

Carlos Gustavo Santos Ribeiro

NÍVEIS CRESCENTES DE ÓLEO DE SOJA EM DIETA BASEADA EM CAPIM-ELEFANTE (*Pennisetum purpureum* Schumack) PICADO SOBRE PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO E CINÉTICA RUMINAL, COMPOSIÇÃO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE DE VACAS MISTIÇAS

Dissertação apresentada a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Nutrição Animal

Orientador: Prof. Dr. Norberto Mário Rodriguez

Belo Horizonte

UFMG – Escola de Veterinária

2009

ASSINATURA DA BANCA

Dedico

À Deus, sempre, aos meus queridos pais e à Ata.

*“A natureza é dotada de perfeições para exprimir a imagem de Deus,
e de defeitos para mostrar que é apenas a imagem.”*

Blaise Pascal (Pensées)

1623 - 1662

*“Eu ouço, eu esqueço;
Eu vejo, eu entendo;
Eu faço, eu aprendo.”*

Confúcio

551 - 478 a.C.

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Norberto pela orientação, ensinamentos e apoio durante todo o período.

Agradeço ao Fernando César, exemplo de profissional a ser seguido, pelo suporte e disponibilidade a todo momento.

Ao Marco Antônio, exemplo de responsabilidade, pelos ensinamentos e amizade.

À Professora Sandra, pelas ótimas aulas e pela disponibilidade.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro ao Projeto CVZ-1815/06 e pela bolsa de estudo.

À UFMG, minha segunda casa, e aos seus funcionários Toninho e Margot pela ajuda fundamental nas análises, e à Eloísa, pela presteza e simpatia.

Agradeço à EMBRAPA Gado de Leite por ceder as instalações, laboratórios e animais.

Aos funcionários (EMBRAPA) Armando Carvalho, Ceila, Meirinha, Mengo, Moreira, Coutinho, Miguel, Sebastião, Seu Hélio, Zé Carlos, “Pendalha”, Serapião, Seu Chico, Nilva, Michele, Mário, Marlice, Alcio e aos estagiários Renata, Carol, Patrícia e Rafael pela ajuda com as coletas e com as intermináveis análises.

Agradeço à Tia Dida, Tio Manoel e à Fafá por me cederem um “cantinho”.

Ao Professor Paulo Marcos, Dona Marta, Marina e Rafael por me abrirem as portas de sua casa. Serei sempre grato.

Ao Lívio, pela minha indicação ao Professor Norberto.

À Pê, Júnior, Bruno Valente, Angélica, Marcela, Carlos e Sofia pela amizade.

E, finalmente, à Ninha que apareceu no finalzinho... Mas estará comigo em todos os desafios que virão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
ABREVIACÕES	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL	18
-------------------------------	-----------

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

2.1	Técnicas de Avaliação dos Alimentos	19
2.2	Parâmetros Ruminais - pH, AGV e N-NH ₃	19
2.3	Determinação da Degradabilidade no Rúmen	21
2.3.1	Degradabilidade ruminal <i>in situ</i>	21
2.3.2	Digestibilidade <i>in vitro</i>	23
2.4	Taxa de Passagem da Fração Sólida	23
2.5	Taxa de Passagem da Fração Líquida	24
2.6	O Capim-Elefante	25
2.7	Lipídeos	25
2.7.1	Os Óleos Vegetais	26
2.8	Utilização de Lipídeos na Suplementação Dietética de Ruminantes	26
2.9	Metabolismo de Lipídeos no Rúmen	27
2.9.1	A Lipólise	27
2.9.2	A Biohidrogenação	28
2.9.2.1	Microrganismos Envolvidos na Biohidrogenação	28
2.9.2.1.1	Bactérias	28
2.9.2.1.2	Fungos e Protozoários	29
2.9.2.2	Biohidrogenação sob Baixo pH Ruminal	30
2.10	O Ácido Linoleico Conjugado (CLA)	30
2.11	Efeitos da Adição de Lipídeos Sobre a Fermentação Ruminal	31
2.12	Síntese Microbiana de Ácidos Graxos	32
2.13	Metabolismo e Dinâmica Pós-ruminal de Lipídeos	33
2.14	Biossíntese de AG no Leite	34
2.14.1	A Biossíntese de CLA	36
2.14.1.1	Síntese de CLA no Rúmen	36
2.14.1.2	Síntese de CLA nos Tecidos	37
2.15	Efeitos da Suplementação de Lipídeo Sobre o Consumo Voluntário de MS .	37
2.16	Efeitos da Suplementação de Lipídeo Sobre a Produção e Composição do Leite	38
2.16.1	Lipídeo	39
2.16.2	Proteína	39
2.16.3	Lactose	40

2.17	A Síndrome do Baixo Teor de Gordura do Leite (<i>Milk Fat Depression - MFD</i>)	40
------	---	----

CAPÍTULO III

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE, PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA DIETA E DA MANTEIGA E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PRODUTIVOS

3.1	RESUMO	42
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.2.1	Diets Experimentais	43
3.2.2	A Determinação do Consumo de MS e a Avaliação da Composição Química da Dieta	45
3.2.3	Produção e Composição do Leite	46
3.2.4	Avaliação do Perfil de Ácidos Graxos da Dieta	47
3.2.5	Obtenção das Manteigas	47
3.2.6	Análises Laboratoriais das Manteigas	48
3.2.7	Análises Estatísticas	48
3.3	RESULTADO E DISCUSSÃO	49
3.3.1	Perfil de Ácidos Graxos dos Alimentos	49
3.3.1.1	Capim-Elefante	49
3.3.1.2	Óleo de Soja	50
3.3.1.3	Concentrado	52
3.3.2	Composição do Leite	54
3.3.3	Perfil de Ácidos Graxos da Manteiga	58
3.3.3.1	AG de Cadeia Curta e Média	58
3.3.3.2	AG de Cadeia Ímpar e Ramificada	61
3.3.3.3	AG de Cadeia Longa	63
3.3.3.4	Relação Saturado:Insaturado	64
3.3.3.5	Ácidos Graxos <i>Trans</i>	65
3.3.3.6	Ácido Linoleico Conjugado (CLA)	66
3.3.3.7	Relação entre os AG <i>Trans</i> -11 e <i>Cis</i> -9 <i>Trans</i> -11	67
3.3.3.8	AG C18:1 <i>Trans</i> -10, C18:2 <i>Trans</i> -10 <i>Cis</i> -12 e C18:2 <i>Trans</i> -9 <i>Cis</i> -11	68
3.4	CONCLUSÕES	72

CAPÍTULO IV

PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO RUMINAL E CINÉTICA DE SÓLIDOS E LÍQUIDOS NO TRATO GASTROINTESTINAL

4.1	RESUMO	73
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	73
4.2.1	Diets Experimentais	74
4.2.2	Mensuração do Consumo de MS e a Avaliação da Composição Química da Dieta	77
4.2.3	Parâmetros Ruminais	77
4.2.4	Parâmetros de Degradabilidade <i>in situ</i>	78
4.2.5	Digestibilidade <i>in vitro</i> da MS	79

4.2.6	Estimativa da Taxa de Passagem da Fase Sólida da Dieta	79
4.2.7	Estimativa da Taxa de Passagem da Fase Líquida da Dieta	80
4.2.8	Análises Estatísticas	81
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.3.1	Consumo de Matéria Seca (MS)	81
4.3.2	Parâmetros Ruminais	83
4.3.2.1	pH e N-NH ₃	83
4.3.2.2	AGV	86
4.3.3	Taxa de Passagem	94
4.3.3.1	Fase Líquida	94
4.3.3.2	Fase Sólida	96
4.3.4	Degradabilidade ruminal <i>in situ</i> da MS, MO e FDN	98
4.4	CONCLUSÕES	100

CAPÍTULO V

5.1	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
------------	---	------------

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.9.2.1.1.1 - Metabolismo dos ácidos linoleico e α -linolênico no rúmen em pH normal.

Figura 2.9.2.1.2.1 - Metabolismo dos ácidos linoleico e α -linolênico no rúmen em pH baixo.

Figura 3.3.3.1 - Representação dos teores de ácidos graxos saturados e insaturados presentes nas manteigas oriundas de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja na matéria seca da dieta.

Figura 3.3.3.7.1 - Influência da adição de níveis crescentes de óleo de soja sobre a concentração dos ácidos graxos C18:1 *trans-11* e o isômero de CLA C18:2 *cis-9 trans-11* no leite de vacas mestiças Holandês x Zebu.

Figura 3.3.3.7.2 - Relação entre a concentração do isômero de CLA *cis-9 trans-11* (eixo y) e o AG C18:1 *trans-11* (eixo x) no leite de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja na matéria seca da dieta.

Figura 3.3.3.8.1 - Influência da adição de níveis crescentes de óleo de soja sobre o teor de gordura e a concentração do isômero de CLA C18:2 *trans-10 cis-12* no leite de vacas mestiças Holandês x Zebu.

Figura 3.3.3.8.2 - Relação entre o teor de gordura (eixo y) e a concentração do ácido graxo C18:1 *trans-10 cis-12* (eixo x) no leite de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja na matéria seca da dieta.

Figura 3.3.3.8.3 - Influência da adição de níveis crescentes de óleo de soja sobre o teor de gordura e a concentração do isômero de CLA C18:2 *trans-9 cis-11* no leite de vacas mestiças Holandês x Zebu.

Figura 3.3.3.8.4 - Relação entre o teor de gordura (eixo y) e a concentração do ácido graxo C18:1 *trans-9 cis-11* (eixo x) no leite de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja na matéria seca da dieta.

Figura 4.3.2.1.1 - Variação do pH no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em função do tempo de amostragem (h) e do nível de inclusão de óleo de soja na matéria seca da dieta após o fornecimento da alimentação diária.

Figura 4.3.2.1.2 - Variação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja (% da matéria seca), em função do tempo (h) após o fornecimento da alimentação diária.

Figuras 4.3.2.2.1 e 4.3.2.2.2 - Variação da concentração de acetato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes

de óleo de soja (% da matéria seca), em função do tempo (h) após o fornecimento da alimentação diária.

Figuras 4.3.2.2.3 e 4.3.2.2.4 - Variação da concentração de propionato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja (% da matéria seca), em função do tempo (h) após o fornecimento da alimentação diária.

Figuras 4.3.2.2.5 e 4.3.2.2.6 - Variação da concentração de butirato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja (% da matéria seca), em função do tempo (h) após o fornecimento da alimentação diária.

Figura 4.3.2.2.7 - Variação da concentração ruminal de AGV no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja (% da matéria seca), em função do tempo (h) após o fornecimento da alimentação diária.

Figura 4.3.2.2.8 - Variação da relação acetato:propionato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dietas baseadas em capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja na matéria seca da dieta, em função do tempo (h) após o fornecimento da alimentação diária.

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.14.1 - Origem dos ácidos graxos do leite, em porcentagem.

Tabela 3.2.1.1 - Ingredientes e composição química das dietas experimentais

Tabela 3.2.1.2 - Composição bromatológica média e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca do capim-elefante

Tabela 3.2.1.3 - Composição bromatológica e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca dos suplementos concentrados

Tabela 3.3.1.1.1 - Variação do perfil de ácidos graxos do capim-elefante ao longo do experimento

Tabela 3.3.1.2.1 - Comparação dos dados relativos à composição lipídica do óleo de soja adicionado ao concentrado com aqueles exigidos pela legislação brasileira (Portaria N° 795) e apresentados por GLASSER *et al.* (2008)

Tabela 3.3.1.3.1 - Composição lipídica média do concentrado ao longo de sete dias de armazenamento

Tabela 3.3.2.1 - Produção e composição do leite de vacas mestiças Holandês x Zebu alimentadas com dietas à base de capim-elefante suplementado com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de soja na matéria seca total

Tabela 3.3.3.1 - Concentração (g/100 g de AG totais) dos diferentes ácidos graxos presentes nas manteigas oriundas de vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de capim-elefante e suplementadas com diferentes níveis de óleo de soja

Tabela 4.2.1.1 - Ingredientes e composição química das dietas experimentais

Tabela 4.2.1.2 - Composição bromatológica média e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca do capim-elefante

Tabela 4.2.1.3 - Composição bromatológica e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca dos suplementos concentrados

Tabela 4.3.1.1 - Consumo de matéria seca de vacas mestiças Holandês x Zebu alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementado com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de soja na MS total

Tabela 4.3.2.1.1 - Efeito de dietas contendo níveis crescentes de óleo de soja sobre o pH ruminal em função do tempo transcorrido desde o fornecimento da alimentação diária pela manhã

Tabela 4.3.2.1.2 - Efeito de dietas contendo diferentes níveis de óleo de soja sobre a concentração nitrogênio amoniacal (mg/dL) no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu, em função do tempo transcorrido desde o fornecimento da alimentação diária, realizado pela manhã

Tabela 4.3.2.2.1 - Efeito dos níveis de óleo de soja (% da matéria seca) sobre a concentração (mMol / 100 mL) e a porcentagem molar de acetato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dieta à base de capim-elefante, em função do tempo após a alimentação da manhã

Tabela 4.3.2.2.2 - Efeito dos níveis de óleo de soja (% da matéria seca) sobre a concentração (mMol / 100 mL) e a porcentagem molar de propionato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dieta à base de capim-elefante, em função do tempo após a alimentação da manhã

Tabela 4.3.2.2.3 - Efeito dos níveis de óleo de soja (% da matéria seca) sobre a concentração (mMol / 100 mL) e a porcentagem molar de butirato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dieta à base de capim-elefante, em função do tempo após a alimentação da manhã

Tabela 4.3.2.2.4 - Efeito dos níveis de óleo de soja (% da matéria seca) sobre a concentração ruminal (mMol / 100 mL) de ácidos graxos voláteis no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dieta à base de capim-elefante, em função do tempo após a alimentação da manhã

Tabela 4.3.2.2.5 - Efeito dos níveis de óleo de soja (% da matéria seca) sobre a relação acetato:propionato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dieta à base de capim-elefante, em função do tempo após a alimentação da manhã

Tabela 4.3.3.1.1 - Parâmetros da cinética de fluxo de líquido no trato gastrointestinal de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dietas baseadas em capim-elefante suplementado com óleo de soja na MS da dieta, segundo estimativas obtidas pelo modelo de COLUCCI (1984)

Tabela 4.3.3.2.1 - Parâmetros da cinética de fluxo de partículas no trato gastrointestinal de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dietas baseadas em capim-elefante suplementado com óleo de soja na MS da dieta, segundo estimativas obtidas do ajuste do modelo de GROVUM e WILLIAMS (1973)

Tabela 4.3.4.1 - Parâmetros de degradabilidade *in situ* da matéria seca do volumoso fornecido para vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dietas baseadas em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumack) suplementado com óleo de soja na MS da dieta, usando a equação $DE(t) = (A - B * e^{-c * t})$ proposta por MEHREZ e ORSKOV (1977) e modificada por SAMPAIO (1988)

Tabela 4.3.4.2 - Parâmetros de degradabilidade *in situ* da matéria orgânica do volumoso fornecido para vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dietas baseadas em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumack) suplementado com óleo de soja na MS da dieta, usando a equação $DE(t) = (A - B * e^{-c * t})$ proposta por MEHREZ e ORSKOV (1977) e modificada por SAMPAIO (1988)

Tabela 4.3.4.3 - Parâmetros de degradabilidade *in situ* da fibra em detergente neutro do volumoso fornecido para vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dietas baseadas em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumack) suplementado com óleo de soja na MS da dieta, usando a equação $DE(t) = (A - B * e^{-c * t})$ proposta por MEHREZ e ORSKOV (1977) e modificada por SAMPAIO (1988)

ABREVIACÕES

Ac – Acetato
AG - ácidos graxos
AGCIR – ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada
AGV – ácidos graxos voláteis
Bu – Butirato
C - carbono
Ca – Cálcio
CCS - contagem de células somáticas
Cr – Cromo
DIVMS – Digestibilidade *in vitro* da Matéria Seca
EE - extrato etéreo
FDA – fibra em detergente ácido
FDN – fibra em detergente neutro
GM - glândula mamária
GW - GROVUM e WILLIAMS (1973)
MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MFD – Milk Fat Depression
mL - mililitro
MO - matéria orgânica
MOO - microrganismo
MS - matéria seca
N – Nitrogênio
N-NH₃ – nitrogênio amoniacal
NNP – Nitrogênio Não-Proteico
NRC – National Research Council
OS - óleo de soja
PB – Proteína Bruta
PEG – Polietilenoglicol
Pr – Propionato
PV - peso vivo
QL - quadrado latino
TGI – trato gastro intestinal
TVA – Ácido Trans-Vaccênico
VLDL – *very low density lipoprotein*

RESUMO

A presente dissertação foi composta por dois experimentos distintos, sendo o primeiro experimento realizado com o objetivo de avaliar a influência da adição de quatro níveis crescentes de óleo de soja (OS) (0; 1,5; 3,0 e 4,5% da matéria seca, MS) em dietas à base de capim-elefante picado como único volumoso sobre a composição lipídica do leite de doze vacas mestiças Holandês x Zebu com produção média igual a $18,0 \pm 4,6$ kg/dia de leite e peso corporal médio de $502,6 \pm 47,8$ kg. As vacas foram distribuídas em três quadrados latinos (QL) 4×4 . Cada fase do QL se estendeu por 15 dias, sendo os dez primeiros para adaptação às dietas e os cinco últimos destinados às coletas de dados e amostras. Foram analisados os perfis de ácidos graxos (AG) dos alimentos oferecidos (capim-elefante, óleo de soja e concentrado) e da gordura do leite na forma de manteiga. Com relação aos alimentos, os dados obtidos revelaram estabilidade tanto na composição de AG do capim quanto do óleo adicionado ao concentrado mesmo após sete dias de exposição ao ar. Já com relação à manteiga, observou-se redução ($P < 0,01$) nas concentrações dos AG de cadeia curta (C4 a C10), média (C12 a C16) e saturados à medida que se adicionou OS à dieta. Em contrapartida, o óleo elevou a concentração dos AG C18:1 *trans*-11 ($P < 0,01$) e C18:1 *trans*-10 ($P < 0,01$), indicando incremento no aporte de AG intermediários da biohidrogenação ruminal na glândula mamária. Houve incremento ($P < 0,01$) nas concentrações de todos os AG de 18 C, saturados e monoinsaturados. Destaque para os ácidos esteárico C18:0 e oleico C18:1 *cis*-9 com concentrações iguais a 7,78; 9,12; 9,42 e 9,94 g/100 g e 20,40; 21,83; 23,14 e 22,64 g/100 g para as dietas contendo 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente. O ácido oleico C18:1 *cis*-9 foi o isômero *cis* e o AG vaccênico C18:1 *trans*-11 foi o principal isômero *trans* observado na gordura das manteigas. Excetuando os isômeros C18:3 *iso*1 e C18:3 *iso*2, a inclusão de níveis crescentes de OS reduziu ($P < 0,01$) a concentração dos ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada. Levando-se em conta a qualidade nutracêutica da manteiga, os resultados foram satisfatórios, pois se observou aumento ($P < 0,01$) na participação dos AG mono, poliinsaturados e insaturados totais em 44, 54 e 43 % entre os tratamentos com adição de 0 e 4,5% de OS, respectivamente. Houve também a diminuição ($P < 0,01$) da proporção dos AG saturados em 25% (para as dietas com 0 e 4,5% de OS). A concentração de todos os isômeros de CLA aumentou linearmente ($P < 0,01$). Nos tratamentos com 0 e 4,5%, a concentração total de CLA se elevou na ordem de 361,5% (de 1,31 para 4,70 g/100 g). O isômero C18:2 *cis*-9 *trans*-11 representou, aproximadamente, 98% do total de CLA e aumentou 358,6% (de 1,28 para 4,59 g/100 g). Observou-se elevada correlação ($r^2 = 0,942$) entre o ácido vaccênico e o CLA C18:2 *cis*-9 *trans*-11 ($\hat{y} = 0,448x + 0,546$), entre a redução no teor de gordura no leite e o aumento da concentração do CLA C18:2 *trans*-10 *cis*-12 ($\hat{y} = -16,44x + 3,3$; $r^2 = 0,296$) e do CLA C18:2 *trans*-9 *cis*-11 ($\hat{y} = -10,41x + 3,49$; $r^2 = 0,397$). Com relação à composição do leite, observou-se que, apesar da manutenção do consumo de MS e da diferença de oferta de energia líquida de lactação entre os tratamentos (+ 0,06Mcal/kg MS à medida que se adicionou óleo), não houve ($P > 0,05$) efeito nem sobre a produção diária de leite nem sobre a produção diária corrigida para 3,5% de gordura. Esse menor aproveitamento energético pode ser explicado em parte pela menor degradabilidade ruminal tanto da MS quanto do FDN (segundo experimento). Já o teor e a produção diária de gordura reduziram linearmente ($P < 0,01$ e $P = 0,03$, respectivamente) provavelmente reflexo da considerável secreção dos isômeros de CLA C18:2 *trans*-10, *cis*-12 e C18:2 *trans*-9, *cis*-11, comprovadamente inibidores da secreção de gordura na GM. O teor de lactose diminuiu ($P = 0,02$) 0,15%, entre os tratamentos controle e com 4,5% de OS. Diferentemente do que prega a literatura, o teor de proteína do leite elevou ($P < 0,03$) os seus valores. O mesmo comportamento não foi observado na produção diária de proteína. Como informação inédita, houve a constatação de que existe diferença ($P < 0,05$) entre o perfil de AG do leite ordenhado na manhã e na tarde. O segundo experimento

da presente dissertação teve por objetivo avaliar o consumo de matéria seca, os parâmetros e a cinética ruminal de vacas alimentadas com dietas baseadas em capim-elefante picado como único volumoso e suplementadas com níveis crescentes de óleo de soja (OS) na MS (0; 1,5; 3,0 e 4,5%) em delineamento em Quadrado Latino 4x4. Foram utilizadas quatro vacas mestiças Holandês x Zebu fistuladas no rúmen, no terço inicial de lactação (90 ± 25 dias) e com produção média de $15,6 \pm 3,0$ kg de leite/dia. O consumo diário de MS não sofreu influência ($P > 0,05$) da adição de óleo de soja em níveis iguais ou inferiores a 4,5% da dieta (13,4; 13,8; 14,5 e 13,7 kg/dia ou 2,90; 3,02; 3,17 e 2,93 % PV/dia para os tratamentos com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente). Dentre os parâmetros de fermentação ruminal, somente a concentração ruminal de propionato e butirato e a concentração molar de butirato sofreram influência ($P < 0,05$) dos tratamentos. Haja vista a pequena influência dos diferentes tratamentos sobre o consumo de MS e os parâmetros ruminais, supõe-se que a adição de óleo de soja até o nível de 4,5% da MS pouco influenciou a população microbiana do rúmen. Essa suposição confronta com os resultados observados na digestibilidade *in situ*. Dentre os parâmetros de degradabilidade ruminal *in situ* da MS e da MO, tanto a taxa de degradação (c) (4,00; 3,32; 3,26 e 2,71%/h para a MS e 4,1; 3,5; 3,3 e 3,0 %/h para a MO para os tratamentos com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente) quanto a degradabilidade efetiva (DE) (35,09; 32,64; 33,54 e 31,04% para a MS e 42,26; 39,98; 40,31 e 39,13 % para a MO para os tratamentos com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente) reduziram seus valores com a adição de OS a um nível de significância de 7 e 10%, respectivamente. Dentre os parâmetros de degradabilidade ruminal *in situ* da FDN somente a degradabilidade efetiva (DE) sofreu influência ao nível de significância de 7% (23,19; 21,04; 22,21 e 19,46% para os tratamentos com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente). Nenhum dos parâmetros da cinética de fluxo da fase sólida ou líquida da dieta sofreu influência ($P > 0,05$) da adição de óleo de soja. Não houve interação entre os tratamentos e o tempo de amostragem em nenhum dos parâmetros observados.

Palavras-chave: Capim-elefante, CLA, óleo de soja, taxa de passagem, vacas mestiças.

ABSTRACT

This dissertation was composed of two distinct experiments, the objective of the first experiment was to evaluate the influence of the addition of four different levels of soybean oil (SO) (0, 1.5, 3.0 and 4.5% of dry matter, DM) in diets based on chopped elephant grass on the lipid composition of milk of twelve crossbred Holstein x Zebu cows with average production equal to 18.0 ± 4.6 kg/day of milk and mean body weight of 502.6 ± 47.8 kg. The cows were distributed in three 4x4 Latin Squares (LS). Each phase of the LS extended by 15 days, the first ten days for diet adaptation and the last five for collection of data and samples. We analyzed the fatty acids (FA) profiles of the food (elephant grass, concentrate and soybean oil) and the butter milk. The data presented showed that the concentrate FA composition was stable even seven days of air exposure. About the butter, the concentrations of short (C4 to C10), medium (C12 to C16) and saturated chain FA were reduced ($P < 0.01$). In contrast, the oil increased the concentration of C18:1 trans-11 ($P < 0.01$) and C18:1 trans-10 ($P < 0.01$) FA. There was an increase ($P < 0.01$) on the concentration of all 18C FA, saturated and monounsaturated. The oleic acid C18:1 cis-9 was the cis isomer and vaccenic acid C18:1 trans-11 the trans isomer with highest concentrations. Except for the isomers C18:3 iso1 and C18:3 iso2, the levels of branched-chain odd FA reduced ($P < 0.01$) expressively. The nutraceutical characteristics of the butter were

satisfactory, there was some increase ($P<0.01$) in the mono, polyunsaturated and total unsaturated FA (44, 54 and 43% between treatments with the addition of 0 and 4.5% of SO, respectively). There was also a decrease ($P<0.01$) in the proportion of saturated FA by 25% (for diets with 0 and 4.5% of SO). The concentration of all CLA isomers increased linearly ($P<0.01$). Between the treatments 0 and 4.5% of SO, the total concentration of CLA increased about 361.5% (from 1.31 to 4.70 g/100 g). The C18:2 cis-9 trans-11 isomer accounted for approximately 98% of total CLA and increased 358.6% (from 1.28 to 4.59 g/100 g). There was a high correlation ($r^2=0.942$) between the vaccenic acid and C18:2 cis-9 trans-11 CLA ($y = 0.448x + 0.546$), between the reduction of the milk fat content and the increasing concentration of C18:2 trans-10 cis-12 CLA ($y = -16.44x + 3.3$, $r^2=0.296$) and the C18:2 cis-9 trans-11 CLA ($y = -10.41x + 3.49$, $r^2=0.397$). The content and daily production of fat decreased linearly ($P<0.01$ and $P=0.03$, respectively). It probably reflects the considerable secretion of isomers of CLA C18:2 trans-10, cis-12 and C18:2 trans-9, cis-11, known inhibitors of secretion of fat in mammary gland. The lactose content decreased ($P=0.02$) 0.15%, between control and 4.5% of SO. Unlike the literature, the content of milk protein increased ($P<0.03$) their values. The same behavior was not observed in the daily production of protein. As new information, we observed that there is difference ($P<0.05$) between the FA profile in the milk milked in the morning and afternoon. The second experiment of this dissertation was made to evaluate the consumption of dry matter, the rumen parameters and gastrointestinal kinetic of cows fed diets based on chopped elephant grass supplemented with increasing levels of SO (0, 1.5, 3.0 and 4.5%) in a 4x4 Latin Square. We used four rumen fistulated crossbred Holstein x Zebu cows, in the initial fase of lactation (90 ± 25 days) and average production of 15.6 ± 3.0 kg of milk/day. The daily DM intake was not affected ($P>0.05$) for the soybean oil added at levels equal to or lower than 4.5% of the diet (13.4, 13.8, 14.5 and 13.7 kg/day or 2.90, 3.02, 3.17 and 2.93% BW/day for treatments with 0, 1.5, 3.0 and 4.5% for SO, respectively). Among the rumen fermentation parameters, only the concentration of ruminal propionate and butyrate and the molar concentration of butyrate were influenced ($P<0.05$) by treatments. Was observed small influence of different treatments on DM consumption and ruminal parameters, it seems that the addition of soybean oil up to 4.5% of the DM showed little influence at the microbial population of the rumen. This assumption confronted with the results observed in in situ digestibility. Among the parameters of in situ ruminal degradability of DM and OM, both the rate of degradation (c) (4.00, 3.32, 3.26 and 2.71%/h and 4.1 for MS, 3, 5, 3.3 and 3.0%/h for the MO for the treatments with 0, 1.5, 3.0 and 4.5% for OS, respectively) and effective degradability (ED) (35.09, 32.64, 33.54 and 31.04% for DM and 42.26, 39.98, 40.31 and 39.13% for the OM for the treatments with 0, 1.5, 3.0 and 4.5% for OS, respectively) reduced their values ($P<0.07$ and $P<0.10$, respectively) with the addition of SO. Among the parameters of NDF in situ ruminal degradability, only ED was affected ($P<0.07$) (23.19, 21.04, 22.21 and 19.46% for treatments with 0, 1.5, 3.0 and 4.5% for SO, respectively). None of the kinetic parameters of the liquid or solid phase flow was affected ($P<0.05$) of adding soybean oil. There was no interaction between treatments and time of sampling in any of the observed parameters.

Keywords: CLA, Napier Grass, soybean oil, passage rate, crossbred cows.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de lipídeos nas rações concentradas fornecidas na dieta já é prática comum em sistemas intensivos de produção de leite. Dentre outros fins, essa ferramenta é utilizada com o intuito de substituir parte do amido da dieta, aumentar a concentração energética e, mais recentemente, alterar a composição do leite. A sua adição, em alguns casos, acarreta redução do consumo de matéria seca e do teor de gordura do leite. Sendo esta última indesejável quando se pensa na remuneração do produtor através da qualidade e composição do leite.

Todos os componentes do leite estão sujeitos à manipulação, mas a perspectiva de se manipular a gordura a partir da nutrição objetiva atender à demanda dos consumidores de leites especiais e seus derivados, um nicho dentro mercado consumidor cada vez mais numeroso e preocupado com a qualidade lipídica do lácteo consumido.

Infelizmente, a gordura do leite tem sido listada como um dos fatores de risco na geração de doenças coronarianas devido ao seu alto conteúdo de ácidos graxos saturados de cadeia média. A modificação do perfil de ácidos graxos presentes na gordura do leite, de forma a reduzir o conteúdo de saturados e elevar o de poliinsaturados e do ácido linoléico conjugado (CLA), tem sido um dos principais focos de pesquisa tanto no campo, com a nutrição animal, quanto nas indústrias de alimentos lácteos.

A maior parte dos estudos envolvendo suplementação de dietas com fontes lipídicas vegetais tem usado como

volumoso forrageiras temperadas, geralmente conservadas pelos processos de ensilagem ou fenação. Os métodos de conservação de forragem levam à diminuição da concentração dos ácidos graxos poliinsaturados presentes nos tecidos vegetais devido à manutenção da atividade oxidativa respiratória celular, assim como, devido à atividade das enzimas e dos microrganismos. Esse fato justifica a utilização de forragens frescas e bem manejadas quando se busca a maximização dos ácidos graxos insaturados e de CLA na gordura do leite como na presente dissertação.

Na literatura, encontram-se poucos trabalhos com forrageiras tropicais objetivando melhorar a composição da gordura. Os poucos estudos sobre esse assunto conduzidos no Brasil com vacas em lactação ou usaram animais puros ou silagens como fontes de volumoso. Sendo assim, a presente dissertação torna-se pioneira ao apresentar dados gerados a partir da utilização de forrageira tropical e vacas mestiças.

Assim sendo, o presente experimento teve como objetivo estudar os efeitos da inclusão de níveis crescentes de óleo de soja numa dieta baseada em capim-elefante picado fornecido a vacas leiteiras mestiças. Foi estudada a ação dessa dieta sobre o consumo de matéria seca, a digestibilidade dos nutrientes, a produção, a composição e o perfil de ácidos graxos do leite, os parâmetros de fermentação ruminal e, finalmente, sobre a cinética das partículas sólidas e dos fluidos presentes no trato gastrointestinal.

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Técnicas de Avaliação dos Alimentos

O objetivo principal da avaliação de alimentos é permitir que haja otimização da sua eficiência de utilização, oferecendo respostas mais confiáveis em relação à resposta animal. Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas que caracterizem de forma precisa os alimentos é extremamente importante, uma vez que esses dados possibilitarão a formulação de dietas de acordo com às exigências dos animais de forma confiável e gerar respostas, em termos de desempenho, mais reais e precisas. A correta caracterização dos alimentos, associada à determinação adequada das exigências dos animais em nutrientes, é o ponto inicial para que a nutrição animal seja aplicada (BERCHIELLI, *et al.*, 2006).

2.2. Parâmetros Ruminais - pH, AGV e N-NH₃

As oscilações cíclicas ocorridas no pH ruminal são reflexo das atividades metabólicas do rúmen ao longo do dia. As variações ocorridas no pH são resultantes das mudanças na concentração de ácidos graxos voláteis (AGV), na quantidade de saliva produzida e na velocidade de absorção dos produtos finais da fermentação (OWENS e GOETSCH, 1988).

O pH pode afetar a degradação dos componentes da dieta em virtude das alterações ocorridas na atividade microbiana. Sabe-se que a degradação da celulose é inibida em pH menor ou igual a 6,0. Normalmente, há queda no pH ruminal quando se aumenta a quantidade de grãos ou se diminui a relação volumoso:concentrado da dieta. Com dietas à base de forragem, o pH se mantém estável

devido à digestão mais lenta das fibras e à sua ação mecânica na parede do rúmen, estimulando o reflexo da ruminação e de salivação. Esta, rica em tampões (CHAPAVAL *et al.*, 2008).

Devido à sua natureza fermentativa, os ruminantes absorvem uma fração muito pequena dos carboidratos (CHO) na forma de hexose (glicose). O principal produto da fermentação dos CHO são os ácidos graxos voláteis (AGV), cujos principais representantes são o acetato (Ac – 2C), propionato (Pr – 3C) e butirato (Bu – 4C), além dos ácidos graxos de cadeia ramificada presentes em menor quantidade (BERGMAN, 1973). Os AGV podem representar até dois terços da energia ingerida pelo animal. A maior parte dos AGV produzida no rúmen é absorvida através da parede do rúmen-retículo sob taxa de absorção variável. Eles atravessam a parede ruminal, entram na circulação sanguínea, para serem convertidos em energia nos tecidos (MARKANTONATOS *et al.*, 2008).

Em geral, quando se diminui a relação volumoso:concentrado, observa-se diminuição da proporção acetato:propionato. Essa proporção é utilizada para comparar e prever o valor nutritivo relativo das dietas. Em geral, quando se aumenta as concentrações de celulose e hemicelulose em relação às de carboidratos solúveis e amido na dieta observa-se aumento na proporção acetato:propionato (CHAPAVAL *et al.*, 2008)

A produção de AGV pela microbiota ruminal ocorre em taxas variáveis durante o dia. Ela é influenciada pela natureza da dieta e pelo padrão ou frequência de alimentação do animal (VAN SOEST,

1994). Uma tentativa de se caracterizar a natureza da fermentação pode ser feita através da medição da concentração de cada um dos AGV no rúmen.

Os AGV respondem por 60 a 70% do suprimento de energia metabolizável nos ruminantes, sendo, por isso, de grande importância na síntese de leite (VAN SOEST, 1994). Dos três principais, o Ac e Bu servem como substrato para oxidação, objetivando a produção de energia, e como precursores da lipogênese em ruminantes, contribuindo, também, como importantes fontes de energia de reserva. Já o Pr, é o único gliconeogênico, respondendo por 65 a 80% da produção líquida de glicose em vacas em lactação. Ele pode contribuir na produção de energia por ser o principal precursor da gliconeogênese, ou porque os ruminantes absorvem apenas pequena parte da glicose advinda do intestino delgado (SEYMOUR *et al.* 2005). O balanço entre o fornecimento de Pr gliconeogênico em relação de Ac e Bu não-gliconeogênicos influencia na eficiência de utilização de produção dos AGV (MACRAE e LOBLEY, 1982). Como resultado, a produção total de AGV, tanto a proporção molar quanto a concentração, podem funcionar como importantes indicadores da eficiência de utilização dos alimentos pelos ruminantes (MACRAE e LOBLEY, 1982; MARKANTONATOS *et al.*, 2008).

A avaliação quantitativa da produção dos três principais AGV originados da digestão e metabolismo dos componentes da dieta, principalmente os CHO, pode fornecer informações essenciais que permitem comparações precisas entre os diversos substratos presentes na dieta ou para a avaliação dos agentes capazes de alterar a fermentação ruminal. Tradicionalmente, tais avaliações envolvem a utilização de cromatografia gasosa e as técnicas *in vitro* e *in vivo* com a utilização de componentes radioativos (MARKANTONATOS *et al.*, 2008).

Modelos do metabolismo ruminal têm sido gerados com o objetivo de prever a concentração de AGV. No entanto, a relação precisa entre a concentração dos AGV ruminais e a produção de leite ainda é um mistério (SEYMOUR *et al.* 2005).

O nitrogênio (N) presente no rúmen é oriundo do nitrogênio não-proteico da dieta, da saliva na forma de ureia e das proteínas potencialmente fermentáveis no rúmen, tais como as proteínas dos alimentos, as proteínas endógenas da saliva, as células epiteliais de descamação e as estruturas microbianas lisadas. As proteínas constituem os principais compostos nitrogenados presentes nas forragens (VAN SOEST, 1994; MOTA, 2006).

O indicador da eficiência de utilização do N é a concentração de amônia ruminal (SATTER e ROFFLER, 1975; MOTA, 2006), visto que, aproximadamente 60 a 80% do N incorporado pelos microrganismos advém dela.

Segundo MINSON (1990), para que haja funcionamento do rúmen sem comprometimento das atividades microbianas básicas, é necessário que haja ao menos 7% de proteína bruta (\approx 1% de N) na matéria seca (MS) ruminal. SATTER e SLYTER (1974) recomendam manter a concentração ruminal de amônia superior a 5 mg/dL para que a degradabilidade ruminal da MS se mantenha em níveis aceitáveis. A disponibilidade de N no rúmen, assim como de outros nutrientes, não deve ser limitante para a fermentação. O teor de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) é consequência do equilíbrio entre sua produção e utilização pelos microrganismos, e esta última depende da quantidade de energia disponível (BORGES, 1999). Portanto, as exigências nutricionais de N degradável no rúmen têm sido expressas em função da energia disponível, utilizando a relação de 32 g de

N/kg matéria orgânica fermentável da dieta (ARC, 1980). Segundo RODRIGUEZ (1986), existe um ponto de saturação dos sistemas enzimáticos das bactérias, a partir do qual há perda de N sob a forma de amônia.

Níveis de N disponíveis no rúmen, superiores aos valores mínimos exigidos para que haja síntese microbiana, têm efeitos positivos sobre o consumo e fermentação ruminal, especialmente em dietas baseadas em forragens. LENG (1990) sugeriu valores de 10 mg de N-NH₃/100 mL de fluido ruminal para máxima fermentação de forragens de baixa qualidade, e para que não haja influência negativa sobre o consumo das mesmas.

A suplementação com concentrados energéticos tem efeito consistente na fermentação ruminal e proporciona redução da concentração de N-NH₃. A redução da amônia ruminal pode estar associada com a elevada captura de N-NH₃ originada da fração proteica de alta degradabilidade ruminal presente nas pastagens (SAYERS, 1999; BARGO *et al.*, 2002; REIS e COMBBS, 2002; MOTA, 2006). A concentração do N-NH₃ ruminal eleva-se com suplementação com farelo de soja ou qualquer outro ingrediente rico em proteína degradável no rúmen (SAYERS, 1999; MOTA, 2006)

2.3. Determinação da Degradabilidade no Rúmen

2.3.1. Degradabilidade ruminal *in situ*

A técnica do saco de nylon ou degradabilidade *in sacco* ou ruminal *in situ*, é amplamente utilizada para estimar a degradabilidade dos componentes das forragens MS, MO, FDN, FDA) durante a fermentação no rúmen. Ela possibilita uma estimativa rápida e simples da degradação dos nutrientes no rúmen, além de permitir

acompanhamento da degradação ao longo do tempo (MEHREZ e ØRSKOV, 1977). A técnica baseia-se no desaparecimento de amostras de alimentos acondicionadas em sacos confeccionados em material sintético não degradável no rúmen, isento de N, incubados no rúmen por diferentes períodos de tempo.

As principais vantagens dessa técnica estão no fato do processo de degradação ocorrer em condições reais do rúmen, ser de rápida e fácil execução, da necessidade de pequenas quantidades de alimentos e pelo fato de permitir o contato íntimo entre o alimento testado e o ambiente ruminal. Por esses motivos, segundo VERITÉ *et al.* (1990) citado por LEOPOLDINO (2000), é considerada a técnica ideal para simular o ambiente ruminal dentro de determinado regime alimentar, apesar de não sofrer os efeitos da mastigação, da ruminação nem do escape ruminal. Outra limitação, segundo esses autores, é que as correlações obtidas entre os estudos *in vivo* e *in situ* normalmente não são elevadas. As razões para isto vão desde a falta de padronização da técnica *in situ* até erros na medição do fluxo da digesta (AFRC, 1995).

No momento da adoção do método, alguns fatores devem ser observados para que os erros sejam minimizados. Um aspecto importante é a qualidade e a porosidade dos sacos de nylon. Deve-se utilizar sacos com porosidade adequada que permita a entrada dos microrganismos no seu interior para que haja a degradação do alimento, remoção dos produtos finais da degradação e redução das perdas de amostras não-degradadas, normalmente na faixa de 45 a 50µm (VAN HELLEN e ELLIS, 1977 citado por BERCHIELLI *et al.*, 2006). A determinação do número de horários de incubação dependerá do tipo de alimento a ser avaliado. Para os alimentos de rápida digestão, como os suplementos energético-proteicos os tempos 2, 6, 12, 24 e 36 horas permitem formação adequada da curva de

degradação. Já alimentos fibrosos, requerem tempos de incubação mais prolongados (ØRSKOV *et al.*, 1988).

Os sacos devem apresentar livre movimentação dentro do rúmen, permitindo a entrada de líquido ruminal no seu interior, de forma que todas as amostras possam ser adequadamente colonizadas e possibilitar as trocas entre os fluidos internos e externos ao saco. Para se determinar a quantidade de amostra a ser incubada, deve-se levar em conta a quantidade de resíduo pós-incubação que permanece no saco, para que seja possível fazer as determinações laboratoriais. NOCEK (1988) citou a relação 10 a 20 mg/cm² quando se utilizam forragens e concentrados, respectivamente. Com relação ao tamanho das partículas, o ideal é que as amostras sejam moídas de forma a representar o processo mastigatório do animal, porém, na maioria das vezes esse objetivo não é alcançado. ØRSKOV *et al.* (1988) recomendaram moagem em peneira com malha de 5mm quando se trabalha com forragens verdes, úmidas ou ensiladas.

Nos resíduos não-digeridos, analisam-se os nutrientes de interesse, de modo a permitir o cálculo de suas percentagens cumulativas de desaparecimento em cada tempo de incubação. Estes dados finais são então ajustados a equações matemáticas visando à estimativa de parâmetros da cinética de degradação ruminal (AFRC, 1995; NRC, 2001). Esses ajustes são importantes em sistemas de avaliação de alimentos e de predição de desempenho, são ferramentas auxiliares na comparação nutricional qualitativa de alimentos e na de tipos específicos de processamentos, na sincronização da degradação de componentes dietéticos proteicos e energéticos visando à otimização da fermentação microbiana (ØRSKOV *et al.*, 1980).

Vários são os modelos matemáticos disponíveis para calcular o ajuste das curvas de desaparecimento de nutrientes em função do tempo de incubação (SAMPAIO, 1997). Os cálculos, embora de resolução complexa, foram considerados aceitáveis, visto as atuais facilidades advindas do uso generalizado de computadores e *softwares* (LÓPEZ *et al.*, 1999; LOPES, 2002).

O modelo não-linear exponencial proposto por MEHREZ e ØRSKOV (1977) e modificado por SAMPAIO (1988) é de relativa simplicidade, além de dispor de banco de dados consistente e abrangente. A expressão matemática do modelo é:

$$\text{Deg (t)} = (A - B * e^{-c * t})$$

para $t > L$

Onde:

Deg (t) = porcentagem de degradação acumulada no tempo t de incubação ruminal;

A (%) = interseção da curva de degradação quando $t = 0$, que representa a fração potencialmente degradável;

B (%) = degradabilidade potencial do material que permaneceu no saco após o tempo zero e que será degradado pela ação da microbiota, se não houvesse *lag-time* ou tempo de colonização (L, horas);

c (%/hora) = taxa constante de degradação da fração potencialmente degradável (B) por ação da microbiota;

t = tempo de incubação;

Os tempos de colonização ou *lag time* (L) podem ser calculados conforme relatado por FIGUEIRA (1991), sendo que, posteriormente, e quando necessário, os parâmetros da equação (SAMPAIO, 1988) devem ser novamente estimados sem os dados referentes aos tempos de incubação inferiores ao *lag-time* calculado.

As determinações das degradabilidades efetivas (DE, %) podem ser feitas de acordo com o modelo proposto

por ØRSKOV e MCDONALD (1979), qual seja:

$$DE = S + ((B1*c)/(c + k_1)),$$

Onde:

S (%) = fração solúvel mais partículas com tamanho reduzido que atravessam os poros do nylon;

B1 (%) = fração potencialmente degradável por ação da microbiota (A – S);

k₁ (%/hora) = taxa de passagem ruminal, estabelecida segundo recomendações do ARC... (1984).

2.3.2. Digestibilidade *in vitro*

A eficiência de qualquer técnica *in vitro* de avaliação de alimentos depende da capacidade de se reproduzirem os eventos e processos químicos que estão presentes no rúmen-retículo, abomaso e intestino dos animais para estimar quantitativamente a taxa e grau de digestão similares aos obtidos *in vivo* (VAN SOEST, 1994). Para isso, tais métodos têm sido utilizados e aperfeiçoados, visando à maior precisão com relação aos resultados *in vivo*. Resultados estes, considerados os mais confiáveis, apresentando, entretanto, certos inconvenientes, como o requerimento de grandes quantidades de alimentos e número alto de repetições, elevando o custo da técnica. Isso faz com que haja procura maior por métodos *in vitro*, que proporcionam avaliação da digestibilidade a baixo custo e curto prazo (BERCHIELLI *et al.*, 2006).

VAREL e KREIKEMEIER (1995) compararam os métodos *in vitro* e *in situ* e observaram diferenças nos resultados obtidos para o tempo de colonização (*lag time*), taxa e extensão de digestão. Os autores atribuem as diferenças entre os métodos à menor concentração microbiana presente na técnica *in vitro*, quando comparada à presente no rúmen do animal.

2.4. Taxa de Passagem da Fração Sólida

A taxa de passagem do alimento afeta diretamente a utilização de nutrientes. Por isso, o conhecimento da dinâmica de fluxo dos diferentes componentes da digesta no rúmen-retículo é de fundamental importância em modelos de nutrição de ruminantes, que busquem previsões acuradas de relacionamento entre dieta, suprimento de nutrientes e performance animal específica (OFFER e DIXON, 2000). Esses autores discutiram que uma característica comum aos modelos de função ruminal, diz respeito ao sistema de previsão das cinéticas de degradação dos componentes dietéticos, visando à estimativa do suprimento de nutrientes para os microrganismos, bem como a quantificação do suprimento de nutrientes não degradados (escape) para o intestino.

A excreção fecal de partículas marcadas segue uma curva regular e matematicamente simples. Estas curvas tiveram diferentes interpretações biomatemáticas com o passar do tempo, mas a expressão exponencial bicompartimental de GROVUM e WILLIAMS (1973) tem sido a preferida. Estes autores introduziram partículas marcadas com ¹⁴⁴Ce em diferentes sítios do TGI em diferentes experimentos, e propuseram:

k₁ = taxa de passagem pelo rúmen-retículo (RR);

k₂ = taxa de passagem pelo ceco e cólon terminal;

t₁ – t₀ = tempo de trânsito no omaso, intestino delgado (ID) e parte do intestino grosso (IG).

Incrementos de consumo resultaram no aumento de k₁ e k₂ como observaram BLAXTER *et al.* (1956) citado por ALLEN e VOELKER LINTON (2007), mas o efeito

foi maior sobre k_2 . ELLIS e MATIS (1979) citado por ALLEN e VOELKER LINTON (2007) baseados nos resultados de BLAXTER *et al.* (1954), assumiram que o compartimento de mistura dominante era o rúmen e que outros compartimentos pós-gástricos eram de menor importância, aplicado cinética tempo-dependente para k_1 (rápida).

GROVUM e WILLIAMS (1973) usaram o modelo proposto por BRANDT e THAKER (1958) considerando os dois termos exponenciais como compartimentos de mistura e o terceiro compartimento, tubular, como tempo de trânsito.

$$Y = A e^{-k_1(t-TT)} - A e^{-k_2(t-TT)} \quad \text{para } t \geq TT,$$

$$Y = 0 \quad \text{para } t < TT,$$

Y = concentração fecal do indicador no tempo t;

A = não tem significado biológico (apenas matemático) e corresponde à intercepta das duas retas obtidas pelas regressões usadas para calcular k_1 e k_2 .

k_1 = taxa fracional de passagem pelo rúmen-retículo, sendo o tempo de retenção no RR = $1/k_1$ = TRR;

k_2 = taxa fracional de passagem no ceco e colo proximal, sendo o tempo de retenção no CC = $1/k_2$ = TRC;

TT = Tempo de trânsito através do omaso, abomaso, intestino delgado e grosso ou ao tempo transcorrido desde a dosificação até o primeiro aparecimento do indicador nas fezes.

t = tempo transcorrido após administração do indicador.

O tempo total do trânsito no TGI = TRR + TRC + TT

O uso deste sistema de equações exponenciais parece válido, embora pudesse admitir outro compartimento de mistura, o abomaso. Isto estaria aparentemente incluído em k_1 . GROVUM e WILLIAMS (1973) mostraram que k_1 e k_2

são negativamente correlacionadas e que na medida em que se aumenta o concentrado na dieta, aumenta o tempo de retenção do material fibroso no compartimento tubular.

2.5. Taxa de Passagem da Fração Líquida

Os indicadores utilizados na verificação da dinâmica da fração líquida do conteúdo ruminal são usados não só em estudos de digestibilidade, como também nos estudos de balanço hídrico e de determinação do volume ruminal. Para estimativa deste parâmetro, determinada quantidade do indicador é introduzida no rúmen e o volume é calculado a partir da concentração do indicador depois da sua difusão uniforme no líquido ruminal (UDÉN *et al.*, 1980).

Segundo UDÉN *et al.* (1980), um dos primeiros pesquisadores a utilizar indicadores da fase líquida foi HYDEN *et al.* (1961). Ele criou um modelo matemático que objetivava estudar os movimentos hídricos ruminais, valendo-se do polietileno glicol (PEG). Todavia, além das implicações relativas ao seu peso molecular, ele se precipita com os taninos, cuja concentração é alta em forrageiras tropicais. A partir da observação de tais características indesejáveis, esses autores buscaram outros indicadores, sendo o quelato de cobalto com ácido etileno-diamino-tetracético trihidratado (Co-EDTA.3H₂O) o que melhor se destacou.

Para ajuste aos dados das concentrações de cobalto nas amostras de líquido ruminal COLUCCI (1984) utilizou o seguinte modelo exponencial unicompartmental:

$$Y = A * e^{-k*t}$$

Onde:

Y (ppm) = concentração do indicador no tempo t;

A (ppm) = concentração do indicador no tempo zero;

k (/h) = taxa constante de diluição ou taxa de passagem da fase líquida no rúmen.

2.6. O Capim-Elefante

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumack) é uma gramínea originária da África tropical, perene, com hábito de crescimento cespitoso e, por utilizar a via C₄, possui elevada capacidade fotossintética. Ele tem se destacado entre as forrageiras mais utilizadas nos sistemas intensivos de produção de leite no Brasil em decorrência do seu potencial produtivo e da sua qualidade bromatológica, sendo capaz de apresentar elevadas produções de forragem quando devidamente adubado e manejado (COSER *et al.*, 2001).

De modo geral, os requisitos nutricionais para vacas de alta produção ultrapassam os níveis de nutrientes encontrados nas forrageiras tropicais, principalmente aqueles relacionados à energia metabolizável e proteína digestível. Pesquisas mostram que o capim-elefante, cortado com 60 dias de idade, fornece nutrientes apenas para a manutenção das vacas e produção, por dia, de cinco a seis quilogramas de leite por vaca (DERESZ *et al.* 1997). Já o capim cortado com 45 dias de idade, fornece nutrientes para manutenção e produção de leite em torno de sete quilogramas por dia, utilizando-se como base as exigências do NRC (2001). Entretanto o capim cortado com 30 dias, apesar da baixa produção de matéria seca por área, apresenta melhor qualidade bromatológica em relação aos outros cortes, além de um maior número de ciclos de corte durante o ano (SOARES, 2002). Sendo assim, para que um sistema de alta produção leiteira seja viável a partir da utilização dessa forrageira, torna-se necessário lançar mão da suplementação energético-proteica, contudo, isso resulta

em aumento do custo de produção do sistema.

A composição fibrosa do capim-elefante permite que o pH ruminal se mantenha em valores próximos à faixa considerada ótima para a absorção de ácidos graxos voláteis (AGV) e à atividade dos microrganismos celulolíticos, principais responsáveis pela biohidrogenação lipídica no rúmen (LOPES, 2002).

Em dietas contendo capim-elefante, a utilização de suplementos para vacas em lactação normalmente está associada a benefícios ruminais, dentre eles, o aumento da produção molar de propionato. Entretanto, o seu uso deve ser monitorado criteriosamente, visando evitar eventuais quedas no pH que induzam prejuízos à degradação da fração fibrosa do capim-elefante (LOPES e AROEIRA, 1998) e redução no teor de gordura do leite.

2.7. Lipídeos

Os lipídeos formam um grupo de substâncias químicas com funções biológicas extremamente variadas. As gorduras e os óleos são as principais formas de armazenamento de energia nos animais vertebrados e em grande parte das espécies de plantas. Os fosfolipídeos e esteróis são os principais elementos estruturais das membranas biológicas. Outros lipídeos, apesar de presentes em quantidades relativamente pequenas, participam de forma crucial nos organismos, como cofatores enzimáticos, carreadores de elétrons, pigmentos absorvedores de luz, regiões hidrofóbicas de proteínas, agentes emulsificantes do trato digestivo, hormônios, mensageiros intracelulares, entre outros (NELSON e COX, 2006).

Segundo o NRC 2001, gordura é um termo genericamente utilizado para descrever compostos que possuem alto conteúdo de

AG incluindo triglicerídeos, fosfolípidos, ácidos graxos (AG) não esterificados e sais de AG de cadeia longa. Os AG são ácidos carboxílicos com comprimento de cadeia carbônica variando entre 4 e 36 carbonos. Em alguns, essa cadeia pode ser linear e completamente saturada, enquanto em outros, pode ser ramificada e conter várias insaturações.

Em animais vertebrados, os AG livres (AG não-esterificados, com um grupo carboxilato livre) podem circular pela corrente sanguínea ligados não covalentemente a carreadores proteicos como a soroalbumina e as apoproteínas C e E. No entanto, eles estão presentes no plasma principalmente na forma de derivados do ácido carboxílico como os ésteres ou amidas.

Os derivados lipídeos de construção mais simples são os trigliceróis, também conhecidos por triglicerídeos (TG), gorduras ou gorduras neutras. Os triglicerídeos são compostos por três AG unidos via ligações ésteres a uma única molécula de glicerol. O TG que contém o mesmo tipo de AG em todas as três posições é chamado de TG simples.

Na maioria das células eucarióticas, os TG estão contidos em pequenos glóbulos livres no citosol que têm a função de agir como reserva de energia. Nos vertebrados, os adipócitos armazenam em gotículas, em certos momentos, em quantidade suficiente para preencher a célula por completo. Nas plantas, os TG também são armazenados para servir como fonte de energia e precursores metabólicos em sementes em fase de germinação. Tanto os adipócitos quanto as sementes em germinação contêm lipases que catalizam a hidrólise dos TG armazenados, liberando AG para os locais onde haja demanda de energia.

Há duas vantagens em se usar TG, ao invés de polissacarídeos, como glicogênio e

amido, como fonte de energia. Primeiro, porque os átomos de carbono dos AG são mais reduzidos do que os dos açúcares, ou seja, a oxidação dos AG produz pouco mais que duas vezes (2,25) a energia da queima dos carboidratos. Segundo, porque as moléculas de TG são hidrofóbicas e, portanto, desidratadas. Sendo assim, o organismo que carrega gordura como combustível não necessita carregar peso extra de água, normalmente associada com os polissacarídeos (cerca de 2 g/g de polissacarídeo) (NELSON e COX, 2006).

2.7.1. Os Óleos Vegetais

Os azeites e óleos são gorduras líquidas provenientes das reservas vegetais armazenadas em frutos e sementes. Os azeites são obtidos por pressão e os óleos são obtidos por pressão, solventes e posterior purificação e refinação. A qualidade de um óleo e o fim que lhe é dado depende da sua composição de AG. Por exemplo, os óleos para fritura devem possuir alto grau de estabilidade oxidativa em temperaturas elevadas, apresentando em sua composição elevado teor de ácido oleico C18:1 *cis-9*.

No caso da alimentação animal, deve-se levar em conta o objetivo pelo qual irá se utilizar a suplementação lipídica. Caso seja o aumento da concentração energética da dieta, devem-se usar gorduras saturadas, protegidas ou não. Se o objetivo é a produção de gordura do leite com altos níveis de AG insaturados, em especial o *trans-11* C18:1, linoleico C18:2 e linoleico conjugado, deve-se usar fonte de óleo rica em seus precursores, ou seja, o ácido linoleico C18:2 *cis-9 cis-12* e o ácido α -linolênico C18:3 *cis-9 cis-12 cis-15* (BAUMAN et al., 1999).

2.8. Utilização de Lipídeos na Suplementação Dietética de Ruminantes

A suplementação com gordura, tanto de origem vegetal quanto animal, tem sido utilizada na dieta de ruminantes, entre outros motivos, devido ao seu alto valor calórico, aproximadamente 2,25 vezes mais energia por unidade de massa do que em relação aos carboidratos. Esse fato permite incremento da densidade energética das dietas e do consumo de energia sem aumento concomitante no fornecimento de amido. Entretanto, essa afirmação só é verdadeira se o consumo de MS for mantido próximo das dietas sem adição de gordura.

A suplementação lipídica também evita a diminuição da digestibilidade da fibra causada pelas dietas ricas em CHO rapidamente fermentáveis, limita a ocorrência de acidose ruminal, elimina o pó e facilita a peletização (quando < 2%) durante a fabricação de rações, ajuda a eliminar o H₂ do ambiente ruminal, gera baixa quantidade de calor durante a sua digestão, diminuindo a incidência de estresse térmico em vacas leiteiras de alta produção, minimizam os problemas associados ao déficit energético no puerpério, além de poder alterar a concentração de determinados ácidos graxos (AG) da gordura do leite, tornando mais interessantes ao consumo humano. (CHILLIARD, 1993; PALMQUIST, 1994; NRC, 2001; BAUMAN *et al.*, 2003; STAPLES, 2006).

Vários trabalhos também observaram aumento na eficiência alimentar de vacas alimentadas com gordura. Uma das razões para esse aumento seria a redução da síntese de gordura do leite (SCHAFHÄUSER JR, 2005).

Dentre as desvantagens observadas, há uma tendência à diminuição da proteína e da gordura do leite (WU e HUBER, 1994), da digestibilidade da fibra e da ingestão de MS quando em concentrações acima de 5% da

MS da dieta (BEAM *et al.*, 2000; NRC, 2001; BAUMAN *et al.*, 2003).

2.9. Metabolismo de Lipídeos no Rúmen

O rúmen da vaca leiteira funciona como barreira impedindo que os AG insaturados alcancem o intestino delgado (ID). As duas principais transformações por que passam os AG da dieta no rúmen são a lipólise e a biohidrogenação (BEAM *et al.*, 2000; NRC 2001; JENKINS *et al.*, 2008).

2.9.1. A Lipólise

Assim que os lipídeos presentes na dieta alcançam o rúmen, ocorre extensa hidrólise das ligações ésteres dos triglicerídeos, fosfolipídeos e glicolipídeos pelas enzimas lipolíticas (lipases) microbianas. Esse passo é pré-requisito para que ocorra a biohidrogenação dos AG insaturados (BAUMAN *et al.*, 2003).

Em sistemas de produção a pasto, o perfil dos lipídeos que chegam ao rúmen é reflexo da grande quantidade de cloroplastos presentes nas folhas das forragens. Eles são compostos por galactolipídeos (mono e digalactosildiglicerídeos), sulfolipídeos (sulfoquinovosildiglicerídeos) e fosfolipídeos (principalmente, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol e fosfatidiletanolamina) ricos em ácido α -linolênico (18:3; *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15). A hidrólise desses ésteres de lipídeos é atribuída a uma grande variedade de galactosidases e fosfolipases produzidas pelas bactérias ruminais (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1988; JENKINS, 1993; DRACKLEY, 2000).

Em dietas ricas em grãos de oleaginosas ou concentrados com adição de óleo vegetal, os principais lipídeos presentes são, normalmente, os triglicerídeos ricos em ácido linoleico (18:2; *cis*-9, *cis*-12). AG

insaturados como os apresentados, são susceptíveis a alterações durante o processo de estocagem e de armazenamento.

A hidrólise dos lipídeos presentes na dieta é causada predominantemente pelas bactérias ruminais, havendo pouca influência dos protozoários ciliados, fungos, saliva ou lipases presentes nas plantas (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1988; BAUMAN *et al.*, 2003).

As lipases, produzidas principalmente pelas bactérias *Anaerovibrio lipolytica* e *Butyrivibrio fibrisolvens*, são enzimas extracelulares capazes de hidrolizar por completo os acilglicerois a AG livres mais glicerol, com pequena produção de mono e diglicerídeos. O glicerol é rapidamente fermentado, produzindo, principalmente, propionato (JENKINS, 1993).

2.9.2. A Biohidrogenação

HARFOOT e HAZLEWOOD (1988) definem a biohidrogenação (BH) como processo de conversão dos AG insaturados a saturados, via hidrogenação das duplas ligações, tendo como produtos intermediários, AG *trans* (Figuras 2.9.2.1.1.1 e 2.9.2.1.1.2).

Os principais substratos são os ácidos linoleico (18:2 *cis*-9, *cis*-12) e α -linolênico (18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15), abundantes nos pastos e em outros alimentos presentes na dieta de ruminantes. A taxa de BH aumenta com o grau de insaturação dos AG (BEAM *et al.*, 2000), mas diminui quando há fornecimento de dietas ricas em concentrado. Isso ocorre devido à queda do pH ruminal e, conseqüentemente, à inibição da lipólise microbiana (BAUMAN *et al.*, 2003).

2.9.2.1. Microrganismos Envolvidos na Biohidrogenação

2.9.2.1.1. Bactérias

As bactérias ruminais envolvidas com a BH são divididas em dois grupos (A e B) baseadas em suas ações metabólicas (KEMP e LANDER, 1984). Para que haja BH completa dos AG poliinsaturados da dieta, torna-se necessária a ação de ambos os grupos. O grupo A, composto exclusivamente por bactérias produtoras de butirato e cujo principal membro é o *Butyrivibrio fibrisolvens*, é mais eficiente em hidrogenar os AG poliinsaturados a CLA C18:2 *cis*-9 *trans*-11 e ácido esteárico C18:1 *trans*-11, por ser numericamente muito superior ao grupo B. Este grupo é composto principalmente de *Fusocillus* spp. e *Clostridium proteoclasticum*, e utilizam C18:1 *trans*-11 como substrato para a produção do ácido esteárico C18:0 (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1988; JENKINS, 2008).

A cascata de reações ocorridas durante o processo de BH explica porque o aumento da concentração de AG poliinsaturados na dieta causa simultaneamente incremento na concentração de monoinsaturados e diminuição na concentração de saturados no rúmen (Figura 2.9.2.1.1.1) (FELLNER *et al.*, 1995).

O primeiro passo do processo de BH ruminal é a isomerização das duplas ligações *cis*-12 a *trans*-11, resultando em AG conjugado di ou trienoico, seguida da hidrogenação das duplas ligações *cis*-9, formando o ácido *trans* vaccênico (TVA) C18:1 *trans*-11. O passo final consiste na hidrogenação das duplas ligações *trans*-11 produzindo o ácido esteárico C18:0 ou C18:1 *trans* ou *cis*-15 (Figura 2.9.2.1.1.1) (KHANAL e DHIMAN, 2004).

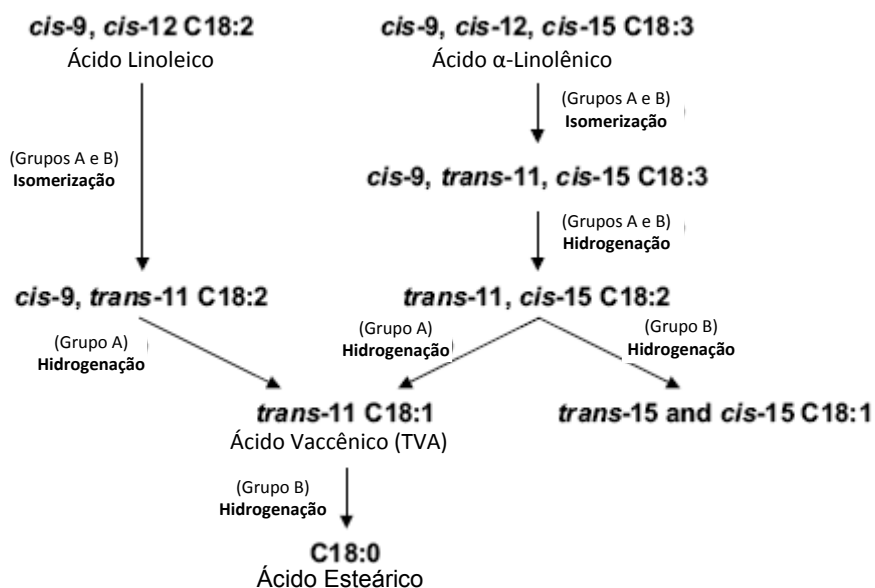


Figura 2.9.2.1.1.1. Metabolismo dos ácidos linoleico e α -linolênico no rúmen em pH normal.
Fonte: Adaptado de KHANAL e DHIMAN, 2004

Alguns suplementos dietéticos, como o óleo de peixe e outras fontes de AG poliinsaturados, parecem inibir o último passo da BH, causando aumento do fluxo de AG C18:1 *trans* e redução do fluxo de ácido esteárico para fora do rúmen (SHINGFIELD *et al.*, 2003), além de reduzir os teores de gordura do leite. Isso ocorre devido à ação deletéria desses lipídeos sobre grupo B de bactérias (BAUMAN *et al.*, 2003).

BEAM *et al.* (2000), conduziram cinco experimentos com o objetivo de identificar fatores que influenciam a taxa de lipólise e BH dos AG no rúmen. Eles verificaram que a taxa de lipólise do óleo de soja declinava de 44%/h para menos de 30%/h quando se aumentava a adição de óleo de 2 para 10% na MS da dieta. A taxa média de BH dos AG C18:2 foi de 14,3%/h, e declinou 1,2%/h a cada unidade percentual de C18:2 adicionada à dieta. Comparado com o AG C18:2, as taxas de BH do C18:1 eram menores (3,6%/h em média) sejam quais fossem as fontes de lipídio. Em vacas leiteiras alimentadas com óleo vegetal,

observaram-se perdas dos AG C18:1, C18:2 e C18:3 entre o rúmen e o duodeno iguais a 78, 83 e 94%, respectivamente. A taxa de BH é maior quanto maior é o grau de insaturação da cadeia carbônica dos AG.

Baseado nesses achados, concluiu-se que altas concentrações de ácido linoleico C18:2 na dieta tendem a reduzir a taxa de BH e aumentar o fluxo pós-ruminal desse AG. Isso se deve à inibição competitiva entre as enzimas isomerase e os AG insaturados de cadeia longa. A linoleato isomerase isolada de bactérias *Butyrivibrio fibrisolvens* foi inibida por AG insaturados com cadeias com mais de 16 C.

2.9.2.1.2. Fungos e Protozoários

Numa revisão recente sobre biohidrogenação de AG em ambiente ruminal, JENKINS *et al.* (2008) apresentaram trabalhos mostrando que a taxa de biohidrogenação ruminal de AG poliinsaturados não é diferente entre grupos de animais isentos de protozoários ruminais

e grupos de animais normais. Já os fungos, por serem numericamente inferiores e metabolicamente menos ativos que as bactérias, apresentam pouca influência sobre o processo de metabolismo de ácidos graxos.

2.9.2.2. Biohidrogenação sob Baixo pH Ruminal

Dietas ricas em CHO rapidamente fermentáveis e pobres em fibra tendem a reduzir o pH ruminal e, como consequência,

alterar a população microbiana. Essa alteração de pH causa redução numérica drástica nos grupos A e B de bactérias e selecionam espécies resistentes ao ambiente ácido como a *Megasphaera elsdenii* (KIM *et al.*, 2002). As bactérias acidófilas alteram o caminho metabólico da biohidrogenação direcionando para a síntese do AG C18:1 *trans*-10 e para o CLA C18:2 *trans*-10, *cis*-12, este último, conhecido por reduzir o teor de gordura do leite (Figura 2.9.2.1.2.1) (BAUMAN *et al.*, 1999; BAUMGARD, 2002).

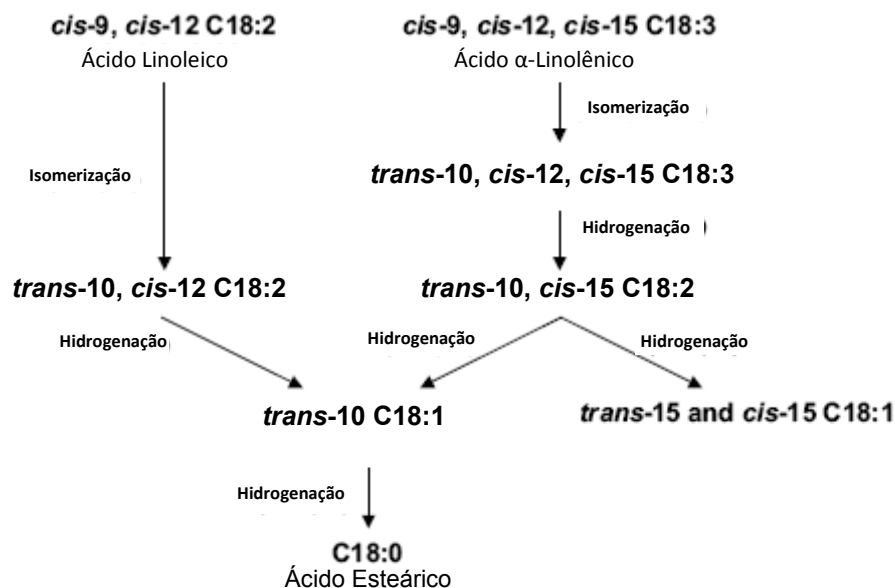


Figura 2.9.2.1.2.1: Metabolismo dos ácidos linoleico e α -linolênico no rúmen em pH baixo. Fonte: Adaptado de KHANAL e DHIMAN, 2004

2.10. O Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

O Ácido Linoleico Conjugado (CLA) é uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico C18:2 *cis*-9, *cis*-12, apresentado duas duplas ligações insaturadas conjugadas em distintas conformações pela cadeia carbônica. Cada

dupla ligação pode ser *cis* ou *trans* (BAUMAN *et al.*, 1999).

O CLA é um produto intermediário do processo de biohidrogenação do ácido linoleico e α -linolênico no rúmen pelas bactérias ruminais (grupos A e B), tendo o *Butyrivibrio fibrisolvens* como principal representante (Figura 2.9.2.1.1.1). Ele também pode ser sintetizado a partir da

conversão endógena do ácido vaccênico C18:1 *trans*-11 a CLA C18:2 *cis*-9, *trans*-11 pela enzima Δ^9 -desaturase presente na glândula mamária e nos adipócitos (BAUMAN *et al.*, 1999)

Há interesse crescente no estudo do CLA devido aos seus potenciais benefícios à saúde humana. Já foram observadas ações antiaterogênicas, antidiabéticas e antiadipogênicas e suspeita-se da existência de ação sobre o metabolismo da vitamina A, ossificação e resposta imune (BELURY *et al.*, 2003; PARIZA *et al.*, 2000).

Dentre os isômeros fisiologicamente importantes, o C18:2 *cis*-9, *trans*-11 é o mais prevalente na gordura do leite de vaca, representando entre 80 e 90% do total de CLA, seguido pelo C18:2 *trans*-10, *cis*-12 representando entre 3 e 5% do total (PARODI, 1999).

Sabe-se que, em dietas ricas em AG, tanto o teor de CLA na gordura do leite quanto os seus isômeros variam com o tempo (BAUMAN *et al.*, 2000; ABUGHAZALEH *et al.*, 2004; ROY *et al.*, 2006; SHINGFIELD *et al.*, 2006a), a partir da fonte de AG oferecida (DHIMAN *et al.*, 2000) e entre indivíduos (BAUMAN *et al.*, 2000; SHINGFIELD *et al.*, 2006a).

2.11. Efeitos da Adição de Lipídeos Sobre a Fermentação Ruminal

O atual interesse pela utilização de suplementos lipídicos como fonte alternativa de energia na nutrição de ruminantes tem estimulado a utilização de vários tipos de ingredientes. Esse fato permitiu observar efeitos diversos sobre a fermentação ruminal.

As diferentes ações dos lipídeos sobre a fermentação ruminal são normalmente atribuídas a particularidades presentes nas suas estruturas, como o tipo de grupo

funcional presente e o grau de insaturação da sua molécula. Sabe-se que os AG insaturados inibem mais a fermentação ruminal que os saturados (MACZULAK *et al.*, 1981; JENKINS, 1993; CHALUPA, 2005). Nesse mesmo contexto, sabe-se que alguns derivados lipídicos como os sais de Ca, acil amidas e os triglicerídeos, inibem menos a fermentação se comparado aos AG livres.

Baseadas nessas informações, as indústrias de alimentos para animais desenvolveram produtos comerciais como os sais de Ca de AG de cadeias longas, lipídios ricas em AG saturados e gorduras protegidas por encapsulação, capazes de reduzir ou eliminar os problemas relativos à fermentação e digestão dos ruminantes.

AG de cadeia curta e média normalmente são transformados em AGV, que podem ser absorvidos pela parede ruminal ou passar livres para serem absorvidos no intestino (KENNELLY *et al.*, 2000).

Teores dietéticos de gordura superiores a 10% são capazes de reduzir a digestão ruminal de carboidratos (CHO) estruturais em mais de 50% devido aos efeitos negativos sobre bactérias metanogênicas e celulolíticas. Essa redução é acompanhada por diminuição da produção de metano, hidrogênio e AGV, incluindo queda na relação acetato:propionato (BOGGS *et al.*, 1987; JENKINS, 1993).

BOCK *et al.* (1991), trabalhando com novilhas alimentadas com 3,5% de sebo na MS da dieta, observaram diminuição significativa na digestibilidade ruminal, tanto da fibra (FDN e FDA) quanto da MS total. O mesmo não ocorreu com os CHO não-estruturais. Esse fato sugere que a adição de gordura prejudica mais a digestibilidade da fibra do que a digestibilidade dos CHO não-estruturais.

O metabolismo de proteína no rúmen também é alterado. A adição de gordura diminui a digestão da proteína causando, assim, queda na concentração da amônia ruminal e aumento no fluxo de N para o duodeno. Essas alterações normalmente vêm acompanhadas de aumento na eficiência da síntese de proteína bacteriana. Essa maior eficiência tem sido atribuída à redução do número de protozoários no rúmen, diminuindo, assim, a predação bacteriana e reciclagem de N (PALMQUIST, 1994).

Dentre os mecanismos que têm sido propostos para explicar como os lipídeos interferem na fermentação ruminal estão as teorias da modificação da população ruminal ligada à digestão de celulose e a de que os lipídeos reduzem a disponibilidade de Ca necessária para as funções microbianas. No entanto, segundo JENKINS (1993), as teorias da camada lipídica e da ação antimicrobiana foram as que receberam maior atenção pela comunidade científica.

A teoria da camada lipídica tenta explicar a redução na fermentação ruminal pela formação de um filme de gordura sobre as fibras presentes na dieta. Essa cobertura causaria efeitos negativos devido à inibição do contato das enzimas hidrolíticas livres na luz ruminal e das células microbianas às partículas de alimento. A fixação dos microrganismos nas partículas é necessária para que haja a digestão da celulose no rúmen.

A teoria da ação antimicrobiana diz respeito à redução da viabilidade dos microrganismos pelos efeitos citotóxicos dos AG sobre as membranas celulares eucarióticas. Segundo JENKINS (1993), os AG de cadeia longa atacam a bicamada lipídica das membranas biológicas devido à presença de grupos carboxílicos livres nas suas moléculas e devido à sua natureza hidrofóbica e anfifílica.

2.12. Síntese Microbiana de Ácidos Graxos

O conteúdo lipídico total na MS microbiana varia entre 10 e 15%. Os lipídios presentes nas estruturas bacterianas se originam de fontes exógenas, via ingestão de AG de cadeia longa pelo animal hospedeiro, e endógenas, via síntese *de novo*. A parcela de contribuição de cada fonte depende do nível de suplementação, da sua composição e das espécies bacterianas presentes no rúmen (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1988; BAUMAN *et al.*, 2003).

Segundo KATZ e KEENEY (1967), no interior do rúmen de bovino alimentado com dieta contendo até 2,5% de gordura na MS, entre 7,5 e 15,0% dos lipídios presentes no líquido ruminal são originados de protozoários. Sendo assim, estes microrganismos acabam se tornando fonte potencial de lipídeos para o hospedeiro.

Os principais lipídeos que fazem parte da composição, tanto das bactérias quanto dos protozoários ruminais, são os AG saturados palmítico C16:0 e esteárico C18:0, numa proporção sempre próxima de 1:2 nas bactérias. Os AG monoinsaturados constituem de 15 a 20% do total (VLAEMINCK *et al.*, 2006b).

Os AG poliinsaturados normalmente não são sintetizados por bactérias. No entanto, sabe-se que sua presença nos microrganismos ruminais ocorre devido ao englobamento desses AG presentes no conteúdo ruminal. (FULCO, 1983; HARFOOT e HAZLEWOOD, 1988; JENKINS, 1993; BAUMAN *et al.*, 2003; VLAEMINCK *et al.*, 2006b; OR-RASHID *et al.*, 2007).

O conteúdo lipídico das bactérias ruminais é composto por vários AG monoinsaturados como o C18:1 *trans*-10 e o C18:1 *trans*-11,

sendo estes derivados da BH dos AG da dieta, e poliinsaturados como o C18:2 *cis*-9, *trans*-11, C18:2 *trans*-10, *cis*-12, C18:2 *trans*-11, *cis*-15, o ácido linoleico C18:2 *cis*-9, *cis*-12 e α -linolênico C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15. Além disso, sua composição lipídica também se caracteriza pela grande proporção de AG de cadeia ímpar e ramificada. Eles têm como função manter a fluidez da membrana celular. Dentre os principais AG de cadeia ramificada, citam-se o ácido pentadecanoico C15:0, ácido metiltetradecanoico C15:0 *iso* e *anteiso* e o ácido heptadecanoico C17:0 *iso* e *anteiso* (VLAEMINCK *et al.*, 2006b). No leite de ruminantes, eles se apresentam em concentrações que variam de 1 a 3% (OR-RASHID *et al.*, 2007).

Existe alta correlação entre a proporção de forragem na dieta com a quantidade de AG de cadeia ímpar e ramificada de origem microbiana C15:0 *anteiso* e C17:0 *iso* que passa pelo duodeno. Essa relação sugere que a concentração de AG de cadeia ramificada pode ser usada como ferramenta para avaliar se a dieta formulada é capaz de suprir nutricionalmente as exigências da população microbiana, além de permitir acompanhar as variações no crescimento da população (VLAEMINCK *et al.*, 2006b).

OR-RASHID *et al.* (2007), num excelente trabalho sobre o assunto, analisaram a composição lipídica de bactérias e protozoários do rúmen. Eles observaram que a concentração de ácido palmítico C16:0 era 74% maior nos protozoários e que a concentração do ácido esteárico C18:0 era 2,25 vezes maior que nas bactérias. Verificaram, também, concentrações de AG de cadeia ramificada iguais a 16,5 e 11,0% de ácido vaccênico C18:1 *trans*-11 iguais a 2,0 e 6,6% e do isômero de CLA *cis*-9, *trans*-11 C18:2 iguais a 0,15 e 1,32% em bactérias e protozoários, respectivamente.

Eles sugeriram que a presença de protozoários no rúmen permite aumento na absorção intestinal do isômero C18:2 *cis*-9, *trans*-11 e outros AG insaturados precursores da síntese de CLA nos ruminantes.

2.13. Metabolismo e Dinâmica Pós-ruminal de Lipídeos

O material que deixa o rúmen é praticamente idêntico ao que entra no intestino delgado, mostrando que não há absorção ou modificação significativa nos AG de cadeia média e longa dentro do omaso e abomaso (NOBLE, 1981, citado por BAUMAN *et al.*, 2003).

Como consequência da ação da microbiota ruminal, aproximadamente 85% dos lipídeos que entram pelo intestino delgado dos ruminantes se apresentam na forma de AG livres saturados predominando o ácido esteárico C18:0. Os 15% restantes são formados por fosfolipídeos bacterianos e pequenas quantidades de triglicerídeos e glicolipídeos originados dos alimentos. Esses AG esterificados são hidrolizados pelas lipases intestinais e pancreáticas. A absorção de gordura pelo intestino delgado ocorre, principalmente, no jejuno, na forma de micelas (DOREAU e FERLAY, 1994; DRACKLEY, 2000).

Os AG saturados que alcançam o duodeno são alvo das enzimas desaturase (produtores de ligações insaturadas) presentes nos enterócitos e na glândula mamária (GM). Como resultado, a relação C18:0 e C18:1 é mais baixa no leite do que no conteúdo intestinal. Esse mecanismo de desaturação é usado pelos ruminantes para aumentar a fluidez da gordura (KENNELLY *et al.*, 2000).

Segundo DEMEYER e DOREAU (1999), em dietas à base de forragem, a quantidade total de lipídeos que entra no duodeno

normalmente é maior que aquela ingerida, já em dietas suplementadas com lipídeos, é superior somente quando em altas concentrações (> 5%). Isso ocorre devido à ação deletéria dos lipídeos sobre o desenvolvimento microbiano, conseqüentemente, sobre a síntese *de novo*.

A digestibilidade intestinal dos AG, que é de, aproximadamente, 80%, varia de acordo com a quantidade ingerida, pelo comprimento da cadeia carbônica, pelo grau de insaturação dos AG da dieta e pelo grau de hidrólise dos triglicérides e biohidrogenação dos AG. Apesar de os AG do conteúdo intestinal serem predominantemente não-esterificados, a capacidade intestinal de digerir triglicérides e absorver AG é bastante alta em vacas (CHILLIARD, 1993).

O suco pancreático e a bile, essenciais na digestão e absorção de lipídeos no intestino delgado, entram no duodeno através do ducto biliar comum. Os sais biliares dissociam os AG adsorvidos pelas partículas de alimento e permitem que haja formação de micelas (CHILLIARD, 1993).

Os sais biliares e a lisolecitina, produto resultante da hidrólise da fosfolipase, promovem a formação de micelas de AG altamente saturados no intestino delgado. Essas micelas se associam com as vilosidades (bordas em escova) do epitélio do jejuno e permitem a passagem dos AG e da lisolecitina através da membrana celular dos enterócitos, difundindo-se para dentro do citoplasma. A maior parte dos sais biliares é absorvida no íleo e retorna ao fígado para ser reincorporada à bile (DEMEYER e DOREAU, 1999).

Dentro dos enterócitos, os AG são reesterificados a glicerol-3-fosfato para formar triglicérides. Em seguida, o colesterol, os fosfolipídeos e os triglicérides recém formados aglomeram-se para dar origem a partículas lipoproteicas

(quilomicrons) que são secretadas pelos enterócitos. Após absorção via linfa, os quilomicrons e VLDL recebem apoproteínas (apo-C e apo-E) sintetizadas no fígado. A Apo-C inibe a retirada dos quilomicrons e VLDL da circulação pelo fígado, permitindo que eles sejam absorvidos em outros tecidos. Um componente da apo-C ativa a enzima lipoproteína lipase, localizada nos capilares dos tecidos, causando a hidrólise das membranas da VLDL e dos quilomicrons. Os AG liberados são absorvidos pelas células e usados como fonte de energia ou para síntese de TG. Os restos de VLDL e quilomicrons sob forma de LDL (20%) e HDL (70%) são captados e metabolizados no fígado (CHILLIARD, 1993).

2.14. Biossíntese de AG no Leite

Contrariamente ao que acontece nos monogástricos, o tecido adiposo é o principal sítio de lipogênese do ruminante. Tanto o tecido adiposo quanto a glândula mamária (GM) utilizam acetato e não glicose para a síntese *de novo* dos AG. A sua síntese na GM segue caminho metabólico similar ao que ocorre no tecido adiposo, com a diferença de que ela não produz a enzima elongase nem pode produzir AG de cadeia carbônica maior que 16 (PALMQUIST e JENKINS, 1980).

O primeiro passo no processo de síntese *de novo* é a conversão de Acetil-CoA a Malonil-CoA, catalizado pela Acetil-CoA Carboxilase na mitocôndria. O aumento da cadeia carbônica, até no máximo C16, ocorre pela adição de dois átomos de carbono por vez por meio da ação da enzima Ácido Graxo Sintetase e gasto de ATP. Esse aumento de dois carbonos ocorre devido ao substrato utilizado, sendo o acetato na maior parte das vezes. O transporte dos dois C através da parede mitocondrial deve ser feito sob forma de citrato. No monogástrico, a Citrato Liase

transforma o citrato em Acetil-CoA no citosol. A Citrato Liase é praticamente inativa no ruminante como também a enzima málica. Isto evita o uso de glicose para a síntese de AG no tecido adiposo do ruminante. A única alternativa então como fonte de C para síntese de AG é o acetato. O fígado das vacas sintetiza muito pouco AG seja a partir de glicose ou de acetato. Este último, porém, é o preferido (KENNELLY *et al.*, 2000).

De maneira geral, cerca de 50% dos AG presentes no leite são sintetizados na GM, 40 a 45% são de origem dietética e o

restante vem do tecido adiposo (PALMQUIST e JENKINS, 1980). AG de cadeia média podem ser sintetizados na GM ou ser de origem dietética. Os AG de cadeia longa são, na sua maioria, de origem dietética e são transportados para a GM em quilomícrons ou lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (Item 2.13). As lipoproteínas que alcançam a GM são hidrolizadas no epitélio capilar pela enzima Lipoproteína Lipase e se tornam disponíveis para a incorporação na gordura do leite (KENNELLY *et al.*, 2000) (Tabela 2.14.1).

Tabela 2.14.1. Origem dos ácidos graxos do leite, em porcentagem

	BhBa ¹	Síntese <i>de novo</i>	TG do sangue
Butírico – C4:0	100	-	-
Caproico – C6:0	100	-	-
Caprílico – C8:0	100	-	-
Cáprico – C10:0	50	50	-
Láurico – C12:0	-	100	-
Mirístico – C14:0	-	100	-
Palmítico – C16:0	-	50	50
Palmitoleico – C16:1	-	50	50
Esteárico – C18:0	-	-	100
Oleico – C18:1	-	-	100
Linoleico – C18:2	-	-	100

¹ Beta-hidroxibutirato

Fonte: Adaptado de BALDWIN e POLOUNSKY, 1977

O balanço entre os AG da dieta, os de cadeia longa de origem microbiana e os de cadeia curta e média originados da síntese *de novo* que chegam à GM pode ser alterado via manipulação da dieta do animal. Sendo assim, a utilização de óleos vegetais ricos em AG insaturados de cadeia longa permite alterar a composição da gordura do leite de forma a torná-lo mais interessante do ponto de vista nutracêutico. No entanto, o processo de biohidrogenação por que passam os AG insaturados no rúmen torna esse objetivo um desafio (KENNELLY *et al.*, 2000).

Os AG de cadeia ímpar e ramificada presentes no leite são originados das bactérias que deixam o rúmen. Seus principais representantes são os isômeros do ácido tetradecanoico C14:0 *iso*, do ácido pentadecanoico (C15:0, C15:0 *iso* e C15:0 *anteiso*), do ácido hexadecanoico (C16:0 *iso*) e do ácido heptadecanoico (C17:0, C17:0 *iso* e C17:0 *anteiso*). Atualmente, está havendo interesse crescente nesses AG devido ao seu potencial de avaliação da função ruminal (padrão de fermentação e produção de N bacteriano), dos efeitos anticarcinogênicos, da sua influência sobre a temperatura de derretimento da gordura do leite e como potencial indicadores da

ingestão de produtos lácteos na dieta humana (VLAEMINCK *et al.*, 2006b).

O aumento na proporção de forragem na dieta normalmente aumenta a concentração de AG de cadeia ímpar e ramificada na gordura do leite, sendo os isômeros C14:0 *iso* e C15:0 *iso* os que sofrem mais impacto. A fonte de forragem também afeta substancialmente a concentração desses AG. Quando se substitui silagem de gramínea pela de milho, observa-se queda nas concentrações dos isômeros C14:0 *iso* e C15:0 *iso* e aumento nas dos C17:0 e C17:1 *cis-9* (VLAEMINCK *et al.*, 2006a).

A GM possui alta atividade de Esteroil-CoA Desaturase (Δ^9 -desaturase) que gera uma dupla ligação convertendo o ácido esteárico C18:0 em ácido oleico C18:1 *cis-9* ou ácido vaccênico C18:1 *trans-11* em CLA C18:2 *cis-9*, *trans-11* (NTAMBI, 1995; KENNELLY *et al.*, 2000).

KENNELLY *et al.* (2000) observaram que vacas alimentadas com suplementos lipídicos protegidos contendo óleo de linhaça e safflower chegaram a produzir leite com mais de 30% de C18:2 e 20% de C18:3 na sua gordura, sendo que, no mesmo experimento, o grupo controle produziu 2 e 1% desses AG, respectivamente. A partir dessa observação, concluíram que a habilidade da GM em secretar AG insaturados não é fator limitante quando se objetiva maximizar sua concentração nos produtos de origem láctea via alteração de dieta. Na prática, a limitação está na eficiência de proteção contra a biohidrogenação microbiana por que passam os AG insaturados no rúmen e na qualidade do processamento do leite e seus derivados.

A literatura mostra que é possível produzir derivados lácteos com níveis elevados de C18:2 e C18:3. No entanto, tais produtos possuem vida de prateleira reduzida e requerem modificações no processo de

produção, como no caso da fabricação da manteiga e do queijo ricos em AG insaturados (MCDONALD e SCOTT, 1977). KENNELLY *et al.* (2000) sugeriram equilíbrio nesse caso, ou seja, que a utilização da suplementação lipídica em vacas leiteiras objetive queda nas proporções de C16:0 : C18:1 e C16:0 : C18:0 total, sem excessivo aumento na concentração de C18:2 e C18:3 para ajudar a minimizar os efeitos sobre o processamento industrial e vida de prateleira.

2.14.1. A Biossíntese de CLA

O CLA encontrado no leite e na carne de ruminantes tem duas origens principais: é formado durante a biohidrogenação ruminal (Figura 2.9.2.1.1.1) do ácido linoleico C18:2 *cis-9*, *cis-12* ou a partir do ácido vaccênico C18:1 *trans-11* como substrato da ação da enzima Δ^9 -desaturase nos tecidos periféricos. Sendo assim, a presença do CLA nos produtos derivados dos ruminantes está diretamente relacionada à quantidade de produtos da biohidrogenação incompleta dos AG insaturados no rúmen (BAUMAN *et al.* 1999).

2.14.1.1. Síntese de CLA no Rúmen

As vias metabólicas utilizadas na síntese ruminal de CLA já foram representadas nas Figuras 2.9.2.1.1.1 e 2.9.2.1.1.2.

Vale acrescentar que, assim como a biohidrogenação do ácido linoleico C18:2 *cis-9*, *cis-12*, a biohidrogenação do ácido α -linolênico C18:3 *cis-9*, *cis-12* *cis-15* também começa com uma isomerização seguida de sequência de reações de redução e termina com a formação de ácido esteárico C 18:0.

À medida que o pH do rúmen cai, a população bacteriana muda e, como

consequência, ocorrem mudanças no padrão de fermentação e nos seus produtos finais (VAN SOEST, 1994) (Figura 2.9.2.1.1.2).

GRIINARI *et al.* (1998) observaram mudanças no perfil dos ácidos *trans*-octadecenoicos na gordura do leite de vacas acidose induzidas. Nessa situação, o ácido C18:1 *trans*-10 substituiu o ácido vaccênico C18:1 *trans*-11 como o isômero *trans* predominante na gordura do leite. Eles sugeriram a existência de uma enzima, a *cis*-9, *trans*-10 isomerase, produzida por bactérias acidófilas, responsável pela síntese do isômero de CLA C18:2 *trans*-10, *cis*-12. Esse isômero tem sua concentração aumentada na gordura de vacas alimentadas com dietas ricas em CHO altamente fermentáveis ou pobres em fibras.

2.14.1.2. Síntese de CLA nos Tecidos

Trabalhos relacionados à composição lipídica do leite observaram que, não importando a dieta utilizada, a concentração do ácido esteárico C18:1 *trans*-11 está sempre linearmente relacionada à concentração do isômero de CLA C18:2 *cis*-9, *trans*-11. Baseados nessa observação, BAUMAN e GRIINARI (1999) propuseram que o *cis*-9, *trans*-11 seria originado da desaturação do C18:1 *trans*-11 pela enzima Δ^9 -desaturase presente nos tecidos dos ruminantes.

CORL *et al.* (1998) infundiram diretamente no abomaso de vacas em lactação 12,5g de ácido esteárico C18:1 *trans*-11 por dia durante três dias. Após esse período, o conteúdo de CLA na gordura do leite aumentou mais de 40%, indicando que vacas em lactação possuem a habilidade de sintetizar CLA endogenamente.

Num segundo experimento, CORL *et al.* (1999) quantificaram a importância da desaturase na produção de CLA a partir da infusão intra-abomasal de ácido esterúlico,

um potente inibidor específico da enzima Δ^9 -desaturase. Eles observaram drástica redução no conteúdo de C18:2 *cis*-9, *trans*-11. Ficando claro que a síntese endógena de CLA a partir da enzima Δ^9 -desaturase representava a principal via de síntese de CLA da gordura do leite dos ruminantes.

O sistema desaturase é um complexo multienzimático que inclui as enzimas NADH-citocromo b_5 redutase, a citocromo b_5 , a Acil-CoA redutase e a Δ^9 -desaturase. A Δ^9 -desaturase introduz uma dupla ligação *cis* entre os carbonos 9 e 10 da cadeia carbônica dos AG. O estearoil-CoA e o Palmitoil-CoA são os principais substratos da Δ^9 -desaturase e os produtos dessas reações são importantes componentes dos fosfolipídeos e triglicerídeos responsáveis pela manutenção da fluidez da membrana celular (NTAMBI, 1995). No entanto, vasta gama de AG saturados e insaturados Acil-CoA podem servir de substrato, incluindo o ácido octadecenoico C18:1 *trans*-11 (KHANAL e DHIMAN, 2004).

O tecido adiposo e a glândula mamária são os principais locais da síntese endógena do CLA C18:2 *cis*-9, *trans*-11 em ruminantes em crescimento e vacas em lactação, respectivamente (BAUMAN e GRIINARI, 1999).

2.15. Efeitos da Suplementação de Lipídeos Sobre o Consumo Voluntário de MS

Os efeitos da suplementação de lipídeos sobre o consumo de alimentos variam bastante devido às diferentes interações existentes entre fatores como estágio da lactação, nível de consumo e produção, fonte de lipídios utilizados, grau de processamento do alimento, nível de inclusão do suplemento e interação entre ingredientes da dieta (ALLEN, 2000; SCHAFFHÄUSER JR, 2005).

Quando o efeito de preenchimento do rúmen não limita o consumo, o animal se alimenta visando saciar sua demanda energética, sendo assim, a ingestão de dietas com elevados teores de lipídeo tendem a fazer com que o animal acabe ingerindo quantidade menor de MS (GAGLIOSTRO e CHILLIARD, 1991). As vantagens da suplementação lipídica podem ser perdidas se houver redução do consumo voluntário (ONETTI e GRUMMER, 2004). Essa redução pode ou não ser acompanhada de baixa ingestão de energia, dependendo de fatores relacionados ao tipo de gordura, suas características físicas e químicas, à sua digestibilidade ou em função da quantidade suplementada.

As gorduras insaturadas tendem a deprimir mais o consumo do que as saturadas, provavelmente pela maior capacidade de dispersão dessas gorduras em nível ruminal (PANTOJA *et al.*, 1996; SCHAFHÄUSER JR, 2005). Apesar disso, GRUMMER (1995) comentou que as gorduras mais saturadas, embora não sejam tão ativas no rúmen, são menos digestíveis em nível intestinal.

Com relação à fonte de gordura, tem-se observado maior redução do consumo quando são utilizados óleos ao invés de sementes inteiras. Esse fato ocorre provavelmente devido à menor quantidade de gordura livre no rúmen quando esta está contida em grãos (COPPOCK e WILKS, 1991).

Os mecanismos responsáveis pela redução do consumo de matéria seca ainda não estão totalmente esclarecidos, mas devem estar relacionados aos efeitos deletérios da gordura sobre a fermentação ruminal, digestibilidade da fibra, motilidade intestinal, palatabilidade da dieta, liberação de hormônios intestinais e sobre a oxidação hepática das gorduras ingeridas (ALLEN, 2000). Em dietas com suplementação lipídica, espera-se maior tempo de retenção

da digesta no rúmen devido à redução da taxa de degradação da fibra e, portanto, à redução da taxa de passagem, o que por consequência aumenta o efeito de preenchimento da dieta (ALLEN, 2000; SCHAFHÄUSER JR, 2005). Tal situação encontra bastante respaldo na literatura (VAN SOEST, 1994). Outros fatores seriam os efeitos da gordura sobre o metabolismo intermediário (CHOI *et al.*, 2000; NRC, 2001).

Em função dos fatores limitantes, têm-se recomendado níveis próximos de 5 a 7% de gordura livre na MS (RABELO *et al.*, 1996; NRC, 2001) principalmente devido aos efeitos negativos desta sobre a digestibilidade da fibra (VAN SOEST, 1994). Embora as gorduras insaturadas possam produzir distúrbios sobre o ambiente ruminal, o óleo contido em sementes, como de soja e de algodão, por ser liberado lentamente pode ser suplementado sem os mesmos distúrbios dos seus equivalentes na forma livre (COPPOCK e WILKS, 1991). Fontes de gordura, como o caroço de algodão e o grão tostado de soja, podem ser utilizadas em níveis próximos de 12% da MS sem causar diminuição do teor de gordura do leite devido à liberação lenta da gordura no ambiente ruminal.

2.16. Efeitos da Suplementação de Lipídeos Sobre a Produção e Composição do Leite

Os resultados da suplementação lipídica sobre a produção de vacas leiteiras apresentados pela literatura são bastante controversos. Muitos trabalhos utilizando gordura na dieta de vacas em lactação têm relatado redução de consumo voluntário, com ausência de efeitos sobre a produção de leite ou sobre o consumo concomitante à elevação da resposta em produção de leite.

VARGAS *et al.* (2002) não encontraram diferenças na produção de leite em vacas recebendo dietas com diferentes níveis de óleo de soja. ONETTI e GRUMMER (2004) citado por WEISBJERG *et al.* (2008), observaram que a resposta à suplementação com gordura era maior no início da lactação. Em revisão publicada em 1993, CHILLIARD concluiu que as respostas geralmente são mais baixas no início e maiores no final da lactação. Já o NRC (2001) concluiu que as respostas produtivas à suplementação lipídica em vacas leiteiras de alta produção ainda não estão bem definidas.

A nutrição é a forma mais efetiva e rápida de se alterar a composição do leite. Quase todos os componentes estão sujeitos à manipulação, no entanto, o potencial de alteração varia de acordo com o componente. Em geral, o teor e a composição lipídica da gordura são os mais passíveis de mudança. Uma simples alteração na relação concentrado:volumoso é capaz de variar o teor de gordura entre 2 e 4%. A proteína é menos sensível a variações e a lactose praticamente não se altera (KENNELLY *et al.*, 2000).

2.16.1. Gordura

As respostas da suplementação lipídica sobre a produção total e a composição da gordura do leite também são bastante variadas. Sabe-se que essa variação depende, principalmente, do grau de influência dos lipídios sobre a fermentação ruminal. A influência é determinada pelo grau de saturação e pelo nível de suplementação lipídica da dieta (PALMQUIST e JENKINS, 1980; BAUMAN e GRIINARI, 2001).

A gordura do leite é composta por AG de cadeia carbônica de comprimentos variados. Os AG de 4, 6, 8 e 10 carbonos encontrados no leite são produzidos pelos

microrganismos do rúmen, os de 4 a 16 carbonos são sintetizados *de novo* pela glândula mamária a partir do acetato e butirato. Os AG restantes, aproximadamente 50% do total, vem diretamente da gordura absorvida do sangue. Esses AG são compostos, principalmente, por 16 e 18 C. Todos os C18 e, aproximadamente, 40% dos C 16 são originados da dieta (HARVATINE *et al.*, 2009). Eles também podem vir dos microrganismos digeridos no intestino delgado ou da mobilização das reservas corporais nos momentos de balanço energético negativo.

A glândula mamária tem a capacidade de transformar em gordura láctea os lipídeos, os AGV e os corpos cetônicos presentes na circulação sanguínea e os AG mobilizados das reservas corporais e da síntese bacteriana. Devido a esta característica, já foram descritos mais de 400 AG diferentes no leite (PALMQUIST, 1991). Outra importante propriedade da glândula mamária, assim como do intestino delgado, é converter AG saturados em mono-insaturados, contribuindo para assegurar a fluidez normal ao leite (GRUMMER *et al.*, 1991).

Sabe-se que à medida que se aumenta a gordura consumida, maior é a proporção de AG C 18 e menor a de AG de cadeia curta. ASHES *et al.* (1997) observaram queda de 25, 29 e 20% na concentração dos AG < C14, C14 e C16, respectivamente, e aumento de 45, 40, 59 e 11% nos AG C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3, respectivamente, quando adicionaram grãos de oleaginosas (soja, algodão e canola) à dieta.

2.16.2. Proteína

A suplementação com lipídios normalmente tem efeito negativo sobre o teor de proteína no leite, não sendo, necessariamente, uma

regra. A produção diária total de proteína pode permanecer constante ou até mesmo aumentar em situações nas quais a produção de leite aumenta (KENNELLY *et al.*, 2000).

A depressão no teor de proteína do leite pode ser consequência de vários fatores, podendo-se citar a redução da disponibilidade de carboidratos para a síntese de proteína microbiana, a restrição na disponibilidade de glicose, a resistência à insulina pelas células da glândula mamária, prejudicando o transporte de aminoácidos no tecido mamário, a redução da secreção de somatotropina pela hipófise anterior ou a redução do fluxo sanguíneo que reduziria a captação de aminoácidos pela glândula mamária (CANT *et al.*, 1993; ALLEN, 2000; NRC, 2001).

Outra teoria sugere que a suplementação lipídica reduziria a produção de propionato no rúmen, afetando negativamente a glicemia pela redução da gliconeogênese. Dessa forma, a gliconeogênese teria que ser compensada com maior utilização de aminoácidos, reduzindo o seu aporte para a glândula mamária (KENNELLY *et al.*, 2000).

2.16.3. Lactose

Os efeitos da suplementação lipídica sobre o teor de lactose do leite são variáveis e podem ocorrer, entre outros fatores, devido à possível redução da síntese ruminal de propionato, que causaria redução no aporte de glicose para a síntese de lactose na glândula mamária (SCHAFHÄUSER JR, 2005).

A concentração de lactose do leite varia pouco, principalmente pelo fato de sofrer pouca influência da alimentação. Seus teores são um pouco mais baixos logo no início e no final da lactação. Por ser o principal componente osmótico do leite,

junto com o potássio, é considerada o regulador da síntese do leite (MÜHLBACH *et al.*, 2000).

2.17. A Síndrome do Baixo Teor de Gordura do Leite (*Milk Fat Depression - MFD*)

A síndrome da baixa concentração de gordura do leite ou a depressão da gordura do leite (*milk fat depression - MFD*) foi descrita pela primeira vez há mais de 150 anos. É caracterizada por diminuição na produção da gordura láctea em até 50% sem que haja queda na produção diária de leite ou de qualquer outro componente (BAUMAN e GRIINARI, 2001).

A MFD não é uma situação patológica, sua origem é, normalmente, nutricional. Ela pode ser induzida por dietas com altos níveis de CHO fermentáveis e baixos de fibras, por dietas fibrosas, porém de tamanho de partícula pequeno ou com concentrados ricos em óleos poliinsaturados, por inibidores da produção de metano ou pela queda de consumo causado pelo estresse calórico. Essas dietas alteram a população microbiana do rúmen e, conseqüentemente, o processo de biohidrogenação dos AG poliinsaturados, refletindo na composição lipídica do leite (PERFIELD *et al.*, 2006).

A queda da secreção de gordura no leite diminui a mobilização no tecido adiposo, permitindo que haja incremento na lipogênese, aumentando a atividade da Acetil-CoA carboxilase e tornando os adipócitos mais eficientes na captação de acetato (PERFIELD *et al.*, 2006).

A avaliação da MFD num rebanho leiteiro é de fundamental importância, não somente pelo fato de que a gordura é o componente mais visado pela indústria de laticínios e o responsável pelo estabelecimento do valor a ser pago pelo litro de leite, mas porque ela

pode servir como eficiente indicador de acidose ruminal subclínica (PERFIELD *et al.*, 2006).

Em 2001, BAUMAN e GRIINARI propuseram a Teoria da Biohidrogenação, que estabeleceu que a MFD está relacionada com a presença de alguns AG normalmente presentes em situações anormais de fermentação de AG insaturados. O primeiro intermediário identificado como potente inibidor da síntese de gordura do leite foi o isômero de CLA C18:2 *trans*-10, *cis*-12 (PERFIELD *et al.*, 2006; GAMA *et al.*, 2007; BAUMAN *et al.*, 2008).

Há correlação direta entre os níveis crescentes do isômero C18:1 *trans*-10 presente no leite e a redução da síntese *de novo* de AG. Esta redução ocorre devido à redução da atividade da enzima Acetil-CoA Carboxilase e da Ácido Graxo sintase (PIPEROVA *et al.*, 2000).

Descobriu-se que em certas situações não havia linearidade na relação entre o conteúdo de C18:1 *trans*-10, *cis*-12 e a magnitude da redução da gordura do leite. Este fato sugeriu que a ação de um só isômero não seria suficiente para explicar o comportamento de queda observado. Foi então que se descobriu mais dois isômeros responsáveis por essa redução de gordura, o C18:2 *trans*-9, *cis*-11 e o C18:2 *cis*-10, *trans*-12 (PERFIELD *et al.*, 2007, HARVATINE *et al.*, 2009).

Segundo BAUMAN *et al.* (2008), utilizando-se doses idênticas, o isômero C18:2 *cis*-10, *trans*-12 é equivalente ou ligeiramente mais eficiente que o C18:2 *trans*-10, *cis*-12 na redução da produção da gordura do leite. Já o C18:2 *trans*-9, *cis*-11 tem a metade da sua capacidade de ação.

Os mecanismos de ação fisiológica dos isômeros de CLA responsáveis pela redução do teor de gordura no leite foram muito bem revisados por BAUMAN *et al.* (2008) e HARVATINE *et al.* (2009).

CAPÍTULO III

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO LEITE, PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA DIETA E DA MANTEIGA E AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS PRODUTIVOS

3.1. RESUMO

O primeiro experimento da presente dissertação foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da adição de quatro níveis crescentes de óleo de soja (OS) (0; 1,5; 3,0 e 4,5% da matéria seca, MS) em dietas à base de capim-elefante picado como único volumoso sobre a composição lipídica do leite de doze vacas mestiças Holandês x Zebu com produção média igual a $18,0 \pm 4,6$ kg/dia de leite e peso corporal médio de $502,6 \pm 47,8$ kg. As vacas foram distribuídas em três quadrados latinos (QL) 4 x 4. Cada fase do QL se estendeu por 15 dias, sendo os dez primeiros para adaptação às dietas e os cinco últimos destinados às coletas de dados e amostras. Foram analisados os perfis de ácidos graxos (AG) dos alimentos oferecidos (capim-elefante, óleo de soja e concentrado) e da gordura do leite na forma de manteiga. Com relação aos alimentos, os dados obtidos revelaram estabilidade tanto na composição de AG do capim quanto do óleo adicionado ao concentrado mesmo após sete dias de exposição ao ar. Já com relação à manteiga, observou-se redução ($P < 0,01$) nas concentrações dos AG de cadeia curta (C4 a C10), média (C12 a C16) e saturados à medida que se adicionou OS à dieta. Em contrapartida, o óleo elevou a concentração dos AG C18:1 *trans*-11 ($P < 0,01$) e C18:1 *trans*-10 ($P < 0,01$), indicando incremento no aporte de AG intermediários da biohidrogenação ruminal na glândula mamária. Houve incremento ($P < 0,01$) nas concentrações de todos os AG de 18 C, saturados e monoinsaturados. Destaque para os ácidos esteárico C18:0 e oleico C18:1 *cis*-9 com concentrações iguais a 7,78; 9,12; 9,42 e 9,94 g/100 g e 20,40; 21,83; 23,14 e 22,64 g/100 g para as dietas contendo 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente. O ácido oleico C18:1 *cis*-9 foi o isômero *cis* e o AG vaccênico C18:1 *trans*-11 foi o principal isômero *trans* observado na gordura das manteigas. Excetuando os isômeros C18:3 *iso*1 e C18:3 *iso*2, a inclusão de níveis crescentes de OS reduziu ($P < 0,01$) a concentração dos ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada sugerindo uma redução na população microbiana ruminal. Levando-se em conta a qualidade nutracêutica da manteiga, os resultados foram satisfatórios, pois se observou aumento ($P < 0,01$) na participação dos AG mono, poliinsaturados e insaturados totais em 44, 54 e 43 % entre os tratamentos com adição de 0 e 4,5% de OS, respectivamente. Houve também a diminuição ($P < 0,01$) da proporção dos AG saturados em 25% (para as dietas com 0 e 4,5% de OS). A concentração de todos os isômeros de CLA aumentou linearmente ($P < 0,01$). Nos tratamentos com 0 e 4,5%, a concentração total de CLA se elevou na ordem de 361,5% (de 1,31 para 4,70 g/100 g). O isômero C18:2 *cis*-9 *trans*-11 representou, aproximadamente, 98% do total de CLA e aumentou 358,6% (de 1,28 para 4,59 g/100 g). Observou-se elevada correlação ($r^2 = 0,942$) entre o ácido vaccênico e o CLA C18:2 *cis*-9 *trans*-11 ($\hat{y} = 0,448x + 0,546$), entre a redução no teor de gordura no leite e o aumento da concentração do CLA C18:2 *trans*-10 *cis*-12 ($\hat{y} = -16,44x + 3,3$; $r^2 = 0,296$) e do CLA C18:2 *trans*-9 *cis*-11 ($\hat{y} = -10,41x + 3,49$; $r^2 = 0,397$). Com relação à composição do leite, observou-se que, apesar da manutenção do consumo de MS e da diferença de oferta de energia líquida de lactação entre os tratamentos (+ 0,06Mcal/kg MS à medida que se adicionou óleo), não houve ($P > 0,05$) efeito nem sobre a produção diária de leite nem sobre a produção diária corrigida para 3,5% de gordura. Esse menor aproveitamento energético pode ser explicado em parte pela menor degradabilidade ruminal tanto da MS quanto

do FDN (Capítulo IV). Já o teor e a produção diária de gordura reduziram linearmente ($P < 0,01$ e $P = 0,03$, respectivamente) provavelmente reflexo da considerável secreção dos isômeros de CLA C18:2 *trans-10, cis-12* e C18:2 *trans-9, cis-11*, comprovadamente inibidores da secreção de gordura na GM. O teor de lactose diminuiu ($P = 0,02$) 0,15%, entre os tratamentos controle e com 4,5% de OS. Diferentemente do que prega a literatura, o teor de proteína do leite elevou ($P < 0,03$) os seus valores. O mesmo comportamento não foi observado na produção diária de proteína. Como informação inédita, houve a constatação de que existe diferença ($P < 0,05$) entre o perfil de AG do leite ordenhado na manhã e na tarde.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre janeiro e abril de 2008 no Campo Experimental de Coronel Pacheco, de propriedade da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco a $21^{\circ} 37'$ de latitude Sul e $43^{\circ} 18'$ de longitude Oeste, na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. O clima da região é do tipo Cwa, mesotérmico (Köppen), e a precipitação média anual é de, aproximadamente, 1.500 mm. Nos meses de outubro a março ocorre, normalmente, verão quente e chuvoso e nos meses de abril a setembro, inverno frio e seco.

Foram utilizadas doze vacas mestiças Holandês x Zebu com composição genética variando entre 3/4 a 15/16 de Holandês, múltiparas (3 ou 4 partos), no terço inicial de lactação (90 ± 25 dias), com produção média no início do experimento igual a $18,0 \pm 4,6$ kg/dia de leite e peso corporal médio de $502,6 \pm 47,8$ kg.

As vacas foram alojadas em curral do tipo “Free Stall” com camas individuais de areia, bebedouros coletivos e sistema de limpeza de pista por *flushing*. Os cochos de alimentação possuíam portões eletrônicos do tipo *calan-gates* (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA) que permitiam controle individual diário do consumo de alimentos.

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, às 6 h e às 14 h, e a produção de leite medida diariamente

durante todo o período experimental. As instalações de ordenha eram compostas por uma sala de espera e uma sala de ordenha duplo 8 semi-paralelo com fosso central e equipamentos da marca Alfa -Laval.

As doze vacas foram distribuídas em três quadrados latinos (QL) 4 x 4. Cada fase do QL se estendeu por 15 dias, sendo os dez primeiros para adaptação às dietas (EIFERT *et al.*, 2005; EIFERT *et al.*, 2006) e os cinco últimos destinados às coletas de dados e amostras, totalizando 60 dias de período experimental.

As pesagens dos animais foram feitas nos três primeiros dias de cada fase do QL e nos três dias finais dos experimentos, totalizando cinco médias de cada animal. As pesagens foram feitas na parte da manhã, sem jejum prévio, sendo considerado como peso final, a média dos três dias.

3.2.1. Dietas Experimentais

As dietas experimentais (tratamentos), baseadas em capim-elefante como única fonte de volumoso, foram formuladas pelo programa SPARTAN (Michigan State University) com o objetivo de atender às exigências estabelecidas pelo NRC (2001) para essa categoria animal. Os tratamentos utilizados, em base de matéria seca (MS), foram os seguintes:

- Controle ou 0% de óleo de soja (OS) na MS: capim-elefante picado + suplemento concentrado sem adição de OS;
 - 1,5% de OS na MS: capim-elefante picado + suplemento concentrado com adição de OS;
 - 3,0% de OS na MS: capim-elefante picado + suplemento concentrado com adição de OS;

- 4,5% de OS na MS: capim-elefante picado + suplemento concentrado com adição de OS.

A proporção dos ingredientes e a composição química predita das dietas são apresentadas na Tabela 3.2.1.1.

Tabela 3.2.1.1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais

Ingredientes ¹	Nível de inclusão de óleo de soja (% da matéria seca da dieta)			
	Controle	1,5%	3,0%	4,5%
Capim-Elefante	46,0	46,0	46,0	46,0
Fubá de Milho	17,0	16,3	15,1	14,4
Farelo de Soja	19,0	19,0	19,8	19,6
Polpa Cítrica	17,0	16,3	15,1	14,4
PVM ²	1,0	1,0	1,0	1,0
Óleo de Soja	-	1,5	3,0	4,5
Composição Química da Dieta¹				
Proteína Bruta (% da MS)	14,5	14,4	14,5	14,4
Extrato Etéreo (% da MS)	2,7	4,1	5,6	7,0
Fibra em Detergente Neutro (% da MS)	43,0	42,8	42,6	42,3
Fibra em Detergente Ácido (% da MS)	25,6	25,5	25,4	25,2
ELL (Mcal/kg) ³	1,44	1,5	1,56	1,62
Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (%) ⁴	68,09	65,65	65,49	64,13

¹Valores estimados pelo programa SPARTAN (Michigan State University); ²Mistura vitamínico-mineral; ³Energia líquida de lactação, ⁴Valores analisados.

A relação volumoso:concentrado foi de 46:54. A alimentação foi fornecida uma vez ao dia logo após a ordenha da manhã na forma de mistura completa, utilizando-se equipamento semi-automatizado e computadorizado (CALAN SUPER DATARANGER®, *American Calan Inc.*, Northwood, NH) para pesagem e distribuição individual nos cochos. A

quantidade oferecida das dietas foi ajustada diariamente para permitir cerca de 10% de sobras.

Utilizou-se como fonte exclusiva de volumoso o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) com idade aproximada de 90 dias. O solo da capineira foi corrigido e adubado, conforme recomendações

agronômicas após avaliação das análises. A sua composição bromatológica média e

digestibilidade *in vitro* é apresentada na Tabela 3.2.1.2.

Tabela 3.2.1.2. Composição bromatológica média e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca do capim-elefante

Matéria Seca, MS (%)	25,68
Proteína bruta (% da MS)	5,82
Extrato Etéreo (% da MS)	1,18
Fibra em Detergente Neutro (% da MS)	73,81
Fibra em Detergente Ácido (% da MS)	49,76
Lignina (% da MS)	10,99
Cinzas (% da MS)	11,33
Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (%)	41,63

O capim-elefante foi cortado a cada dois dias. Após cada corte, o capim era abrigado sob cobertura apropriada até o momento da picagem que ocorria diariamente pouco antes do horário da alimentação.

A composição bromatológica e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca do concentrado está apresentada na Tabela 3.2.1.3.

Tabela 3.2.1.3. Composição bromatológica e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca dos suplementos concentrados

Composição Química	Concentrados			
	Controle	1,5% OS	3,0% OS	4,5% OS
Matéria Seca, MS (%)	87,91	87,87	88,46	88,00
Proteína bruta (% da MS)	22,71	19,61	23,35	23,31
Extrato Etéreo (% da MS)	2,47	5,35	8,58	11,08
Fibra em Detergente Neutro (% da MS)	15,46	16,87	15,99	15,81
Fibra em Detergente Ácido (% da MS)	10,26	11,50	9,52	9,22
Digestibilidade <i>in vitro</i> da MS (%)	91,85	86,12	85,74	85,78

3.2.2. A Determinação do Consumo de MS e a Avaliação da Composição Química da Dieta

(American Calan Inc., Northwood, NH, EUA), descontando a quantidade de sobras do material oferecido.

O consumo individual de matéria seca (MS) foi determinado diariamente usando cochos com portões eletrônicos do tipo calan-gates

Foram coletadas diariamente, durante os cinco últimos dias de cada período do QL, amostras das dietas completas, das sobras,

do volumoso e dos concentrados e seus ingredientes. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C para posteriores análises bromatológicas segundo SILVA e QUEIROZ (2002), e para determinação do perfil de ácidos graxos (OUTEN *et al.*, 1976).

Foram coletadas amostras dos quatro tipos de concentrado no 1º e 7º dia após o preparo da mistura, sendo imediatamente congeladas, com o objetivo de avaliar possíveis alterações no seu perfil de ácidos graxos causadas por oxidação. As amostras destinadas à análise do perfil de ácidos graxos e peroxidação lipídica foram liofilizadas, enquanto que as destinadas às análises bromatológicas foram pré-secadas por 72 h em estufa de ventilação forçada, regulada para 55°C. Também se analisou o perfil de ácidos graxos do óleo de soja utilizado no seu preparo.

Depois de descongeladas, as amostras de volumoso, concentrado, oferecido e sobras, foram pré-secadas por 72 h em estufa com circulação e renovação de ar, modelo TE-394/3 (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP), a 55°C, e moídas em moinho de facas do tipo Willey da marca NÚCLEO, modelo MR340, dotado de peneira com perfurações de 1 mm. Posteriormente, as amostras foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS) a 105°C, proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e quanto à digestibilidade *in vitro* da MS segundo método descrito por TILLEY e TERRY (1963) (Tabelas 3.2.1.2 e 3.2.1.3). Não foram realizadas análises de DIVMS, nem de teores de ácidos graxos nas amostras de sobras.

3.2.3. Produção e Composição do Leite

A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura foi calculada pela seguinte

equação: $(0,432 + 0,1625 \times \% \text{gordura}) \times \text{produção de leite}$ (NRC, 2001).

O aumento anormal da contagem de células somáticas (CCS) do leite é reflexo da presença de infecções intramamárias. Esse aumento exerce influência sobre a composição do leite, diminuindo a concentração dos constituintes normais e elevando a de componentes sanguíneos, como a albumina, imunoglobulinas e alguns íons (WILSON *et al.*, 2004). A CCS não é afetada pela adição de lipídios à dieta, apesar disso, tornou-se necessária sua avaliação com o objetivo de verificar se houve influência na composição do leite na presente dissertação. A CCS foi feita através do equipamento Bentley® 2000 (Bentley Instruments). A leitura, expressa em células/mL, foi convertida para o sistema de escore linear (EL), que vai de 0 a 10, segundo recomendações da *The Dairy Herd Improvement Association* (DHIA), órgão ligado ao *The National Mastitis Council*. A conversão foi realizada utilizando a seguinte fórmula:

$$EL = ((\ln (CCS / 100)) / 0,693147) + 3$$

Segundo a DHIA, o EL de uma glândula mamária sadia geralmente fica abaixo de 4.

Nos cinco últimos dias de cada fase do QL, foram coletadas amostras individuais para a determinação da composição físico-química (Bentley® 2000, Bentley Instruments). Na ordenha da manhã, eram coletados dois terços da amostra e o terço restante, na da tarde, de forma a representar mais fielmente a composição do leite total produzido no período de 24 horas.

As amostras destinadas à avaliação físico-química, ou seja, os teores de proteína, gordura, lactose, ureia e contagem de células somáticas (CCS) para avaliação do EL foram coletadas em frascos plásticos de 50 mL contendo uma pastilha de Bronopol como conservante (AOAC, 1990). As

amostras foram mantidas sob refrigeração (<10°C) até o momento das análises, ocorridas no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG). A análise do teor de nitrogênio não-proteico (NNP) no leite foi realizada na Clínica do Leite (Piracicaba, SP).

3.2.4. Avaliação do Perfil de Ácidos Graxos da Dieta

Antes das etapas de extração e metilação dos AG, as amostras de forragem e concentrados foram liofilizadas e moídas, enquanto a amostra de óleo de soja, representativa de todo o experimento, foi mantida na sua embalagem original. A extração dos ácidos graxos foi realizada segundo AOAC 996.06. Os ésteres metílicos foram obtidos de acordo com HARTMAN e LAGO (1973).

Os ésteres de metila foram quantificados em cromatógrafo gasoso modelo HP 5890, série II da Hewlett Packard, com detector de ionização de chama (FID), coluna capilar de sílica fundida de 60 m x 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de fase estacionária de ciano propil siloxano, programação de temperatura de 150 a 200°C e taxa de aquecimento de 1,3°C/min. O injetor foi mantido à temperatura de 250°C no modo de divisão de fluxo (*split*) numa razão de 50:1. Foi injetado 1 µL de uma solução 2% em diclorometano. A temperatura do FID foi de 280°C e o fluxo de gás carreador (H₂) foi de 2,5 mL/min (medido a 40°C).

A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção com padrões da NUCHEK (Elysian, IL). A concentração de cada AG presente no pool foi recalculada a partir dos cromatogramas obtidos.

A determinação do perfil de ácidos graxos do concentrado, da forragem e do óleo de

soja foi realizada na Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ).

3.2.5. Obtenção das Manteigas

As manteigas foram produzidas por processo semi-artesanal descrito por GONZALEZ *et al.* (2003) no primeiro dia de coleta de cada fase do QL.

Inicialmente, o leite foi acondicionado em quatro latões previamente identificados por tratamento (0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS) e por horário de ordenha (manhã ou tarde).

Ao final de cada ordenha, os latões foram transportados para o local de fabricação da manteiga onde o leite foi transferido para recipientes menores, aquecido a 45-50°C e, em seguida, passado por desnatadeira elétrica (marca Alfa Laval) para separação do creme. Os cremes produzidos foram submetidos a processo de pasteurização lenta a 72°C por 30 minutos e, em seguida, resfriados em geladeira por 24 h, conforme descrito por BAUMAN *et al.* (2000).

O objetivo da pasteurização foi reduzir o número de microrganismos termoestáveis, responsáveis pela aceleração do processo de rancificação oxidativa sem que houvesse alteração da estabilidade dos componentes.

Os cremes resfriados passaram pelo processo de inversão em liquidificadores domésticos com a adição de água gelada (5-10°C) segundo ADMIK e SALAZAR (1976).

A manteiga obtida foi lavada com água fria, depois retirado o excesso de água e, em seguida, armazenada em potes plásticos transparentes com vedação por pressão e identificadas quanto à data, tratamento e ordenha a uma temperatura de - 80° C até o momento das análises.

Além de separar as manteigas por tratamento (0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS) e por fase do QL, optou-se também por separá-las pelo horário de ordenha (manhã e tarde), pois não foram encontrados na literatura estudos comparando o perfil de ácidos graxos entre diferentes horários de ordenhas.

Durante a sua fabricação, não houve a adição de sal, fermentos lácticos, corantes, decolorantes ou coadjuvantes de quaisquer tipos.

3.2.6. Análises Laboratoriais das Manteigas

O perfil de ácidos graxos da manteiga foi determinado em cromatógrafo gasoso, modelo 6890N, da Agilent Technologies com detector ionização de chama (FID), utilizando-se coluna capilar de sílica fundida SUPELCO, modelo CP-Sil-88, de 100 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,2µm de fase estacionária de ciano propil siloxano. As condições da corrida utilizadas (fluxo de gás carreador, o gradiente de temperatura do forno, a razão de “split”) foram descritas por DESTILLATS *et al.* (2007).

Os principais ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção observados em padrões apropriados (Sigma Diagnostics, PA). Os isômeros de C18:1 *trans/cis* e de CLA foram identificados com base em trabalhos publicados na literatura (ROACH *et al.*, 2002; CHRISTIE *et al.*, 2007; DESTILLATS *et al.*, 2007).

A fração lipídica das amostras foi previamente extraída em solução de hexano-isopropanol (3:2), conforme descrito por HARA e RADIN (1978). Antes da injeção no cromatógrafo, foram metiladas em solução básica de metóxido de sódio (CHRISTIE, 1982). Este

procedimento tem sido preferencialmente utilizado, pois catálises ácidas podem resultar na isomerização dos isômeros de CLA de configuração *cis-trans* ou *trans-cis* para configurações do tipo *trans-trans* (KRAMER *et al.*, 1997). Os ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção observados em padrões apropriados (Sigma Diagnostics, PA).

A determinação do perfil de AG da manteiga foi feita no Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora (MG).

3.2.7. Análises Estatísticas

Os resultados de composição do leite foram analisados pelo procedimento GLM do SAS (SAS Institute Inc., 2001), tendo como fontes de variação: quadrado-latino (QL), animal dentro de QL, período, tratamento (níveis de óleo de soja) e interação QL x tratamento. Os efeitos de tratamento foram avaliados pelo PROC REG do SAS. Efeitos foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

Os resultados das avaliações das manteigas também foram analisados pelo GLM do SAS (SAS Institute Inc., 2001), tendo como fontes de variação: grupo animal (quatro grupos, pois as manteigas foram obtidas a partir da mistura do leite de três animais/tratamento), período, tratamento (níveis de óleo), ordenha e interação tratamento x ordenha. O teor de umidade das manteigas foi utilizado como covariável nas análises de variância para remover qualquer interferência de variações na mesma sobre as demais respostas avaliadas. Os efeitos de tratamento e as equações de regressão foram determinados pelo PROC REG do SAS. As correlações entre as variáveis foram avaliadas pelo PROC CORR do SAS. Efeitos foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

A análise de variância e a comparação de médias pelo teste de *Tukey* ($P < 0,05$) foram realizadas com auxílio do SAS 2001. O

esquema de análise de variância para os experimentos com vacas fistuladas e não-fistuladas é mostrado na tabela abaixo:

Fontes de variação	Graus de liberdade	
	Não-fistuladas	
Total	47	
Períodos (linhas)	3	
Animais (colunas)	11	
Tratamentos	3	
Erro	30	

Utilizou-se da decomposição ortogonal dos graus de liberdade dos tratamentos dietéticos para avaliar o efeito da suplementação com óleo de soja, bem como por decomposição dos graus de liberdade

em efeitos polinomiais, verificar a eventual significância de resposta linear ou quadrática dos tratamentos (SAS Institute Inc., 2001).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Perfil de Ácidos Graxos dos Alimentos

3.3.1.1. Capim-elefante

O teor de lipídeos presente nas plantas decresce à medida que o estágio vegetativo avança. Isso ocorre porque há diminuição da relação folha:haste e, conseqüentemente, da área foliar metabolicamente ativa onde estão presentes os cloroplastos ricos em ácidos graxos poliinsaturados, principalmente o C18:3 (ELGERSMA *et al.*, 2003). Os mesmos autores afirmaram que o intervalo de corte/pastejo exerce influência não só sobre a proporção de fibra, mas também sobre o perfil de AG das gramíneas. À medida que a planta se aproxima da sua maturidade e, conseqüentemente, da idade de emissão de inflorescências, há reorganização das substâncias de reserva, entre elas os AG, em direção às sementes. Essa afirmação ajudou a dar base à decisão de se fazer corte uniformizador das plantas que, no caso do presente experimento, ocorreu aproximadamente 70 dias antes do início do período de adaptação do primeiro QL. Esse

corte objetivou reduzir a variação composicional da forragem fornecida ao longo de todo o período experimental.

Toda planta recém cortada, durante os primeiros estágios da digestão ou do processo de conservação, mantém ativa o metabolismo celular dos seus tecidos e, conseqüentemente, a ação enzimática. A manutenção desse processo acarreta, além do consumo de CHO, proteólise e lipólise (ELGERSMA *et al.*, 2006). Os métodos de conservação de forragem, como a ensilagem e a fenação, levam à diminuição da concentração dos ácidos graxos devido à atividade oxidativa respiratória, à formação de polímeros, assim como, devido à atividade das enzimas vegetais e dos microrganismos (VAN SOEST, 1994; ELGERSMA *et al.*, 2003; SHINGFIELD *et al.*, 2005a; DEWHURST, 2006). Assim sendo, a utilização de meios de conservação de forragens tende a provocar alterações na fração lipídica dos vegetais. Esse fato justifica a utilização de forragens frescas quando se busca a maximização da concentração de CLA na gordura do leite como na presente dissertação. ELGERSMA *et al.* (2003), observou que o teor de CLA

na gordura do leite de vacas alimentadas com a gramínea de clima temperado *Lolium perenne* se elevava linearmente com a concentração do ácido α -linolênico presente na planta.

A Tabela 3.3.1.1.1 apresenta os valores da composição lipídica média do capim-elefante oferecido durante as oito semanas de duração do experimento com as vacas não fistuladas. Deve-se chamar a atenção para o fato de que a evolução das semanas apresentada na tabela não representa, necessariamente, o aumento da maturidade do capim.

Segundo VAN SOEST (1994), a fração lipídica dos vegetais é composta principalmente pelos AG mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), linoleico (C18:2) e α -linolênico (C18:3) totalizando, aproximadamente, 90% dos AG totais. No capim-elefante avaliado, observaram-se valores médios iguais a 1,2; 35,45; 4,02; 20,72 e 18,56 g/100g de AG total (%) para os referidos AG, totalizando 79,95%. Os lipídeos de cadeias curtas (4 a 12 C), média (13 a 17 C) e longa (maior que 18 C) totalizaram 3,85; 38,25 e 59,62%, respectivamente. Os saturados representaram 53,49%, os monoinsaturados 9,32% e os poliinsaturados 39,26%.

As concentrações médias dos AG saturados, mono e poliinsaturados foram iguais a 52,33; 8,89 e 39,26 g/100g de AG totais, respectivamente. Deve-se chamar a atenção com a relação inversa existente entre o ácido palmítico C16:0 e os ácidos linoléico e α -linolênico. À medida que o ácido palmítico reduz a sua concentração, há a elevação dos ácidos insaturados. Estes tendem a ser mais presentes em forragens mais jovens.

FERNANDES *et al.* (2007), trabalhando com amostras de capim-elefante colhidas de diversas propriedades do sul do Estado de São Paulo, observaram concentrações de

C16:0, C16:1 *cis*-9, C18:0, C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9, *cis*-12 e C18:3 iguais a 25,3; 0,8; 5,8; 5,7; 18,7 e 37,0%. Estes valores são numericamente distintos dos observados na presente dissertação, mas que reforçam a observação de VAN SOEST (1994).

Infelizmente, a literatura referente aos ácidos graxos (AG) presentes nas forrageiras de clima tropical ainda é muito pobre. Isso mostra a necessidade de geração de informações sobre o assunto, já que não é prudente a comparação com as informações obtidas em forragens de clima temperado.

3.3.1.2. Óleo de Soja

O presente experimento utilizou como principal fonte lipídica da dieta, óleo de soja comercial.

Características como qualidade de solo, temperatura média anual, cultivar utilizada, entre outros fatores, são capazes de influenciar a composição lipídica dos óleos vegetais. Sendo assim, tornou-se necessário definir um padrão de composição para o óleo de soja que se destina à comercialização e impedir a venda de produtos adulterados. O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou com esse objetivo, em 15 de dezembro de 1993, a Portaria N° 795.

GLASSER *et al.* publicaram em 2008 uma síntese com os dados de trabalhos publicados nos últimos 40 anos que utilizaram suplementos lipídicos de diferentes fontes com o objetivo de verificar o impacto sobre a produção e composição de leite em vacas. Os dados, para comparação, estão apresentados na Tabela 3.3.1.2.1.

Tabela 3.3.1.1.1: Variação do perfil de ácidos graxos do capim-elefante ao longo do experimento¹

Ácido Graxo	Semanas								Média
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	
	(g/100g de ácidos graxos totais)								
C8:0	nq	nq	1,02	0,77	nq	nq	nq	nq	0,89
C10:0	nq	nq	0,58	0,66	nq	nq	nq	nq	0,62
C12:0	2,89	2,85	2,35	1,67	1,99	2,30	2,29	2,38	2,34
C14:0	1,42	1,58	0,76	0,65	1,41	1,24	1,24	1,34	1,21
C15:0	1,14	0,93	0,96	0,46	0,86	0,82	0,84	0,89	0,86
C16:0	42,48	39,73	31,92	27,91	37,26	34,54	34,05	35,35	35,41
C17:0	1,08	0,88	0,28	0,48	0,90	0,86	0,82	0,84	0,77
C18:0	4,22	4,02	3,68	3,50	5,61	3,59	4,98	4,01	4,20
C18:1 c9	6,05	5,93	9,60	11,56	10,50	6,63	8,07	7,30	8,21
C18:1²	0,64	nq	0,27	0,94	1,11	0,50	0,89	0,66	0,72
C18:2 c9c12	17,67	17,11	25,57	25,91	20,62	19,90	20,03	18,85	20,71
C20:0	3,47	2,76	1,39	1,48	2,47	2,34	2,87	2,48	2,41
C18:3 c9c12c15	13,78	19,27	17,54	22,58	12,82	22,27	19,23	20,92	18,55
C20:1	nq	nq	nq	0,50	nq	nq	nq	nq	0,06
C22:0	2,22	1,96	1,76	1,13	1,88	2,32	2,24	2,09	1,94
C24:0	3,27	2,99	2,32	1,55	2,94	2,95	3,31	3,22	2,82
AG saturados	62,19	57,7	47,02	40,26	55,32	50,96	52,64	52,6	52,33
Monoinsaturados	6,69	5,93	9,87	13,00	11,61	7,13	8,96	7,96	8,89
Poliinsaturados	31,45	36,38	43,11	48,49	33,44	42,17	39,26	39,77	39,26

¹ Amostras compostas de cada semana; ² Somatório de outros isômeros de C18:1; nq: detectado mas não quantificado (<0,05 g/100g de ácidos graxos totais)

Tabela 3.3.1.2.1. Comparação dos dados relativos à composição lipídica do óleo de soja adicionado ao concentrado com aqueles exigidos pela legislação brasileira (Portaria N° 795) e apresentados por GLASSER *et al.* (2008)

Ácidos Graxos	Fontes de Informação		
	GLASSER <i>et al.</i> ¹	Portaria N° 795 ¹	Experimento ¹
C14:0	0 – 0,2	nq	0,09
C16:0	9,5 – 13,3	9,0 – 14,5	11,17
C16:1	0 – 0,2	nq	nq
C17:0	-	-	nq
C18:0	3,5 – 4,7	2,5 – 5,0	3,27
C18:1 <i>cis-9</i>	19,8 – 24,8	18,0 – 34,0	22,49
C18:1²	-	-	1,52
C18:2 <i>trans</i>	-	-	nq
C18:2	50,3 – 56,7	45,0 – 60,0	53,78
C20:0	-	nq	0,34
C18:3 <i>trans</i>	-	-	nq
C18:3	5,1 – 8,9	3,5 – 8,0	6,50
C20:1	-	-	0,21
C22:0	-	nq	0,45
C24:0	-	nq	0,40
Saturados	-	-	15,72
Monoinsaturados	-	-	24,22
Poliinsaturados	-	-	60,28

¹Valor expresso em g do ácido graxo / 100 g do total de ácidos graxos da amostra (g/100g);² Somatório de outros isômeros de C18:1; - : não citado; nq: detectado mas não quantificado.

O óleo de soja utilizado no experimento cumpre as exigências impostas pela legislação vigente. Ele apresentou concentrações dos ácidos linoleico e α -linolênico, principais precursores de CLA nos ruminantes, iguais a 53,78 e 6,5 g/100g, respectivamente. Os AG saturados apresentaram-se numa concentração igual a 15,72 g/100g, os insaturados 24,22 g/100g e os poliinsaturados 60,28 g/100 g. A relação

saturado:insaturado do óleo de soja foi igual a 1:5,3.

3.3.1.3. Concentrado

A composição lipídica do concentrado foi avaliada (Tabela 3.3.1.3.1) a partir de amostras coletadas em dois diferentes momentos: no dia em que se preparou o

concentrado (Dia 0) e no último dia de uso (Dia 7). Essa avaliação objetivou verificar o nível de alteração sofrido pelo óleo de soja durante o período de armazenamento.

Devido à sua exposição ao ar (O₂), aos microrganismos, e às variações de temperatura, é de se esperar a ocorrência de

algum grau de saturação ou de β-oxidação (quebra da cadeia carbônica e formação do grupo acetil) dos lipídeos. Tais transformações podem influenciar negativamente a aceitabilidade do alimento pelos animais e, conseqüentemente, a ingestão de matéria seca, além de alterações no perfil de AG da gordura do leite.

Tabela 3.3.1.3.1. Composição lipídica média do concentrado ao longo de sete dias de armazenamento

Ácidos Graxos	Concentração Média ¹							
	Controle		1,5% OS		3,0% OS		4,5% OS	
	Dia 0	Dia 7	Dia 0	Dia 7	Dia 0	Dia 7	Dia 0	Dia 7
C10:0	0,03	-	-	-	-	-	-	-
C12:0	0,13	0,19	0,16	0,14	-	-	-	-
C14:0	0,18	0,19	0,16	0,16	0,13	0,12	0,12	0,12
C16:0	19,18	19,10	15,96	15,43	14,17	14,26	13,72	13,54
C16:1 <i>cis</i>	0,25	0,26	0,19	0,16	-	-	0,13	0,13
C17:0	0,19	0,20	0,16	0,16	-	-	0,18	-
C18:0	3,37	3,33	3,41	3,47	3,36	3,41	3,32	3,43
C18:1 <i>cis-9</i>	24,64	24,36	24,15	23,56	23,10	23,28	22,76	23,08
C18:1 ²	1,33	1,35	1,40	1,43	1,46	1,47	1,49	1,49
C18:2 <i>cis-9 cis-12</i>	45,55	45,74	48,50	49,35	51,51	51,11	52,10	51,61
C20:0	0,45	0,44	0,42	0,39	0,34	0,39	0,35	0,26
C18:3 ω-3	3,83	3,93	4,69	4,95	5,61	5,48	5,83	5,69
C20:1	0,19	0,21	0,22	0,22	-	-	0,05	0,18
C22:0	0,33	0,33	0,38	0,41	0,39	0,41	0,40	0,43
C24:0	0,38	0,37	0,29	0,31	-	0,26	0,21	0,22
Saturados	24,24	24,15	20,94	20,47	18,39	18,85	18,30	18,00
Insaturados	75,79	75,85	79,15	79,67	81,68	81,34	82,36	82,18

¹Concentrações médias, em g/100g de AG total, das amostras coletadas em cada uma das quatro fases do Quadrado Latino; ² Somatório de outros isômeros de C18:1.

Dentre os AG mais presentes no concentrado, o C16:0 apresentou teores variando entre 13,72 e 19,18% nas amostras do dia 0, e de 13,54 e 19,10% nas amostras do dia 7, com tendência de queda à medida em que se adicionou OS. No entanto, apresentou valores estáveis entre os dois dias. O ácido oleico C18:1 *cis*-9 manteve valores estáveis tanto entre tratamentos quanto entre dias. O ácido linoleico C18:2 *cis*-9 *cis*-12 e α -linolênico C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15 apresentaram tendência de elevação à medida em que se adicionou OS ao concentrado. Os valores variaram entre 45,55 e 52,10% nas amostras do dia 0, e 45,74 e 51,61% nas amostras do dia 7 para o ácido linoleico, e entre 3,83 e 5,83% nas amostras do dia 0, e 3,93 e 5,69% nas amostras do dia 7. Não se observou diferença entre os dias dentro de um mesmo concentrado. Mesmo o ácido α -linolênico

C18:3, o mais sujeito à oxidação, manteve valores semelhantes reforçando a estabilidade oxidativa do material.

A partir desses resultados, pode-se concluir que, dentro do período de sete dias, não ocorreram alterações químicas relevantes nos AG originados do óleo de soja adicionados aos concentrados e que o perfil de AG fornecido aos animais permaneceu dentro da composição esperada.

3.3.2. Composição do Leite

A Tabela 3.3.2.1 apresenta os resultados das análises composicionais das amostras de leite. Nesta tabela também são apresentados os dados relativos à produção total e corrigida de leite e de cada um dos seus componentes.

Tabela 3.3.2.1. Produção e composição do leite de vacas mestiças Holandês x Zebu alimentadas com dietas à base de capim-elefante suplementado com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de soja na matéria seca total

Variável	Nível de inclusão de OS na MS da dieta				CV ¹ (%)	Efeito ²	
	0%	1,5%	3,0%	4,5%		L	Q
Produção de leite, kg/vaca/dia	17,8	18,7	18,2	18,2	5,7	ns	ns
PLC para 3,5% gordura, kg/vaca/dia ³	17,4	17,6	16,8	16,4	7,0	ns	ns
Teor de gordura, %	3,36	3,11	2,99	2,84	7,4	<0,01	ns
Produção de gordura, kg/vaca/dia	0,60	0,59	0,55	0,52	9,8	0,03	ns
Teor de proteína, %	3,23	3,25	3,30	3,46	3,8	0,03	ns
Produção de proteína, kg/vaca/dia	0,58	0,61	0,60	0,62	5,0	ns	ns
Teor de lactose, %	4,52	4,45	4,45	4,37	3,1	0,02	ns
Produção de lactose, kg/vaca/dia	0,80	0,83	0,81	0,80	15,0	ns	ns
Escore Linear	3,42	3,65	3,84	3,92	12,9	0,02	ns

¹ Coeficiente de variação; ² ns=não-significativo (P>0,05); L=Linear, Q=Quadrático; ³ PLC = Produção de leite corrigida.

Apesar da manutenção do consumo de MS e da diferença de oferta de energia líquida de lactação entre os tratamentos (+ 0,06Mcal/kg MS à medida que se adicionou óleo), não se observou ($P>0,05$) efeito nem sobre a produção diária de leite nem sobre a produção diária corrigida para 3,5% de gordura. Esse menor aproveitamento energético pode ser explicado em parte pela menor degradabilidade ruminal tanto da MS quanto do FDN (Tabelas 4.3.4.1 e 4.3.4.3 do Capítulo IV) observadas.

Assim como na presente dissertação, nem VARGAS *et al.* (2002) nem EIFERT *et al.* (2006), que trabalharam com a adição de diferentes níveis de OS na dieta de vacas leiteiras, encontraram variações ($P>0,05$) na produção diária ou na corrigida para 3,5% de gordura em relação ao grupo controle. Sendo que esses últimos observaram redução ($P<0,05$) no consumo de MS (kg/dia) e no de FDN (kg/dia). Da mesma forma, OLIVEIRA (2005) trabalhando com a adição de 4,4% de AG via grãos de soja extrusados na dieta de vacas da raça Holandesa não observou efeito ($P>0,05$) sobre a produção diária total nem na de leite corrigida para 3,5% de gordura.

Em contrapartida, ALZAHAL *et al.* (2008), utilizando dietas isoenergéticas, estudou a influência da adição de OS (0; 1,7 e 3,4% da MS), monensina e da associação entre estes sobre a produção e composição do leite de vacas multíparas da raça Holandesa, e observaram aumento ($P<0,01$) na produção diária de leite. BU *et al.* (2007) trabalhando com a adição de 4,0% de OS em dieta com níveis crescentes de energia para vacas da raça Holandesa, observaram aumento ($P<0,05$) na produção diária de leite de 21,7 para 25,8 kg/vaca/dia.

EIFERT *et al.* (2005) avaliaram os efeitos da adição de 4,0% de OS combinada ou não com monensina sódica na dieta de vacas 7/8 Holandês x Gir sobre o consumo, produção e composição do leite. Eles observaram que

o OS reduziu a produção total em 6,7%, e em 15,7% a produção corrigida para 3,5% de gordura. O consumo diário de MS e de FDN também sofreu redução ($P<0,05$).

No presente experimento, tanto o teor quanto a produção diária de gordura reduziram linearmente ($P<0,01$ e $P=0,03$, respectivamente). Os dados estão de acordo com os observados por EIFERT (2004) e ALZAHAL *et al.* (2008). Esses últimos observaram diminuição linear ($P<0,001$) tanto no teor quanto na produção diária de gordura. OLIVEIRA (2005) e EIFERT *et al.* (2006) observaram queda apenas no teor de gordura do leite. Para estes últimos, a redução no teor de gordura do leite foi acompanhada por pequeno acréscimo na produção de leite, permitindo produções de gordura iguais entre tratamentos com e sem OS. SHINGFIELD *et al.* (2008), trabalhando com adição de níveis crescentes de óleo de girassol (0, 250, 500 e 750 g/vaca/dia) numa dieta baseada em silagem de milho, com relação volumoso:concentrado igual a 60:40, para vacas da raça Ayrshire não observaram alteração na produção diária ($P=0,18$) de gordura.

O OS é rico em AG insaturados, esse fato permite que haja considerável secreção do AG C18:1 *trans-10* e dos isômeros de CLA C18:2 *trans-10, cis-12* e C18:2 *trans-9, cis-11*, originados da biohidrogenação ruminal ou da síntese na GM, na gordura do leite. Tais AG são comprovadamente inibidores da secreção de gordura na GM (PIPEROVA *et al.*, 2000; BAUMAN e GRIINARI, 2001; PERFIELD *et al.*, 2006; PERFIELD *et al.*, 2007; BAUMAN *et al.*, 2008). Esse fato, somado aos baixos valores de pH ruminal nos diferentes tratamentos (Tabela 4.3.2.1.1, Capítulo IV) justificaria a queda da gordura observada na presente dissertação.

Diferentemente do que prega a literatura, o teor de proteína do leite, na presente

dissertação, elevou ($P < 0,03$) os seus valores à medida que se adicionou OS. Os teores observados foram iguais a 3,23; 3,25; 3,30 e 3,46% para os tratamentos com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente. O mesmo comportamento não foi observado na produção diária de proteína.

A síntese da proteína do leite, principalmente a caseína, depende do aporte de aminoácidos (AA) via irrigação sanguínea à GM. Sendo assim, quaisquer eventos que influenciem negativamente o crescimento da população bacteriana no rúmen, a absorção intestinal, a concentração plasmática de AA ou o volume de sangue que irriga a glândula mamária, podem causar limitação na síntese proteica (CANT *et al.*, 1993). Segundo MAIGA e SCHINGOETHE (1997), o crescimento bacteriano no rúmen é desejável, pois, durante a fermentação, geram compostos nitrogenados e carbonados que auxiliam na síntese da maior parte dos aminoácidos necessários para que as células mamárias sintetizem a proteína láctea.

Sendo assim, apesar de tais resultados sugerirem que a microbiota ruminal não sofreu ação inibitória suficiente a ponto de comprometer o seu desenvolvimento e reduzir o aporte de aminoácidos (AA) à GM, os resultados de digestibilidade *in situ* observados (Item 4.3.4 do Capítulo IV) contradizem essa suposição.

A adição de AG à dieta diminui a digestão da proteína causando, assim, queda na concentração da amônia ruminal e aumento no fluxo de N para o duodeno. Essas alterações normalmente vêm acompanhadas de aumento na eficiência da síntese de proteína bacteriana. Essa maior eficiência tem sido atribuída à redução do número de protozoários no rúmen, diminuindo, assim, a predação bacteriana e reciclagem de N (PALMQUIST, 1994).

O Item 4.3.2.1 do Capítulo IV mostra que não houve comprometimento da concentração de N-NH₃ no rúmen. Essa informação sugere que o aporte de NNP à glândula mamária não foi comprometido pelo efeito defaunatório da adição de AG insaturados à dieta sobre a população microbiana ruminal. Tal afirmação pode ser comprovada pela inalteração ($P = 0,48$) das concentrações de NNP entre os diferentes tratamentos.

O conteúdo proteico do leite pode diminuir por causa da deficiência de um ou mais aminoácidos. Em dois trabalhos distintos, CANT *et al.* (1993) suplementaram dietas de vacas em lactação com gordura e obtiveram redução na proteína do leite. Esses autores observaram que o lipídio, além de reduzir o fluxo sanguíneo para a GM, diminuiu a concentração arterial de aminoácidos, inibindo a atividade da insulina. Segundo PALMQUIST e JENKINS (1980), o aumento na porcentagem de gordura presente na dieta ocasiona resistência à insulina. Essa resistência tornaria a insulina incapaz de estimular a utilização da glicose pela glândula mamária, sendo outra possível explicação para a redução da concentração de proteína no leite. Em adição, a produção de ácido propiônico durante fermentação ruminal também é uma forma de contribuir para a síntese proteica do leite.

Outra teoria, proposta por DOEPEL *et al.* (2004), sugere que a redução de quaisquer componentes sólidos do leite permitiria à GM redirecionar os nutrientes não utilizados num primeiro momento, para a síntese de um outro componente. Por exemplo, a queda do teor de gordura causada pela presença do CLA C18:2 *trans-10*, *cis-12* permitiria uma economia de energia que poderia ser convertida, entre outros, em lactose ou proteína.

Diante do exposto, o mais provável é que a elevação dos teores de proteína do leite não

seja um efeito de rúmen, mas sim, pós-absortivo como uma possível elevação no fluxo sanguíneo ou um aumento do uso de AA pela GM. Suposição esta que não pode ser comprovada a partir dos dados levantados.

Os resultados obtidos no presente experimento estão de acordo com os observados por FLOWERS *et al.* (2008) e HE *et al.* (2008). Os primeiros autores verificaram a influência de quatro níveis (0, 170, 340 e 510g) de óleo de linhaça adicionado à dieta de vacas Holandesas sobre a composição do leite. Eles observaram que a suplementação com o óleo de linhaça resultou em aumento quadrático ($P < 0,02$) tanto no teor de proteína quanto no de gordura. Eles não observaram efeito sobre a produção de leite, consumo de MS, nem na contagem de células somáticas. Já HE *et al.* (2008), trabalhando com vários tipos de óleos vegetais na dieta de vacas Holandesas, observaram aumento no teor de proteína quando 5,0% de óleo de safflower foi adicionado à dieta. Apesar dos resultados observados, ainda são necessários mais estudos sobre esse assunto.

Nem DHIMAN *et al.* (2000), trabalhando com adição de diferentes níveis (0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 %) de OS numa dieta baseada em silagem de alfafa e milho, nem EIFERT *et al.* (2005) ou EIFERT *et al.* (2006) observaram depressão no conteúdo de proteína do leite.

VARGAS *et al.* (2002), trabalhando com a adição de 3 e 7% de OS em dieta baseada em silagem de sorgo para vacas da raça Holandesa, OLIVEIRA (2005) e BU *et al.* (2007) não observaram nenhum tipo de influência da adição de lipídeos sobre a composição do leite.

Tem-se como verdadeira a afirmação de que a concentração da lactose no leite não pode ser alterada por meio de mudanças na

dieta, a não ser por severa queda no fornecimento de MS ao animal. SUTTON (1989) mostrou que essas mudanças existem, mas são sutis e inconsistentes, alcançando, ocasionalmente, significância estatística. Tem sido reportado que a suplementação com altos níveis de gordura, tanto na forma protegida quanto na livre, é capaz de diminuir a concentração de lactose em até 0,2% (SUTTON, 1989). O autor propõe que não é correto afirmar que a concentração da lactose não pode ser manipulada pela dieta.

O teor de lactose entre os tratamentos controle e com 4,5% de OS diminuiu ($P=0,02$) 0,15%, ou seja, dentro do limite de 0,2% apresentado por SUTTON (1989) para esse tipo de experimento. EIFERT *et al.* (2006) também observaram decréscimo ($P=0,02$) de 0,16% ao adicionar 2,25% de OS à dieta. SANTOS *et al.* (2001a), VARGAS *et al.* (2002), OLIVEIRA (2005), BU *et al.* (2007) e FLOWERS *et al.* (2008) não observaram variações nem no teor nem na produção diária de lactose.

SCHAFHÄUSER JR. (2005) avaliou os efeitos de níveis crescentes de suplementação com quatro níveis (3,5; 5,0; 6,5 e 8,0%) de gordura bruta de arroz, na forma de farelo integral e óleo, em dietas isoproteicas e isofibrosas, sobre o consumo, produção e metabolismo de vacas leiteiras de alta produção na fase inicial da lactação. O autor não observou efeito da suplementação lipídica sobre a produção de leite (33,1; 33,3; 34,0 e 33,4kg/dia, respectivamente), sobre a produção corrigida para gordura, sobre o teor de gordura, lactose ou sobre os sólidos totais. O teor de proteína bruta do leite diminuiu com o aumento da concentração de gordura nas dietas, mas não houve efeito sobre a produção diária de proteína.

Os valores de EL observados para o tratamento controle; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS foram 3,42; 3,65; 3,84 e 3,92,

respectivamente. Esses valores foram linearmente crescentes ($P=0,02$) e estão de acordo com a recomendação da DHIA para que não haja alterações composicionais mensuráveis no leite. FLOWERS *et al.* (2008) não observaram alteração ($P>0,10$) na CCS do leite de vacas alimentadas com diferentes níveis de óleo de linhaça.

Os resultados das análises físico-químicas do leite encontrados neste trabalho estão dentro dos valores recomendados pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA, 1980). Isso indica que o leite de vacas que façam uso de suplementação lipídica com OS em uma dieta baseada em capim-elefante, nestas mesmas condições, não tem as características alteradas, sendo, portanto, considerado um leite normal dentro da legislação vigente, podendo ser utilizado pelas indústrias de laticínios.

3.3.3. Perfil de Ácidos Graxos da Manteiga

Segundo GRUMMER (1991), a habilidade em modificar o perfil da gordura láctea é altamente dependente da eficiência pela qual os lipídeos são transferidos da dieta para o retículo endoplasmático liso das células secretoras da GM. Então, sabendo-se que a capacidade de biohidrogenação da microbiota do rúmen é alta, mas limitada quando há disponibilidade muito grande de substrato, deve-se buscar a maximização da ingestão de AG insaturados de cadeia longa. Isso permite que haja produção de gordura láctea com baixos teores de AG originados da síntese *de novo*, mas rica em insaturados de cadeia longa. Esse mesmo autor observou depressão entre 20 e 40% nos teores dos AG C4:0 a C16:0 e elevação de 55 a 80% nos C18:0 e C18:1 na gordura do leite de vacas alimentadas com canola integral, girassol e óleo de girassol rico em ácido oleico.

3.3.3.1. AG de Cadeia Curta e Média

A Tabela 3.3.3.1 apresenta a concentração dos diferentes AG presentes nas manteigas oriundas de vacas alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de óleo de soja (OS).

Quando comparado com outros alimentos, a gordura do leite possui concentrações elevadas de ácidos graxos (AG) de cadeia curta. Eles apresentam a característica de serem voláteis, conferindo grande parte do aroma e sabor de muitos dos produtos lácteos, principalmente da manteiga e do queijo. No caso dos queijos, esses ácidos contribuem para caracterizar os diferentes tipos (ABREU, 1993, SANTOS *et al.* 2001b).

Os AG de cadeia curta são sintetizados principalmente nas células epiteliais da glândula mamária a partir do acetato e β -hidroxibutirato originados no rúmen (LIN e KUMAR, 1971). Dentre os AG de cadeia curta, especial atenção tem sido dada ao butirato C4:0 devido ao seu potencial efeito anticarcinogênico (PARODI, 1999; CHILLIARD *et al.*, 2000). Já os ácidos láurico C12:0, mirístico C14:0 e palmítico C16:0 são indesejáveis, porque induzem o aumento de colesterol no sangue (GRINARI *et al.*, 1995).

As concentrações dos AG de cadeia curta (C4 a C10) e média (C12 a C16) diminuíram ($P<0,01$) à medida que se adicionou óleo de soja à dieta. Os ácidos butírico (C4:0) e palmítico, que apresentaram um comportamento quadrático, variaram entre 3,34 e 2,68, e 30,32 e 20,99g/100g de AG. Houve variação na concentração do C4:0, C14:0, C15:0 *iso*, C15:0 *anteiso*, C14:0 *iso* e C16:0 entre as ordenhas da manhã e da tarde.

Tabela 3.3.3.1. Concentração (g/100 g de AG totais) dos diferentes ácidos graxos presentes nas manteigas oriundas de vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de capim-elefante e suplementadas com diferentes níveis de óleo de soja

Ácidos graxos ¹	Nível de OS nas dietas (%MS)				Ordenha ²		CV ³ (%)	Efeito ⁴	
	0	1,5	3,0	4,5	M	T		L	Q
	g / 100g de AG totais								
C4:0	3,34	3,41	3,00	2,68	3,06a	3,16b	6,12	**	*
C6:0	2,10	1,97	1,60	1,35	1,76	1,76	6,06	**	ns
C8:0	1,05	0,94	0,73	0,60	0,84	0,82	7,22	**	ns
C10:0	2,50	2,10	1,57	1,31	1,92	1,83	10,01	**	ns
C11:0	0,38	0,30	0,23	0,16	0,26	0,27	11,52	**	ns
C12:0	3,12	2,56	1,99	1,53	2,38	2,22	13,57	**	ns
C13:0	0,07	0,07	0,01	0,03	0,03	0,06	127,01	ns	ns
C14:0	11,40	9,89	8,12	7,09	9,37a	8,87b	8,62	**	ns
C15:0 <i>iso</i>	0,35	0,30	0,24	0,19	0,26a	0,28b	7,99	**	ns
C15:0 <i>anteiso</i>	0,61	0,53	0,45	0,38	0,48a	0,51b	7,52	**	ns
C14:1 <i>cis-9</i>	1,41	1,17	0,99	0,83	1,07	1,13	12,69	**	ns
C15:0	1,14	1,00	0,87	0,77	0,95	0,95	5,89	**	ns
C14:0 <i>iso</i>	0,27	0,23	0,20	0,17	0,21a	0,22b	7,98	**	ns
C16:0	30,32	25,26	22,89	20,99	25,79a	23,94b	7,54	**	*
C16:1 <i>cis-9</i>	1,75	1,38	1,29	1,21	1,36	1,46	11,39	**	*
C17:0	0,61	0,56	0,51	0,46	0,53	0,54	6,94	**	ns
C17:1	0,28	0,23	0,21	0,18	0,21a	0,24b	14,65	**	ns
C18:0	7,78	9,12	9,42	9,94	9,11	9,02	6,36	**	ns
C18:1 <i>trans-5</i>	-	-	0,02	0,02	<0,01	0,01	284,17	ns	ns
C18:1 <i>trans-6-8</i>	0,23	0,51	0,66	0,88	0,60	0,84	15,66	**	ns
C18:1 <i>trans-9</i>	0,34	0,52	0,64	0,69	0,55	0,54	15,32	**	*
C18:1 <i>trans-10</i>	0,43	1,04	1,36	1,52	1,05	1,13	34,94	**	ns
C18:1 <i>trans-11</i>	2,00	4,24	6,44	9,35	5,66	5,36	21,01	**	ns
C18:1 <i>trans-12</i>	0,36	0,55	0,72	0,80	0,61	0,60	13,08	**	ns
C18:1 <i>trans-13 e trans-14</i>	0,50	0,66	0,75	1,18	0,83	0,71	37,74	**	ns

continua

Ácidos graxos ¹	Nível de OS nas dietas (%MS)				Ordenha ²		CV ³ (%)	Efeito ⁴	
	0	1,5	3,0	4,5	M	T		L	Q
	g / 100g de AG totais								
C18:1 <i>cis</i> -9 e <i>trans</i> -15	20,40	21,83	23,14	22,64	21,04a	22,97b	7,61	**	ns
C18:1 <i>cis</i> -11	0,58	0,63	0,70	0,78	0,67	0,68	7,64	**	ns
C18:1 <i>cis</i> -12	0,27	0,50	0,66	0,82	0,56	0,56	13,53	**	ns
C18:1 <i>cis</i> -13	0,05	0,08	0,09	0,10	0,09	0,07	73,93	ns	ns
C18:1 <i>cis</i> -14 e <i>trans</i> -16	0,34	0,52	0,62	0,66	0,53	0,54	10,38	**	**
C19:0	0,12	0,21	0,29	0,29	0,23	0,23	20,05	**	*
C18:1 <i>cis</i> -15	0,10	0,18	0,23	0,21	0,18	0,18	32,25	**	*
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -12	0,32	0,32	0,27	0,38	0,34	0,30	23,95	ns	**
C18:2 <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -12	0,11	0,17	0,24	0,30	0,21	0,20	40,27	**	ns
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	2,29	2,40	2,42	2,40	2,30a	2,46b	7,23	ns	ns
C20:0	0,12	0,13	0,13	0,14	0,13	0,13	6,19	**	ns
C18:3 <i>iso</i> 1	0,15	0,16	0,16	0,14	0,14	0,17	23,61	ns	ns
C18:3 <i>iso</i> 2	-	<0,01	0,03	0,05	0,01	0,02	159,35	*	ns
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	0,28	0,29	0,26	0,23	0,28	0,25	20,00	ns	ns
CLA C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	1,28	2,47	3,74	4,59	2,90	3,15	18,00	**	ns
CLA C18:2 <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11	0,02	0,04	0,06	0,08	0,05	0,05	15,06	**	ns
CLA C18:2 <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	<0,01	0,01	0,03	0,03	0,02	0,02	49,85	**	ns
Saturados	63,64	56,99	50,89	46,82	55,87a	53,30b	4,97	**	ns
Insaturados	33,47	40,07	45,71	50,10	41,28a	43,39b	5,42	**	ns
Monoinsaturados	29,01	34,22	38,51	41,88	35,04a	36,77b	10,4	**	ns
Poliinsaturados	4,46	5,85	7,20	8,22	6,24	6,63	5,81	**	ns

¹Os AG estão ordenados pelos tempos de retenção observados; ²Média das ordenhas na manhã (M) e tarde (T); Médias seguidas por letras distintas diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Tukey; ³Coefficiente de Variação; ⁴Probabilidade de efeito Linear (L) ou Quadrático (Q) (*P<0,05; **P<0,01; ns: não significativo). Não houve efeito de interação tratamento x horário de ordenha (P>0,05) para nenhuma das respostas avaliadas.

GRUMMER (1991), PALMQUIST *et al.* (1993), CHOUINARD *et al.* (1997) GRIINARI *et al.* (1998), DHIMAN *et al.* (2000), BAUMAN e GRIINARI (2003) e BU *et al.* (2007) descreveram várias teorias sobre a redução da síntese *de novo* de AG na glândula mamária. Dentre elas, a teoria da deficiência de acetato e β -hidroxibutirato, a teoria da glicogênese-insulina, a teoria da vitamina B₁₂/metilmalonil e teoria da biohidrogenação. Esta última tem sido a mais aceita, e baseia-se no princípio de que certas condições nutricionais que afetam a biohidrogenação ruminal dos AG, levam à síntese de AG *trans* que são potentes inibidores da síntese *de novo* na glândula mamária.

Tanto a teoria da deficiência de acetato e β -hidroxibutirato quanto a da biohidrogenação seriam capazes de explicar a diminuição da concentração dos AG de cadeia curta e média observada no presente experimento, pois a adição de óleo de soja reduziu as concentrações de acetato e butirato no rúmen (Tabelas 4.3.2.2.1 e 4.3.2.2.3 do Capítulo VI), e a Tabela 3.3.2.1 confirma que realmente houve aumento na concentração de todos os isômeros *trans* presentes na manteiga.

Concomitante à redução do teor dos AG de cadeia curta e média, a adição do OS aumentou a participação dos AG de cadeia longa em 40%, em média, refletindo a composição do óleo de soja, cuja participação desses AG gira em torno dos 90%.

BAUMAN e GRIINARI (2001) observaram que o aumento no aporte de AG para o rúmen, associado a modificações do metabolismo da população microbiana do rúmen pode elevar a produção de AG *trans*. BAUMGARD *et al.* (2001) observaram que infusões de C18:2 *trans*-10 *cis*-12 no abomaso, reduziu em 44% a porcentagem de gordura do leite e 48% a atividade das enzimas acetil-CoA carboxilase e do

complexo Ácido Graxo Sintetase. Porém, a infusão de C18:2 *cis*-9 *trans*-11 não afetou a produção de gordura.

SANTOS *et al.* (2001b) objetivaram verificar o efeito de duas diferentes fontes de lipídios (soja integral moída ou óleo de soja) adicionadas à dieta de seis vacas mestiças Holandês x Zebu sobre o perfil de AG da gordura do leite, especialmente sobre o aumento do CLA. Eles observaram que, se comparado com a ração controle, as fontes suplementares de lipídios reduziram significativamente ($P < 0,05$) os teores dos AG butírico C4:0, caproico C6:0, caprílico C8:0, cáprico C10:0, láurico C12:0, mirístico C14:0 e total de AG de cadeia curta no leite, sendo o efeito maior com a ração suplementada com óleo de soja.

EIFERT *et al.* (2005, 2006) trabalhando com a adição de, respectivamente, 4,0 e 2,25% de óleo de soja na MS de uma dieta contendo monensina e silagem de milho como volumoso, observaram que a adição de óleo reduziu tanto os ácidos graxos de cadeia curta quanto os de média. OLIVEIRA (2005) trabalhando com a adição de soja extrusada em dieta com duas proporções de forragem observou redução na concentração de AG de cadeia curta, tanto em dietas com alta (131,64 para 99,23 mg/g de AG) como de baixa proporção de forragem (125,45 para 94,67 mg/g de AG) ($P < 0,01$). O maior efeito foi observado para dietas com alta proporção de forragem. A redução da concentração dos AG de cadeia curta foi acompanhada pelo aumento da concentração de C18:2 *trans*-10 *cis*-12, para o tratamento com baixa fibra e alto teor de lipídeo ($P < 0,01$). De modo geral, os AG de cadeia média diminuíram com o aumento do teor de lipídeos na dieta.

3.3.3.2. AG de Cadeia Ímpar e Ramificada (AGCIR)

A principal fonte de AGCIR no leite são as bactérias ruminais que sintetizam os AG a partir dos AGV de cadeia ímpar (propionato e valerato, principalmente) como *primers* (DEMEYER e DOREAU, 1999).

Excetuando os isômeros C18:3 *iso1* e C18:3 *iso2*, a inclusão de níveis crescentes de óleo de soja (OS) reduziu ($P < 0,01$) a concentração dos ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada (AGCIR). O AG C14:0 *iso* apresentou concentrações iguais a 0,27; 0,23; 0,20 e 0,17 g/100 g, o AG C15:0 *iso* de 0,35; 0,30; 0,24 e 0,19 g/100 g e o AG C15:0 *anteiso* de 0,61; 0,53; 0,45 e 0,38 g/100 g para os tratamentos com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente. Estas observações fazem supor que à medida que se adicionou (OS) à dieta, houve inibição da síntese microbiana. Esse fato é confirmado pelos resultados observados na dinâmica ruminal apresentados no Capítulo IV. Resultados similares aos observados nessa dissertação também foram reportados por MANSBRIDGE e BLAKE (1997), CHILLIARD *et al.* (2000), SOLOMON *et al.* (2000), EIFERT *et al.* (2005) e EIFERT *et al.* (2006).

Segundo OR-RASHID *et al.* (2007), os AG C15:0, C15:0 *iso* e *anteiso* e o C17:0 *iso* e *anteiso* se apresentam na gordura dos ruminantes em concentrações que variam entre 1 e 3%. Na presente dissertação, as concentrações observadas foram iguais a 2,7; 2,39; 2,07 e 1,80 g/ 100g para os tratamentos 0; 1,5; 3,0 e 4,5 % de OS, respectivamente.

Segundo VLAEMINCK *et al.* (2006b), variações na concentração de AGCIR estão relacionadas à composição nutricional da dieta. O conteúdo dietético de amido e de proteína bruta é, respectivamente, negativa e positivamente correlacionados às concentrações de AGCIR na gordura do leite. WEIMER *et al.* (1999) observaram que a população de bactérias celulolíticas do rúmen tende a aumentar à medida que se

eleva o conteúdo de FDN da dieta. Isto pode explicar os altos níveis de AGCIR normalmente encontrados em dietas com alta relação volumoso:concentrado.

VLAEMINCK *et al.* (2004) verificaram que altos níveis de amido na dieta provocaram aumento na proporção dos AG C15:0 e C17:0, enquanto que incremento no conteúdo de FDN foi positivamente relacionado à concentração de C15:0 *anteiso*. Essas observações vão de acordo com o fato de que os AG C15:0 e C17:0 são importantes componentes das bactérias amilolíticas e o C15:0 *anteiso* das celulolíticas. JURJANZ *et al.* (2004) e VAN NESPEN *et al.* (2005) citado por VLAEMINCK *et al.* (2006b) observaram baixos níveis de C14:0 *iso* e C15:0 *iso* na gordura do leite de vacas em início de lactação. Isso pode ter sido originado pela dieta baseada em silagem de milho e concentrado energético com altos níveis de amido rapidamente degradável no rúmen capaz de causar severa redução de pH pós-prandial e de inibir as bactérias celulolíticas.

VLAEMINCK *et al.* (2006b) relataram que o aumento na concentração do AGCIR C17:0 *iso* foi acompanhado da diminuição da concentração do AG C18:0 e aumento dos intermediários monoenos *trans*. Baseando-se nessas observações, as bactérias envolvidas na biohidrogenação ruminal têm sido classificadas em dois grupos: A - formado por bactérias capazes de hidrogenar AG poliinsaturados até monoenos *trans* e, B - responsáveis por hidrogenar os monoenos *trans* a C18:0 (Item 2.9.2.2 do Capítulo II). Isso sugere que as condições ruminais que promovem a síntese do AG C17:0 *iso* são inibitórias ao grupo de bactérias B (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1988).

Pouco se sabe a respeito de como as bactérias regulam a sua composição lipídica, entretanto, sabe-se que elas podem

incorporar diretamente os AG da dieta. DEMEYER e DOREAU (1999) observaram que, na presença de altas quantidades de lipídios dietéticos, as bactérias e os protozoários podem incorporar ácido linoleico e outros AG em sua estrutura de membrana, inibindo a síntese microbiana *de novo*, corroborando a menor produção de AGCIR nas dietas com OS.

3.3.3.3. AG de Cadeia Longa

Houve incremento ($P < 0,01$) nas concentrações de todos os AG de 18 C, saturados e monoinsaturados, à medida que se adicionou OS à dieta. Destaque para os ácidos esteárico C18:0 e oleico C18:1 *cis-9* com concentrações iguais a 7,78; 9,12; 9,42 e 9,94 g/100 g e 20,40; 21,83; 23,14 e 22,64 g/100 g para as dietas contendo 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente. A concentração do ácido esteárico C18:0 aumentou com a elevação do teor de OS da dieta, possivelmente em consequência da maior taxa de biohidrogenação ruminal dos AG C18 poliinsaturados presentes na dieta.

GRUMMER (1991) forneceu suplemento para vacas em lactação com AG livres e observou diminuição na relação C18:0 : C18:1 na gordura do leite, indicando que a habilidade de biohidrogenação da microbiota do rúmen havia sido excedida devido às grandes quantidades de óleo livre presente no rúmen. Na presente dissertação, essa relação variou pouco entre os tratamentos 0 e 4,5% de OS (3,4 e 3,8; respectivamente) sugerindo que a quantidade total de lipídeos oferecida na dieta (7,1% da MS na dieta com 4,5% de OS) não alcançou o limite de ação da biohidrogenação ruminal.

O ácido oleico C18:1 *cis-9* foi o isômero *cis* que apresentou a concentração mais elevada na gordura das manteigas. Ele pode

ser originado tanto da biohidrogenação dos AG C18 insaturados presentes na dieta quanto da ação da Δ^9 -desaturase sobre o ácido esteárico C18:0 (JENKINS, 1993). Por sua vez, o AG vaccênico C18:1 *trans-11* foi o principal isômero *trans* observado na gordura das manteigas.

OLIVEIRA (2005) observou que tanto a redução da proporção de forragem como o teor de lipídeos na dieta, provocaram decréscimo na concentração de C18:0 na gordura do leite ($P < 0,05$), indicando possível redução das etapas finais da biohidrogenação ruminal. Estes efeitos também foram observados por GRIINARI *et al.* (1998) que encontraram redução na produção do ácido esteárico C18:0 (136 para 63 g/dia) acompanhada pelo aumento na proporção de AG C18:1 *Trans* em função redução da proporção de forragem na dieta.

Segundo EIFERT *et al.* (2005), aumento nas concentrações dos isômeros C18:1 *trans* no duodeno podem provocar incrementos na quantidade de substrato para a enzima Δ^9 -desaturase presente nos tecidos refletindo, assim, no conteúdo do ácido rumênico (CLA C18:2 *cis-9 trans-11*). Essa observação vai ser confirmada e comentada mais adiante. BATEMAN e JENKINS (1998) observaram aumento na concentração de C18:1 *trans* no conteúdo ruminal quando a dose de OS foi aumentada para até 8% da MS, o que concorda com FELLNER *et al.* (1995), que verificaram aumento na concentração de isômeros C18:1 *trans*, e reduções na biohidrogenação e formação de C18:0, quando elevaram a concentração de ácido linoleico em meio de cultura.

As concentrações médias dos ácidos linoleico C18:2 *cis-9 cis-12* e α -linolênico C18:3 *cis-9 cis-12 cis-15* foram de 2,38 e 0,27 g/100 g e se mantiveram estáveis à medida que se adicionou OS à dieta indicando que a biohidrogenação ruminal

não chegou ao seu limite apesar do maior aporte de AG insaturados. O horário de ordenha influenciou ($P<0,05$) a concentração do ácido linoleico (2,30 e 2,46 g/100 g, respectivamente, nas ordenhas da manhã e da tarde).

Proporcionalmente à quantidade de ácido linoleico presente na dieta, percebe-se que a sua concentração na manteiga foi baixa. Isso se deve a três fatores: primeiro, devido à baixa eficiência de incorporação deste AG quando em altas concentrações, segundo, porque os tecidos de reserva têm maior afinidade a esse AG que a glândula mamária (CHILLIARD *et al.*, 2000) e, devido ao seu alto grau de biohidrogenação no rúmen.

Para EIFERT *et al.* (2005), tanto o OS como a monensina foram eficientes em elevar ($P<0,05$) as concentrações dos ácidos oleico, linoleico e α -linolênico no leite, muito embora os valores observados tenham sido baixos, principalmente, em relação à quantidade de OS fornecida nas dietas. Segundo EIFERT *et al.* (2006), a concentração do ácido linoleico não diferiu entre as fontes de carboidratos, mas aumentou ($P<0,05$) na presença de OS. Um pequeno acréscimo observado (7,0%)

indicou intensa biohidrogenação do ácido linoleico.

3.3.3.4. Relação Saturado:Insaturado

A inclusão de níveis crescentes de OS diminuiu ($P<0,01$) a proporção dos AG saturados em 25% (de 63,64 para 53,78 g/100 g) para as dietas com 0 e 4,5% de OS. Foi observado aumento ($P<0,01$) da participação dos AG insaturados, monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) em 43% (de 33,47 para 50,10 g/100 g), 44% (de 29,01 para 41,88 g/100 g) e 54 % (de 4,46 para 8,22 g/100 g) na gordura das manteigas oriundas dos tratamentos com adição de 0 e 4,5% de OS, respectivamente (Figura 3.3.3.1).

Esse resultado ocorreu provavelmente devido ao aumento no fornecimento de AG insaturados na dieta, fazendo com que parte deles escapasse do processo de biohidrogenação ruminal, sendo absorvidos no intestino delgado, elevando, com isso, seus teores no leite. Outro motivo poderia ser a redução da concentração dos AG de cadeia curta e média (JENKINS, 1993) já que o excesso de AG de cadeia longa inibe a síntese *de novo*.

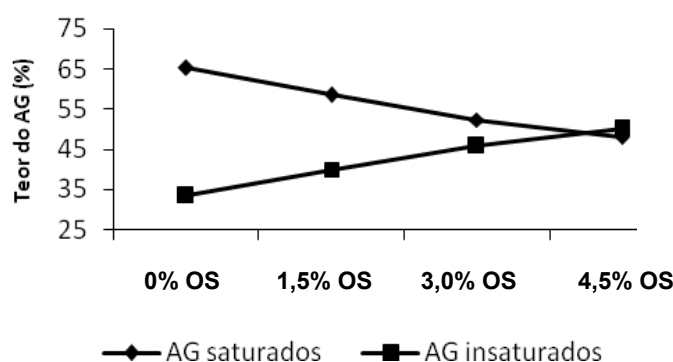


Figura 3.3.3.1. Representação dos teores de ácidos graxos saturados e insaturados presentes nas manteigas oriundas de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja na matéria seca da dieta.

Resultados semelhantes foram obtidos por DRACKLEY e ELLIOTT (1992), LACOUNT *et al.* (1995) e SANTOS *et al.* (2001a). É importante resaltar que o aumento na concentração de AG insaturados, principalmente o C18:1 *cis*-9, *trans*-11 e C18:1 *cis*-9, é bastante interessante do ponto de vista nutracêutico, devido à sua conhecida ação anti-aterosclerótica (PARODI, 1999; PARIZA *et al.*, 2000).

3.3.3.5. Ácidos Graxos *Trans*

A adição de níveis crescentes de AG de cadeia longa mono e poliinsaturados na dieta via OS elevou a concentração dos AG C18:1 *trans*-11 ($P < 0,01$) e C18:1 *trans*-10 no leite ($P < 0,01$), indicando incremento no aporte de AG intermediários da biohidrogenação ruminal na glândula mamária. No presente trabalho, apesar do incremento na concentração do ácido esteárico C18:0 ($P < 0,01$), o aumento verificado na concentração dos AG C18:1 *trans* indica que a biohidrogenação dos AG insaturados da dieta não foi completa no rúmen, embora seja comum que a extensão da biohidrogenação aumente com a elevação do grau de insaturação dos AG da dieta.

O acúmulo de C18:1 *trans* no leite é característica da incompleta biohidrogenação dos AG no rúmen (GRUMMER, 1991; BAUMAN *et al.*, 1999; BAUMAN e GRIINARI, 2001). De modo geral, a concentração de C18:1 *trans* na gordura do leite é aumentada em situações como na adição de altas quantidades de lipídios insaturados na dieta (C18:1 *trans*11), em baixo pH ruminal (C18:1 *trans*-10) e na presença de ionóforos (CANT *et al.*, 1993; BATEMAN e JENKINS, 1998). Para BESSA *et al.* (2000), a população microbiana é muito sensível aos fatores acima citados e a maior produção ruminal de isômeros C18:1 *trans*

nestas situações é um mecanismo de defesa da microbiota, permitindo às bactérias manter a integridade da membrana celular, uma vez que os AG *trans* são menos tóxicos que os de configuração *cis*.

Têm-se discutido a respeito do papel dos isômeros *trans* gerados no rúmen durante a biohidrogenação ruminal e supõe-se que o acúmulo destes é função da menor toxicidade da configuração *trans* comparada com a *cis* às membranas celulares dos microrganismos ruminais (BESSA *et al.*, 2000). A rota da biohidrogenação do ácido linoleico C18:2 envolve a formação de um dieno conjugado e, posteriormente, de um isômero *trans*, até a completa saturação a AG esteárico C18:0. Embora a formação de CLA C18:2 *cis*-9 *trans*-11 e de C18:1 *trans*-11 esteja envolvida na principal rota de biohidrogenação, em situações dietéticas específicas, há aparecimento de outros dienos e AG *trans* correspondentes (CHILLIARD *et al.*, 2000), o que concorda com o aumento das concentrações dos diferentes isômeros *trans* no leite.

Quando vacas leiteiras são alimentadas com dieta rica em concentrados e AG poliinsaturados de cadeia longa, a depressão da concentração de gordura do leite é acompanhada por aumento na do AG C18:1 *trans*-10 (Item 2.17 do Capítulo II) (GRIINARI *et al.*, 1998; BAUMAN *et al.*, 1999; BAUMGARD, 2002). Essa afirmação confirma os resultados observados para composição do leite (Item 4.3.1.4 desse Capítulo). A Tabela 3.3.2.1 mostra que houve diminuição linear ($P < 0,05$) tanto no teor quanto na produção diária de gordura, resultado da elevação das concentrações dos AG *trans*.

Apesar da ingestão de AG *trans* estar relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, pelo aumento na relação LDL/HDL (PARODI, 1999; PARIZA *et al.* 2000), o ácido vaccênico C18:1 *trans*-11

tem ação potencialmente benéfica à saúde. Ele pode ser convertido em ácido rumênico (CLA C18:2 *cis-9 trans-11*) no corpo humano a partir da ação da enzima Δ^9 -desaturase (TURPEINEN *et al.*, 2002).

3.3.3.6. Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

As rotas da biohidrogenação ruminal dos ácidos linoleico e α -linolênico propostas por HARFOOT e HAZLEWOOD (1988) (Figuras 2.9.2.1.1.1 e 2.9.2.1.1.2 do Capítulo II) envolvem a formação do ácido rumênico (CLA C18:2 *cis-9 trans-11*) e sua redução à ácido vaccênico C18:1 *trans-11* antes da sua completa saturação à ácido esteárico C18:0. Devido a essas rotas metabólicas e à síntese endógena tendo como substrato o ácido vaccênico, de 78 a 85% do CLA encontrado na gordura do leite apresenta-se na forma de ácido rumênico C18:2 *cis-9 trans-11* (CORL *et al.*, 1998; BAUMAN e GRIINARI, 2001; BU *et al.*, 2007).

O incremento nas concentrações do isômero C18:1 *trans-11* no duodeno pode elevar a quantidade de substrato para a enzima Δ^9 -desaturase presente no tecido adiposo e na glândula mamária refletindo, assim, no conteúdo do ácido rumênico na gordura dos ruminantes. Dependendo do ambiente ruminal, a rota da biohidrogenação pode ser alterada, promovendo formação de outros isômeros *trans* e, conseqüentemente, outros isômeros de CLA (GRIINARI *et al.*, 1998). Em ambiente ruminal com baixo pH tende-se a formar o isômero de CLA C18:2 *trans-10 cis-12* e os monoenos *trans-10*.

Na presente dissertação, observou-se um aumento linear ($P < 0,01$) nas concentrações de todos os isômeros de CLA à medida que se adicionou OS à dieta. As concentrações para os tratamentos com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS foram 1,30; 2,52; 3,83 e 4,70 g/100 g de AG total, respectivamente. Nos

Leite com elevados teores de ácido vaccênico geralmente é rico em ácido rumênico (GRIINARI *et al.*, 1998, BU *et al.*, 2007).

tratamentos com 0 e 4,5% de inclusão de OS na dieta, houve aumento na concentração total de CLA da ordem de 361,5%. O isômero C18:2 *cis-9 trans-11* representou, aproximadamente, 98% do total de CLA e aumentou 358,6% entre os tratamentos com 0 e 4,5% de OS.

EIFERT *et al.* (2006) e DHIMAN *et al.* (2000) observaram aumento ($P < 0,05$), em relação ao grupo controle, de 230 e 237 % no conteúdo de CLA total quando adicionaram 2,25 e 4,0% de OS na dieta, respectivamente. Embora sejam experimentos diferentes, as respostas semelhantes observadas para níveis de óleo tão distintos fazem supor a existência de outros fatores que envolvem a biohidrogenação ruminal e a secreção de CLA no leite (CHILLIARD *et al.*, 2000). Trabalhando com vacas alimentadas com dietas controle contendo 59% de forragem e basal suplementada com 4,0% de OS na MS, BU *et al.* (2007) observaram aumento ($P < 0,05$) no teor de CLA C18:2 *cis-9 trans-11* da ordem de 273%. DHIMAN *et al.* (2000) adicionaram 0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 % de OS na dieta de vacas em lactação e observaram que relação ao grupo controle, as dietas com 2,0 e 4,0% de OS aumentaram a concentração total de CLA em 237 e 314%, respectivamente.

MCGUIRE *et al.* (1996) observaram aumento linear ($P < 0,05$) de, aproximadamente, 300% na concentração de CLA no leite ao utilizar 3,0 e 7,2% de lipídios insaturados (óleo de milho) na dieta.

Com o objetivo de avaliar a composição lipídica do leite de vacas alimentadas com pasto de bromegrass (*Bromus riparius*) com concentrado, pasto com TMR ou somente

TMR, BARGO *et al.* (2006) verificaram que quanto maior a proporção de pasto nas dietas menor foi o conteúdo de AG de cadeia curta e média e de AG saturados e maior o conteúdo de AG de cadeia longa e insaturados. Em relação ao grupo TMR, aquele cuja dieta foi baseada somente em pasto apresentou conteúdo de CLA C18:2 *cis-9 trans-11* 105% maior. Segundo os autores, o aumento no teor de CLA foi associado primariamente à elevadas concentrações de ácido α -linolênico C18:3 presentes na forragem, o qual dá origem ao ácido vaccênico a partir do processo de biohidrogenação ruminal.

OLIVEIRA (2005) observou que a concentração de C18:2 *cis-9 trans-11* aumentou ($P < 0,01$) 30,5% com a inclusão de lipídeos em dietas com elevado teor de forragem. Para dietas com baixa proporção de forragem, a elevação no teor de lipídeos acarretou aumento ($P < 0,01$) de 28%. Segundo o autor, o menor aumento no tratamento com menor proporção de forragem pode ser explicado pelo incremento de C18:2 *trans-10 cis-12*, indicando modificação da biohidrogenação ruminal.

Segundo BU *et al.* (2007), sob mesmas condições, óleos vegetais ricos em ácido linoleico são mais eficientes em produzir ácido vaccênico e CLA *cis-9 trans-11* na

gordura do leite do que óleos contendo altos níveis de ácido α -linolênico. A mistura do linoleico com α -linolênico, apesar de aditiva, nunca é superior ao linoleico isolado. Esse fato explica a alta eficiência do OS em sintetizar CLA na gordura do leite.

3.3.3.7. Relação entre os AG *Trans-11* e *Cis-9 Trans-11*

O isômero C18:2 *cis-9 trans-11* é o principal CLA presente na gordura do leite de bovinos, sendo derivado da biohidrogenação ruminal dos AG insaturados da dieta e pela conversão endógena do ácido vaccênico C18:1 *trans-11*, via ação da enzima Δ^9 -desaturase, na glândula mamária (BAUMAN *et al.*, 1999). A similaridade das respostas do CLA C18:2 *cis-9 trans-11* com as observadas para o ácido vaccênico indicam uma forte influência da atividade da Δ^9 -desaturase na incorporação do CLA C18:2 *cis-9 trans-11* (Figuras 3.3.3.7.1 e 3.3.3.7.2).

Percebeu-se elevada correlação ($r^2=0,942$) entre ambos os AG, sendo que a concentração do CLA C18:2 *cis-9 trans-11* (eixo y) aumentou 0,448 unidades a cada incremento de uma unidade de C18:1 *trans-11* (eixo x) ($\hat{y}=0,448x + 0,546$).

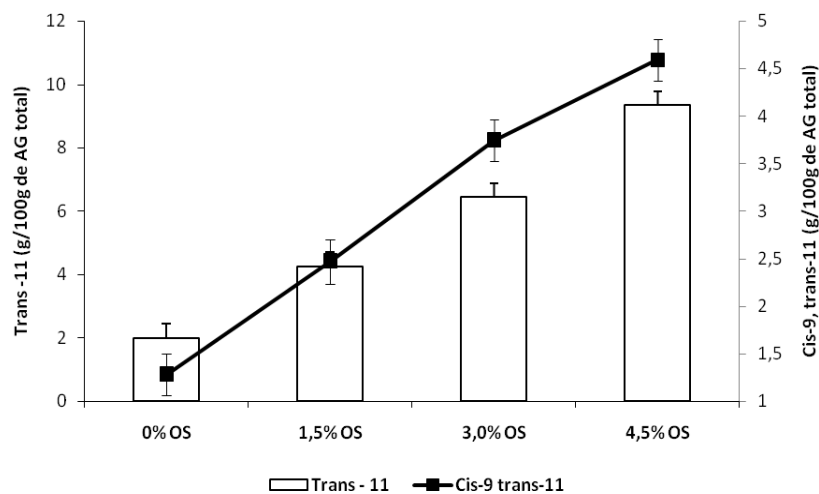


Figura 3.3.3.7.1. Influência da adição de níveis crescentes de óleo de soja sobre a concentração dos ácidos graxos C18:1 *trans-11* e o isômero de CLA C18:2 *cis-9 trans-11* no leite de vacas mestiças Holandês x Zebu.

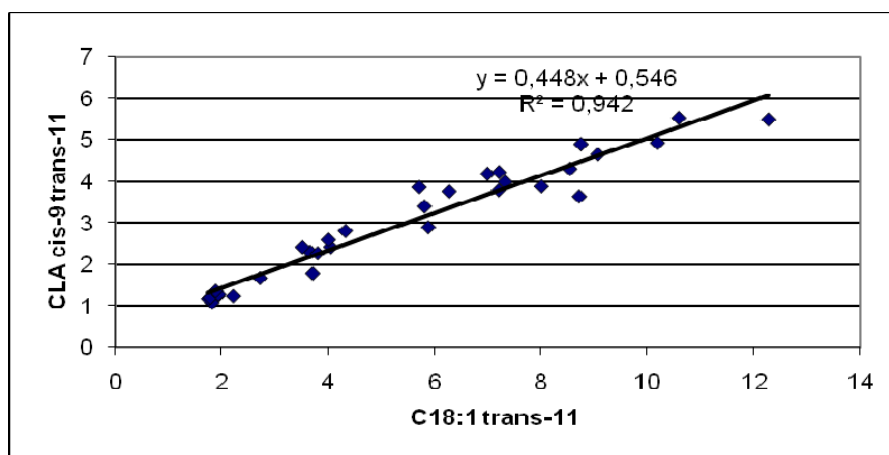


Figura 3.3.3.7.2. Relação entre a concentração do isômero de CLA *cis-9 trans-11* (eixo y) e o AG C18:1 *trans-11* (eixo x) no leite de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja na matéria seca da dieta.

3.3.3.8. AG C18:1 *Trans-10*, C18:2 *Trans-10 Cis-12* e C18:2 *Trans-9 Cis-11*

GRIINARI *et al.* (1998) observaram que a combinação de dietas pobres em fibra, ricas em carboidratos (CHO) e em AG insaturados promovia alterações na fermentação ruminal reduzindo a concentração do AG C18:1 *trans-11* e elevando a de C18:1 *trans-10* no leite, refletindo na redução do teor de gordura.

GRIINARI *et al.* (1998) e CHOUINARD *et al.* (1999) foram os primeiros autores a afirmar que o AG C18:1 *trans-10* e o CLA C18:2 *trans-10 cis-12* estão associados com os mecanismos responsáveis pela síndrome da baixa gordura do leite.

BAUMGARD *et al.* (2001) relataram reduções na concentração de gordura do leite na ordem de 25 a 50% para infusões intra-abomasais de 3,5 a 14,0 g/dia de CLA

C18:2 *trans-10 cis-12*, respectivamente. Em dieta pobre em fibras e rica em CHO, PETERSON *et al.* (2003) encontraram redução de 27% e aumento na concentração de CLA C18:2 *trans-10 cis-12* de < 0,01 para 0,6 g/100g. Esses mesmos autores observaram em biópsia de tecidos da glândula mamária que o CLA C18:2 *trans-10 cis-12* causava redução significativa na concentração do mRNA responsável pela síntese das enzimas: 1) Acetil-CoA Carboxilase e a Ácido Graxo Sintetase: envolvidas com a síntese *de novo*; 2) Lipoproteína Lipase: responsável pelo transporte de AG da circulação para o interior da célula; 3) Estearoil-CoA Dessaturase que auxilia na dessaturação dos AG e 4) Ácido Graxo Acil-Coa Ligase, Glicerol Fosfato Aciltransferase e Acilglicerol Fosfato Aciltransferase: importantes na síntese de triglicerídeos intracelular.

Trabalhos subsequentes continuaram a demonstrar a redução na produção de gordura do leite a partir da ação do CLA C18:2 *trans-10 cis-12*. No entanto, comparações entre as relações dose-resposta em dietas capazes de induzir a síndrome da baixa gordura do leite sugeriram também ação de outros AG (BAUMAN e GRIINARI, 2001; PERFIELD *et al.*, 2002; PETERSON *et al.*, 2003; GAMA *et al.*, 2007; PERFIELD *et al.*, 2007). SHINGFIELD *et al.*, (2005b, 2006b) e ROY *et al.* (2006) verificaram elevada correlação entre a porcentagem de gordura no leite e a concentração do isômero C18:2 *trans-9 cis-11* e confirmaram o envolvimento desse AG com alguns tipos de síndrome da baixa gordura do leite. PERFIELD *et al.* (2007) verificaram redução de 15% na

porcentagem de gordura do leite após infusão intra-abomasal de 5g de C18:2 *trans-9 cis-11* por dia. Os mesmos autores propuseram ainda a existência de um terceiro inibidor, o CLA C18:2 *cis-10, trans-12*.

As Figuras 3.3.3.8.1 e 3.3.3.8.2, e as Figuras 3.3.3.8.3 e 3.3.3.8.4 apresentam as relações obtidas na presente dissertação entre a redução no teor de gordura no leite e o aumento da concentração do CLA C18:2 *trans-10 cis-12* e do CLA C18:2 *trans-9 cis-11*, respectivamente.

No caso do AG C18:2 *trans-10 cis-12* (eixo x), o aumento de uma unidade porcentual desse AG na gordura do leite, resulta na redução de 16,44 % no teor de gordura do leite ($\hat{y} = -16,44x + 3,3$; $r^2 = 0,296$).

O aumento de uma unidade porcentual do AG *trans-9 cis-11* na gordura do leite reduz em 10,41% o teor de gordura do leite ($\hat{y} = -10,41x + 3,49$; $r^2 = 0,397$).

Segundo BAUMAN *et al.* (2001) citado por OLIVEIRA (2005), a redução da porcentagem de gordura no leite seria desejável caso não houvessem sistemas de pagamento que bonificam o produtor pela composição e qualidade. Conforme justificaram a redução da síntese de gordura pela glândula mamária diminui a demanda energética que, na fase inicial de lactação, está acima da capacidade de ingestão de MS da vaca. OVERTON *et al.* (2001) observaram que a redução da produção de gordura no leite em até 23%, além de aumentar a produção de leite, reduziu o balanço energético negativo de vacas no pós-parto.

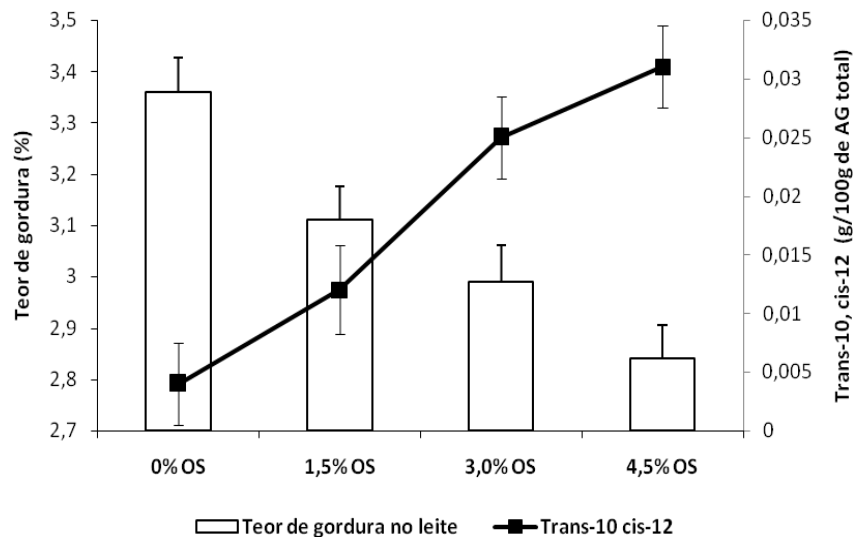


Figura 3.3.3.8.1. Influência da adição de níveis crescentes de óleo de soja sobre o teor de gordura e a concentração do isômero de CLA C18:2 *trans-10 cis-12* no leite de vacas mestiças Holandês x Zebu.

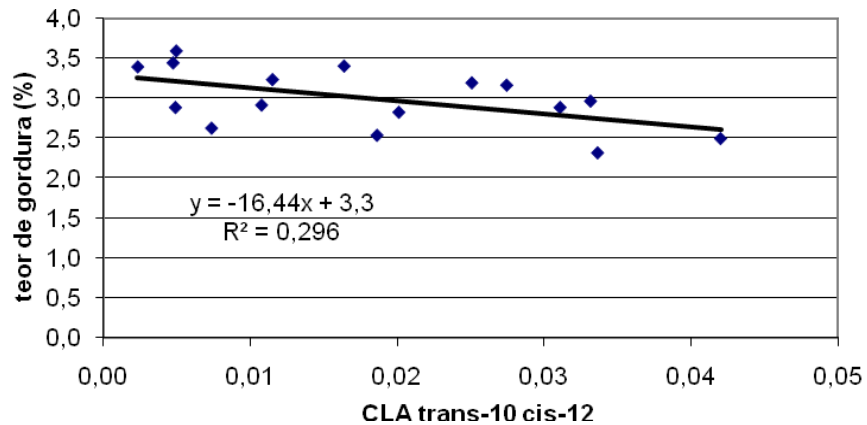


Figura 3.3.3.8.2. Relação entre o teor de gordura (eixo y) e a concentração do ácido graxo C18:1 *trans-10 cis-12* (eixo x) no leite de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja na matéria seca da dieta.

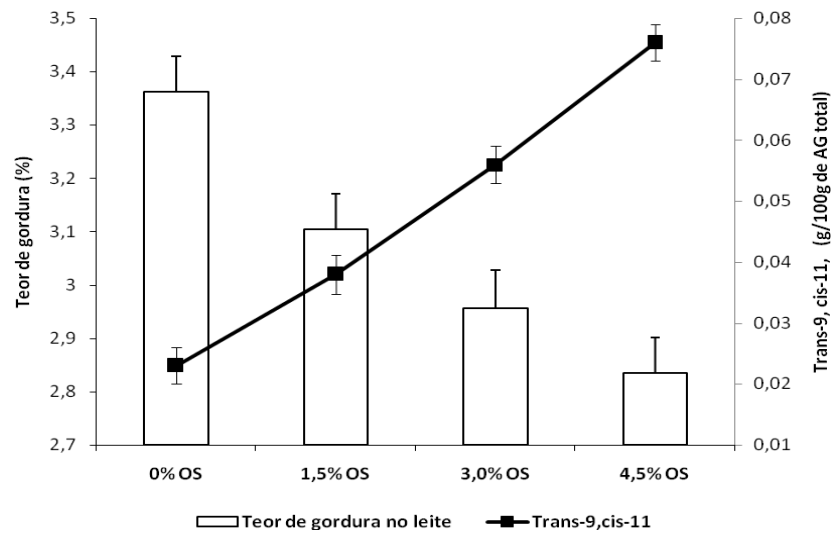


Figura 3.3.3.8.3. Influência da adição de níveis crescentes de óleo de soja sobre o teor de gordura e a concentração do isômero de CLA C18:2 *trans-9 cis-11* no leite de vacas mestiças Holandês x Zebu.

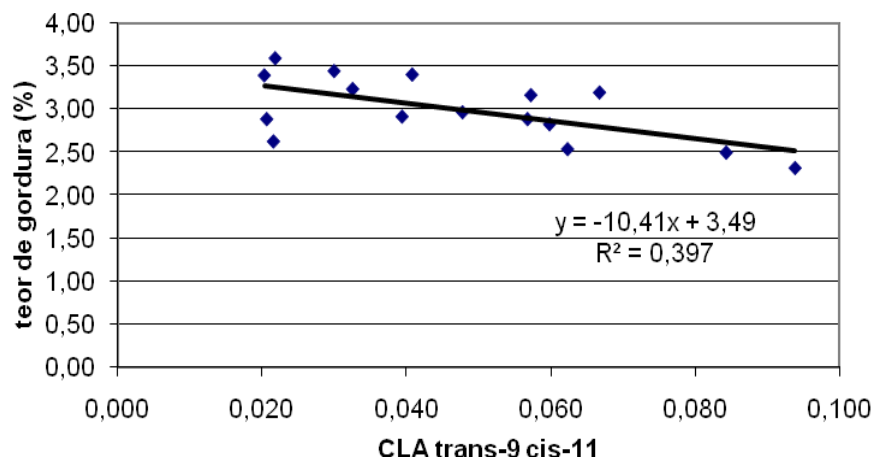


Figura 3.3.3.8.4 Relação entre o teor de gordura (eixo y) e a concentração do ácido graxo C18:1 *trans-9 cis-11* (eixo x) no leite de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja na matéria seca da dieta.

3.4. CONCLUSÕES

A suplementação de dietas baseadas em capim-elefante com a adição de níveis inferiores a 4,5% de óleo de soja na matéria seca alterou de forma positiva a composição da gordura láctea. Tais benefícios foram decorrentes da redução ($P<0,01$) nas concentrações dos AG saturados de cadeia curta (C4 a C10), média (C12 a C16) e saturados, da elevação ($P<0,01$) dos teores de AG mono e poliinsaturados de cadeia longa e dos teores de CLA, em especial do isômero C18:2 *cis-9 trans-11* em cerca de 360%.

Os resultados observados permitem concluir que as vacas submetidas a essa dieta tiveram o teor e a produção diária da gordura do leite substancialmente reduzidos

($P<0,01$ e $P=0,03$, respectivamente), reflexo da considerável secreção dos isômeros de CLA C18:2 *trans-10, cis-12* e C18:2 *trans-9, cis-11*, comprovadamente inibidores da secreção de gordura na GM. Essa resposta torna-se altamente indesejável quando se pensa em remuneração do produtor pela qualidade e composição do leite.

Com relação às análises obtidas do perfil lipídico dos alimentos, os dados revelaram estabilidade na composição de AG do óleo adicionado ao concentrado mesmo após sete dias de exposição ao ar. Sendo esse um ponto importante quando se pensa na utilização prática da dieta.

Constatou-se que existe diferença ($P<0,05$) entre o perfil de AG do leite ordenhado na manhã e na tarde.

CAPÍTULO IV

PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO RUMINAL E CINÉTICA DE SÓLIDOS E LÍQUIDOS NO TRATO GASTROINTESTINAL

4.1. RESUMO

O segundo experimento da presente dissertação teve por objetivo avaliar o consumo de matéria seca (MS), os parâmetros e a cinética ruminal de vacas alimentadas com dietas baseadas em capim-elefante picado como único volumoso e suplementadas com níveis crescentes de óleo de soja (OS) na MS (0; 1,5; 3,0 e 4,5%) em delineamento em Quadrado Latino 4x4. Foram utilizadas quatro vacas mestiças Holandês x Zebu fistuladas no rúmen, no terço inicial de lactação (90 ± 25 dias) e com produção média de $15,6 \pm 3,0$ kg de leite/dia. O consumo diário de MS não sofreu influência ($P > 0,05$) da adição de óleo de soja em níveis iguais ou inferiores a 4,5% da dieta (13,4; 13,8; 14,5 e 13,7 kg/dia ou 2,90; 3,02; 3,17 e 2,93 % PV/dia para os tratamentos com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente). Dentre os parâmetros de fermentação ruminal, somente a concentração ruminal de propionato e butirato e a concentração molar de butirato sofreram influência ($P < 0,05$) dos tratamentos. Haja vista a pequena influência dos diferentes tratamentos sobre o consumo de MS e os parâmetros ruminais, supõe-se que a adição de óleo de soja até o nível de 4,5% da MS pouco influenciou a população microbiana do rúmen. Essa suposição confronta com os resultados observados na digestibilidade *in situ*. Dentre os parâmetros de degradabilidade ruminal *in situ* da MS e da MO, tanto a taxa de degradação (c) (4,00; 3,32; 3,26 e 2,71%/h para a MS e 4,1; 3,5; 3,3 e 3,0 %/h para a MO para os tratamentos com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente) quanto a degradabilidade efetiva (DE) (35,09; 32,64; 33,54 e 31,04% para a MS e 42,26; 39,98; 40,31 e 39,13 % para a MO para os tratamentos com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente) reduziram seus valores com a adição de OS a um nível de significância de 7 e 10%, respectivamente. Dentre os parâmetros de degradabilidade ruminal *in situ* da FDN somente a degradabilidade efetiva (DE) sofreu influência ao nível de significância de 7% (23,19; 21,04; 22,21 e 19,46% para os tratamentos com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente). Nenhum dos parâmetros da cinética de fluxo da fase sólida ou líquida da dieta sofreu influência ($P > 0,05$) da adição de óleo de soja. Não houve interação entre os tratamentos e o tempo de amostragem em nenhum dos parâmetros observados.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre março e maio de 2007 no Campo Experimental de Coronel Pacheco, de propriedade da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, na Zona da Mata do Estado Minas Gerais.

Foram utilizadas quatro vacas mestiças Holandês x Zebu com composição genética

variando entre 3/4 a 15/16 de Holandês, fistuladas no rúmen, múltiparas (3 ou 4 partos), no terço inicial de lactação (90 ± 25 dias), com produção média igual a $15,6 \pm 3,0$ kg/dia de leite e peso corporal médio de $458,0 \pm 57,0$ kg.

Os animais permaneceram em área cimentada de 6 x 10 m, cercada por cordoalha e mourões de madeira e

parcialmente protegida por cobertura de telhas de amianto. A área possuía cochos de alimentação com portões eletrônicos do tipo *calan-gates* (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA) que permitiram controle individual do consumo de alimentos. Não havia camas.

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, às 6 e às 14 horas, sendo a produção de leite medida diariamente durante todo o período experimental. As instalações de ordenha eram compostas por uma sala de espera e sala de ordenha duplo 4 semi-paralela com fosso central e equipamentos da marca Alfa-Laval.

As quatro vacas fistuladas foram distribuídas em três quadrados latinos (QL) 4 x 4. Os períodos experimentais apresentaram duração de 21 dias, sendo os onze primeiros destinados à adaptação às dietas (EIFERT *et al.*, 2005; EIFERT *et al.*, 2006) e os dez últimos destinados às coletas de dados e amostras, totalizando 84 dias.

4.2.1. Dietas Experimentais

As dietas experimentais (tratamentos), baseadas em capim-elefante, foram formuladas pelo programa Spartan (Michigan State University) com o objetivo de atender às exigências estabelecidas pelo NRC (2001) para essa categoria animal. Os tratamentos utilizados, em base de matéria seca (MS), foram os seguintes:

- Controle ou 0% de óleo de soja (OS) na MS: capim-elefante picado + suplemento concentrado sem adição de OS;
- 1,5% de OS na MS: capim-elefante picado + suplemento concentrado com adição de OS;
- 3,0% de OS na MS: capim-elefante picado + suplemento concentrado com adição de OS;
- 4,5% de OS na MS: capim-elefante picado + suplemento concentrado com adição de OS.

A proporção dos ingredientes e a composição química das dietas são apresentadas na Tabela 4.2.1.1.

A alimentação foi fornecida uma vez ao dia, logo após a ordenha da manhã, na forma de mistura completa. A pesagem e distribuição individual do alimento nos cochos foram feitas em balaios, sendo a mistura realizada nos próprios cochos, tomando-se sempre o cuidado de misturar ao máximo o concentrado na forragem. A quantidade oferecida foi ajustada diariamente para permitir, aproximadamente, 10% de sobras.

Utilizou-se como fonte exclusiva de volumoso o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) com idade aproximada de 100 dias. O solo da capineira foi corrigido e adubado, conforme recomendações agrônomicas após avaliação das análises. A composição bromatológica média do capim-elefante é apresentada na Tabela 4.2.1.2.

Tabela 4.2.1.1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais

Ingredientes ¹	Nível de inclusão de óleo de soja (% da matéria seca da dieta)			
	Controle	1,5%	3,0%	4,5%
Capim-Elefante	52,0	51,9	52,5	52,5
Fubá de Milho	16,1	15,4	14,0	13,3
Farelo de soja	16,1	15,4	14,0	13,3
Polpa cítrica	14,8	14,7	15,4	15,4
PVM ²	1,0	1,0	1,0	1,0
Óleo de soja (OS)	-	1,5	3,0	4,5
Composição Química da Dieta¹				
Proteína Bruta (% da MS)	14,5	14,4	14,5	14,4
Extrato Etéreo (% da MS)	2,8	4,2	5,6	7,1
Fibra em Detergente Neutro (% da MS)	43,0	42,8	42,8	42,5
Fibra em Detergente Ácido (% da MS)	25,2	25,0	25,1	24,9
Energia Líquida de Lactação (Mcal/kg)	1,51	1,57	1,63	1,69

¹Valores estimados pelo programa Spartan (Michigan State University); ²Mistura vitamínico-mineral.

Tabela 4.2.1.2. Composição bromatológica média e digestibilidade *in vitro* da matéria seca do capim-elefante

Matéria Seca (MS, %)	28,8
Proteína Bruta (% da MS)	6,5
Extrato Etéreo (% da MS)	1,4
Fibra em Detergente Neutro (% da MS)	73,1
Fibra em Detergente Ácido (% da MS)	47,5
Lignina (% da MS)	9,8
Cinzas (% da MS)	10,1
Digestibilidade <i>in vitro</i> da MS (%)	44,4

Tornou-se fundamental realizar manejo adequado da forrageira, visto que a maturidade da forragem é inversamente relacionada à sua habilidade em aumentar o teor de CLA na gordura do leite (DHIMAN *et al.*, 2005).

Os cortes do capim-elefante para o fornecimento da alimentação foram feitos a cada dois dias. Após cada corte, o capim era abrigado sob cobertura apropriada até o momento da picagem que ocorria diariamente pouco antes do horário da alimentação.

A escolha do capim-elefante ocorreu por três motivos. Primeiro, pelo fato de ser importante forrageira tropical utilizada na alimentação de vacas leiteiras no Brasil. Segundo, por ser plantada geralmente como capineira permitindo fácil registro do seu consumo. E, finalmente, porque permite a

ingestão de uma fração lipídica parecida com a ingerida sob condição de pastejo. Apesar de terem sido consumidas em até 48 horas após seu corte, imagina-se que o material tenha mantido os fosfolipídeos e os galactolipídeos íntegros, com ação mínima da oxidação bacteriana e das lípases endógenas.

O fornecimento de rações concentradas com diferentes teores de óleo exigiu que se fizesse a mistura dos ingredientes numa frequência maior. Isso se justifica pela facilidade de oxidação dos ácidos graxos (AG) insaturados presentes no óleo de soja. Assim sendo, as rações foram preparadas semanalmente, de forma a minimizar sua peroxidação lipídica e evitar alterações no perfil do óleo ingerido e redução da ingestão voluntária de MS. A composição bromatológica do concentrado está apresentada na Tabela 4.2.1.3.

Tabela 4.2.1.3: Composição bromatológica e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca dos suplementos concentrados

Composição Química	Concentrados			
	Controle	1,5% OS ¹	3,0% OS	4,5% OS
Matéria Seca (MS, %)	87,10	87,37	88,15	88,19
Proteína Bruta (% da MS)	21,12	21,80	21,59	21,21
Extrato Etéreo (% da MS)	2,81	5,40	8,95	11,80
Fibra em Detergente Neutro (% da MS)	14,74	15,68	16,59	16,45
Fibra em Detergente Ácido (% da MS)	8,93	9,32	9,95	10,13
Digestibilidade <i>in vitro</i> da MS (%)	89,63	86,63	84,83	80,18

¹ OS = óleo de soja

A opção pela utilização de óleo de soja se deveu à sua boa disponibilidade de mercado, ao seu baixo valor de compra se comparado com outros óleos vegetais, e aos altos teores de ácidos graxos poliinsaturados, especialmente o linoleico e α -linolênico (Tabela 3.4.1.2.1, Capítulo III), que são comprovadamente eficientes

precursores da síntese de CLA em ruminantes. (BAUMAN *et al.*, 1999) .

A adição de níveis superiores a 4,5% MS de óleo foi descartada para se evitar redução excessiva da digestão da fibra no rúmen e do consumo de MS que, por sua vez, poderia gerar menor desempenho dos animais além de quedas expressivas no teor

e na produção diária de gordura no leite (BAUMAN *et al.*, 1999; BAUMGARD, 2002). Tais respostas tendem a ser exacerbadas especialmente quando se lança mão de fontes de óleos predominantemente insaturados e livres no rúmen, como no caso do usado no presente experimento.

A polpa cítrica substituiu 50% do milho na formulação dos concentrados. A inclusão desta teve como objetivo principal alterar os padrões de fermentação ruminal pela substituição do amido do milho por pectina da polpa cítrica, levando à maior formação de acetato e menor de propionato tentando, assim, minimizar possíveis quedas no pH ruminal (LEIVA *et al.*, 2000; HALL, 2001; EIFERT, 2004).

Dietas ricas em carboidratos altamente fermentáveis provocam queda rápida no pH ruminal. Isto pode resultar na formação do isômero de CLA C18:2 *trans*-10 *cis*-12 no rúmen (PIPEROVA *et al.*, 2000), o qual está associado diretamente à queda expressiva no teor de gordura do leite (BAUMAN e GRIINARI, 2001).

Os teores proporcionalmente crescentes de energia líquida de lactação das dietas se explicam pelo fato de o experimento priorizar a verificação da influência da adição de OS sobre a composição lipídica da gordura do leite em detrimento ao desempenho animal. Outra justificativa é o fato de que se objetivou manter relação volumoso:concentrado próxima à 50:50 em base de MS.

A mistura mineral, além de presente na ração, também esteve disponível para os animais durante todo o período experimental em cochos específicos para esse fim. Utilizou-se uma mistura mineral comercial, específica para vacas leiteiras.

4.2.2. Mensuração do Consumo de MS e a Avaliação da Composição Química da Dieta

O consumo individual de MS foi determinado diariamente usando cochos com portões eletrônicos do tipo calan-gates (American Calan Inc., Northwood, NH, EUA), descontando a quantidade de sobras do material oferecido. A quantidade oferecida foi ajustada diariamente para permitir, aproximadamente, 10% de sobras.

Foram coletadas diariamente, durante os cinco últimos dias de cada período do QL, amostras das dietas completas, das sobras, do volumoso e dos concentrados e seus ingredientes. Em seguida, foram armazenadas a -20°C para posterior análise bromatológica segundo SILVA e QUEIROZ (2002).

Depois de descongeladas, as amostras de volumosos, concentrados, oferecidos e sobras, foram pré-secas em estufa com circulação e renovação de ar, modelo TE-394/3 (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP), a 55°C por 72 horas, e moídas em moinho de facas do tipo *Willey* da marca NÚCLEO, modelo MR340, dotado de peneira com perfurações de 1 mm. Posteriormente, as amostras foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS) a 105°C, proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) segundo SILVA e QUEIROZ (2002) e quanto à digestibilidade *in vitro* da MS segundo a metodologia descrita por TILLEY e TERRY (1963). Não foram realizadas análises de DIVMS nas sobras.

4.2.3. Parâmetros Ruminais

Foram realizadas amostragens individuais de líquido ruminal no primeiro dia do período de coletas (11° de cada fase do QL)

nos tempos zero (imediatamente antes), 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 e 24 horas após o fornecimento dos alimentos. O líquido ruminal foi coletado de quatro pontos diferentes do rúmen via fistula. Após coagem em gaze dupla e homogeneização, foi feita a leitura do valor de pH, com auxílio de potenciômetro digital portátil modelo TEC 3P-MP v.7.1 (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP).

Em seguida, foram coletadas três alíquotas de 10 mL de líquido ruminal para as análises de concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) (AOAC, 1990), dos principais ácidos graxos voláteis (AGV) e de Co para a verificação do fluxo de líquidos. As alíquotas foram armazenadas, respectivamente, em recipientes contendo oito gotas de H₂SO₄ a 50% (N-NH₃), 2 mL de ácido metafosfórico 20% (AGV) e sem conservantes (Co). Após coleta, as amostras foram rigorosamente homogeneizadas e congeladas a -20°C.

O método utilizado para análise da concentração de N-NH₃ no líquido ruminal foi baseada no método Micro-Kjeldahl. As concentrações dos AGV (acético, propiônico e butírico) foram determinadas por meio de cromatografia gasosa por ionização de chama, conforme AOAC (1990).

4.2.4. Parâmetros de Degradabilidade *in situ*

Antes do início do período de coleta do QL, foram colhidas amostras do capim oferecido e, em seguida, pré-secas a 55°C, durante 72 horas, em estufa com circulação e renovação de ar, modelo TE-394/3 (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP) e moídas em moinho de facas do tipo *Willey*, da marca NÚCLEO, modelo MR340, dotado de peneira com perfurações de 5 mm. Esse procedimento

visou à incubação em sacos de nylon com 20 x 10 cm de dimensão e com abertura de malha de 50 µm, para estimativas de parâmetros de degradação ruminal (NOCEK, 1988).

Foram incubados aproximadamente 6 g de amostra pré-seca por saco, possibilitando, assim, relação entre 10 e 20 mg de MS de amostra/cm² de área de saco (NOCEK, 1988). Esses sacos, em triplicata, foram fixados espaçadamente aos elos de uma corrente de metal, amarrados em uma das extremidades a um fio de nylon suficientemente longo para permitir que o conjunto se alojasse no saco ventral do rúmen e em outra a um lastro de metal para dar estabilidade ao conjunto.

Imediatamente antes da incubação no rúmen, todos os sacos foram mergulhados em água à temperatura ambiente por cerca de 30 minutos. Após este período, foram retirados aqueles referentes ao tempo zero, para a estimativa da fração solúvel e das partículas com tamanho reduzido que atravessassem os poros do nylon e, em seguida, foram congelados a -20°C. Os demais sacos foram colocados no rúmen e retirados 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a incubação e congelados em seguida.

Com o objetivo de se padronizar o processo, todos os sacos foram descongelados, lavados simultaneamente e colocados em estufa com circulação e renovação de ar, modelo TE-394/3 (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP), a 55°C, por 72 horas. Após a secagem, eles foram pesados e os resíduos analisados quanto aos teores de MS, a 105°C, e FDN, conforme métodos já relatados.

As estimativas dos parâmetros de degradabilidade ruminal *in situ* foram realizadas segundo o modelo não-linear exponencial proposto por MEHREZ e ORSKOV (1977) e modificado por

SAMPAIO (1988). A expressão matemática do modelo é:

$$\text{Deg (t)} = (A - B * e^{-c * t}) \quad \text{para } t > L$$

Onde:

Deg (t) = porcentagem de degradação acumulada no tempo t de incubação ruminal;

A (%) = interseção da curva de degradação quando t = 0, que representa a fração potencialmente degradável;

B (%) = degradabilidade potencial do material que permaneceu no saco após o tempo zero e que será degradado pela ação da microbiota, se não houvesse *lag-time* ou tempo de colonização (L, horas);

c (%/hora) = taxa constante de degradação da fração potencialmente degradável (B) por ação da microbiota;

t = tempo de incubação;

Os tempos de colonização ou *lag time* (L) foram calculados conforme relatado por FIGUEIRA (1991), sendo que, posteriormente, e quando necessário, os parâmetros da equação (SAMPAIO, 1988) foram novamente estimados sem os dados referentes aos tempos de incubação inferiores ao *lag-time* calculado.

As determinações das degradabilidades efetivas (DE, %) foram realizadas de acordo com o modelo proposto por ØRSKOV e MCDONALD (1979), qual seja:

$$DE = S + ((B1 * c) / (c + k_1)),$$

Onde:

S (%) = fração solúvel mais partículas com tamanho reduzido que atravessam os poros do nylon;

B1 (%) = fração potencialmente degradável por ação da microbiota (A - S);

k₁ (%/hora) = taxa de passagem ruminal, estabelecida segundo recomendações do ARC (1984).

Os parâmetros de degradabilidade ruminal *in situ* do capim-elefante foram estimados pelo processo iterativo do algoritmo Marquardt, com auxílio do procedimento para modelos não-lineares (PROC NLIN) do SAS (SAS Institute Inc., 2001), a partir da utilização conjunta dos dados das quatro repetições disponíveis (vacas) por tratamento, obtendo, portanto, valores médios para caracterizar as referidas condições estudadas. No entanto, curvas individuais também foram obtidas.

4.2.5. Digestibilidade *in vitro* da MS

Utilizou-se a metodologia descrita por TILLEY e TERRY (1963) na avaliação da digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) do capim-elefante e do concentrado (Tabelas 4.2.1.2 e 4.2.1.3). As amostras de capim e concentrado foram coletadas no início do período de adaptação. Elas foram pré-secas em estufa de ventilação forçada, regulada para a 55°C por 72 horas e no primeiro dia de amostragem, coletou-se os líquidos ruminais das vacas adaptadas em cada um dos tratamentos para que se pudesse fazer a incubação. As amostras foram digeridas em triplicata por 96 h.

4.2.6. Estimativa da Taxa de Passagem da Fase Sólida da Dieta

Em cada fase do QL foi coletada uma amostra de capim-elefante picado, que foi submetida à extração a quente com detergente neutro comercial, da fração fibra em detergente neutro (FDN). Por este procedimento, nas fibras das quatro amostras coletadas, foram obtidas concentrações superiores à 82% de FDN na MS que, posteriormente, foram complexadas com dicromato de sódio (Na₂Cr₂O₇.2H₂O), conforme procedimentos relatados por UDÉN *et al.* (1980). Em cada fase do QL foram administrados,

individualmente, via rúmen, 100 g de FDN de capim-elefante mordentada com Cr.

As coletas de fezes foram realizadas diretamente no reto dos animais nos horários 0, 6, 12, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76, 84, 92, 96, 104, 120, 128 e 144 horas pós-dosificação.

As amostras de fezes foram imediatamente congeladas a -20°C e, posteriormente, pré-secas a 55°C por 72 horas em estufa com circulação e renovação de ar, modelo TE-394/3 (Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP), moídas em moinho de facas do tipo *Willey* da marca NÚCLEO, modelo MR340, dotado de peneira com perfurações de 1 mm, e acondicionadas em recipientes de vidro. O cromo nas fezes foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica, após digestão nitroperclórica (KIMURA e MILLER, 1957).

Os parâmetros da cinética de fluxo da fase sólida foram estimados pelo processo iterativo do algoritmo Marquardt, com auxílio do procedimento para modelos não-lineares (PROC NLIN) do programa SAS (SAS Institute Inc., 2001), segundo os modelos descritos por GROVUM e WILLIAMS (1973).

Os cálculos dos tempos de retenção ruminal e pós-ruminal e do tempo médio de retenção no TGI (modelo proposto por GROVUM e WILLIAMS, 1973) foram realizados, segundo procedimentos relatados por LIRA *et al.* (2006).

4.2.7. Estimativa da Taxa de Passagem da Fase Líquida da Dieta

Utilizou-se o Co-EDTA como indicador para estimativa da taxa de passagem da fase líquida, em conformidade com os procedimentos relatados por UDÉN *et al.* (1980). No primeiro dia do período de

coleta do QL, imediatamente antes do fornecimento da alimentação, foram administrados, via fistula ruminal, 5 g de Co-EDTA (17,24% de Co na MS) diluídos em 200 mL de água destilada. Amostras de 10 mL de líquido ruminal para análise de Cobalto foram coletadas nos mesmos tempos das amostras de N-NH₃ e AGV.

A concentração do Cobalto presente no líquido ruminal foi determinado por leitura em espectrofotômetro de absorção atômica, após digestão nitroperclórica (BATAGLIA *et al.*, 1983; SALINAS e GARCIA, 1985). Para ajuste aos dados das concentrações de cobalto nas amostras de líquido ruminal foi utilizado o modelo exponencial unicompartmental relatado por COLUCCI (1984), cuja expressão é:

$$Y = A * e^{-k * t}$$

Onde:

Y (ppm) = concentração do indicador no tempo t;

A (ppm) = concentração do indicador no tempo zero;

k (/h) = taxa constante de diluição ou taxa de passagem da fase líquida no rúmen.

O volume de fluido ruminal (V, litros) foi estimado a partir da relação entre a quantidade de Cobalto administrada (mg) e o valor de A estimado pelo modelo. O tempo de reciclagem (TR, em horas) foi calculado como a recíproca da taxa de passagem da fase líquida no rúmen (k). A taxa de reciclagem (TaxaRec, n^o de vezes que o pool é completamente reciclado a cada 24 horas) foi calculada como 24/TR. A taxa de fluxo (TaxaFluxo, litros/h) foi calculada como o produto do volume de fluido ruminal (V) pela taxa de passagem da fase líquida no rúmen (k) (UDÉN *et al.*, 1980).

Os parâmetros da cinética da fase líquida no rúmen foram estimados pelo processo iterativo do algoritmo Marquardt, com

auxílio do procedimento para modelos não-lineares (PROC NLIN) do SAS (SAS Institute Inc., 2001) para cada um dos tratamentos avaliados, a partir da utilização conjunta dos dados das quatro repetições disponíveis (vacas), obtendo, portanto, valores médios para caracterizar as referidas condições estudadas. No entanto, curvas individuais também foram obtidas.

4.2.8. Análises Estatísticas

Os dados relativos ao consumo de MS, parâmetros de degradabilidade ruminal *in*

situ da MS, MO e da FDN e das taxas de passagem das fases líquida e sólida foram analisados pelo procedimento GLM do SAS (SAS Institute Inc., 2001), tendo como fontes de variação: quadrado-latino (QL), animal dentro de QL, período e tratamento (níveis de óleo de soja). A comparação das médias foi realizada, utilizando-se o LSMEANS do SAS... (2001), por meio do teste de Tukey (P<0,05).

O esquema de análise de variância utilizado para estas variáveis é mostrado na tabela abaixo:

Fontes de variação	GL ¹
Total	15
Períodos (linhas)	3
Animais (colunas)	3
Tratamentos	3
Erro	6

¹GL = graus de liberdade

O efeito da suplementação do capim-elefante com óleo de soja sobre consumo de MS, parâmetros de degradabilidade ruminal *in situ* da MS, MO e da FDN e das taxas de passagem das fases líquida e sólida foi também estudado por meio de regressões lineares e quadráticas, utilizando o procedimento PROC REG do SAS... (2001).

As variáveis de fermentação ruminal (pH, concentrações de N-NH₃ e de AGV e relação acetato:propionato) foram analisadas pelo procedimento MIXED do SAS... (2001), segundo delineamento QL 4 x 4 em esquema de parcela sub-dividida, com as dietas alocadas nas parcelas e os tempos de amostragem nas sub-parcelas. O modelo para análise de variância incluiu como fontes de variação vaca, período, tratamento, tempo, interação tratamento x tempo, além dos resíduos. As comparações de médias foram realizadas por meio do teste de Tukey (P<0,05).

As correlações entre as variáveis (P<0,05) foram avaliadas pelos coeficientes de correlação de *Pearson*, obtidos por meio do PROC CORR do SAS... (2001).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Consumo de Matéria Seca (MS)

Os mecanismos responsáveis pela redução do consumo de MS em animais submetidos a dietas ricas em lipídeos ainda não estão totalmente esclarecidos, mas devem estar relacionados aos efeitos deletérios da gordura sobre o crescimento microbiano e, conseqüentemente, sobre a fermentação da fibra, reduzindo, assim, a taxa de passagem da digesta pelo trato gastrointestinal. Podem estar relacionados também, ao nível de inclusão e ao tipo de lipídeo, ao grau de processamento do alimento, à digestibilidade da fibra, à motilidade intestinal, à palatabilidade da dieta, à

liberação de hormônios intestinais, sobre a oxidação hepática das gorduras ingeridas ou ao status fisiológico do animal (ALLEN, 2000). A Tabela 4.3.1.1 apresenta os

resultados de consumo de alimento observado no experimento com as vacas fistuladas.

Tabela 4.3.1.1. Consumo de matéria seca de vacas mestiças Holandês x Zebu alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementado com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de soja na MS total

Variável	Dietas				CV ¹ (%)	Efeito ²	
	0% OS	1,5% OS	3,0% OS	4,5% OS		L	Q
Peso vivo (kg)	462,0	459,0	457,4	467,6	-	-	-
Produção de leite (kg/dia)	14,4	15,1	15,2	16,2	6,6	ns	ns
Consumo de MS							
kg/dia	13,4	13,8	14,5	13,7	8,8	ns	ns
% do Peso Vivo	2,90	3,02	3,17	2,93	7,1	ns	ns

¹ Coeficiente de variação; ² ns = não significativo (P>0,05) pelo teste de Tukey; L = Linear, Q = Quadrático.

A suplementação com altas quantidades de óleo vegetal na dieta de vacas em lactação normalmente provoca queda na ingestão de alimentos e, conseqüentemente, na produção de leite devido aos seus efeitos deletérios sobre a fermentação ruminal (JENKINS, 1993; CHILLIARD *et al.*, 2001). O NRC (2001) recomenda a utilização de, no máximo, 7% de gordura livre na MS da dieta. No presente estudo, os consumos diários de MS foram iguais a 13,4; 13,8; 14,5 e 13,7 kg/dia ou 2,90; 3,02; 3,17 e 2,93 % PV/dia para os tratamentos com 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente. Esses valores mostram que o consumo diário de MS não sofreu influência (P>0,05) da adição de óleo de soja em níveis inferiores a 4,5% da dieta. Esses resultados fazem supor que a fermentação ruminal não fora comprometida de forma significativa. Mas segundo os resultados da produção ruminal de AGV (Tabelas 4.3.2.2.1, 4.3.2.2.2, 4.3.2.2.3 e 4.3.2.2.4) e da degradabilidade *in situ* (Tabelas 4.3.4.1, 4.3.4.2 e 4.3.4.3) apresentados no nesse Capítulo, observa-se que tal afirmação não é correta.

Segundo COPPOCK e WILKS (1991), dietas ricas em óleos vegetais não comprometem a fermentação ruminal quando esses óleos são liberados de forma lenta na luz do rúmen, não observando distúrbios sobre o ambiente ruminal causados pelos AG na forma livre.

BATEMAN e JENKINS (1998) conduziram experimento onde avaliaram os efeitos da adição de óleo de soja em dieta rica em fibra sobre a fermentação ruminal de vacas em lactação. Assim como no presente estudo, as dietas apresentaram relação volumoso:concentrado de 50:50% (base MS). O OS participou com 0, 2, 4, 6 e 8 % da MS da dieta. Eles observaram que à medida que se adicionou OS, houve diminuição linear (P<0,05) nas ingestões de MS e MO. Não foi relatada a forma com que o OS foi fornecido, mas os autores observaram que, apesar da diminuição da ingestão de MS, a ingestão de energia não se alterou.

Trabalhando com a adição de 4% de OS na dieta de 40 vacas da raça Holandesa, BU *et al.* (2007) também não verificaram variação no consumo de MS em relação ao grupo controle. ALZAHAL *et al.* (2008), avaliando níveis de inclusão de OS (0; 1,7 e 3,4% da MS), monensina e da associação entre estes em dieta baseada em silagem de milho e feno sobre a produção e composição do leite de 72 vacas multíparas da raça Holandesa, não observaram efeito sobre a ingestão de MS. Da mesma forma, OLIVEIRA (2005) trabalhando com a adição de 4,4% de AG via grãos de soja extrusados na dieta de vacas da raça Holandesa, não observou efeito de tratamento sobre o consumo de MS.

Avaliando os efeitos da adição de 4,0% de OS combinado, ou não, com monensina sódica na dieta de vacas 7/8 Holandês x Gir em lactação baseada em silagem de milho sobre o consumo, produção e composição do leite, EIFERT *et al.* (2005) observaram que a presença de 4,0% de OS na MS da dieta reduziu ($P<0,05$) o CMS de 19,27 para 17,10 kg/dia. Num experimento semelhante, mas com adição de 2,25% de OS (EIFERT *et al.*, 2006) verificaram tendência de queda ($P=0,07$) no consumo de MS (19,0 para 17,8 kg/dia) e, embora não tenham observado diferenças sobre a produção de leite, a redução no consumo de MS permitiu que as dietas com OS apresentassem eficiência alimentar 9,8% maior em relação ao tratamento controle.

SCHAFHÄUSER JR. (2005) avaliou os efeitos da suplementação com 3,5; 5,0; 6,5 e 8,0% da MS de gordura bruta de arroz, na forma de farelo integral e óleo, em dietas isoproteicas e isofibrosas, sobre o consumo, produção e metabolismo de vacas leiteiras de alta produção na fase inicial da lactação. O comportamento do consumo de MS foi quadrático, com redução ($P<0,05$) importante somente no maior nível de suplementação. Nos demais, os valores

foram semelhantes ($P>0,05$; 25,8; 26,2; 25,9 e 24,5kg de MS/dia, respectivamente).

4.3.2. Parâmetros Ruminais

4.3.2.1. pH e N-NH₃

Quanto mais intensificado o sistema de produção de leite, menor é a dependência por pastagens e maior por forrageiras conservadas e de suplementação energético-proteica. A quantidade e qualidade da dieta consumida, o volumoso, a relação volumoso:concentrado e o manejo alimentar estão entre os fatores que influenciam o pH, e as concentrações de N-NH₃ e AGV do rúmen (MOTA, 2002). As Tabelas e Figuras 4.3.2.1.1 e 4.3.2.1.2, apresentam, respectivamente, os efeitos da adição de níveis crescentes de OS sobre o pH e a concentração de N-NH₃ no rúmen de quatro vacas mestiças Holandês x Zebu.

Observando-se as médias dos diferentes tempos, percebe-se que logo após o fornecimento da alimentação diária única, às 8 horas da manhã, houve queda ($P<0,05$; de 6,84 para 6,13 na quarta hora) no pH ruminal. Os valores se mantiveram baixos até a décima segunda hora para, em seguida, elevarem-se até atingirem os valores iniciais, próximos a 6,8; 24 horas após a primeira amostragem. Não houve variação de pH ruminal entre tratamentos ($P>0,05$). Não houve interação ($P=0,95$) entre os tratamentos e o tempo de amostragem.

MERTENS (1977) e VAN SOEST (1994) afirmam que pH ruminal inferior a 6,1 pode inibir a degradação da celulose em virtude das alterações no desenvolvimento da microbiota celulolítica. Em alguns momentos, os tratamentos 0; 3,0 e 4,5% de OS chegaram a valores muito próximos desse patamar. O Item 4.3.5 deste capítulo mostra que realmente houve comprometimento ($P=0,04$) na taxa de

degradação (c) e tendência ($P=0,07$) à diminuição da degradabilidade efetiva (DE) *in situ* da MS do capim-elefante. Valores de pH próximos de 6,0 podem ser considerados indicativos de que uma única alimentação diária, bem como a relação concentrado:volumoso de 50:50, poderiam comprometer a viabilidade da microbiota celulolítica e, com isso, a digestão das frações fibrosas das dietas.

Trabalhando com vacas em lactação sob condição de pastejo em capim-elefante suplementado com 4kg/vaca/dia de concentrado, fornecidos duas vezes ao dia, CAMPOS *et al.* (2007) observaram valores médios de pH iguais a 6,35 e 6,29 imediatamente antes da alimentação, e de 6,13 e 6,00 três horas após o fornecimento da alimentação da manhã e da tarde, respectivamente. Somente a leitura de pH pós-prandial da tarde foi inferior ($P<0,05$) às demais leituras.

Tabela 4.3.2.1.1. Efeito de dietas contendo níveis crescentes de óleo de soja sobre o pH ruminal em função do tempo transcorrido desde o fornecimento da alimentação diária pela manhã

Tempo	Níveis de suplementação (% da MS da dieta)				Médias
	0% OS	1,5% OS	3,0% OS	4,5% OS	
0 ¹	6,90	6,87	6,74	6,87	6,84 ^A
2	6,36	6,32	6,33	6,33	6,33 ^C
4	6,18	6,14	6,13	6,09	6,13 ^D
6	6,12	6,22	6,02	6,03	6,10 ^D
8	6,19	6,28	6,08	6,07	6,15 ^D
10	6,16	6,11	6,08	6,16	6,13 ^D
12	6,30	6,31	6,16	6,22	6,25 ^{CD}
16	6,48	6,39	6,38	6,44	6,42 ^B
24	6,77	6,77	6,73	6,79	6,77 ^A
Médias	6,38	6,38	6,29	6,33	

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem ($P>0,05$) pelo teste de Tukey; ¹Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.

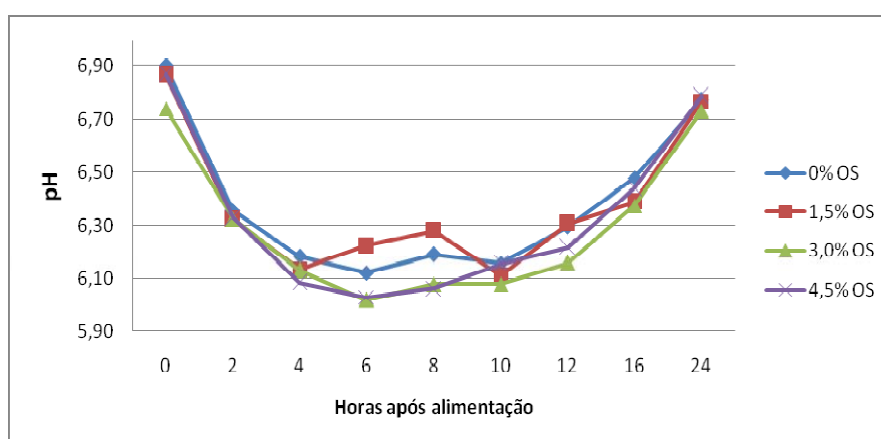


Figura 4.3.2.1.1. Variação do pH no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em função do tempo de amostragem (h) e do nível de inclusão de óleo de soja na matéria seca da dieta após o fornecimento da alimentação diária.

Tabela 4.3.2.1.2. Efeito de dietas contendo diferentes níveis de óleo de soja sobre a concentração de nitrogênio amoniacal (mg/dL) no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu, em função do tempo transcorrido desde o fornecimento da alimentação diária, realizado pela manhã

Tempo	Níveis de suplementação (% da MS da dieta)				Médias
	0% OS	1,5% OS	3,0% OS	4,5% OS	
0 ¹	15,75	16,10	15,93	14,18	15,49 ^B
2	18,20	21,00	18,90	17,15	18,81 ^A
4	17,33	17,33	17,68	14,35	16,67 ^{AB}
6	12,95	13,83	15,75	13,83	14,09 ^B
8	10,68	12,60	13,30	12,43	12,25 ^C
10	9,63	12,60	13,83	11,38	11,86 ^C
12	9,45	13,13	13,48	11,73	11,94 ^C
16	12,43	14,70	13,83	13,30	13,56 ^{BC}
24	14,53	17,15	14,70	15,93	15,58 ^B
Médias	13,44	15,38	15,26	13,81	

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey; ¹Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.

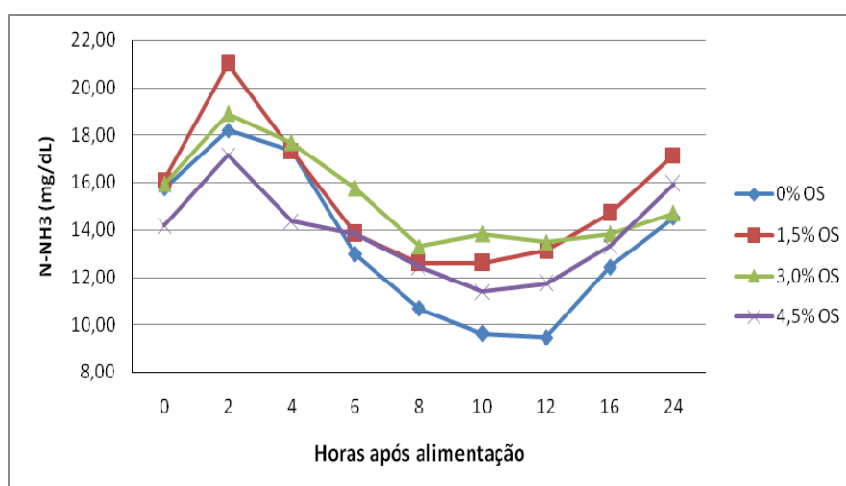


Figura 4.3.2.1.2. Variação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja (% da matéria seca), em função do tempo (h) após o fornecimento da alimentação diária.

Logo após o fornecimento das dietas, observou-se aumento ($P < 0,05$) na concentração de N-NH₃ até a quarta hora em resposta à degradação do concentrado para, em seguida, diminuir. Por volta da décima sexta hora, a concentração de N-NH₃ aumentou até voltar ao patamar inicial, próximo de 15,5 mg/dL. Observou-se concentração mais baixa ($P < 0,05$) nos tempos 2 e 4 para o tratamento com 4,5%

de OS (17,15 e 14,35 mg/dL, respectivamente). Nos tempos 10 e 12, a dieta sem a adição de OS apresentou valores de concentração de N-NH₃ mais baixos ($P < 0,05$). Não houve variação na concentração de N-NH₃ ruminal entre tratamentos ($P > 0,05$). Não houve interação ($P = 0,76$) entre os tratamentos e o tempo de amostragem.

SATTER e SLYTER (1974) recomendam manter a concentração ruminal de amônia superior a 5 mg/dL para que a degradabilidade ruminal da MS se mantenha em níveis aceitáveis. A média obtida no experimento foi de 14,5, ou seja, aproximadamente três vezes superior ao recomendado pelo NRC sendo, então, suficiente para garantir bom nível de fermentação microbiana.

Os lipídios insaturados provocam efeito inibitório sobre a população de bactérias gram-positivas, fermentadoras obrigatórias de aminoácidos (RUSSELL *et al.*, 1988). Essa população especializada em desaminar aminoácidos é estimulada pelo aumento da concentração de proteína bruta degradável na dieta e inibida pelos ionóforos (LANA e RUSSELL, 1997) e pelo abaixamento do pH ruminal (LANA *et al.*, 1998). Uma vez que os lipídios têm efeito defaunatório sobre a população microbiana ruminal semelhante aos ionóforos (LANA e RUSSELL, 1997), era de se esperar redução na atividade de desaminação e sobre a concentração de N-NH₃ no rúmen quando na presença dos lipídios. Entretanto, não foi verificado tal efeito, assim como na maioria dos parâmetros de fermentação avaliados.

Objetivando avaliar o efeito da adição de dois níveis de OS (3 e 7% da MS) na dieta de vacas da raça Holandesa sobre a produção e composição do leite, e sobre os parâmetros ruminais e o consumo de MS, VARGAS *et al.* (2002) observaram efeito depressor dos lipídios apenas sobre o consumo de MS. SOARES (2002) observou pH médio de 6,8 para vacas em lactação alimentadas com capim-elefante suplementado com 4kg/dia de concentrado e concentração ruminal de N-NH₃ igual a

15,7 mg/dL. EIFERT *et al.* (2005) não observaram influência da presença de OS sobre o pH ruminal, apresentando média de 6,35. Observaram, no entanto, interação significativa entre a adição de OS e a concentração de N-NH₃ no rúmen (P=0,048). As concentrações médias de N-NH₃ para os tratamentos com 0 e 4% de adição de OS foram iguais a 12,30 e 9,41 mg/dL. O OS reduziu a concentração ruminal de N-NH₃.

4.3.2.2. AGV

Os AGV são responsáveis pelo suprimento de 60 a 70% da energia metabolizável dos ruminantes (VAN SOEST, 1994), sendo de grande importância na produção de vacas leiteiras. Dentre os três principais AGV, o ácido acético e o butírico são substratos para oxidação celular e precursores de lipídeos. Já o propiônico é o único AGV glicogênico, sendo responsável pela síntese de 65 a 80% da glicose produzida na vaca leiteira (SEYMOUR *et al.*, 2005).

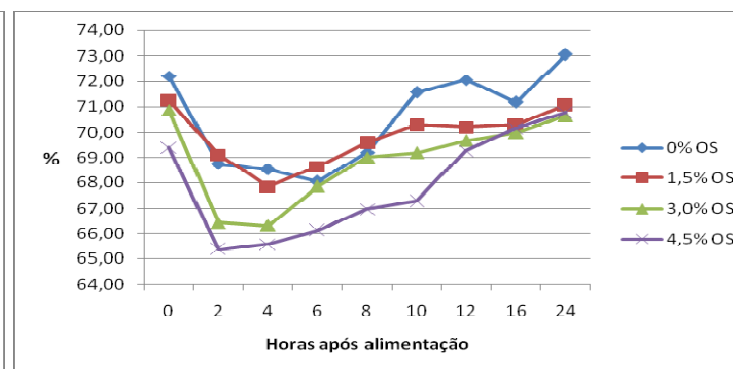
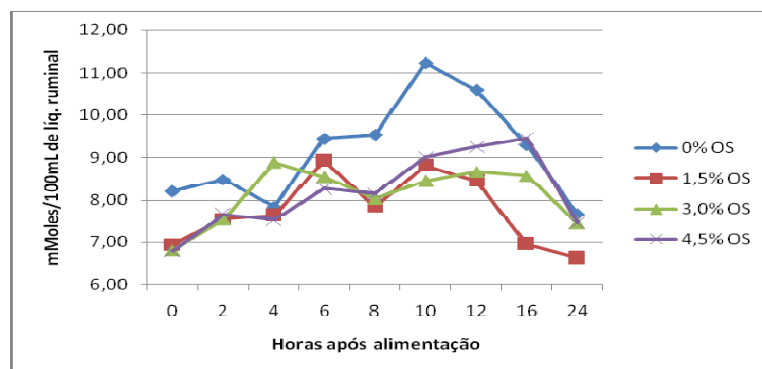
A síntese de AGV pela microbiota ruminal ocorre em taxas variáveis durante o dia e é influenciada pela natureza da dieta e pelo padrão de alimentação do animal (VAN SOEST, 1994). A concentração de cada um deles é reflexo do tipo de fermentação ruminal (SEYMOUR *et al.*, 2005).

As Tabelas 4.3.2.2.1, 4.3.2.2.2 e 4.3.2.2.3 e as Figuras 4.3.2.2.1, 4.3.2.2.2, 4.3.2.2.3, 4.3.2.2.4, 4.3.2.2.5 e 4.3.2.2.6 apresentam o efeito da adição dos diferentes níveis de OS sobre a concentração e a porcentagem ruminal de acetato, propionato e butirato, respectivamente.

Tabela 4.3.2.2.1. Efeito dos níveis de óleo de soja (% da matéria seca) sobre a concentração (mMol / 100 mL) e a porcentagem molar de acetato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dieta à base de capim-elefante, em função do tempo após a alimentação da manhã

Tempo	Concentração ruminal de Acetato					% molar de Acetato no rúmen				
	0% OS	1,5% OS	3,0% OS	4,5% OS	Médias	0% OS	1,5% OS	3,0% OS	4,5% OS	Médias
0 ¹	8,21	6,95	6,81	6,79	7,19^B	72,21	71,26	70,87	69,41	70,93^A
2	8,48	7,56	7,54	7,66	7,81^{AB}	68,75	69,12	66,43	65,37	67,42^B
4	7,84	7,64	8,89	7,54	7,98^{AB}	68,53	67,85	66,32	65,58	67,07^B
6	9,45	8,92	8,54	8,26	8,79^{AB}	68,05	68,64	67,86	66,14	67,67^B
8	9,54	7,86	8,04	8,15	8,40^{AB}	69,22	69,59	69,02	66,97	68,70^B
10	11,23	8,81	8,44	9,01	9,38^A	71,55	70,30	69,19	67,29	69,58^{AB}
12	10,60	8,45	8,66	9,26	9,24^A	72,05	70,20	69,67	69,28	70,30^{AB}
16	9,30	6,95	8,57	9,45	8,57^{AB}	71,17	70,30	69,98	70,17	70,40^{AB}
24	7,66	6,63	7,45	7,46	7,30^B	73,06	71,06	70,64	70,77	71,38^A
Médias	9,15	7,75	8,11	8,18		70,51	69,81	68,89	67,89	

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey; ¹Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.

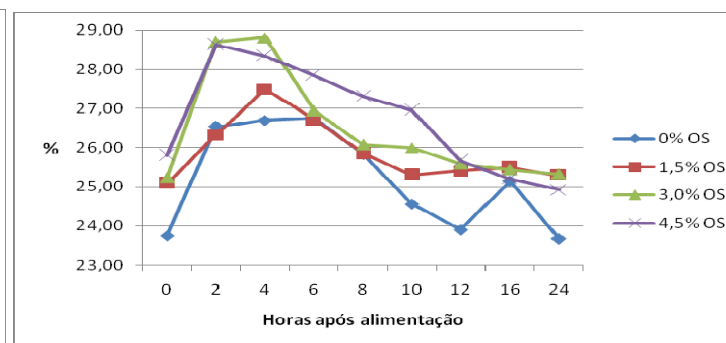
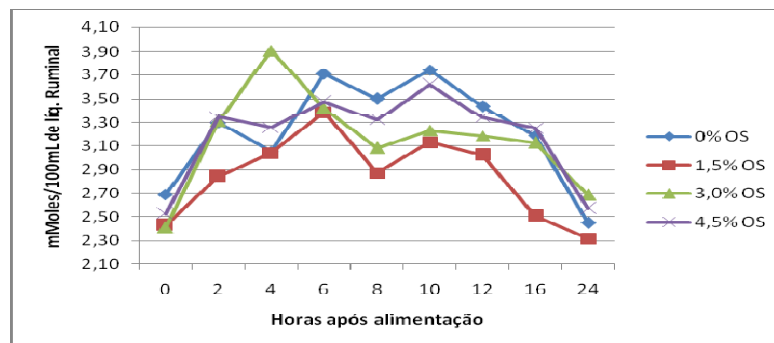


Figuras 4.3.2.2.1 e 4.3.2.2.2. Variação da concentração de acetato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja (% da matéria seca), em função do tempo (h) após o fornecimento da alimentação diária.

Tabela 4.3.2.2.2. Efeito dos níveis de óleo de soja (% da matéria seca) sobre a concentração (mMol / 100 mL) e a porcentagem molar de propionato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dieta à base de capim-elefante, em função do tempo após a alimentação da manhã

Tempo	Concentração ruminal de Propionato					% molar de Propionato no rúmen				
	0% OS	1,5% OS	3,0% OS	4,5% OS	Médias	0% OS	1,5% OS	3,0% OS	4,5% OS	Médias
0 ¹	2,69	2,43	2,41	2,53	2,51^B	23,75	25,08	25,23	25,81	24,97^B
2	3,30	2,85	3,31	3,35	3,20^A	26,54	26,34	28,69	28,62	27,55^A
4	3,05	3,04	3,91	3,26	3,31^A	26,71	27,49	28,81	28,34	27,83^A
6	3,71	3,38	3,42	3,48	3,50^A	26,76	26,72	26,95	27,84	27,07^{AB}
8	3,50	2,87	3,08	3,33	3,20^A	25,84	25,86	26,08	27,31	26,27^{AB}
10	3,74	3,13	3,23	3,62	3,43^A	24,56	25,32	25,99	26,96	25,71^B
12	3,44	3,03	3,18	3,34	3,25^A	23,91	25,42	25,60	25,68	25,15^B
16	3,18	2,51	3,13	3,25	3,02^{AB}	25,14	25,50	25,44	25,20	25,32^B
24	2,45	2,32	2,69	2,57	2,51^B	23,67	25,29	25,33	24,92	24,80^B
Médias	3,23^b	2,84^a	3,15^{ab}	3,19^b		25,21	25,89	26,46	26,74	

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra maiúscula e nas linhas seguidas pela mesma letra minúscula não diferem ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey; ¹Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.



Figuras 4.3.2.2.3. e 4.3.2.2.4. Variação da concentração de propionato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja (% da matéria seca), em função do tempo (h) após o fornecimento da alimentação diária.

Tabela 4.3.2.2.3. Efeito dos níveis de óleo de soja (% da matéria seca) sobre a concentração (mMol / 100 mL) e a porcentagem molar de butirato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dieta à base de capim-elefante, em função do tempo após a alimentação da manhã

Tempo	Concentração ruminal de Butirato					% molar de Butirato no rúmen				
	0% OS	1,5% OS	3,0% OS	4,5% OS	Médias	0% OS	1,5% OS	3,0% OS	4,5% OS	Médias
0 ¹	0,458	0,358	0,380	0,470	0,416^{BC}	4,04	3,67	3,91	4,78	4,10^C
2	0,591	0,488	0,550	0,706	0,584^{AB}	4,71	4,54	4,89	6,01	5,03^{AB}
4	0,540	0,515	0,655	0,702	0,603^{AB}	4,77	4,67	4,87	6,09	5,10^{AB}
6	0,717	0,588	0,659	0,754	0,679^A	5,19	4,64	5,19	6,03	5,26^A
8	0,680	0,505	0,579	0,694	0,615^{AB}	4,95	4,56	4,91	5,72	5,03^{AB}
10	0,614	0,540	0,601	0,768	0,631^A	3,89	4,39	4,82	5,75	4,71^B
12	0,595	0,522	0,587	0,665	0,592^{AB}	4,04	4,38	4,73	5,05	4,55^{BC}
16	0,484	0,414	0,563	0,611	0,518^B	3,69	4,20	4,58	4,64	4,28^{BC}
24	0,348	0,329	0,419	0,455	0,388^C	3,27	3,65	4,03	4,31	3,82^C
Médias	0,559^a	0,473^a	0,555^a	0,647^b		4,28^a	4,30^a	4,66^a	5,37^b	

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra maiúscula e nas linhas seguidas pela mesma letra minúscula não diferem ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey; Médias nas linhas seguidas pela mesma letra minúscula não diferem ($P > 0,05$); ¹ Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.

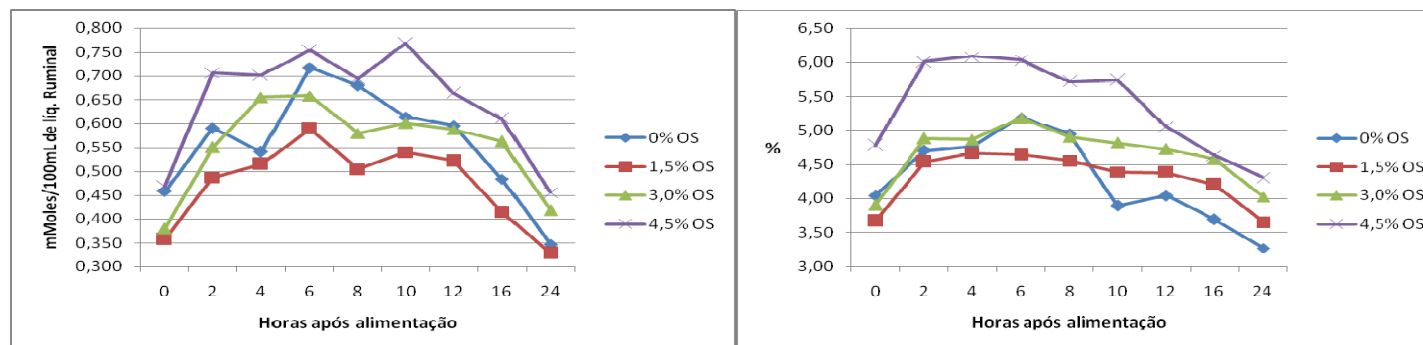


Figura 4.3.2.2.5 e 4.3.2.2.6. Variação da concentração de butirato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja (% da matéria seca), em função do tempo (h) após o fornecimento da alimentação diária.

A concentração ruminal média de acetato (Tabela 4.3.2.2.1) foi de 8,3mMol/100mL e somente no momento que antecedeu a alimentação (tempos 0 e 24 horas) foi observado valor menor ($P<0,05$) em relação aos demais tempos de amostragem. Os tempos 10 e 12 do grupo controle (11,23 e 10,60 mMol/dL, respectivamente) foram superiores ($P<0,05$) aos dos outros tratamentos. No tempo 16, a concentração observada pelo tratamento com adição de 1,5% de OS foi inferior em relação ao controle e ao tratamento com 4,5% de OS. Entre tratamentos, não houve variação na concentração ruminal nem na concentração molar do acetato ($P>0,05$). Não houve interação ($P=0,88$) entre os tratamentos e o tempo de amostragem.

A concentração média de propionato no rúmen (Tabela 4.3.2.2.2) permaneceu estável durante praticamente todo o dia, reduzindo-se ($P<0,05$) somente nos momentos que antecederam a alimentação (tempos 0 e 24 horas), onde observaram concentração de 2,51 mMol/100mL. No tempo 8, a concentração de ácido propiônico no grupo controle (3,50 mMol/100mL) foi superior ($P<0,05$) ao do tratamento com 1,5% de OS (2,87 mMol/100mL). No tempo 16, no mesmo tratamento foi observado um valor (2,51 mMol/100mL) inferior ($P<0,05$) em relação àquele dos grupos controle e com 4,5% de OS (3,18 e 3,25 mMol/100mL, respectivamente).

Apesar de não haver comprovação estatística, observa-se que entre os tempos 8 e 16, as concentrações de propionato no grupo controle são sempre superiores às demais. Isso permite sugerir que a adição de OS à dieta está influenciando sobre a fermentação dos precursores de propionato. Apesar dessa redução, não houve comprometimento do aporte de glicose à glândula mamária capaz de reduzir a produção de leite dos animais (Capítulo III).

Houve variação na concentração ruminal de propionato entre os tratamentos. O tratamento 1,5% de OS foi inferior ($P<0,05$; 2,84 mMol / 100 mL) aos tratamentos 0 e 4,5% de OS (3,23 e 3,19 mMol / 100 mL, respectivamente) mas equivalente (3,15 mMol / 100 mL) ao 3,0% de OS. Não houve interação ($P=0,91$) entre os tratamentos e o tempo de amostragem.

A concentração média de butirato no rúmen (Tabela 4.3.2.2.3) apresentou valores mais altos ($P<0,05$) nos tempos 6 e 10 (0,68 e 0,63 mMol/100mL, respectivamente), e mais baixos ($P<0,05$) nos momentos anteriores ao fornecimento da alimentação (0,42 e 0,39 mMol/100mL), como era de se esperar. Ao comparar os tratamentos, as concentrações mais baixas ocorreram nas adições intermediárias de OS e no tratamento com 4,5% de OS foram observados incrementos ($P<0,05$) nas concentrações de butirato em quase todos os tempos (exceto 0 e 24 horas). Isso sugere que a adição de quantidades medianas de OS (aproximadamente 5,5% de EE) permite maior eficiência energética de fermentação, a partir de maior produção de acetato e propionato, já que a produção de butirato é considerada menos interessante do ponto de vista energético (VAN SOEST, 1994).

Com relação às médias entre tratamentos, observou-se que o tratamento com adição de 4,5% de OS obteve valores superiores ($P<0,05$) tanto na concentração ruminal (0,647 mMol / 100 mL) quanto na concentração molar (5,37%) de butirato. Os outros tratamentos tiveram valores iguais a 0,559; 0,473 e 0,555 mMol / 100 mL e 4,28; 4,30 e 4,66% para 0; 1,5 e 3,0% de OS, respectivamente. Não houve interação ($P=0,82$) entre os tratamentos e o tempo de amostragem.

SEYMOUR *et al.* (2005) compilaram vários trabalhos relativos à nutrição de vacas da raça Holandesa em lactação para

verificar as relações entre os parâmetros produtivos e ruminais. Dentre os trabalhos, houve variações nas fontes de carboidrato, nos tamanhos de partículas, utilização de subprodutos, níveis de carboidratos não estruturais, níveis de adição de lipídeos e tipos de forragens. Eles observaram elevadas relações entre a produção de leite e às concentrações ruminais de butirato ($r^2=0,47$), de propionato ($r^2=0,23$) e a ingestão de MS ($r^2=0,69$). Os dados relativos à produção de leite apresentados na Tabela 3.3.1.2 do Capítulo III apresentam resultados semelhantes. Houve incremento linear ($P=0,03$) na produção de leite, e nas porcentagens molares (%) de propionato e de butirato, à medida que se adicionou OS à dieta.

No mesmo trabalho, ainda observaram que houve pouca ou nenhuma relação entre a produção de leite e a concentração ruminal de acetato ou total de AGV. A concentração ruminal de butirato foi positivamente relacionada à ingestão de MS ($r^2=0,28$). A relação entre os AGV produzidos no rúmen e a composição do leite foi de moderada a fraca. O conteúdo de gordura (g/100 g) associou-se positivamente à relação acetato:propionato ($r^2=0,26$), o teor de proteína (g/100 g) associou-se negativamente ao pH ruminal ($r^2=0,17$). Esses resultados sugerem que o aumento da ingestão de energia em vacas em lactação está direcionado principalmente para a síntese ruminal de butirato e propionato para a produção de ATP.

A Tabela 4.3.2.2.4 e a Figura 4.3.2.2.7 mostram que as concentrações médias de AGV nos tempos 6, 10 e 12 (12,97; 13,44 e 13,08 mMol/100mL, respectivamente) foram superiores ($P<0,05$) aos dos momentos que antecederam a alimentação (tempos 0 e 24 horas). Percebe-se que, no tempo 8, o grupo controle apresentou valor (13,72 mMol/100mL) superior ($P<0,05$) ao do grupo com 1,5% de OS (11,23 mMol/100mL). No tempo 10, o grupo

controle (15,59mMol/100mL) foi superior ($P<0,05$) ao tratamento com 1,5 e 3,0% de OS (12,48 e 12,27 mMol/100mL, respectivamente). No tempo 16, apenas o tratamento 1,5% de OS (9,87 mMol/100mL) foi inferior ($P<0,05$) aos demais grupos. Apesar da produção de AGV ter sido superior nos horários 8, 10, 12 e 16 do tratamento controle, o pH se apresentou mais baixo nos horários 6 e 8 dos tratamentos com 3,0 e 4,5% de OS. Não houve diferença entre as concentrações totais de AGV entre tratamentos ($P>0,05$). Não houve interação ($P=0,90$) entre os tratamentos e o tempo de amostragem.

Haja vista a pequena influência dos diferentes tratamentos sobre o consumo de MS e os parâmetros ruminais, supõe-se que a adição de óleo de soja até o nível de 4,5% da MS pouco influenciou a população microbiana do rúmen. Essa suposição confronta com os resultados obtidos na digestibilidade *in situ* (Item 4.3.4 deste Capítulo).

Os resultados observados sugerem que a fermentação ruminal ficou comprometida apenas quando houve adição de pequenas quantidades de OS, diferentemente do que é proposto por JENKINS (1993) e BAUMAN *et al* (1999).

Para EIFERT *et al.* (2005), a concentração total de AGV não foi influenciada ($P>0,05$) pelos tratamentos, entretanto, a proporção molar dos produtos finais de fermentação foi alterada, indicando alteração na população microbiana. A proporção molar de acetato foi reduzida ($P<0,05$) na presença de óleo de 71,7 para 69,4 mMol%. O OS aumentou ($P<0,05$) as proporções molares de propionato de 22,4 (0% de OS) para 25,3mMol% (4,0% de OS) e reduziu ($P<0,05$) a relação acetato propionato (A:P) de 3,21 (0% de OS) para 2,79 (4,0% de OS). Segundo os autores, a proporção molar do propionato aumentou tanto pela diminuição de acetato como de butirato na

presença de OS. A proporção de butirato foi reduzida ($P < 0,05$) na presença de OS, indicando redução na atividade de protozoários, sugerindo efeito defaunatório descrito por NAGARAJA *et al.* (1997).

CAMPOS *et al.* (2007) observaram concentrações de acetato, propionato, butirato e AGV total iguais a 10,5 (63%); 3,9 (23%); 2,4 (14%) e 167,8 mMol/100mL (100%).

Tabela 4.3.2.2.4. Efeito dos níveis de óleo de soja (% da matéria seca) sobre a concentração ruminal (mMol / 100 mL) de ácidos graxos voláteis no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dieta à base de capim-elefante, em função do tempo após a alimentação da manhã

Concentração de AGV ¹					
Tempo	0% OS	1,5% OS	3,0% OS	4,5% OS	Médias
0 ²	11,35	9,73	9,60	9,79	10,12 ^B
2	12,36	10,90	11,41	11,72	11,59 ^{AB}
4	11,44	11,19	13,45	11,50	11,89 ^{AB}
6	13,87	12,90	12,62	12,49	12,97 ^A
8	13,72	11,23	11,70	12,17	12,21 ^{AB}
10	15,59	12,48	12,27	13,40	13,44 ^A
12	14,63	12,00	12,43	13,27	13,08 ^A
16	12,97	9,87	12,26	13,31	12,10 ^{AB}
24	10,46	9,28	10,56	10,49	10,19 ^B
Médias	12,93	11,06	11,81	12,01	

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey; ¹Somatório das concentrações de Ace, Pro e But, ²Coleta anterior ao fornecimento da alimentação.

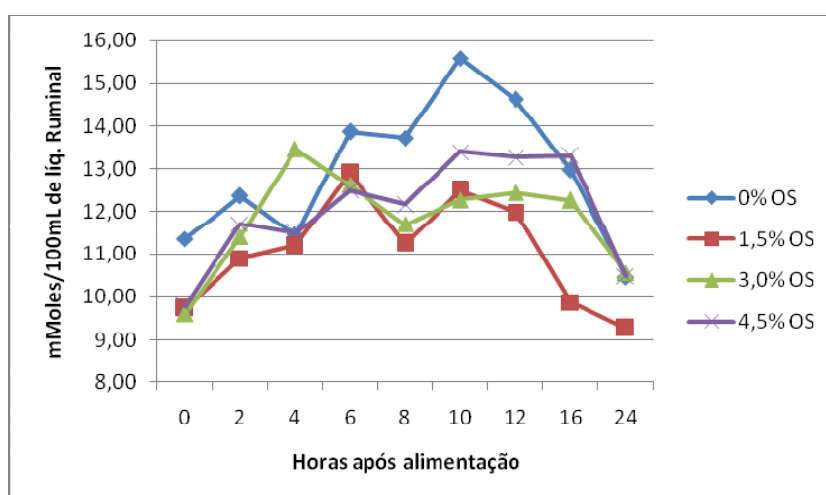


Figura 4.3.2.2.7. Variação da concentração ruminal de AGV no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja (% da matéria seca), em função do tempo (h) após o fornecimento da alimentação diária.

A Tabela 4.3.2.2.5 e a Figura 4.3.2.2.8 apresentam os efeitos dos diferentes níveis de óleo de soja sobre a relação

acetato:propionato em função do tempo após a alimentação da manhã.

Tabela 4.3.2.2.5. Efeito dos níveis de óleo de soja (OS, % da matéria seca) sobre a relação acetato:propionato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dieta à base de capim-elefante, em função do tempo após a alimentação da manhã

Relação Acetato:Propionato					
Tempo	0% OS	1,5% OS	3,0% OS	4,5% OS	Médias
0 ¹	3,08	2,87	2,82	2,71	2,87 ^{AB}
2	2,64	2,65	2,33	2,29	2,48 ^B
4	2,62	2,51	2,33	2,33	2,45 ^B
6	2,59	2,60	2,54	2,39	2,53 ^B
8	2,72	2,72	2,67	2,46	2,64 ^B
10	2,95	2,80	2,70	2,51	2,74 ^{AB}
12	3,06	2,79	2,76	2,77	2,85 ^{AB}
16	2,93	2,76	2,79	2,85	2,83 ^{AB}
24 ¹	3,16	2,82	2,83	2,92	2,93 ^A
Médias	2,86	2,73	2,64	2,58	

Médias nas colunas seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem ($P>0,05$) pelo teste de Tukey; ¹Coleta imediatamente anterior ao fornecimento da alimentação.

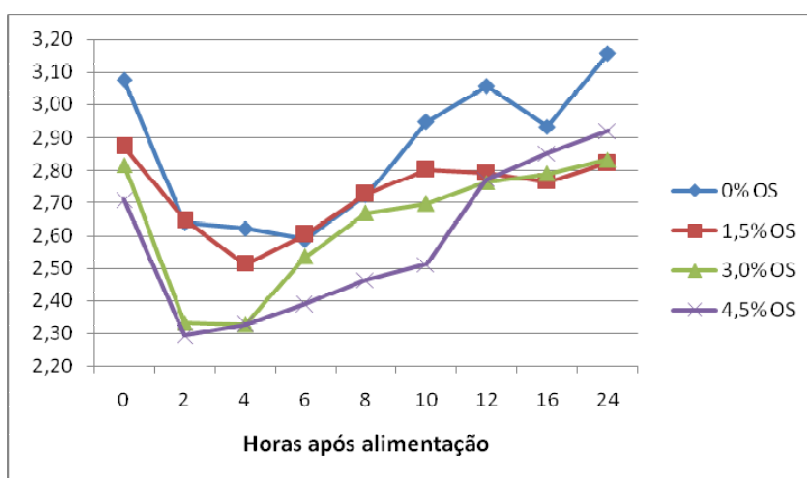


Figura 4.3.2.2.8. Variação da relação acetato:propionato no rúmen de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dietas baseadas em capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja na matéria seca da dieta, em função do tempo (h) após o fornecimento da alimentação diária.

Quando se comparou as médias entre os diferentes horários, observou-se que somente no tempo 24 (2,93:1) a relação acetato:propionato no rúmen foi diferente ($P<0,05$) dos demais horários. Não houve diferença na relação acetato:propionato

entre tratamentos ($P>0,05$). Não houve interação ($P=0,95$) entre os tratamentos e o tempo de amostragem.

A relação acetato:propionato no líquido ruminal é influenciada pela dieta, variando

de 3,5:1 em dieta à base de volumoso a 1,25:1 em dieta rica em concentrado (NAGARAJA *et al.*, 1997). Os valores observados variaram de 2,29:1 (tempo 2; 4,5% de OS) a 3,16:1 (tempo 24; 0% de OS).

Em geral, quando se diminui a relação volumoso:concentrado, observa-se diminuição da proporção acetato:propionato. Como no experimento essa relação se manteve fixa entre dietas, esse fator não influenciou nas variações observadas. CHAPAVAL *et al.* (2008) afirmaram ainda, que quando se aumenta os níveis de celulose e hemicelulose em relação aos de carboidratos solúveis e de amidos na dieta também aumenta-se a proporção acetato:propionato. Como apresentado na Tabela 4.2.1.3, as dietas foram isofibras, sugerindo que as variações observadas foram consequência das diferentes concentrações de OS.

BATEMAN e JENKINS (1998) conduziram trabalho com o objetivo de determinar os efeitos da adição de 0, 2, 4, 6 e 8% de OS na MS de dietas ricas em fibra (50% capim bermuda, 50% concentrado) sobre a fermentação e a concentração de lipídeos no rúmen de vacas não lactantes da raça Holandesa. Os autores observaram que a concentração total de AGV declinava à medida que se adicionava OS (0, 2, 4, 6 e 8%) às dietas ricas em fibra. Estes autores observaram queda somente quando adicionaram 8% de OS na MS da dieta. Ao mesmo tempo em que observaram diminuição na concentração molar de acetato, houve aumento linear ($P<0,05$) na proporção molar de propionato, fazendo com que a relação entre eles declinasse linearmente ($P<0,05$) com o incremento nos níveis de OS na dieta. Esse é um indício de que, assim como na presente dissertação, a fermentação da fibra foi afetada.

SHINGFIELD *et al.* (2008) utilizaram vacas da raça Holandesa em lactação para avaliar a ação do ácido linoleico, a partir do óleo de girassol como fonte principal, sobre o metabolismo ruminal. A dieta era composta por silagem de capim, concentrado e quatro diferentes quantidades de óleo de soja (0, 250, 500 e 750 g/vaca/dia). Eles não observaram diferenças no consumo total de MS ($P=0,13$) nem no de matéria orgânica ($P=0,23$), no pH e na concentração de AGV no rúmen, mas foi observada tendência à queda ($P=0,09$) na concentração ruminal de N-NH₃. Assim como no presente experimento, eles observaram diminuição na proporção acetato:propionato ($P<0,001$) à medida que adicionaram OS à dieta. Segundo os autores, as dietas com 250 e 500g/dia de OS afetaram menos a fermentação ruminal que as com 750g/dia.

Observações de VARGAS *et al.* (2002) mostraram que os lipídios insaturados inibiram as bactérias ruminais gram-positivas e estimularam aquelas produtoras de propionato, causando decréscimo na relação acetato:propionato se comparado ao grupo controle (3,09:1 para 2,93:1). Segundo eles, o aumento da proporção molar de propionato foi devido ao incremento da sua produção com concomitante redução nas de acetato e butirato.

4.3.3. Taxa de Passagem

4.3.3.1. Fase Líquida

Os parâmetros do fluxo de líquido no trato gastrointestinal das vacas alimentadas com diferentes teores de OS na dieta estão apresentados na Tabela 4.3.3.1.1.

Tabela 4.3.3.1.1. Parâmetros da cinética de fluxo de líquido no trato gastrointestinal de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dietas baseadas em capim-elefante suplementado com óleo de soja na MS da dieta, segundo estimativas obtidas pelo modelo de COLUCCI (1984)

Parâmetros ¹	Nível de inclusão de óleo de soja na matéria seca da dieta				CV ² (%)	Efeito ³	
	0%	1,5%	3,0%	4,5%		L	Q
VR	116,65	99,72	110,27	106,69	16,46	ns	ns
TR	10,39	8,72	9,25	8,81	20,06	ns	ns
TxR	2,43	2,98	2,66	2,83	18,72	ns	ns
Tx Fluxo	11,35	11,62	12,00	12,01	5,99	ns	ns
Tx Passagem	10,0	12,0	11,0	12,0	18,68	ns	ns

¹ VR - Volume ruminal (litros); TR - tempo de reciclagem (horas); TxR - taxa de reciclagem (vezes/dia); Tx Fluxo - taxa de fluxo (L/hora); Tx passagem - taxa de passagem da fase líquida (%/h); ² Coeficiente de variação; ³ ns - não significativo (P>0,05) pelo teste de Tukey; L - Linear, Q - Quadrático.

A adição de OS não influenciou (P>0,05) nenhum dos parâmetros da cinética de fluidos. Tais resultados estão de acordo com os observados por CLARY *et al.* (1993) que trabalharam com adição de 4% de gordura na dieta de novilhas. Já KLUSMEYER *et al.* (1991) e BATEMAN e JENKINS (1998) observaram diminuição (P<0,05) na taxa de fluxo (TF) à medida que se adicionou OS à dieta.

Segundo OWENS e GOETSCH (1988), o volume ruminal (VR), quando expresso em porcentagem do peso vivo, varia entre 15 e 21%. Na presente dissertação, variou entre 23,3% (0% de OS) e 20,0% (1,5% de OS). Segundo esses autores, as variações no volume de líquido ruminal podem ser atribuídas aos níveis de concentrado das dietas e à qualidade da forragem utilizada.

A taxa de passagem de fluidos no rúmen pode variar conforme o nível de ingestão, a proporção de concentrado, o indicador utilizado e os locais de amostragem (BATEMAN e JENKINS, 1998). Assim como proposto pela literatura, ELYAS (2007) trabalhando com vacas da raça Holandesa manejadas em pastagem de Coastcross fertilizada e suplementadas com diferentes quantidades (3,0 e 6,0 kg) de concentrado observou aumento (P<0,05) na TxPassagem de líquidos nos animais que

consumiram maior quantidade de concentrado. Segundo o autor, isto se justifica pela maior ingestão de suplemento, aliada à redução da ingestão de MS da forragem. A autora observou, ainda, que o maior (P<0,05) TR estimado para os animais alimentados com baixa quantidade de concentrado ocasionou menor TxR e maior TxFluxo quando comparado ao tratamento com maior suplementação.

Em um experimento semelhante, MOTA (2006), não observou influência alguma sobre a dinâmica ruminal da fase líquida. Os valores observados por ele foram de 9,75 e 8,53 para a TR, de 2,57 e 2,78 para a TxR, de 6,71 e 6,80 para a TxFluxo e de 10,72 e 11,82 para a TxPassagem das dietas com baixa e alta suplementação, respectivamente. Somente a TxFluxo obteve valores diferentes ao do presente experimento.

Trabalhando com capim-napier, brachiária e colônia para vacas leiteiras mestiças Holandês x Zebu, BENEDETTI (1994) também não observou diferença quanto à cinética da fase líquida entre as forrageiras analisadas e encontrou os valores médio para o tempo de reciclagem de 7,25 h, a taxa de reciclagem igual a 3,47 vezes por dia e a taxa de fluxo de 10,57 L/h.

4.3.3.2. Fase Sólida

A taxa de passagem do alimento no rúmen é importante na regulação do consumo, já que afeta a utilização de nutrientes. Por estar diretamente relacionada ao efeito de enchimento físico do rúmen, influencia o consumo voluntário de alimentos e, por conseguinte, a produtividade animal (VAN SOEST, 1994). Existem diversos procedimentos metodológicos para obtenção de estimativas da taxa de passagem da fase sólida. As técnicas indiretas, com o uso de indicadores não-absorvíveis, ingeridos ou diretamente infundidos no rúmen em dose única, têm sido mais adotadas nas estimativas dos parâmetros de dinâmica da passagem das partículas no trato gastrintestinal (TGI) dos ruminantes (OFFER e DIXON, 2000; LOPES *et al.*, 2008).

Dentre os vários indicadores utilizados nas estimativas de taxa de passagem da fase sólida, foi demonstrado que as fibras complexadas com cromo (Cr), denominadas de cromo-mordentes, foram eficientes na

representação do fluxo de partículas no TGI de novilhos (OFFER e DIXON, 2000; LOPES *et al.*, 2008).

Alguns autores propuseram modelos não-lineares para descrever a passagem de partículas de tamanhos diferentes e de líquidos pelo TGI de ruminantes. GROVUM e WILLIAMS (1973) utilizaram dois termos exponenciais como compartimentos de mistura e um terceiro compartimento, tubular, como tempo de trânsito e propuseram método gráfico para calcular os parâmetros. Este modelo, embora seja bastante utilizado para gerar estimativas de taxa de passagem, considera o processo de passagem nos diferentes segmentos do trato digestivo como sendo independentes do tempo de permanência nos diferentes compartimentos (SOARES *et al.* 2001). Segundo este modelo, há igual probabilidade de escape para todas as partículas alimentares sem considerar o tamanho ou a composição da dieta. A Tabela 4.3.3.2.1 apresenta os parâmetros da cinética de fluxo de partículas estimada por esse modelo.

Tabela 4.3.3.2.1. Parâmetros da cinética de fluxo de partículas no trato gastrintestinal de vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dietas baseadas em capim-elefante suplementado com óleo de soja na MS da dieta, segundo estimativas obtidas do ajuste do modelo de GROVUM e WILLIAMS (1973)

Parâmetros ¹	Nível de inclusão de óleo de soja (OS) na matéria seca da dieta				CV ² (%)	Efeito ³	
	0%	1,5%	3,0%	4,5%		L	Q
k ₁	3,99	4,43	3,89	4,39	11,47	ns	ns
k ₂	4,97	5,44	4,80	5,34	11,27	ns	ns
TT	17,19	11,49	15,83	17,78	16,71	ns	ns
TRR	25,45	23,12	25,98	23,19	11,16	ns	ns
TRPOS	20,56	18,65	20,99	19,06	12,27	ns	ns
TMR	63,21	59,25	62,80	60,03	6,83	ns	ns
R ² (%)	72,3	82,6	90,0	80,4	-	-	-

¹k₁ - taxa de passagem no rúmen (%/h); k₂ - taxa de passagem no ceco e cólon (%/h); TT - tempo de trânsito (h); TRR= tempo de retenção no rúmen (1/k₁, h); TRPOS - tempo de retenção no ceco e cólon

proximal ($1/k_2$, h); TMR - tempo médio de retenção no TGI (TR + TPOS + TT, h); ²Coeficiente de variação (%); ³ ns – não-significativo ($P>0,05$) pelo teste de Tukey; L - Linear, Q - Quadrático.

As concentrações de cromo na MS dos materiais mordentados situaram-se entre 1,90 e 2,19% da MS, estando próximas daquela máxima recomendada por BURNS *et al.* (2001). Segundo estes autores, concentrações de Cr superiores a 1,4% da MS poderiam, eventualmente em decorrência de mudanças na densidade das partículas complexadas (EHLE, 1984; OFFER e DIXON, 2000), alterar o comportamento cinético, quando comparado àquele das partículas originais do alimento. Entretanto, na literatura consultada, em estudos visando a estimativas de parâmetros de cinética de fluxo no TGI de bovinos, foi relatado o uso de concentrações de Cr no mordente, variando de 1,0 (MOORE *et al.*, 1992) até 10,36% (COLUCCI *et al.*, 1982).

Não houve efeito da inclusão de OS ($P>0,05$) sobre os parâmetros da cinética do fluxo da fase sólida no TGI estimadas pelo modelo bicompartimental tempo-independente proposto por GROVUM e WILLIAMS (1973) (GW).

Os valores médios de k_1 e k_2 estimados pelo modelo GW foram de 4,18 e 5,14 %/h, respectivamente. A taxa de passagem no rúmen (k_1) é de grande importância, pois determina o fluxo da digesta pelo trato gastrointestinal que, no caso de forrageiras tropicais, apresenta, de modo geral, valores baixos devido, principalmente, ao elevado teor de fibra em sua composição química.

Para BARBI (1991), a taxa de passagem ruminal (k_1) para forrageiras tropicais deve girar em torno de 4,16 %/hora. Segundo MERTENS (1992), estes parâmetros estão condicionados, principalmente pelo nível de consumo, pela forma física da dieta, pelas variações na estimulação da ruminação, pelo tipo de indicador usado na determinação da curva de excreção fecal,

pela proporção volumoso:concentrado e por fatores climáticos.

Segundo ELLIS *et al.* (1994) citado por LOPES *et al.* (2008), a obtenção de k_1 e k_2

semelhantes ($k_1 \cong k_2$) é inconsistente com

as premissas relacionadas a modelos de dois compartimentos sequenciais. Esses autores discutiram eventuais condições em que tal situação se estabelece e recomendaram, baseando-se na literatura, que a razão entre esses dois parâmetros (k_2/k_1) deveria exceder o valor de 1,5 para que se alcançasse estimativa confiável da taxa de passagem ruminal. No caso do presente experimento, essa razão foi igual a 1,23 para o modelo GW. Apesar desse valor ter ficado fora do parâmetros sugeridos, os outros valores obtidos pelo modelo são bem coerentes em termos biológicos tanto para k_1 quanto para k_2 .

SHINGFIELD *et al.* (2008), verificaram que à medida que aumentava o teor de óleo vegetal, reduzia ($P<0,05$) o k_1 .

Os valores médios estimados por GW para TRR e TRPOS foram de 24,44 e 19,82h, respectivamente. O TRR representa o tempo que o alimento permanece no rúmen sofrendo a ação dos microrganismos para que ocorra redução do tamanho das partículas alimentares, sendo um parâmetro inversamente correlacionado com a taxa de passagem no rúmen ($TRR=1/k_1$) (GROVUM e WILLIAMS, 1973).

Segundo FORBES (1995), o TRR é influenciado pela concentração de fibra na dieta. Dietas ricas em fibras elevam o TRR devido à diminuição da taxa de degradação (k_1) da fibra. A presença de maiores

quantidades de fibra nos intestinos reduz o tempo de retenção pós-ruminal (TRPOS) por estimular os movimentos peristálticos, sendo assim, dietas ricas em concentrado tendem a aumentar o TRPOS.

Na presente dissertação, o modelo GW sugeriu um tempo de retenção no TGI das fibras marcadas com cromo-mordante por um tempo igual a 61,32 horas. Quando se lança mão da utilização de suplementos lipídicos na dieta de ruminantes, espera-se maior tempo de retenção da digesta no rúmen devido à redução da taxa de degradação da fibra causada pelo comprometimento da ação microbiana e devido à redução da taxa de passagem, aumentando o efeito de preenchimento da dieta. O ajuste do modelo de GW aos dados gerou valores de r^2 bem diversos. A maioria deles apresentou valores abaixo de 90%.

SOARES *et al.* (2001) estimaram parâmetros da cinética da fase sólida no TGI de 18 vacas mestiças Holandês x Zebu, em lactação, pastejando capim-elefante, utilizando o modelo GW. Os autores observaram k_1 , TRR e TMR iguais a 3,0%/h; 51,10 h e 82,54 h, respectivamente. CAMPOS *et al.* (2007), estudando a cinética ruminal de seis vacas leiteiras recebendo 4kg/dia de concentrado e pastejando piquetes de capim-elefante, estimaram valores de k_1 e de TRR, respectivamente iguais a 3,98%/h e 25,1 h com o mesmo modelo.

PEREIRA *et al.* (2007) realizaram experimento que objetivou avaliar a taxa de passagem de partículas do volumoso e o comportamento ingestivo de novilhas leiteiras de três grupos genéticos mantidas em confinamento e alimentadas com dietas com dois níveis (30 e 60%) de fibra em detergente neutro (FDN), utilizando-se como volumoso o capim-elefante cultivar Mineirão picado. Eles observaram que as taxas de passagem de partículas do capim-elefante no rúmen-retículo (k_1) diminuíram

de 4,04 para 3,76%/h com o aumento do nível de FDN da dieta, enquanto que no ceco-cólon (k_2), foram maiores para a dieta com alta concentração de FDN (9,96%) em relação à dieta com baixo teor de FDN (8,59%/h). Os tempos de retenção no rúmen-retículo (TRR) foram 13,8% menores ($P<0,05$) para a dieta com 30% de FDN (24,06 h), quando comparados com aqueles observados na dieta com 60% de FDN (27,92 h). No entanto, os tempos de retenção no ceco-cólon (TRPOS) foram 13,9% maiores ($P<0,05$) para a dieta com 30% de FDN (12,86 h contra 11,29 h). Os tempos médios de retenção (TMR) e os tempos de retenção total (TT) estimados foram numericamente superiores para a dieta com alta concentração de FDN (36,92 h contra 39,21 h e 47,66 h contra 50,82 h; respectivamente).

4.3.4. Degradabilidade ruminal *in situ* da MS, MO e FDN

Os parâmetros de degradabilidade ruminal *in situ* da MS, MO e FDN do capim-elefante, estimados pelo modelo proposto por MEHREZ e ORSKOV (1977) e modificado por SAMPAIO (1988), estão apresentados nas Tabelas 4.3.4.1, 4.3.4.2 e 4.3.4.3, respectivamente.

Dentre os parâmetros de degradabilidade ruminal *in situ* da MS, somente a taxa de degradação (c) e a degradabilidade efetiva (DE) sofreram influência da adição de OS a um nível de significância de 7%. Ambos os parâmetros diminuíram ($P=0,04$ e $P=0,07$, respectivamente) à medida que se adicionou OS, sendo os valores iguais a 4,00; 3,32; 3,26 e 2,71%/h e 35,09; 32,64; 33,54 e 31,04% para os tratamentos 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente. Para cada incremento de 1% de OS na dieta, houve decréscimo ($P=0,04$) de 0,222 unidades percentuais por hora na taxa de degradação da MS do capim-elefante picado no rúmen das vacas ($y = -0,222x + 4,624$; $r^2=0,73$). A

degradabilidade efetiva (DE) reduziu (P=0,07), sendo os valores iguais a 35,09; 32,54; 33,54 e 31,04%. Cada 1% de OS adicionado há a tendência de decréscimo de 0,647 unidades percentuais na DE da MS do capim-elefante ($y = -0,647x + 38,65$; $r^2=0,90$). As médias observadas para A, B1 e DE foram de 55,31; 39,53 e 40,42%, respectivamente.

Dentre os parâmetros de degradabilidade ruminal *in situ* da MO, tanto a taxa de degradação (c) quanto a degradabilidade efetiva (DE) sofreram influência da adição de OS a um nível de significância de 10%. A taxa de degradação (c) e a degradabilidade efetiva (DE) diminuíram (P=0,07 e P=0,10, respectivamente) à

medida que se adicionou OS, sendo os valores iguais a 4,1; 3,5; 3,3 e 3,0%/h e 42,26; 39,98; 40,31 e 39,13% para os tratamentos 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente. Para cada 1% de OS adicionado houve decréscimo (P=0,07) de 0,212 unidades percentuais na taxa de degradação da MO do capim-elefante picado no rúmen das vacas ($y = -0,212x + 4,53$; $r^2=0,70$). As médias observadas para A e B1 foram 59,21% e 35,06%, respectivamente. Como era de se esperar, todos os parâmetros relacionados à degradabilidade *in situ* da MO do capim-elefante utilizado na presente dissertação foram numericamente superiores aos do observado para a MS.

Tabela 4.3.4.1. Parâmetros de degradabilidade *in situ* da matéria seca do volumoso fornecido para vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dietas baseadas em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumack) suplementado com óleo de soja na MS da dieta, usando a equação $DE(t) = (A - B \cdot e^{-c \cdot t})$ proposta por MEHREZ e ORSKOV (1977) e modificada por SAMPAIO (1988)

Parâmetros ¹	Nível de inclusão de óleo de soja na dieta (% da MS)				CV ² (%)	Efeito ³	
	0%	1,5%	3,0%	4,5%		L	Q
A (%)	54,34	55,02	54,99	56,87	5,69	ns	ns
B1 (%)	38,56	39,24	39,21	41,09	9,66	ns	ns
c (%/h)	4,00	3,32	3,26	2,71	17,15	0,04	ns
DE (%)	35,09	32,64	33,54	31,04	5,92	0,07	ns

¹ Degradabilidade potencial (A); Fração degradável no rúmen (B1, se não houvesse tempo de colonização); Taxa de degradação (c); Degradabilidade efetiva (DE) para as taxas de passagem apresentadas na Tabela 3.3.3.2.1.; ² Coeficiente de variação; ³ ns = não significativo (P>0,07) pelo teste de Tukey; L = Linear, Q = Quadrático.

Tabela 4.3.4.2. Parâmetros de degradabilidade *in situ* da matéria orgânica do volumoso fornecido para vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dietas baseadas em capim-elefante suplementado com óleo de soja na MS da dieta, usando a equação $DE(t) = (A - B \cdot e^{-c \cdot t})$ proposta por MEHREZ e ORSKOV (1977) e modificada por SAMPAIO (1988)

Parâmetros ¹	Nível de inclusão de óleo de soja na dieta (% da MS)				CV ² (%)	Efeito ³	
	0%	1,5%	3,0%	4,5%		L	Q
A (%)	58,86	58,82	59,30	59,86	4,01	ns	ns
B1 (%)	34,61	34,49	34,61	36,52	10,01	ns	ns
c (%/h)	4,1	3,5	3,3	3,0	18,54	0,07	ns
DE (%)	42,26	39,98	40,31	39,13	4,00	0,10	ns

¹ Degradabilidade potencial (A); Fração degradável no rúmen (B1, se não houvesse tempo de colonização); Taxa de degradação (c); Degradabilidade efetiva (DE) para as taxas de passagem

apresentadas na Tabela 3.3.3.2.1.; ² Coeficiente de variação; ³ ns = não significativo (P>0,10) pelo teste de Tukey; L = Linear, Q = Quadrático.

Tabela 4.3.4.3 Parâmetros de degradabilidade *in situ* da fibra em detergente neutro do volumoso fornecido para vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, recebendo dietas baseadas em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumack) suplementado com óleo de soja na MS da dieta, usando a equação DE (t) = (A - B*e^{-c*t}) proposta por MEHREZ e ORSKOV (1977) e modificada por SAMPAIO (1988)

Parâmetros ¹	Nível de inclusão de óleo de soja na dieta (% da MS)				CV ² (%)	Efeito ³	
	0%	1,5%	3,0%	4,5%		L	Q
A (%)	48,62	48,63	47,66	52,08	5,66	ns	ns
B1 (%)	47,35	47,35	46,39	50,81	7,52	ns	ns
c (%/h)	3,4	3,2	3,2	2,6	16,16	ns	ns
DE (%)	23,19	21,04	22,21	19,46	6,08	0,07	ns

¹ Degradabilidade potencial (A); Fração degradável no rúmen (B1, se não houvesse tempo de colonização); Taxa de degradação (c); Degradabilidade efetiva (DE) para as taxas de passagem apresentadas na Tabela 3.3.4.2.1.; ² Coeficiente de variação; ³ ns = não significativo (P>0,07) pelo teste de Tukey; L = Linear, Q = Quadrático.

Dentre os parâmetros de degradabilidade ruminal *in situ* da FDN somente a degradabilidade efetiva (DE) sofreu influência ao nível de significância de 7%. A DE diminuiu à medida que se adicionou OS, sendo os valores iguais a 23,19; 21,04; 22,21 e 19,46% para os tratamentos 0; 1,5; 3,0 e 4,5% de OS, respectivamente. O efeito sobre a DE da FDN pode explicar a redução observada na DE da MS. A cada 1% de OS adicionado à dieta houve um decréscimo (P=0,07) de 0,439 unidades percentuais na DE da FDN do capim-elefante ($y = -0,439x + 22,99$; $r^2=0,87$). As médias observadas para A, B e c foram 49,25%; 47,98% e 3,1%/h, respectivamente.

De acordo com DE VETH *et al.* (2001) citado por EIFERT *et al.* (2005), a degradabilidade da FDN e a síntese microbiana são reduzidas quando o pH ruminal permanece 4 h e 12 h, respectivamente, em valores abaixo de 6,0. Isto indica que não somente a média do pH é importante, mas as flutuações diárias deste influenciam a atividade microbiana e, conseqüentemente, a degradabilidade dos alimentos fibrosos. Nenhum dos parâmetros de degradabilidade da MS, MO ou FDN foi

influenciado pelos baixos valores de pH (próximos a 6,0) observados entre 6 e 8 h pós-prandial para os tratamentos com 3,0 e 4,5% de OS (Tabela 4.3.2.1.1).

A Tabela 4.3.2.2.1 do Item 4.3 deste Capítulo apresenta diminuição no teor e na concentração molar de acetato à medida que se adiciona OS à dieta das vacas. Isto sugere que a degradação da fibra (FDN) está sendo comprometida. Essa afirmação é confirmada pelos achados de degradabilidade da FDN apresentados na Tabela 4.3.4.3, apesar da significância da DE ter sido de 0,07. Os resultados obtidos na presente dissertação estão de acordo com os observados por SHINGFIELD *et al.* (2008) que também observaram tendência (P=0,07) de queda da degradabilidade da FDN.

BATEMAN e JENKINS (1998), EIFERT *et al.* (2005 e 2006) não observaram nenhum tipo de efeito (P>0,05) da adição de diferentes níveis de óleos vegetais sobre a degradabilidade ruminal da MS, MO ou FDN. Essas observações indicam que a população microbiana gram-positiva foi pouco alterada pela presença do óleo vegetal. SOARES *et al.* (2008), num

trabalho que objetivou comparar equações de predição de consumo com valores obtidos por métodos diretos utilizando capim-elefante picado para vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação, relataram que a DE da MS do capim-elefante cortado com 60 dias foi de 48,22%. Este valor foi próximo dos observados na presente dissertação.

BENEDETTI *et al.* (2008) avaliaram a degradabilidade *in situ* da MS e da FDN das gramíneas Colonião (*Panicum maximum*), Braquiariinha (*Brachiaria decumbens*) e Napier (*Pennisetum purpureum*) de amostras colhidas manualmente e por vacas portadoras de cânula no esôfago. A degradabilidade potencial (A), a taxa de degradação (c) e a DE para taxas de passagens (k_1) iguais a 2 e 5%/h do capim Napier foram, respectivamente, de 74,9%; 6,4%/h; 59,9% e 47,3% para a MS e 82,1%; 6,3%/h; 63,5% e 48,0% para a FDN. Esses valores foram todos numericamente superiores aos obtidos no presente experimento. Isto ocorreu, provavelmente, devido ao corte manual dos volumosos e à seleção feita pelos animais durante a alimentação permitindo a ingestão das partes mais

digestíveis das plantas. As DE foram calculadas considerando-se as taxas de passagem do rúmen (k_1), segundo a equação proposta por ØRSKOV e MCDONALD (1979).

4.4. CONCLUSÕES

Os dados apresentados nesse capítulo permitem concluir que dietas baseadas em capim-elefante picado como único volumoso e suplementadas com níveis inferiores a 4,5% de óleo de soja na MS não foram capazes ($P>0,05$) de influenciar de modo persistente o consumo de MS, a maioria dos parâmetros de fermentação ruminal e nem os parâmetros da cinética de fluxo da fase sólida ou líquida da dieta em vacas Holandês x Zebu em lactação. Tais observações fazem supor que a dieta ainda não chegou ao limite de adição de óleo de soja e que pouco influenciou a microbiota ruminal. Esta última suposição confronta com os resultados observados de digestibilidade *in situ*, onde vários parâmetros mostraram redução da degradação ruminal do capim-elefante.

CAPÍTULO V

5.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.R. *Factors affecting the biosynthesis of branchedchain fatty acid in milk fat*. Madison, WI: University of Wisconsin. 163p. Tese (Doctor of Philosophy) - University of Wisconsin, 1993.

ABUGHAZALEH, A. A.; SCHINGOETHE, D. J.; HIPPEN, A. R.; KALSCHUR, K. F. Conjugated Linoleic Acid Increases in Milk When Cows Fed Fish Meal and Extruded Soybeans for an Extended Period of Time. *J. Dairy Sci.* v. 87, p. 1758–1766, 2004.

ABUGHAZALEH, A. A. . Effect of fish oil and sunflower oil supplementation on milk conjugated linoleic acid content for grazing dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. v. 141, p. 220–232, 2008.

ADMIK, K.; SALAZAR, J. *Métodos Modernos de Fabricação de Manteiga*. Universidade Federal de Viçosa, p. 141, 1976.

AFRC – AGRICULTURAL FOOD AND RESEARCH COUNCIL. Technical Committee on Responses to Nutrients. *Energy and protein requirements of ruminants*. Wallingford: CAB International, 159p, 1995.

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 83, n. 7, p. 1598-1624, 2000.

ALLEN, M. S., VOELKER LINTON. J. A. In vivo Methods to Measure Digestibility and digestion Kinetics of Feed Fractions in the rumen. Simpósio Internacional... .p. 72-89, 2007.

ALZAHAL, O.; ODONGO, N. E.; MUTSVANGWA, T.; OR-RASHID, M. M.; DUFFIELD, T. F.; BAGG, R.; DICK, P.; VESSIE, G.; MCBRIDE, B. W. Effects of Monensin and Dietary Soybean Oil on Milk Fat Percentage and Milk Fatty Acid Profile in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*, v. 91, p. 1166–1174, 2008.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of Analysis, 11 ed. Washington D.C.: AOAC, 1990.

ARC - AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL. *The nutrient requirements of ruminant livestock Supplement No. 1*. London: CAB, 45p, 1984.

ASHES, J. R., GULATI, S. K., SCOTT, T. W. Potential to Alter the Content and Composition of Milk Fat Through Nutrition. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 2204–2212, 1997.

BALDWIN, A., POLOUNSKY, K. W. In *Reproduction in Domestic Animals*. 3 ed. H.H. COLE E P.T. CUPPS – Acad. Press. 1977.

BARBI, J.H.T. *Avaliação da degradabilidade ruminal de quatro gramíneas tropicais em diferentes idades de corte pela técnica in situ*. 61p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1991.

BARGO, F., L. D. et al. Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 1777–1792, 2002.

BARGO, F.; DELAHOY, J. E.; SCHROEDER, G. F.; BAUMGARD, L. H.; MULLER, L. D. Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated linoleic acid in milk. *Animal Feed Science and Technology*, v. 131, p.226–240, 2006.

BATAGLIA, O.C.; FURLANI, A.M.C.; TEXERIRA, J.P.F.; FURLANI, P.R.; GALLO, J.R. Método de análise química de plantas, Inst. Agron. Campinas, SP, *Boletim técnico* n. 78, 1983.

BATEMAN, H. G.; JENKINS, T. C. Influence of Soybean Oil in High Fiber Diets Fed to Nonlactating Cows on Ruminant Unsaturated Fatty Acids and Nutrient Digestibility. *J Dairy Sci.* v. 81, p. 2451–2458, 1998.

BAUMAN, D. E., BAUMGARD, L. H., CORL, B. A., GRIINARI, J. M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Science*, 1999.

BAUMAN, D. E.; BARBANO, D. M.; DWYER, D. A.; GRIINARI, J. M. Technical Note: Production of Butter with Enhanced Conjugated Linoleic Acid for Use in Biomedical Studies with Animal Models. *J Dairy Sci.*, v. 83, p. 2422–2425, 2000.

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. e GRIINARI, M. G. Nutritional regulation of milk fat synthesis. Disponível em : <www.annurev.nut.com> . Acessado em : 08/09/2008.

BAUMAN, D. E., PERFIELD II, J. W., DE VETH, M. J., LOCK, A. L. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. *Proc. Cornell Nutr. Conf.* p. 175-189, 2003.

BAUMAN, D. E., PERFIELD, J. W., HARVATINE, K. J., BAUMGARD, L. H. Regulation of Fat Synthesis by Conjugated Linoleic Acid: Lactation and the Ruminant Model. The Journal of Nutrition Symposium: Animal Models in Nutrition Research. *Journal of Nutrition*. v. 138, p. 403–409, 2008.

BAUMGARD, L.H.; SANGSTER, J.K.; BAUMAN, D.E. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J. Nutr.* v. 131, p. 1764-1769, 2001.

BAUMGARD, L. H., MATITASHVILI, E., CORL, B. A., DWYER, D. A., BAUMAN, D. E. *Trans*-10, *cis*-12 Conjugated Linoleic Acid Decreases Lipogenic Rates and Expression of Genes Involved in Milk Lipid Synthesis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* v. 85, p. 2155–2163, 2002.

BEAM, T. M., JENKINS, T. C., MOATE, P. J., KOHN, R. A., PALMQUIST, D.L. 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.

BELURY, M. A., MAHON, A., BANNI, S. The Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomer, t10c12-CLA, Is Inversely Associated with Changes in Body Weight and Serum Leptin in Subjects with Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Nutrition*. v. 133, p. 257–260, 2003.

BENEDETTI, E. *Atributos de três gramíneas tropicais, parâmetros ruminais e produção de leite em vacas mestiças mantidas à pasto*. 173p. Tese (Doutorado)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1994.

BENEDETTI, E.; RODRÍGUEZ, N. M.; CAMPOS, W. E.; GONÇALVES, L. C.; BORGES, I. Digestibilidade in vitro e in situ de três forrageiras tropicais colhidas manualmente e por vacas fistuladas no esôfago. *Acta Sci. Anim. Sci.* Maringá, v. 30, n. 2, p. 203-210, 2008.

BERCHIELLI, T. T., GARCIA, A. V., OLIVEIRA, S. G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição. In: BERCHIELLI, T. T., PIRES, A. V., OLIVEIRA, S. G., (1 Ed) *Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal: Editora Fundep, p. 397-421, 2006.

BERGMAN, E. N. Glucose metabolism in ruminants as related to hypoglycemia and ketosis. *Cornell Vet*, v. 63, p. 341-382, 1973.

BESSA, R. J. B.; SANTOS-SILVA, J.; RIBEIRO, J. M. R. et al. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livestock Production Science*, v. 63, p. 201-211, 2000.

BOCK, B. J., HARMON, D. L., BRANDT, R. T., SCHNEIDER, J.E. Fat source and calcium level effects on finishing steer performance, digestion, and metabolism. *Journal of Animal Science*, v. 69, p. 2211, 1991.

BOGGS, D. L., BERGEN, W. G., HAWKINS, D. R. Effects of tallow supplementation and protein withdrawal on ruminal fermentation, microbial synthesis and site of digestion. *Journal of Animal Science*, v. 64, p. 970, 1987.

BORGES, A. L. C. C. Controle da ingestão de alimentos. *Caderno Técnico Escola de Veterinária – UFMG*, n. 21, v. único, p. 67-69, 1999.

BU, D. P.; WANG, J. Q.; DHIMAN, T. R.; LIU, S. J. Effectiveness of Oils Rich in Linoleic and Linolenic Acids to Enhance Conjugated Linoleic Acid in Milk from Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*, v. 90, p. 998–1007, 2007.

BURNS, J.C.; FISHER, D.S.; MOORE, J.E. et al. Preparation of chromium mordanted fiber. In: *Research techniques and numerical methods in grassland and forage science*, USDA - Agricultural Research Service/North Carolina State University, 2001, disponível em: <<http://www.cropsci.ncsu.edu/dsfisher/index.html>>. Acesso em 3 nov. 2001.

CAMPOS, W.E.; BENEDETTI, E.; RODRÍGUEZ, N. M.; SALIBA, E. S.; BORGES, A. L. C. C.; LOPES, M. L. Cinética Ruminal de Vacas Leiteiras a Pasto Consumindo Diferentes Gramíneas Tropicais. *Arch. Zootec.* v. 56, n. 216, p. 829-837, 2007.

CANT, J. P., DePETERS, E. J., BALDWIN, R. L. Mammary Uptake of Energy Metabolites in Dairy Cows Fed Fat and its Relationship to Milk Protein Depression. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 2254-2265, 1993.

CHALUPA, W., VECCIARELLI, B., ELSER, A.E. et al.. Ruminal fermentation *in vitro* of long chain fatty acids. *J. Dairy Sci.*, v. 69, p. 1293-1303, 1986.

CHALUPA, W., MOATE, P., BOSTON, R. Ruminal Metabolism and Intestinal Digestion of Fatty Acids. 2005. Disponível em: http://animal.cals.arizona.edu/swnmc/papers/2002/Chalupa_Moate_Boston2002.pdf . Acesso em: 20/10/08.

CHAPAVAL, L., MELOTTI, L., ROSSI JÚNIOR, P., OLIVINDO, C. S., REGO, J. P. A. Relação volumoso concentrado sobre as concentrações ruminais de amônia, pH e ácidos graxos voláteis em vacas leiteiras mestiças. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.*, v. 9, n. 1, p. 18-28, jan/mar, 2008.

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.M. et al. 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.; FERLAY, A.; DOREAU, M. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Production Science*, v. 70, p. 31-48, 2001.

CHOI, B. R.; PALMQUIST, D. L.; ALLEN, M. S. Cholecystokinin mediates depression of feed intake in dairy cattle fed high fat diets. *Domest. Anim. Endocrinol*, Stoneham, v. 19, p.159-175, 2000.

CHOUINARD, P.Y.; LÉVESQUE, J.; GIRARD, V.; BRISSON, G.J. Dietary soybeans extruded at different temperatures: milk composition and in situ fatty acid reactions. *J. Dairy Sci.* v. 80, n. 11, p. 2913-2924, 1997.

CHOUINARD, P.Y.; CORNEAU, L.; SAEBO, A. et al. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 2737-2745, 1999.

CHRISTIE, W.W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. *J. Lipid Res.* v. 23, p. 1072, 1982.

- CHRISTIE, W. W., DOBSON, G., ADLOF, R. O. A Practical Guide to the Isolation, Analysis and Identification of Conjugated Linoleic Acid. *Lipids*. v. 42, p. 1073–1084, 2007
- CLARY, E. M.; BRANDT JR, R. T.; HARMON, D. L.; NAGARAJA, T. G. Supplemental Fat and Ionophores in Finishing Diets: Feedlot Performance and Ruminal Digesta Kinetics in Steers!. *J Anim Sci* . v. 71, p. 3115-3123, 1993.
- COLUCCI, P.; CHASE, L.E.; VAN SOEST, P.J. Feed intake, apparent diet digestibility, and rate of particulate passage in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 65, p. 1445-1456, 1982.
- COLUCCI, P.E. *Comparative digestion and digesta kinetics in sheep and cattle*. 1984. 230 f. Tese (Doctor of Philosophy) - University of Guelph, Ontario, 1984.
- COPPOCK, C. E.; WILKS, D. L. Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: effects on intake, digestion, milk yield, and milk composition. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 69, n. 9, p. 3826-3837, 1991.
- CORL, B. A., CHOUINARD, P. Y., BAUMAN, D. E., DWYER, D. A., GRIINARI, J. M., NURMELA, D. K. V. Conjugated linoleic acid in milk fat of dairy cows originates in part by endogenous synthesis from trans-11 octadecenoic acid. *J. Dairy. Sci.* v. 81(Suppl. 1), p. 233 (Abstr.), 1998.
- CORL, B. A., LACY, S. H., BAUMGARD, L. H., DWYER, D. A., GRIINARI, J. M., PHILLIPS, B. S., BAUMAN, B. S. Examination of the importance of $\Delta 9$ -desaturase and endogenous synthesis of CLA in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* v. 77(Suppl. 1), p. 118 (Abstr.), 1999.
- CÓSER, A. C., MARTINS, C. E., CARDOSO, F. P. N. Produção de Leite em Pastagem de Capim-Elefante Submetida a Duas Alturas de Resíduo Pós-pastejo. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 25, n. 2, p. 417-423, mar./abr., 2001.
- DEMEYER, D., DOREAU, M.. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Procedures of Nutrition Society*, v. 58, p. 593-607, 1999.
- DERESZ, F. et al. Produção de leite e consumo de vacas mestiças Holandês x Zebu recebendo capim-elefante picado, com ou sem concentrado. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 34., 1997, Juiz de Fora, MG. Anais... Juiz de Fora; SBZ, p. 246-248, 1997.
- DESTAILLATS, F.; GOLAY, P.A.; JOFFRE, F.; WISPELAERE, M.; HUG, B.; GIUFFRIDA, F.; FAUCONNOT, L.; DIONISI, F. Comparison of available analytical methods to measure trans-octadecenoic acid isomeric profile and content by gas-liquid chromatography in milk fat. *Journal of Chromatography A*, v. 1145, p. 222-228, 2007.
- DEWHURST, R. J., SHINGFIELD, K. J., LEE, M. R. F., Scollan, N. D. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*. v. 131, p. 168–206, 2006.

- DHIMAN, T. R.; SATTER, L. D.; PARIZA, M. W.; GALLI, M. P.; ALBRIGHT, K.; TOLOSA, M. X. Conjugated Linoleic Acid (CLA) Content of Milk from Cows Offered Diets Rich in Linoleic and Linolenic Acid. *J Dairy Sci.*, v. 83, p.1016–1027, 2000.
- DHIMAN, T. R.; NAM, S. H.; URE, A. L. Factors Affecting Conjugated Linoleic Acid Content in Milk and Meat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 45, p. 463–482, 2005.
- DOEPEL, L.; PACHECO, D.; KENNELLY, J. J.; HANIGAN, M. D. Milk Protein Synthesis as a Function of Amino Acid Supply. *J. Dairy Sci.*, v. 87, p.1279–1297, 2004.
- DOREAU, M., FERLAY, A. Digestion and utilization of fatty-acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. v. 45, p. 379-396, 1994.
- DRACKLEY, J.K., ELLIOTT, J.P. Milk composition, ruminal characteristics, and nutrient utilization in dairy cows fed partially hydrogenated tallow. *J. Dairy Sci.*, v. 76, p. 183-196, 1992.
- DRACKLEY, J.K. Lipid Metabolism. In: D’MELLO, J. P. F. (Ed.) *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. 1. Ed. CABI. p. 97-119, 2000.
- EHLE, F.R. Influence of feed particle density on particulate passage from rumen of holstein cow. *J. Dairy Sci.*, v. 67, p. 693-697, 1984.
- EIFERT, E. C. *Fontes de Carboidratos, Óleo de Soja e Monensina para Vacas Lactantes: Desempenho, Digestibilidade, Parâmetros Ruminais e Perfil de Ácidos Graxos do Leite*. 2004. 135f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- EIFERT, E. C.; LANA, 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 em Vacas Lactantes. *R. Bras. Zootec.*, v. 34, n. 1, p. 297-308, 2005.
- EIFERT, E. C.; LANA, R. P.; DUARTE, D. P.; et al. Consumo, produção e composição do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e diferentes fontes de carboidratos na dieta. *R. Bras. Zootec.*, v. 35, n. 1, p. 211-218, 2006.
- ELGERSMA, A. et al. Comparison of the fatty acid composition of fresh and ensiled ryegrass (*Lolium perenne* L.), affected of cultivar and regrowth interval. *Animal Feed Science and Technology*, v. 108, n. 1-4, p. 191-205, 2003.
- ELGERSMA, A.; TAMMINGA, S.; ELLEN, G. Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*, v. 131, p. 207–225, 2006.
- ELYAS, A. C. W. *Consumo de Matéria Seca e Produção de Leite de Vacas “Holandês” Manejadas sob Pastejo e Utilização do Modelo Cornell Net Carbohydrate and Protein System*. 2007. 161f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- FELLNER, V., SAUER, F. D., KRAMER, K. J. K. G. Steady-state rates of linoleic acid biohydrogenation by ruminal bacteria in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, v. 78, p. 1815-1823, 1995.

FERNANDES, S. A. A., MATTOS, W. R. S., MATARAZZO, S. V., GAMA, M. A. S., LANNA, D. P. D., ROSSETO, C. V. Perfil de Ácidos Graxos em Alimentos de Clima Tropical Utilizados nas Dietas para Ruminantes. *B. Industr.anim., N. Odessa*, v. 64, n. 1, p. 19-27, 2007.

FIGUEIRA, D. G. *Efeito do nível de ureia sobre as digestibilidades aparente e "in situ" e a dinâmica da fase sólida em bovinos alimentados com cana-de-açúcar e farelo de algodão*. 123 f. Tese (Mestrado) - Escola de Veterinária, UFMG, Belo Horizonte, 1991.

FLOWERS, G.; IBRAHIM, S. A.; ABUGHAZALEH, A. A. Milk Fatty Acid Composition of Grazing Dairy Cows When Supplemented with Linseed Oil. *J. Dairy Sci.*, v. 91, p. 722-730, 2008.

FORBES, J. M. *Voluntary food intake and diet selection in farms animals*. Walingford: Cab International. p. 532, 1995.

FULCO, A. J. Fatty acid metabolism in bacteria. *Prog. Lipid Res*, v. 22, p. 133, 1983.

GAGLIOSTRO, G., CHILLIARD, Y. Duodenal Rapeseed Oil Infusion in Early and Midlactation Cows. 2. Voluntary Intake, Milk Production, and Composition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 2, p. 499-509, 1991.

GAMA, M. A. S.; GARNSWORTHY, P. C.; GRIINARI, J. M.; LEME, P. R.; RODRIGUES, P. H. M.; SOUZA, L. W. O.; LANNA, D. P. D. Diet-induced milk fat depression: Association with changes in milk fatty acid composition and fluidity of milk fat. *Livestock Science*, 2007.

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.

GONZALEZ, S.; DUNCAN, S. E.; O'KEEFE, S. F.; SUMNER, S. S.; HERBEIN, J. H. Oxidation and Textural Characteristics of Butter and Ice Cream with Modified Fatty Acid Profiles. *J. Dairy Sci.* v. 86, p. 70-77, 2003.

GRIINARI, J.M., BAUMAN, D.E., JONES, L.R. Low Milk Fat in New York holstein herds. *Pro. Nutr. Conf.*, p. 96-105, 1995.

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.

GROVUM, W. L., WILLIAMS, V. J. Rate of passage of digesta in sheep. *British Journal of Nutrition*, v. 30, p. 313-329, 1973.

GRUMMER, R. R., Effect of Feed on the Composition of Milk Fat. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 3244-3257, 1991.

GRUMMER, R. R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, v. 73, n. 9, p. 2820-2833, 1995.

HALL, M.B. Recentes avanços em carboidratos não fibrosos na alimentação de vacas leiteiras. In: Simpósio Internacional em Bovinocultura de Leite: Novos Conceitos em Nutrição, 2, 2001, Lavras. *Anais...* Lavras: Universidade Federal de Lavras, p.149-159, 2001.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*. v. 90, p. 420-426, 1978.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, London, v. 22, n. 8, p. 175-176, 1973.

HARVATINE, K. J., BOISCLAIR, Y. R., BAUMAN, D. E. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal*. p. 1-15, 2009.

HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: HOBSON, P.N., (Ed.) *The rumen microbiol ecosystem*. London: Elsevier Applied Science, p.285-322, 1988.

HE, M.; XIN, H. S.; ARMENTANO, L. E. Effect of dietary vegetable oil and antioxidant supplementation on dairy cattle performance and milk fat depression. *J. Anim. Sci.*, v. 86, E-Suppl. 2/ *J. Dairy Sci.* v. 91, E-Suppl. 1, 2008.

JENKINS, T. C. Lipid Metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 3851-3863, 1993.

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, 2008.

JENSEN, R. G. Invited Review: The Composition of Bovine Milk Lipids. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 295-350, 2002.

KATZ, I., M. KEENEY. The lipids of some rumen holotrich protozoa. *Biochim. Biophys. Acta* v. 144, p. 102-112, 1967.

KEMP, P., LANDER, D. J. Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *Journal of Gen. Microbiol.* v. 130, p. 527-533, 1984.

KENNELLY, J. J., GLIMM, D. R., OZIMEK, L. 20p. *Milk Composition in the Cow*. Edmonton, Alberta: Faculty of Extension, University of Alberta, 2000.

KHANAL, R. C., DHIMAN, T. R. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid (CLA): A Review *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 3 (2), p. 72-81, 2004.

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.

KIMURA, F. T.; MILLER, V. L. Chromic Oxide Measurement, Improved Determination of Chromic Oxide in Cow Feed and Feces. *J. Agric. Food Chem.*, v. 5 (3), p. 216, 1957.

KLUSMEYER, T. H.; LYNCH, G. L.; CLARK, J. H.; NELSON, D. R. Effects of calcium salts of fatty acids and protein source on ruminal fermentation and nutrient flow to duodenum of cows. *J. Dairy Sci.* v. 74, p. 2206–2219, 1991.

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

LACOUNT, D.W., DRACKLEY, J.K., CICELA, T.M. et al. High oil corn as silage or grain for dairy cows during an entire lactation. *J. Dairy Sci.*, v. 78, p. 1745-1754, 1995.

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentation of fistulated cows fed continuously at a constant intake. *Journal of Animal Science*, v. 75, p. 224-229, 1997.

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B.; Van AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating ruminal methane e ammonia production. *Journal of Animal Science*, v. 76, p. 2190-2196, 1998.

LEIVA, E., HALL, M. B., VAN HORN, H. H. Performance of Dairy Cattle Fed Citrus Pulp or Corn Products as Sources of Neutral Detergent-Soluble Carbohydrates. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 2866–2875, 2000.

LENG, R. A. Factors affecting the utilization of “poor quality” forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutrition Research Veterinary*, v. 3, n. 2, p. 277-303. 1990.

LEOPOLDINO, W. M. *Avaliação Nutricional de Pastagens Consorciadas com Leguminosas Tropicais, Dinâmica Ruminal e Produção de leite em Vacas Mestiças*. Tese (Mestrado). Departamento de Zootecnia, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LIN, C.Y., KUMAR, S. Primer specificity of mammary fatty acid synthetase and the role of the soluble b-oxidative enzims. *J. Biological Chemistry*, v. 246, p. 3284-3287, 1971.

LIRA, V. M. C.; PEREIRA, J. C.; VIEIRA, R. A. M. et al. Avaliação de indicadores e modelos matemáticos para o estudo das cinéticas de trânsito e degradação ruminal em novilhos mantidos em pastagem de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf.). *Rev. Bras. Zootec.*, v. 35, p. 902-913, 2006.

LOCK, A. L.; BAUMAN, D. E.; GARNSWORTHY, P.C. Short Communication: Effect of Production Variables on the *Cis-9, Trans-11* Conjugated Linoleic Acid Content of Cows' Milk. *J. Dairy Sci.*, v. 88, p. 2714–2717, 2005.

LOPES, F. C. F., AROEIRA, L. J. M. Consumo, digestibilidade e degradabilidade do capim elefante (*Penisetum purpureum* Schum.) picado e seu efeito sobre características do rúmen de vacas mestiças Holandez-Zebu em lactação. *Arquivo Brasileiro de medicina veterinária e Zootecnia*, v. 50, n. 5, p. 593-599, 1998.

LOPES, F. C. F. *Taxa de Passagem, Digestibilidade in situ, Consumo, Composição Química e Disponibilidade de Capim-Elefante (Pennisetum purpureum, Schumack) Pastejado por Vacas Mestiças Holandês x Zebu em lactação*. 2002. 222f. Tese (Doutorado). Departamento de Zootecnia, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LOPES, F.C.F.; RODRIGUEZ, N. M.; AROEIRA, L. J. M.; DERESZ, F.; SAMPAIO, I. B. M.; MALDONADO-VASQUEZ, H.; VITTORI, A. Modelagem comparativa da cinética de fluxo da fase sólida do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schumack) consumido sob pastejo por vacas mestiças Holandês × Zebu em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 55, n. 6, p. 702-709, 2003.

LOPES, F. C. F.; OLIVEIRA, J. S.; PACIULLO, D. S. C.; AROEIRA, L. J. M.; DERESZ, F.; MORENZ, M. J. F.; DUQUE, A. C. A.; ELYAS, A. C. W. Modelagem comparativa da cinética da fase sólida do capim-elefante picado, suplementado ou não com concentrados, e fornecido a vacas Holandês x Zebu em lactação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 60, n. 3, p. 675-681, 2008.

LÓPEZ, S., FRANCE, J., DHANOA, M. S. et. al. Comparison of mathematical models to describe disappearance curves obtained using the polyester bag technique for incubating feeds in the rumen. *J. Anim. Sci.*, v. 77, n. 7, p. 1875-1888, 1999.

MACRAE, J. C., LOBLEY, G. E. Some factors which influence thermal energy losses during the metabolism of ruminants. *Livestock Production Science*, v. 9, Issue 4, p. 447 – 456, 1982.

MACZULAK, A. E., DEHORITY, B. A., PALMQUIST, D. L. Effects of Long-Chain Fatty Acids on Growth of Rumen Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 856-862 Vol. 42, No. 5, Nov. 1981.

MAIGA, H. A.; SCHINGOETHE, D. J. Optimizing the Utilization of Animal Fat and Ruminant Bypass Proteins in the Diets of Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci.*, v. 80, p. 343–352, 1997.

MANSBRIDGE, R.J.; BLAKE, J.S. Nutritional factors affecting the fatty acid composition of bovine milk. *British Journal of Nutrition*, v. 78, Suppl. 1, p. S37-S47, 1997.

MARKANTONATOS, X., GREEN, M. H., VARGA, G. A. Use of compartmental analysis to study ruminal volatile fatty acid metabolism under steady state conditions in Holstein heifers. *Animal Feed Science and Technology*, v. 143, p. 70–88, 2008.

MCDONALD, I.W., SCOTT, T.W. *World Rev. Nutr. Dietetics*, v. 26, p. 144-150, 1977.

MCGUIRE, M.A., MCGUIRE, M.K., GUY, M.A. et al. Effect of dietary lipid concentration on content of conjugated linoleic acid (CLA) in milk from dairy cattle. *J. Anim. Sci.*, v. 74 (Suppl. 1), p. 266, 1996.

MEHREZ, A. Z., ØRSKOV, E. R. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *Journal Agric. Sci.*, v. 88, n. 3, p. 437-443, 1977.

MERTENS, D. R. Dietary fiber components: relationship to the rate and extent of ruminal digestion. *Fed. Proc.* v. 36, p. 187–192, 1977.

MERTENS, D.R. Análise da fibra e sua utilização na avaliação de alimentos e formulação de rações. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 29., SIMPOSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, 1992, Lavras. *Anais...* Lavras: FAEPE, p.188-217, 1992.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA. Portaria Nº 795, de 15 de dezembro de 1993.

MINSON, D. J. *Forage in ruminant nutrition*. San Diego: Academic Press, p. 483, 1990.

MOORE, J.A.; POND, K.R.; POORE, M.H. et al. Influence of model and marker on digesta kinetic estimates for sheep. *J. Anim. Sci.*, v. 70, p. 3528-3540, 1992.

MOTA, M. F. *Desempenho, Parâmetros Ruminais e Taxa de Passagem em Vacas da Raça Holandesa em Pastagem de Coast-Cross*. 148f. Dissertação (Doutorado). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, 2006.

MÜHLBACH, P. R. F. et al. *Aspectos nutricionais que interferem na qualidade do leite*. In: Encontro Anual da UFRGS Sobre Nutrição de Ruminantes, 2000, Porto Alegre. [**Anais...**] Porto Alegre: Departamento de Zootecnia da UFRGS, p. 73-102, 2000.

NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; Van NEVEL, C.J. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.) *The rumen microbial ecosystem* 2.ed. London: Blackie Academic & Professional, p. 523-632, 1997.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy, 2001.

NELSON, D. L., COX, M. M. Lipídios. In: LEHNINGER, A. L., (4ª Ed.) *Princípios de Bioquímica*. Editora Sarvier, p. 343-368, 2006.

NOCEK, J. E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. *Journal of Dairy Science*, v. 71, n. 8, p. 2051-2069, 1988.

NTAMBI, J. M. The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). *Prog. Lipid Res.* v. 34, p. 139-150, 1995.

OFFER, N. W., DIXON, J. Factors affecting outflow rate from the reticulo-rumen. *Nut. Abs. & Ver.* (B series), v. 70, n. 11, p. 833-844, 2000.

OLIVEIRA, M. A. *Proporção de Forragem e Teor de Lipídeos na Dieta de Vacas Leiteiras, Sobre o Consumo, Produção e a Composição do Leite*. 54f. Dissertação (Mestrado). Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

ONETTI, S. G.; GRUMMER, R. R. Response of lactating cows to three supplemental fat sources as affected by forage in the diet and stage of lactation: a meta-analysis of literature. *Anim. Feed Sci. Technol.*, Amsterdam, v. 115, 2004.

- OR-RASHID, M. M., ODONGO, N. E., MCBRIDE, B. W. Fatty acid composition of ruminal bacteria and protozoa, with emphasis on conjugated linoleic acid, vaccenic acid, and odd-chain and branched-chain fatty acids. *Journal of Animal Science*. v. 85, p. 1228-1234, 2007.
- ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.*, v. 92, p. 499-503, 1979.
- ØRSKOV, E. R., DeB HOVELL, F. D., MOULD, F. Uso de La tetechnica de La bolsa de nylon para La valuación de los alimentos. *Prod. Anim. Trop.*, v. 5, n. 3, p. 213-233, 1980.
- ØRSKOV, E. R., REID, G. W., KAY, M. Prediction of intake by cattle from degradation characteristics of roughages. *Anim. Prod.*, v. 46, n. 1, p. 29-34, 1988.
- OUTEN, G. E., BEEVER, D. E.; FENLON, J. S. Direct methylation of long-chain fatty acids in feeds, digesta and faeces without prior extraction. *J. Sci. Food Agric.* v. 27, p. 419-425, 1976.
- OVERTON, T. R.; BERNAL-SANTOS, G.; PERFIELD, J. W.; BAUMAN, D. E. Effects of feeding conjugated linoleic (CLA) on metabolism and performance of transition dairy cows. *Cornell Nutrition Proceedings*. October 16-18, Rochester, N. Y., p. 179-187. 2001.
- OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D.C. (Ed.). *The ruminant animal digestive physiology and metabolism*. New Jersey: Prentice Hall, p.145-171, 1988.
- PALMQUIST, D. L., JENKINS, T. C. Fat in Lactation Rations: Review. *J. Dairy Sci.* v. 63, p. 1-14, 1980.
- PALMQUIST, D. L. Influence of Source and Amount of Dietary Fat on Digestibility in Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 1354-1360, 1991.
- PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, A.D.; BARBANO, D.M. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 1753-1771, 1993.
- PALMQUIST, D. L. The Role of Dietary Fats in Efficiency of Ruminants. *Journal of Nutrition* v. 22, p. 1377-1382, 1994.
- PANTOJA, J.; FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L. Fatty acids digestibility and lactation performance by dairy cows fed fats varying in degree of saturation. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 79, n. 3, p. 429-437, 1996.
- PARIZA, M. W., YEUNHWA, P., COOK, M. E. Mechanisms of Action of Conjugated Linoleic Acid: Evidence and Speculation. *P. S. E. B. M.*, v. 223, p. 8-13, 2000.
- PARODI, W. P. Conjugated Linoleic Acid and Other Anticarcinogenic Agents of Bovine Milk Fat. *Journal of Dairy Science*, v. 82, p. 1339-1349, 1999.
- PEREIRA, J. C.; CUNHA, D. N. F. V.; CECON, P. R.; FARIA, E. S. Comportamento ingestivo e taxa de passagem de partículas em novilhas leiteiras de diferentes grupos genéticos

submetidas a dietas com diferentes níveis de fibra. *R. Bras. Zootec.*, v. 36, n. 6, p. 2134-2142, 2007 (supl.).

PERFIELD, J. W.; BERNAL-SANTOS, G.; OVERTON, T. R.; BAUMAN, D. E. Effects of dietary supplement of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. *J. Dairy Sci.* v. 85, p. 2609-2617, 2002.

PERFIELD, J. W., DELMONTE, P., LOCK, A. L. YURAWECZ, M. P., BAUMAN, D. E. *Trans*-10, *Trans*-12 Conjugated Linoleic Acid Does Not Affect Milk Fat Yield but Reduces $\Delta 9$ -Desaturase Index in Dairy Cow. *J. Dairy Sci.* v. 89, p.2559–2566, 2006.

PERFIELD, J. W., LOCK, A. L., GRIINARI, J. M., SÆBØ, A., DELMONTE, P., DWYER, D. A., BAUMAN, D. E. *Trans*-9, *Cis*-11 Conjugated Linoleic Acid Reduces Milk Fat Synthesis in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science.* v. 90, p. 2211–2218, 2007.

PETERSON, D. G.; MATITASHVILI, E. A. A.; BAUMAN, D. E. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J. Nut.* , n. 133, p. 3098-3102, 2003.

PIPEROVA, L. S.; TETER, B. B.; BRUCKENTAL, I.; SAMPUGNA, J.; MILLS, S. E.; YURAWECZ, M. P.; FRITSCH, J.; KU, K.; ERDMAN, R. A. Mammary Lipogenic Enzyme Activity, *trans* Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acids Are Altered in Lactating Dairy Cows Fed a Milk Fat–Depressing Diet. *J. Nutr.*, v. 130, p. 2568–2574, 2000.

RABELO, T. G. *Grão de soja moído na alimentação de vacas lactantes*. 1996. Dissertação (Mestrado). Escola de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

REIS, R. B.; COMBS, D. K. Effects of increasing levels of grain supplementation on rumen environment and lactation performance of dairy cows grazing grass-legume pasture. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 2888-2898, 2002.

R.I.I.S.P.O.A - Ministério da Agricultura. BRASIL. 1980. *Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal* (Aprovado pelo decreto nº 30690, de 20.03.52, alterado pelo decreto no 1255, de 25.06.52). Brasília. 66p.

ROACH, J.A.G. MOSSOBA, M.M.; YURAWECZ, M.P.; KRAMER, J.K.G. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Analytica Chimica Acta*, v. 465, p. 207-226, 2002.

RODRIGUEZ, N. M. Importância da degradabilidade da proteína no rúmen para a formulação de rações para ruminantes. *Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG*, v. 1, p. 27-45, 1986.

ROY, A.; FERLAY, A.; SHINGFIELD, K. J.; CHILLIARD, Y. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particular emphasis on *trans*-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. *Animal Science*, v. 82, p. 479–492, 2006.

RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J.; CHEN, G. The enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, p. 872-877, 1988.

SALINAS, J.G., GARCIA, R. Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras. *Centro Internacional de Agricultura Tropical*, Programa de Pastos Tropicales. Cali, Colombia, 83p, 1985.

SAMPAIO, I. B. M. *Experimental designs and modelling techniques in the study of roughage degradation in rumen and growth of ruminant*. 1988. 228 f. Tese (Phylosophy Doctor) - University of Reading, Reading, 1988.

SAMPAIO, I. B. M. Métodos Estatísticos Aplicados à determinação de Digestibilidade in situ. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE DIGESTIBILIDADE EM RUMINANTES, 1997, Lavras. *Anais...* Lavras: UFLA-FAEPE, p. 165-178, 1997.

SANTOS, F. L.; LANA, R. P.; SILVA, M. T. C.; BRANDÃO, F. C. C.; VARGAS, L. H. Produção e Composição do Leite de Vacas Submetidas a Dietas Contendo Diferentes Níveis e Formas de Suplementação de Lipídios. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 30, n. 4, p. 1376-1380, 2001a.

SANTOS, F. L.; SILVA, M. T. C.; LANA, R. P.; BRANDÃO, S. C. C.; VARGAS, L. H.; ABREU, L. R. Efeito da Suplementação de Lipídios na Ração sobre a Produção de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) e a Composição da Gordura do Leite de Vaca. *Rev. bras. zootec.*, v. 30, n. 6, p. 1931-1938, 2001b.

SAS Institute Inc. *SAS® User's Guide: Statistics, Version 8.0 Edition*. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2001.

SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition*, v.32, n.2, p. 199-208, 1974.

SATTER, L. D.; ROFFLER, R. E. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 58, n. 8, p. 1219-1237, 1975.

SAYERS, H. J. *The effect of sward characteristics and level and type of supplement on grazing behaviour, herbage intake and performance of lactating dairy cows*. Tese (Ph.D.). Queen's University of Belfast. The Agricultural Research Institute of Northern Ireland. Hillsborough. 1999.

SCHAFHÄUSER JR., J. *Níveis Crescentes de Gordura de Arroz para Vacas Leiteiras de Alta Produção no Início da lactação*. 152f. Tese (Doutorado). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

SEYMOUR, W. M., CAMPBELL, D. R., JOHNSON, Z. B. Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study. *Animal Feed Science and Technology*, v. 119, p. 155-169, 2005.

SHINGFIELD, K. J., AHVENJARVI, S., TOIVONEN, V., AROLA, A., NURMELA, K. V. V., HUHTANEN, V., GRIINARI, J. M. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Animal Science*, v. 77, p. 165-179, 2003.

SHINGFIELD, K. J., SALO-VÄÄNÄNEN, P., PAHKALA, E., TOIVONEN, V., JAAKKOLA, S., PIIRONEN, V., HUHTANEN, P. Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on the fatty acid composition and vitamin content of cows' Milk. *Journal of Dairy Research*, v. 72, p. 349–361, 2005a.

SHINGFIELD, K. J., REYNOLDS, C. K.; LUPOLI, B.; TOIVONEN, V.; YURAWECZ, M. P.; DELMONTE, P.; GRIINARI, J. M.; GRANDISON, A. S.; BEEVER, D. E. Effect of forage type and proportion of concentrate in the diet on milk fatty acid composition in cows given sunflower oil and fish oil. *Animal Science*, v. 80, p. 225-238, 2005b.

SHINGFIELD, K. J.; REYNOLDS, C. K.; HERVA'S, G.; GRIINARI, J. M.; GRANDISON, A. S.; BEEVER, D. E. Examination of the Persistency of Milk Fatty Acid Composition Responses to Fish Oil and Sunflower Oil in the Diet of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* v. 89, p. 714–732, 2006a.
SHINGFIELD, K. J.; TOIVONEN, V.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P.; GRIINARI, J. M. *Short Communication: Indigestible Markers Reduce the Mammary Δ 9-Desaturase Index and Alter the Milk Fatty Acid Composition in Cows.* *J. Dairy Sci.*, v. 89, p. 3006–3010, 2006b.

SHINGFIELD, K. J.; AHVENJÄRVI, 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. *The Journal of Nutrition*, 2007.

SHINGFIELD, K. J.; AHVENJÄRVI, S.; TOIVONEN, V.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P.; GRIINARI, J. M. Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows. *British Journal of Nutrition*, v. 99, p. 971-983, 2008.

SILVA, D.J, QUEIROZ, A.C. *Análise de Alimentos (Métodos químicos e biológicos)*. Viçosa: UFV, Impr. Univ., 2002.

SOARES, J. P. G.; AROEIRA, L. J. M.; VERNEQUE, R. S.; PEREIRA, O. G.; MARTINS, C. E.; VALADARES FILHO, S. C.; FERREIRA, W. J. Estimativas do Consumo e da Taxa de Passagem do Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) sob Pastejo de Vacas em Lactação. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 30, n. 6S, p. 2183-2191, 2001.

SOARES, J. P. G. *Fatores Limitantes do Consumo de Capim-elefante cv Napier Utilizando vacas Leiteiras Confinadas*. 123f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Campus Jaboticabal – UNESP, Jaboticabal, 2002.

SOARES, J.P.G.; BERCHIELLI, T. T.; SALMAN, A. K. D.; DERESZ, F.; OLIVEIRA, A. D.; VERNEQUE, R. S. Comparações entre equações de predição de consumo de capim-elefante cortado para vacas lactantes. *Arch. Zootec.* v. 57, n. 218, p. 235-246, 2008.

SOLOMON, R.; CHASE, L.E.; BEN-GHEDALIA D. et al. The effect of nonstructural carbohydrate and addition of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 1322–1329, 2000.

- STAPLES, C. R. Milk Fat Depression in Dairy Cows – Influence of Supplemental Fats. *Florida Ruminant Nutrition Symposium*, Best Western Gateway Grand, Gainesville FL, February 1-2, 2006.
- SUKHIJA, P. S., PALMQUIST, D. L. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* v. 36, p. 1202–1206, 1988.
- SUTTON, J. D. Altering Milk Composition by Feeding. *J Dairy Sci.*, v. 72, p.2801-2814, 1989.
- TILLEY, J. M. A., TERRY, R. A. A two stages technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society*, v. 18, p. 104, 1963.
- TURPEINEN, A.M., MUTANEN, M., ARO, A., SALMINEN, I., BASU, S., PALMQUIST, D.L., GRIINARI, J.M. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 76, p. 504–510, 2002.
- UDÉN, P., COLUCCI, P. E., VAN SOEST, P. J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *J. Sci. Food Agric.*, v. 31, n. 7, p. 625-632, 1980.
- VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. New York: O & B Books, 476 p, 1994.
- VARGAS, L. H.; LANA, R. P.; JHAM, G. N.; SANTOS, F. L.; QUEIROZ, A. C.; MANCIO, A. B. Adição de Lipídios na Ração de Vacas Leiteiras: Parâmetros Fermentativos Ruminais, Produção e Composição do Leite. *R. Bras. Zootec.*, v. 31, n. 1, p. 522-529, 2002 (suplemento).
- VAREL, H. V.; KREIKEMEIER, K. K. Technical Note: Comparison of *in vitro* and *in situ* digestibility methods. *J. Anim. Sci.* v. 73, p. 578–582, 1995.
- VLAEMINCK, B.; FIEVEZ, V.; VAN LAAR, H.; DEMEYER, D. Rumen odd and branched chain fatty acids in relation to *in vitro* rumen volatile fatty acid productions and dietary characteristics of incubated substrates. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* v. 88, p. 401–411, 2004.
- VLAEMINCK, B., FIEVEZ, V., DEMEYER, D., DEWHURST, R. J. Effect of Forage:Concentrate Ratio on Fatty Acid Composition of Rumen Bacteria Isolated From Ruminal and Duodenal Digesta. *Journal of Dairy Science.* v. 89, p. 2668–2678, 2006a.
- VLAEMINCK, B.; FIEVEZ, V.; CABRITA, A. R. J.; FONSECA, A. J. M.; DEWHURST, R. J. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 131, p. 389–417, 2006b.
- WEIMER, P. J., WAGHORN, G. C., ODT, C. L., MERTENS, D. R. Effect of diet on population of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* v. 82, p. 122–134, 1999.
- WEISBJERG, M. R., WIKING, L., KRISTENSEN, N. B., LUND, P. Effects of supplemental dietary fatty acids on milk yield and fatty acid composition in high and medium yielding cows *Journal of Dairy Research*, v. 75, p. 142–152, 2008.

WILSON, D. J.; GONZALEZ, R. N.; HERTL, J.; SCHULTE, H. F.; BENNETT, G. J.; SCHUKKEN, Y. H.; GROHN, Y. T. Effect of Clinical Mastitis on the Lactation Curve: A Mixed Model Estimation Using Daily Milk Weights. *J. Dairy Sci.*, v. 87, p. 2073–2084, 2004.

WU, Z., HUBER, J. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. *Livestock Production Science* , v. 39 , Issue 2, p. 141 – 155, 1994.