R. S.; JÚNIOR, J. E. F. Utilização de óleo de soja em rações para vacas leiteiras no período de transição: consumo, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.1363-1371, 2009.

SERRANO, R. D.C.; SIERRA, L. M. P.; CONEGLIAN, S. M.; TONELLO, C. L.; SILVA, L. G.; LIMA, B. S. Síntese microbiana no rúmen. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, V.5, N.5, Ed.152, Art.1025, 2011.

SINGH, S.; HAWKE, J. C. The in vitro lipolysis and biohydrogenation of monogalactosyldiglyceride by whole rumen contents and its fractions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.30, p.603-612, 1979.

SHINGFIELD, K. J.; AHVENJARVI, S.; TOIVONEN, V.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P. Transfer of absorbed cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid into milk is biologically more efficient than endogenous synthesis from absorbed vaccenic acid in lactating cows. **Journal of Nutrition**, v.137, p.1154–1160, 2007.

SHINGFIELD, K. J.; GRIINARI, J. M. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. **European Journal of Lipid Science and Technology**. v.109, p.799–816, 2007.

SHORLAND, F. B.; WEENINK, R. O.; GOLDFINE, H. Effect of the rumen on dietary fat. **Nature**, v.175, p.1129-1130, 1955.

SILVA, D.J.; QUEIRÓZ, A C. **Análise de Alimentos: Métodos químicos e biológicos**. 3ª Ed. Viçosa – MG: UFV, 235p., 2002.

SILVA, C. M. A. P. **Produção e composição do leite, variação de peso corporal e digestibilidade em vacas alimentadas com ração contendo**

grão de soja moída no concentrado. Viçosa, MG: UFV, 1997, 72p. Tese (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1997.

SILVA, M. M. C. **Suplementação de lipídios em dietas para cabras leiteiras.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2005. 108p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa. 2005.

SILVA, M. M. C.; RODRIGUES, M. T.; BRANCO, R. H. et al. Suplementação de lipídios em dietas para cabras em lactação: consumo e eficiência de utilização de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.1, p.257-267, 2007.

SKLAN, D., ASHKENAZI, R., BRAUN, A et al. Fatty acids, cCLAium soaps of fatty acids and cottonseeds fed to hight yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 9, p. 2463-2472, 1992.

STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; THATCHER, W. W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.856– 871, 1998.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **User's guide** : statistics. Version 8.0. Cary: 1999. (CD-ROM).

TETER, B. B.; JENKINS, T. C. Conjugated linoleic acid synthesis within the gut microbial ecosystem of ruminants. In: YARAWECZ, M. P.; KRAMER, J. K. G.; GUDMUNDSEN, O.; PARIZA, M. W.; BANNI, S. (Ed.) **Advances in Conjugated Linoleic Acid Research**. Vol.3, AOCS Press, Champaign, IL, 2006, p. 3-17.

TROEGELER-MEYNADIER, A.; NICOT, M. C.; BAYOUTTHE, C. et al. Effects of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.4054-4063, 2003.

VALADARES, R.F.D., BRODERICK, G.A., VALADARES FILHO, S.C. et al.. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**, 82 (12): 2686-2696, 1999.

- VARGAS, L. H.; LANA, R. P.; JHAM, G. N.; SANTOS, F. L.; QUEIRÓZ, A. C.; MANCIO, A. B. Adição de Lipídios na Ração de Vacas Leiteiras: Parâmetros Fermentativos Ruminais, Produção e Composição do Leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.522-529, 2002.
- VASCONCELOS, A. M.; LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; DIAS, M.; MORAIS, D. A. E. F. Parâmetros ruminais, balanço de compostos nitrogenados e produção microbiana de vacas leiteiras alimentadas com soja e seus subprodutos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p.425-433, 2010.
- VERBIC, J.; CHEN, X.B.; MACLEOD, N.A. et al. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal Agriculture Science**, 114 (3): 243-248.
- WALLACE, R. J.; CHAUDHARY, L. C.; MCKAIN, N. et al. *Clostridium proteoclasticum*: A ruminal bacterium that forms stearic acid from linoleic acid. **FEMS Microbiol. Lett**, v.265, p.195-201, 2006.
- WALLACE, R. J.; MCKAIN, N.; SHINGFIELD, K. J.; DEVILLARD, L. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. **The journal of Lipid Research**, v.48, p.2247-2254, 2007.
- WANG, Y.W.; JONES, P.J. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.28, p.941-55, 2004.
- WARD, P. F. V; SCOTT, T. W.; DAWSON, R. M. C. The hydrogenation of unsaturated fatty acids in the ovine digestive tract. **Biochemical Journal**, v.92, p.60-68, 1964.
- WASOWSKA, I.; MAIA, M. R. G, NIEDZWIEDZKA, K. M. et al. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C₁₈ unsaturated fatty acids. **British Journal of Nutrition**, v.95, p.1199-1211, 2006.
- WEISS, W. P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 61, 1999, **Proceedings**., Ithaca: Cornell University, p. 176-185, 1999.

- WEISS, W. P.; PINOS-RODRÍGUEZ, J. M. Production responses of dairy cows when fed supplemental fat in low-and high-forage diets. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.6144-6155, 2009.
- WEISS, W. P.; WYATT, D. J. Digestible Energy Values of Diets with Different Fat Supplements when Fed to Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.1446-1454, 2004.
- WHITE, R. W.; KEMP, P.; DAWSON, R. M. C. Isolation of a rumen bacterium that hydrogenates oleic acid as well as linoleic and linolenic acid. **Biochemical Journal**, v.116, p.767-768, 1970.
- WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, A. G. **The rumen protozoa**. Springer-Verlag, New York, NY, 1992. 441p.
- WOOD, R. D.; BELL, M. C.; GRAINGER, R. B.; TEEKEL, R. A. Metabolism of labeled linoleic-1-¹⁴C acid in the sheep rumen. **Journal of Nutrition**, v.79, p.62-68, 1963.
- YANEZ-RUIZ, D. R.; SCOLLAN, N. D.; MERRY, R. J.; NEWBOLD, C. J. Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their water-soluble carbohydrate content. **British Journal of Nutrition**, v.96, p.861-869, 2006.

