

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA

Programa de Pós-Graduação

**PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS  
ALIMENTADAS COM CAPIM-ELEFANTE  
SUPLEMENTADO COM ÓLEO DE GIRASSOL**

Carlos Gustavo Santos Ribeiro

MINAS GERAIS

Belo Horizonte

2013



Carlos Gustavo Santos Ribeiro

**PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE DE VACAS ALIMENTADAS COM  
CAPIM-ELEFANTE SUPLEMENTADO COM ÓLEO DE GIRASSOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Nutrição Animal

Orientador: Dr. Fernando César Ferraz Lopes

Co-orientadores: Dr. Marco Antônio Sundfeld da Gama

Prof. Dr. Norberto Mario Rodriguez







*À Deus dedico esta Tese e a minha vida.*



## AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Winston e Darci, principais responsáveis pela realização deste trabalho.

À Ana, meu grande amor. Supliquei uma companheira ao Senhor, Ele me cedeu um de seus anjos.

À Ata, minha grande incentivadora, e a Tomé pelos conselhos e correções do texto.

Ao meu irmão Júnior.

Agradeço à Tia Dida e Tio Manoel por me cederem um pouso em BH.

Ao Fernando César, orientador e amigo, que será para mim um modelo de profissional. Agradeço imensamente sua total disponibilidade em todas as etapas desta Tese.

Ao Marco Antônio e ao Prof. Norberto pela co-orientação.

Aos professores e pesquisadores componentes da banca examinadora: Profa. Dra. Cláudia Freire de Andrade Morais Penna, Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, Prof. Dr. Ricardo Reis e Silva e, em especial, ao Dr. Mirton José Frota Morenz pelo auxílio com as análises estatísticas.

À EMBRAPA Gado de Leite por ceder as instalações, laboratórios, animais e ao apoio financeiro.

Aos funcionários e estagiárias do Laboratório de Cromatografia - Embrapa: Hernani, Ernando, Carol, Mariana e Ellen pela ajuda com as coletas e com as intermináveis análises.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos - Embrapa: Nilva, Michele, Mário e Luís pelo auxílio nas análises bromatológicas.

Aos funcionários do Campo Experimental José Henrique Bruschi - Embrapa: Coutinho, Geraldo Moreira, José Moreira, Meirinha, Mengo, Miguel, Sebastião.

Aos estagiários Davi, Plínio, Hugo e Marcelo que foram fundamentais no fornecimento do trato dos animais e na coleta das amostras.

Às funcionárias do Colegiado de Pós-graduação da EV-UFGM: Eloísa e Paula.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro aos Projetos , e à CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

Peço perdão àqueles que, de alguma forma também me auxiliaram na confecção desta Tese, mas cujos nomes não constam acima. À eles, meu muito obrigado.



---

## SUMÁRIO

---

LISTA DE FIGURAS .....	14
LISTA DE TABELAS .....	18
ABREVIACÕES .....	23
<hr/>	
INTRODUÇÃO GERAL .....	25
<hr/>	
REVISÃO DA LITERATURA	
1 Girassol: cultivo e composição do óleo.....	27
2 Oxidação dos ácidos graxos .....	28
3 O capim-elefante .....	29
3.1 Impacto do fornecimento de volumosos frescos sobre o perfil de ácidos graxos do leite .....	30
4 O metabolismo dos lipídeos no rúmen .....	33
4.1 A lipólise .....	34
4.2 A bio-hidrogenação ruminal .....	35
4.3 Microrganismos envolvidos na bio-hidrogenação .....	35
4.3.1 Bactérias .....	35
4.3.1.1 Bio-hidrogenação sob pH ruminal não-ácido .....	35
4.3.1.2 Bio-hidrogenação sob pH ruminal baixo .....	38
4.3.2 Protozoários .....	39
4.3.3 Fungos .....	41
5 Modos de fornecimento da dieta .....	41
6 Produtos intermediários da bio-hidrogenação ruminal .....	41
6.1 Ácido oleico .....	41
6.2 Ácido vacênico .....	42
6.3 Ácido linoleico .....	43
6.4 Ácido linolênico .....	43
7 Síntese <i>de novo</i> de ácidos graxos nos ruminantes .....	44
7.1 Fontes de carbono utilizadas na síntese de ácidos graxos .....	47
7.2 Fontes de energia utilizadas na síntese de ácidos graxos .....	48
8 Controle da lipogênese mamária .....	48
9 Origem dos ácidos graxos não esterificados (AGNE) do plasma sanguíneo .....	50
10 Origem dos ácidos graxos do plasma sanguíneo .....	52
11 Origens da glicose plasmática .....	53
12 Origens da ureia plasmática .....	53
13 Gordura láctea e a nutrição humana .....	54
13.1 Ácidos graxos saturados .....	54
13.2 Ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada .....	55
13.3 Ácidos graxos <i>trans</i> .....	57
13.4 Ácido palmitelaídico .....	58
13.5 Ácido vacênico .....	59
13.6 Ácido oleico .....	59
13.7 Ácidos graxos poli-insaturados .....	59
13.8 Ácidos linoleicos conjugados .....	60
13.8.1 A biossíntese dos ácidos linoleicos conjugados .....	61
13.8.2 A atividade da enzima $\Delta^9$ -desaturase .....	63
13.8.3 Os potenciais benefícios do consumo de CLA .....	64

13.8.3.1	Ação anticarcinogênica .....	64
13.8.3.2	Ação antiobesidade .....	65
13.8.3.3	Ação antiaterosclerótica .....	65
13.8.3.4	Ação antidiabetogênica .....	65
13.8.3.5	Imunomodulação .....	66
13.8.4	Outras considerações a respeito do consumo de CLA .....	66

## CAPÍTULO I

Consumo, produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite de vacas Holandês recebendo níveis crescentes de óleo de girassol em dietas à base de capim-elefante picado

	RESUMO .....	67
	ABSTRACT .....	67
	INTRODUÇÃO .....	68
	MATERIAL E MÉTODOS .....	68
1	Dietas experimentais .....	69
2	Determinação do consumo .....	72
3	Avaliação da composição química e do perfil de ácidos graxos da dieta .....	73
4	Avaliação da produção e composição do leite .....	74
5	Avaliação do perfil de ácidos graxos do leite .....	74
6	Parâmetros sanguíneos .....	75
7	Procedimentos estatísticos .....	76

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

1	Consumo de alimentos .....	76
2	Parâmetros plasmáticos .....	78
3	Desempenho produtivo e composição centesimal do leite .....	81
4	Perfil de ácidos graxos dos alimentos .....	83
4.1	Capim-elefante .....	83
4.2	Óleo de girassol .....	84
4.3	Concentrados .....	85
5	Perfil de ácidos graxos do plasma sanguíneo .....	86
6	Perfil de ácidos graxos do leite .....	91
6.1	Ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada .....	91
6.2	Ácidos graxos saturados de cadeias carbônicas pares curtas e médias .....	96
6.3	Ácidos graxos saturados de cadeias carbônicas pares longas .....	96
6.4	Ácidos graxos insaturados .....	97
6.4.1	Ácidos graxos monoinsaturados <i>cis</i> .....	98
6.4.2	Ácidos graxos monoinsaturados <i>trans</i> .....	98
6.4.3	Ácidos graxos poli-insaturados .....	100
6.4.4	Ácidos linoleicos conjugados .....	103
6.5	Índice de atividade da enzima desaturase .....	105
	CONCLUSÕES .....	109

## CAPÍTULO II

Consumo, produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com dois tipos de óleo de girassol e dois modos de fornecimento do concentrado em dietas à base de capim-elefante picado

	RESUMO .....	110
	ABSTRACT .....	110

	INTRODUÇÃO .....	112
	MATERIAL E MÉTODOS .....	112
1	Dieta experimental .....	113
2	Mensuração do consumo, avaliação da composição química e perfil de ácidos graxos da dieta e seus ingredientes .....	116
3	Digestibilidade aparente dos nutrientes .....	117
4	Avaliação da produção e composição do leite .....	118
5	Avaliação do perfil de ácidos graxos do leite .....	119
6	Parâmetros sanguíneos .....	120
7	Procedimentos estatísticos .....	120
<hr/>		
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	
<hr/>		
1	Consumo de alimentos .....	121
2	Digestibilidade aparente .....	123
3	Parâmetros plasmáticos .....	124
4	Desempenho produtivo e composição centesimal do leite .....	126
5	Perfil de ácidos graxos dos alimentos .....	128
5.1	Capim-elefante .....	128
5.2	Óleo de girassol .....	129
5.3	Concentrado .....	132
6	Perfil de ácidos graxos do plasma sanguíneo .....	134
7	Perfil de ácidos graxos do leite .....	140
7.1	Ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada .....	140
7.2	Ácidos graxos saturados de cadeia curta e média .....	142
7.3	Ácidos graxos saturados de cadeia longa .....	145
7.4.	Ácidos graxos insaturados .....	146
7.4.1	Ácidos graxos monoinsaturados <i>cis</i> .....	146
7.4.2	Ácidos graxos monoinsaturados <i>trans</i> .....	149
7.4.3	Ácidos graxos poli-insaturados .....	152
7.4.4	Ácidos linoleicos conjugados .....	156
8	Índice de atividade da enzima desaturase .....	161
	CONCLUSÕES .....	163
<hr/>		
	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	163
<hr/>		
	ANEXOS .....	164
<hr/>		
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	168
<hr/>		

---

## LISTA DE FIGURAS

---

### REVISÃO DE LITERATURA

---

- Figura 1 – Ilustração esquemática das três etapas que compõem o processo de oxidação lipídica ..... 29
- Figura 2 – Figura esquemática da Via da Lipoxigenase. AOS, aleno oxido sintase; DES, divinil éter sintase;  $\alpha$ -DOX,  $\alpha$ -dioxigenase; EAS, epóxi-álcool sintase; HPL, hidroxiperóxido liase; LOX, lipoxigenase; POX, peroxigenase; AGPI, ácido graxo poli-insaturado ..... 33
- Figura 3 – Principais rotas metabólicas de bio-hidrogenação dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico no rúmen sob pH não-ácido ..... 36
- Figura 4 – Principais rotas metabólicas de bio-hidrogenação dos isômeros de CLA avaliadas em culturas bacterianas *in vitro* ..... 37
- Figura 5 – Principais rotas metabólicas de bio-hidrogenação dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico no rúmen sob pH baixo ..... 38
- Figura 6 – Efeitos das concentrações de volumoso e de óleo na dieta de bovinos sobre o pH ruminal. HFC: alto volumoso (70V:30C), sem adição de óleo; HFO: alto volumoso (70V:30C), adição de 2% de óleo na MS (50% óleo de peixe e 50% óleo de soja); LFC: baixo volumoso (30V:70C), sem adição de óleo; LFO: baixo volumoso (30V:70C), adição de 2% de óleo na MS ..... 39
- Figura 7 – Perfil dos principais AG insaturados presentes na composição de bactérias e de protozoários ruminais isolados 1 e 6 horas após a ingestão de alimentos ..... 40
- Figura 8 – Rotas metabólicas de bio-hidrogenação do ácido oleico ..... 42
- Figura 9 – Rotas metabólicas de bio-hidrogenação do ácido linoleico ..... 43
- Figura 10 – Rotas metabólicas de bio-hidrogenação do ácido  $\alpha$ -linolênico ..... 44
- Figura 11 – Papel do Ciclo do Ácido Cítrico no anabolismo celular ..... 45
- Figura 12 – Representação esquemática das rotas metabólicas relacionadas à síntese de ácidos graxos no tecido mamário dos ruminantes ..... 46
- Figura 13 – Domínio de ligação DNA-PPAR: interação responsável pela regulação da transcrição do segmento de DNA ..... 48
- Figura 14 – Mecanismo de regulação da transcrição gênica mediado por ácidos graxos poli-insaturados originados da dieta ou das reservas adiposas ..... 48
- Figura 15 – Esquema simplificado da rota de mobilização das gorduras de reserva e seu metabolismo nos hepatócitos ..... 51
- Figura 16 – Comparação entre o fluxo duodenal e a secreção láctea de ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada (g/dia) ..... 56
- Figura 17 – Distribuição típica dos ácidos graxos C18:1 *trans* presentes na gordura do leite e em óleos vegetais parcialmente hidrogenados ..... 57
- Figura 18 – Risco relativo de ocorrência de doenças coronarianas causadas pelo aumento da ingestão de ácidos graxos *trans* originados de gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas e da gordura de ruminantes ..... 58
- Figura 19 – Rotas metabólicas da formação dos isômeros de CLA e seus precursores em ambiente ruminal não-ácido ..... 62
- Figura 20 – Rotas metabólicas da síntese ruminal e endógena do ácido rumênico (CLA *cis*-9 *trans*-11) em bovinos leiteiros ..... 62

---

## CAPÍTULO I

---

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

- Figura 1 – Teores plasmáticos dos ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1 *cis*-9) e linoleico (C18:2 *cis*-9 *cis*-12) em vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total ..... 89
- Figura 2 – Teores plasmáticos dos ácidos vacênico (C18:1 *trans*-11) e  $\alpha$ -linolênico (C18:2 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15) em vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total ..... 89
- Figura 3 – Relação entre a concentração do ácido vacênico no plasma (g/100 g de AG totais) e o consumo de ácido linoleico (g/dia) de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol na matéria seca total ..... 90
- Figura 4 – Teores de ácidos graxos (AG) saturados e insaturados na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total ..... 97
- Figura 5 – Relação entre as concentrações dos ácidos graxos  $\omega$ -6: $\omega$ -3 presentes na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total ..... 101
- Figura 6 – Relação entre as concentrações dos ácidos graxos hipo e hipercolesterolêmicos presentes na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total ..... 101
- Figura 7 – Concentrações dos ácidos graxos hipo e hipercolesterolêmicos na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total ..... 102
- Figura 8 – Influência da adição de níveis crescentes de óleo de girassol sobre os teores dos ácidos rumênico (CLA *cis*-9 *trans*-11) e vacênico (C18:1 *trans*-11) na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total ..... 104
- Figura 9 – Relação entre as concentrações dos ácidos rumênico (CLA *cis*-9 *trans*-11) e vacênico (C18:1 *trans*-11) na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total ..... 104
- Figura 10 – Índice de atividade da enzima  $\Delta^9$ -desaturase na glândula mamária de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total ..... 108

---

## CAPÍTULO II

---

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

- Figura 1 – Teores médios dos principais ácidos graxos presentes nos óleos de girassol utilizados ..... 131

Figura 2 – Somatório dos teores médios dos ácidos graxos saturados, mono e poli-insaturados presentes nos óleos de girassol utilizados .....	131
Figura 3 – Evolução temporal do teor (g/100 g de AG totais) de ácido oleico nos óleos de girassol com alto (▲) e médio (■) teores de ácido oleico .....	132
Figura 4 – Evolução temporal do teor (g/100 g de AG totais) de ácido linoleico nos óleos de girassol com alto (▲) e médio oleico (■) .....	132
Figura 5 – Teores médios dos principais ácidos graxos presentes nos suplementos concentrados formulados com óleo de girassol alto (AO) e médio (MO) oleico .....	133
Figura 6 – Somatório dos teores médios dos ácidos graxos saturados, mono e poli-insaturados nos suplementos concentrados formulados com óleo de girassol alto (AO) e médio (MO) oleico .....	133
Figura 7 – Evolução temporal do somatório das concentrações (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos saturados nos suplementos concentrados formulados com óleo de girassol com alto (AO) (▲) e médio (MO) (■) teores de ácido oleico .....	134
Figura 8 – Evolução temporal dos teores (g/100 g de AG totais) de ácido oleico nos suplementos concentrados formulados com óleo de girassol com alto (AO) (▲) e médio (MO) (■) teores de ácido oleico .....	134
Figura 9 – Evolução temporal dos teores (g/100 g de AG totais) de ácido linoleico nos suplementos concentrados formulados com óleo de girassol com alto (AO) (▲) e médio (MO) (■) teores de ácido oleico .....	134
Figura 10 – Teores do somatório dos ácidos graxos de cadeia carbônica ímpar ou ramificada no plasma de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	135
Figura 11 – Teores de ácido vacênico (C18:1 <i>trans</i> -11) no plasma de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	137
Figura 12 – Teores de ácido linoleico no plasma de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	138
Figura 13 – Teores de ácido oleico no plasma sanguíneo de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	138
Figura 14 – Teores de ácidos graxos de cadeia carbônica ímpar ou ramificada na gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	141
Figura 15 – Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos de cadeia carbônica ímpar e ramificada (AGCIR) na gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	142
Figura 16 – Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos de cadeia curta com número par de C (C4:0 a C10:0) no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a	

dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	145
Figura 17 – Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos de cadeia média com número par de C (C12:0 a C16:0) no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	145
Figura 18 – Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do ácido esteárico no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	146
Figura 19 – Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do ácido oleico no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	149
Figura 20 – Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do C16:1 <i>trans</i> -9 (ácido palmitelaídico) no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	150
Figura 21 – Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do ácido vacênico no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	152
Figura 22 – Relação entre as concentrações dos ácidos graxos $\omega$ -6: $\omega$ -3 do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	153
Figura 23 – Relação entre as concentrações dos ácidos graxos hipo e hipercolesterolêmicos no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	154
Figura 24 – Evolução temporal da relação das concentrações dos ácidos graxos hipo:hipercolesterolêmicos da gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	155
Figura 25 – Evolução temporal do índice de aterogenicidade da gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	156
Figura 26 – Evolução temporal do índice de trombogenicidade da gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	156
Figura 27 – Fragmento de cromatograma contendo detalhe do pico referente ao ácido rumênico com isômero de CLA co-eluído .....	157
Figura 28 – Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do ácido rumênico no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e	

médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	158
Figura 29 – Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12 no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	159
Figura 30 – Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do CLA <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11 no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	159
Figura 31 – Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos inibidores da lipogênese (CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12 e CLA <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11) no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	160
Figura 32 – Evolução temporal do índice de desaturase do par ácido vacênico/rumênico .....	162
Figura 33 – Evolução temporal do índice de desaturase do par ácido esteárico/oleico .....	162

---

## LISTA DE TABELAS

---

### REVISÃO DE LITERATURA

---

Tabela 1 – Composição percentual mínima e máxima de ácidos graxos exigida pela legislação brasileira (IN n° 49 do MAPA) para diversos óleos vegetais comestíveis .....	27
Tabela 2 – Comparação dos efeitos dos volumosos pastejados e conservados sobre as concentrações de ácidos graxos insaturados do leite de vacas (g/100 g de ácidos graxos totais) .....	32
Tabela 3 – Taxa de lipólise ruminal de diferentes triglicerídeos .....	34
Tabela 4 – Influência do pH do líquido de rúmen sobre a taxa de lipólise <i>in vitro</i> após seis horas de incubação .....	35
Tabela 5 – Efeitos do pH (6,4 <i>versus</i> 5,6) e da relação volumoso:concentrado (V:C) da dieta (BC: baixo concentrado 70:30; AC: alto concentrado 30:70) sobre o efluxo de ácidos graxos em cultura de fluxo contínuo (g/100 g de AG C18) no período de 1 hora pós-ingestão .....	39
Tabela 6 – Composição de ácidos graxos C18 (g/100 g de ácidos graxos) de bactérias e protozoários ruminais presentes no abomaso de vacas alimentadas com silagem de milho e feno de alfafa sem suplementação lipídica .....	40
Tabela 7 – Referências de trabalhos que identificaram isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA) no conteúdo ruminal, de acordo com a posição e a geometria das duplas ligações .....	43
Tabela 8 – Atividade das enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos ( $\mu$ moles/min/g de tecido) .....	47

---

## CAPÍTULO I

---

### MATERIAL E MÉTODOS

---

Tabela 1 – Formulação e composição química das dietas experimentais originalmente estabelecidas .....	69
Tabela 2 – Formulação e composição química real das dietas experimentais .....	70

Tabela 3 – Temperaturas médias máximas (T <sub>máx</sub> ) e mínimas (T <sub>mín</sub> ) e precipitação entre os meses de novembro de 2008 e março de 2009 .....	71
Tabela 4 – Composição bromatológica e digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do capim-elefante picado coletado durante os períodos de coleta das quatro fases dos Quadrados Latinos .....	71
Tabela 5 – Composição química média dos concentrados nas quatro fases do Quadrado Latino .....	72
Tabela 6 – Formulação do núcleo vitamínico-mineral .....	72

---

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Tabela 1 – Consumos diários de nutrientes de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total .....	77
Tabela 2 – Parâmetros plasmáticos de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total .....	79
Tabela 3 – Concentrações de ácidos graxos não-esterificados (AGNE – mmol/L), glicose (mg/dL) e ureia (mg/dL) no plasma de vacas em lactação recebendo dietas suplementadas com óleos vegetais .....	80
Tabela 4 – Desempenho produtivo e composição do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total .....	81
Tabela 5 – Concentração de ácidos graxos (g/100 g de AG totais) no óleo de girassol utilizado no experimento, em comparação à encontrada por Glasser <i>et al.</i> (2008) e à exigida pela Instrução Normativa N° 49 .....	85
Tabela 6 – Concentração (g/100 g de AG totais) de ácidos graxos no plasma de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total .....	87
Tabela 7 – Concentração (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos da gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total .....	92
Tabela 8 – Correlações entre os consumos de óleo de girassol (OG) e de ácido linoleico e a secreção láctea dos isômeros C18:1 <i>cis</i> identificados na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total .....	98
Tabela 9 – Correlações entre os consumos de óleo de girassol, de ácido oleico, linoleico e $\alpha$ -linolênico e a secreção láctea dos isômeros <i>trans</i> na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com níveis crescentes de óleo de girassol na matéria seca total .....	99
Tabela 10 – Índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT) da gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementado com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total .....	103
Tabela 11 – Correlações entre o teor de gordura do leite, os consumos de ácido oleico, linoleico e $\alpha$ -linolênico e a secreção láctea dos principais isômeros de CLA ( <i>cis-9 trans-11</i> ; <i>trans-10 cis-12</i> e <i>trans-9 cis-11</i> ) identificados na gordura do leite de primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total .....	105

Tabela 12 – Atividade da enzima $\Delta^9$ -desaturase na glândula mamária de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total .....	107
---	-----

---

## CAPÍTULO II

---

### MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 1 – Formulação e composição química estimadas da dieta experimental .....	113
Tabela 2 – Temperaturas médias máximas (T <sub>máx</sub> ) e mínimas (T <sub>mín</sub> ) e precipitação entre os meses de novembro de 2010 e março de 2011 .....	114
Tabela 3 – Composição bromatológica e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca do capim-elefante durante o período experimental .....	114
Tabela 4 – Composição bromatológica média e a digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca dos concentrados .....	115
Tabela 5 – Formulação da mistura vitamínico-mineral .....	116

---

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1 – Consumo de nutrientes de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	121
Tabela 1a – Desmembramento das médias de consumo diário de extrato etéreo (g/vaca) .....	122
Tabela 1b – Desmembramento das médias de consumo diário do ácido linoleico (g/vaca) .....	123
Tabela 2 – Digestibilidade aparente dos nutrientes e taxa de passagem da forragem em vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	124
Tabela 3 – Parâmetros plasmáticos de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	125
Tabela 4 – Desempenho produtivo e composição do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	126
Tabela 4a – Desdobramento das médias dos teores (%) de lactose no leite .....	127
Tabela 5 – Composição média do perfil de ácidos graxos – AG (g/100 g de AG totais) dos óleos de girassol utilizados no experimento e os intervalos composicionais exigidos pela Instrução Normativa N° 49 (MAPA, 2006) .....	130
Tabela 6 – Teores dos principais ácidos graxos – AG (g/100 g de AG totais) no plasma de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	136
Tabela 6a – Desmembramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) do ácido graxo C18:1 <i>trans</i> -11 no plasma sanguíneo .....	137

Tabela 6b – Desmembramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) do ácido graxo C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 no plasma sanguíneo .....	138
Tabela 6c – Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) do somatório dos ácidos graxos monoinsaturados <i>trans</i> de cadeia carbônica par no plasma sanguíneo .....	139
Tabela 7 – Teores (g/100 g de AG totais) e secreção diária (g/dia) dos ácidos graxos (AG) de cadeia ímpar e ramificada na gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	140
Tabela 8 – Teores (g/100 g de AG totais) e secreção diária (g/dia) dos ácidos graxos saturados na gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	143
Tabela 9 – Teores (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos mono e poli-insaturados no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	147
Tabela 10 – Secreção diária (g/dia) dos ácidos graxos mono e poli-insaturados presentes na gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos distintos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	148
Tabela 9a – Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) do ácido C16:1 <i>trans</i> -9 no leite .....	150
Tabela 10a – Desdobramento das médias das secreções diárias (g/dia) do ácido C16:1 <i>trans</i> -9 no leite .....	150
Tabela 9b – Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) do ácido C18:1 <i>trans</i> -11 no leite .....	151
Tabela 9c – Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) do somatório dos ácidos monoinsaturados <i>trans</i> no leite .....	151
Tabela 9d – Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos C18:2 <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -12 + C18:2 <i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15 no leite .....	153
Tabela 11 – Índices de aterogenicidade (IA) e de trombogenicidade (IT) da gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	155
Tabela 9e – Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) dos isômeros de CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 e <i>trans</i> -7 <i>cis</i> -9 no leite .....	157
Tabela 10b – Desdobramento das médias das secreções diárias (g/dia) do ácido rumênico no leite .....	158
Tabela 12 – Atividade da enzima $\Delta^9$ -desaturase (índice de desaturase) na glândula mamária de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR <i>versus</i> fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado .....	161
Tabela 12a – Desdobramento das médias de atividade da enzima $\Delta^9$ -desaturase sobre o ácido vacênico para a síntese do ácido rumênico .....	161

---

## ANEXOS

---

Tabela 1 – Concentração de ácidos graxos (g/100 g de AG totais) em amostras de capim-elefante, coletadas ao longo do período experimental ..... 164

Tabela 2 – Conteúdo médio de ácidos graxos (g/100 g de AG totais) no concentrado fornecido no primeiro e no último dia de cada fase do Quadrado Latino ..... 165

Tabela 3 – Variação do conteúdo de ácidos graxos (g/100 g de AG totais) do capim-elefante durante o período experimental ..... 166

Tabela 4 – Variação temporal da concentração de ácidos graxos - AG (g/100 g de AG totais) nos ingredientes e nos suplementos concentrados formulados com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico, fornecidos para vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com dieta à base de capim-elefante picado ..... 167

## ABREVIACOES

AA: aminoácidos  
AG: cido graxo  
AGCIR: cidos graxos de cadeia ímpar e ramificada  
AGI: cido graxo insaturado  
AGNE: cidos graxos não-esterificados  
AGPI-CL: cidos graxos poli-insaturados de cadeia longa  
ALL: cido  $\alpha$ -linoleico  
ALN: cido  $\alpha$ -linolênico  
AO: cido oleico  
BHT: Butil-Hidroxi-Tolueno  
CBT: contagem bacteriana total  
CCS: contagem de células somáticas  
cFDA: fibra insolúvel em detergente ácido corrigida para cinzas  
cFDN: fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas  
CHO não fibroso D: carboidrato não fibroso digestível  
CLA: cido linoleico conjugado  
CMS: consumo de matéria seca  
cNDT: consumo de nutrientes digestíveis totais  
CNF: carboidrato não-fibroso  
DIVMS: digestibilidade *in vitro* da matéria seca;  
DN: digestibilidade do nutriente  
EDTA-K<sub>3</sub>: cido etilenodiaminotetra-acético tripotássico  
EE: extrato etéreo  
EED: extrato etéreo digestível  
EL: escore linear  
EP: eficiência produtiva  
EPM: erro padrão da média  
EST: extrato seco total  
FDA: fibra insolúvel em detergente cido  
FDN: fibra insolúvel em detergente neutro  
FDNcp: fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteina  
FDNcpD: fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteina digestível  
FID: detector de ionizao de chama  
g: gramas  
Hipo/hiper: relao entre os ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos  
IA: Índice de Aterogenicidade  
IN: instruo normativa  
IT: Índice de Trombogenicidade  
kg: quilogramas  
L: tendência de comportamento linear

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento  
Mcal/kg: mega calorias por quilograma  
mg/dL: miligramas por decilitro  
mg: miligramas  
mmol/L: milimol por litro  
MS: matéria seca  
NIDA: nitrogênio insolúvel em detergente ácido;  
OG: óleo de girassol  
OS: óleo de soja  
OVPH: óleos vegetais parcialmente hidrogenados  
P: probabilidade  
PB: proteína bruta  
PBD: proteína bruta digestível  
PIDN: proteína insolúvel em detergente neutro;  
PLC3,5: produção de leite corrigida para 3,5% de gordura  
PTFE: Poli Tetra Fluoretileno  
Q: tendência de comportamento quadrático  
QL: Quadrado Latino  
T<sub>máx</sub>: temperatura máxima  
T<sub>mín</sub>: temperatura mínima  
TMR: *total mixed ration*  
V:C: relação volumoso:concentrado  
v/v: volume por volume  
~: aproximadamente  
%pc: consumo de matéria seca em porcentagem do peso corporal  
Σ: somatório  
ω-6/ω-3: relação entre os ácidos graxos ω-6 e ω-3

## INTRODUÇÃO GERAL

Nos dias atuais, o acesso ilimitado à informação tem permitido que os consumidores se tornem cada dia mais cientes da relação existente entre a dieta e a saúde. Informações sobre a importância de uma alimentação saudável e seus impactos sobre a saúde têm despertado o interesse e motivado a população a adotar estilos de vida e de alimentação mais saudáveis.

O leite de vaca e seus produtos derivados são conhecidos como importantes fontes de nutrientes, sendo que suas qualidades nutricionais têm sido atribuídas basicamente à sua composição única, capaz de unir proteínas de alta qualidade, energia na forma de carboidratos e gorduras, ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais, em especial, o cálcio. O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) publicou em 2005 um guia de orientações nutricionais que, dentre outras informações, enfatizou que os “produtos lácteos são capazes de fornecer quantidades substanciais de três dos cinco nutrientes de interesse para crianças, e quatro dos sete nutrientes necessários para alimentação saudável de adultos” (USDA, 2005).

Entretanto, muitos consumidores, em resposta às informações empíricas aos quais são expostos, e parte da comunidade médica vêm criticando o consumo *ad libitum* de leite e derivados devido ao seu conteúdo de ácidos graxos saturados de cadeia média, considerados hipercolesterolêmicos e aterogênicos. Segundo Haug *et al.* (2007), essa visão tem feito com que em alguns países ocidentais já seja possível observar redução do consumo *per capita* de lácteos. Diante disso, o meio científico tem sido chamado a esclarecer o real papel dos alimentos lácteos na manutenção da saúde e no desenvolvimento de doenças crônicas, e criar novas opções de alimentos capazes de gerar benefícios fisiológicos ao consumidor, alimentos esses recentemente definidos como “alimentos funcionais”.

O termo alimento funcional não possui uma definição única, mas foi bem descrito por Huth *et al.* (2012) como sendo o alimento, ou ingrediente de alimento, que contém componentes ativos capazes de fornecer benefícios à saúde e prevenir doenças, além das possibilidades dos nutrientes tradicionais. No Brasil, a definição dessa classe de alimentos foi feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão responsável pela regulação destes alimentos, via Portaria N°398 de 30 de abril de 1999, como sendo todo aquele alimento ou ingrediente de alimento que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.

Os efeitos benéficos dos alimentos funcionais, somados ao crescente interesse dos consumidores pelo assunto, permitiram que surgisse um novo segmento no mercado de alimentos lácteos, os leites e derivados especiais ou *premium*. Esse nicho de mercado é composto por leites longa vida e derivados enriquecidos, naturalmente ou não, com minerais (zinco, ferro e cálcio), vitaminas (A, D, E, complexo B, K, entre outras), fibras ou ácidos graxos essenciais ( $\omega$ -6,  $\omega$ -3 e ácidos linoleicos conjugados).

No Brasil, em 2011, o segmento de leite UHT teve um faturamento próximo de 5,7 bilhões de reais. Porém, enquanto as vendas dos leites comuns crescem a ritmo próximo de 1,9% por ano, as dos *premium* têm tido suas vendas anuais aumentadas em cerca de 31,4% (Danone, 2012). Esse fenômeno tem sido possível graças ao contínuo aumento do poder aquisitivo da população brasileira que, entre os anos de 2003 e 2010, apresentou crescimento de 19% (Brasil, 2010) e que, segundo levantamentos da Federação do Comércio de Bens, Serviços e Turismo do Estado de São Paulo (Fecomercio - SP), entre 2010 e 2020, o crescimento acumulado previsto será ligeiramente inferior a 40%. Essas projeções fazem com que as perspectivas de médio prazo do mercado nacional de leites e derivados *premium* sejam bastante positivas, instigando, assim, o meio científico nacional a desenvolver novas tecnologias que objetivem criar pacotes tecnológicos, a fim de viabilizar a produção desses alimentos nas indústrias e propriedades rurais.

Neste sentido, a manipulação da dieta tem despontado como estratégia promissora a fim de se alterar a composição láctea de forma natural. Todos os componentes do leite são sujeitos à manipulação. Entretanto, o potencial dessa mudança depende do componente, sendo que, em geral, o teor de gordura e seu perfil de ácidos graxos são os mais sujeitos a mudanças.

No sentido de alterar a composição da gordura do leite de modo a torná-la mais adequada ao consumo humano, a manipulação da dieta tem conseguido diminuir os teores dos ácidos graxos saturados de cadeia média, como láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), e aumentar a concentração do ácido oleico (C18:1 *cis*-9) e do isômero do ácido linoleico conjugado (CLA), ácido rumênico (C18:2 *cis*-9 *trans*-11). Grande atenção tem sido direcionada para a maximização do teor deste ácido graxo, desde a descoberta de suas propriedades anticarcinogênicas, de redução da deposição da gordura corporal e dos teores

plasmáticos de colesterol e de regulador imunológico. Também têm-se buscado aumentar a concentração do ácido vacênico (C18:1 *trans*-11). O ácido vacênico, originado da bio-hidrogenação parcial dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico livres no rúmen, após absorvido, pode ser captado pela glândula mamária e incorporado na gordura do leite ou sofrer ação da enzima acil-CoA  $\Delta^9$ -desaturase para que ocorra a síntese do ácido rumênico. Esse fato permite que haja alta correlação entre os teores dos ácidos rumênicos e vacênico no leite sugerindo que, para que se maximize a síntese de ácido rumênico, deve-se prover o rúmen de ácidos graxos poli-insaturados.

Atualmente, a forma mais prática e viável de se elevar as concentrações ruminiais de ácidos graxos poli-insaturados tem sido o fornecimento de óleos vegetais ricos em ácido linoleico e/ou  $\alpha$ -linolênico como os óleos de girassol e soja, por exemplo. Além do fornecimento de ácidos insaturados, a inibição da saturação ruminal do ácido vacênico e a elevação da atividade da enzima  $\Delta^9$ -desaturase são outros fatores que contribuem para o incremento do teor de ácido rumênico no leite.

Um aspecto importante no estudo dos efeitos da inclusão de óleos vegetais em dietas de vacas leiteiras sobre os teores dos ácidos rumênico e vacênico diz respeito ao dia em que os valores máximos desses ácidos graxos são alcançados após o início do fornecimento da suplementação lipídica, bem como a persistência desses valores. Estas respostas tempo-dependentes estão diretamente associadas às mudanças no ambiente ruminal e são praticamente desconhecidas em sistemas de produção de leite no Brasil.

Os óleos vegetais ricos em ácido linoleico são mais eficientes em elevar os teores lácteos dos ácidos rumênico e vacênico no leite. Por outro lado, fontes vegetais ricas em ácido oleico também apresentam potencial para alterar positivamente o perfil da gordura do leite, já que podem permitir elevação significativa da secreção desse ácido graxo. Além disso, a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras ricas em ácidos graxos mono-insaturados é maior do que a daquelas ricas em ácidos graxos poli-insaturados, permitindo que ocorra incremento do período de armazenamento desse óleo na propriedade rural e da “vida-de-prateleira” dos derivados lácteos.

A adoção da suplementação de concentrados na forma de mistura total (*Total Mixed Ration* - TMR) com os alimentos volumosos, além de assegurar consumo balanceado de nutrientes, permite maior estabilidade do ambiente ruminal, principalmente relacionado à menor variação do pH. Por outro lado, é comum em sistemas de produção de leite no Brasil, o fornecimento da quantidade diária do concentrado diretamente no cocho, sobre o volumoso, parcelada ou não em função do número de ordenhas adotado na propriedade. Esse modo de fornecimento pode causar impactos negativos no ambiente ruminal, induzindo mudanças não desejáveis nas rotas e nas concentrações de ácidos graxos intermediários da bio-hidrogenação ruminal, sugerindo ser menos interessante em sistemas de produção que objetivem maximizar a síntese de ácidos graxos benéficos.

A maioria dos trabalhos em que se estudou o potencial da suplementação de dietas de vacas leiteiras com fontes lipídicas de origem vegetal ricas em ácidos linoleico e/ou  $\alpha$ -linolênico foram utilizadas espécies forrageiras de ciclo fotossintético C3, fornecidas, principalmente, sob a forma conservada (fenos e silagens). Durante o processo de conservação das forrageiras, ocorrem perdas lipídicas de ácidos graxos poli-insaturados devido à ocorrência de oxidação, reduzindo-se os teores do ácido linoleico e  $\alpha$ -linolênico destinado ao processo de bio-hidrogenação ruminal, e, conseqüentemente, a síntese de ácido rumênico na glândula mamária. Nos poucos estudos realizados no Brasil com vacas em lactação, a silagem de milho foi a fonte de volumoso mais comumente incluída nas dietas e são poucos os estudos em que a base das dietas das vacas foram forrageiras tropicais quer consumidas no cocho ou sob condição de pastejo.

Diante do exposto, pode-se inferir que a associação dietética de óleos vegetais poli-insaturados com forrageiras tropicais fornecidas *in natura* para vacas pode apresentar grande potencial para alterar positivamente a composição da gordura do leite em termos de nutrição e saúde humana. Esse fato permite que se produza leite e produtos derivados *premium* para o mercado sem que haja a necessidade de grandes adaptações dos sistemas de produção leiteiros já utilizados no Brasil.

Foram objetivos desse trabalho avaliar os efeitos de diferentes estratégias de suplementação contendo óleo de girassol em dietas à base de capim-elefante picado fornecido a vacas em lactação sobre diversos parâmetros produtivos, plasmáticos e de composição do leite.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Girassol: cultivo e composição do óleo

O girassol (*Helianthus annuus* L.) destaca-se como a quinta oleaginosa em produção de grãos e a quarta em produção de óleo no mundo, com 8,78 milhões de toneladas em 2005. Os maiores produtores, com base na safra 2003/2004, foram Rússia, Ucrânia, Argentina, China e Índia (Leite, 2008).

O Brasil ainda possui números pouco expressivos dessa cultura, participando com menos de 1% da produção mundial. Nos últimos anos, no entanto, tem-se verificado crescimento substancial da produção. A produção nacional de grãos de girassol no ano de 2011 ficou próxima de 102,4 mil toneladas, 27% superior à da safra de 2010, reflexo do crescimento do consumo interno (CONAB, 2012).

O aumento do consumo interno se deve, principalmente, à crescente demanda dos setores farmacêutico, alimentício e energético (biodiesel) e à utilização dessa oleaginosa como opção de cultivo em sistemas de rotação de culturas (Leite, 2008).

A planta do girassol apresenta características agrônômicas interessantes para as condições edafoclimáticas brasileiras devido à tolerância à seca e às variações térmicas, se comparada à maioria das espécies oleaginosas cultivadas no Brasil. Devido a tais particularidades, e ao surgimento de diversos ramos da indústria interessados em adquirir o produto, a cultura do girassol tornou-se uma das principais alternativas nas regiões produtoras de grãos (Leite, 2008).

Entre os óleos vegetais comestíveis, o de girassol é o que apresenta um dos maiores teores de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), em especial, do ácido linoleico (C18:2 *cis-9 cis-12*) (Mandarino, 1992) (Tabela 1). Essa característica permite que o seu consumo favoreça a redução dos índices de colesterol plasmático total e da fração LDL, contribuindo, assim, para a prevenção da aterosclerose e doenças cardiovasculares (BNF, 1994).

**Tabela 1.** Composição percentual mínima e máxima de ácidos graxos exigida pela legislação brasileira (IN nº 49 do MAPA) para diversos óleos vegetais comestíveis

Óleo	Ácidos Graxos (%)			
	Saturados	Monoinsaturados	Linoleico	Linolênico
Algodão	24,3 – 32,1	14,7 – 21,7	46,7 – 58,2	≤ 0,4
Soja	10,3 – 21,0	17,0 – 30,0	48,0 – 59,0	3,5 – 8,0
Milho	8,9 – 21,9	20,0 – 42,2	34,0 – 65,6	≤ 2,0
Canola	3,5 – 12,3	51,0 – 70,0	15,0 – 30,0	5,0 – 14,0
Girassol	8,1 – 16,9	14,0 – 39,4	48,3 – 74,0	≤ 0,3
Girassol Médio Oleico	7,2 – 13,4	43,3 – 72,2	18,7 – 45,3	≤ 0,5
Girassol Alto Oleico	6,2 – 13,9	75,0 – 90,7	2,1 – 17,0	≤ 0,3

Fonte: Brasil (2006).

Os híbridos de girassol capazes de produzir óleo com altos/médios teores de ácido oleico (C18:1 *cis-9* –  $\omega$ -9) foram desenvolvidos utilizando os métodos de mutação/seleção vegetal com o objetivo de criar novas opções de óleo comestível interessantes do ponto de vista nutricional, ou seja, ricos em ácidos graxos (AG) insaturados, pobres em AG *trans* e altamente estáveis à oxidação lipídica (Hazebroek, 2000; Dow Agrosience, 2012).

Os óleos de girassol ricos em ácido oleico (ou óleos de girassol alto oleico) têm sido bastante demandados nos segmentos de fabricação de alimentos, a saber: na produção de frituras, produtos de panificação, óleo de cozinha, margarinas, biscoitos e sorvetes, entre outros. Esses novos óleos vêm sendo a alternativa eleita pela indústria alimentícia para minimizar os teores de gorduras saturadas e *trans*, sem reduzir o desempenho industrial e/ou prejudicar as características sensoriais dos alimentos, exigidas pelos consumidores (Dow Agrosience, 2012).

No Brasil, depois que as autoridades públicas determinaram a obrigatoriedade da rotulagem nutricional para a maioria dos alimentos, estimulou-se a utilização de ingredientes mais saudáveis, causando, assim, o aumento da área de plantio de cultivares de girassol produtoras de óleo com elevado teor de ácido oleico.

Atualmente, os maiores produtores mundiais de óleo de girassol alto oleico são os EUA e a Argentina. Prevê-se que a participação mundial de cultivares de girassol alto oleico, deva passar de 8% em 2008, para, aproximadamente, 20% do total de óleo de girassol produzido até 2024 (Syngenta, 2012).

O óleo de girassol alto oleico é mais estável e resistente à oxidação que os demais óleos comestíveis. Seu uso garante a manutenção das características dos alimentos que o utilizam na sua composição por um período de tempo maior, o que aumenta o prazo de validade do produto final.

Essa, entre outras características, permitiu que se estudasse a viabilidade da utilização desse óleo também na alimentação animal, sendo que os primeiros estudos publicados sobre os efeitos do fornecimento do óleo de girassol com altos teores de ácido oleico na dieta de vacas em lactação datam de mais de quarenta anos – Steele e Moore (1968); Wrenn *et al.* (1976); Selner e Schultz (1980). Mais recentemente, sua maior estabilidade à oxidação tem sido um forte argumento para sua utilização também como óleo vegetal na fabricação de biodiesel (Hazebroek, 2000; Dow Agrosience, 2012).

## 2. Oxidação dos ácidos graxos

Os efeitos tóxicos do oxigênio sobre o meio biológico já eram descritos na literatura desde o final do século XIX. Estes efeitos deletérios são resultantes da oxidação de componentes celulares (peroxidação) cujos principais exemplos são os tios, os cofatores enzimáticos (vitaminas), as proteínas, os nucleotídeos e os lípidos, principalmente ácidos graxos insaturados (AGI) (Romero *et al.*, 1998).

Em meio não-biológico, a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) é responsável, basicamente, pela quebra das duplas ligações presentes na cadeia carbônica dos AG e pela geração de novos compostos químicos como ésteres, aldeídos, cetonas, alcoois, lactonas e hidrocarbonos. Na maioria dos casos, como na indústria alimentícia ou na nutrição animal, esses novos compostos são indesejáveis por causarem descaracterização sensorial (aroma e sabor) dos alimentos e, por consequência, redução da aceitabilidade; reduzirem o seu valor nutricional; e gerarem moléculas potencialmente danosas como o malonaldeído e os alquilbenzenos (Bobio e Bobio, 2001; Smith *et al.*, 2007).

Segundo Yin e Porter (2005), devido à presença das duplas ligações em suas moléculas, os AGI tornam-se muito susceptíveis à oxidação, sendo que quanto maior o número de insaturações, maior o seu potencial de oxidação. Benzie (1996) classificou o grau de oxidação dos principais AG e observou que, em meio não-biológico, o ácido  $\alpha$ -linolênico possui potencial de oxidação 100 vezes maior, e o ácido linoleico 10 vezes maior que o da molécula de ácido oleico. Mais recentemente, Min e Boff (2001) observaram taxas de oxidação proporcionais a 1:12:25 para os ácidos oleico, linoleico e linolênico, respectivamente.

Essa classificação dá base teórica para justificar a preferência do uso do ácido oleico no preparo de alimentos e, mais recentemente, na suplementação de dietas para animais. No caso deste último, com o objetivo de se alterar o perfil lipídico dos seus produtos de modo a melhorar tanto as suas qualidades nutracêuticas como aumentar o seu tempo de prateleira.

Confirmando esse comportamento, Kristensen *et al.* (2004) avaliaram a estabilidade oxidativa da gordura do leite de dois grupos de vacas: o primeiro foi alimentado com uma dieta pobre em gordura a fim de estimular a lipogênese mamária e, assim, elevar os teores de AG saturados (via estimulação da síntese *de novo*) e reduzir os teores de AG insaturados, e o segundo foi alimentado com dieta rica em óleo de origem vegetal rica em AG poli-insaturados fazendo com que os teores de AG insaturados do leite elevassem em cerca de 50% em relação ao primeiro tratamento. Os autores verificaram que a gordura do leite originado da dieta insaturada apresentou-se mais oxidativamente instável ( $P < 0,05$ ) durante o período de armazenamento (11 dias a 4-8°C) que a gordura de perfil mais saturado.

Quimicamente, o processo de oxidação consiste na incorporação de oxigênio molecular ( $O_2$ ) a um AGI para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial (Figura 1). Nos sistemas biológicos a peroxidação pode ocorrer, principalmente, por duas vias: i) via enzimática envolvendo as enzimas ciclooxigenases e lipoxigenases na oxigenação dos AGPI; ii) a peroxidação não-enzimática, que envolve a participação de metais de transição ( $Fe^{n+}$ ,  $Cu^{n+}$ ) e outros radicais livres. Em ambiente não-biológico, a via não-enzimática é a preferencial (Lima e Abdalla, 2001).

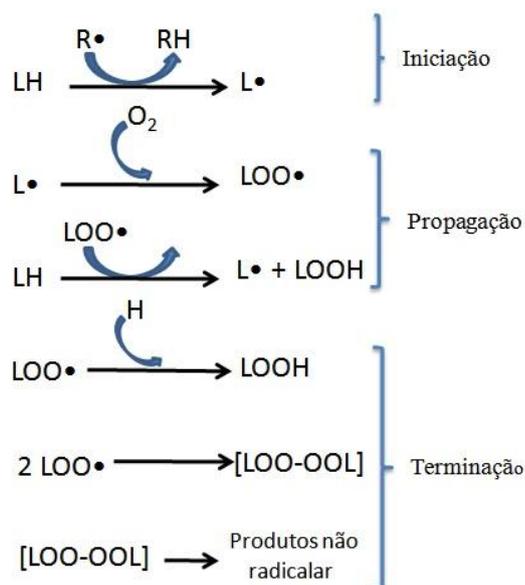
Pelo mecanismo de oxidação não-enzimático, os AGI podem reagir com moléculas em estado excitado (elétrons desemparelhados), dando início a um processo denominado de peroxidação lipídica ou auto-

oxidação que ocorre por meio de uma série de reações em cadeia divididas em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 1) (Schilstra *et al.*, 1992).

A fase de iniciação representa o início da reação de oxidação, onde o AGI (LH) sofre ataque de uma molécula suficientemente reativa (R•) para retirar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-), formando um radical de carbono (L•), momento em que se inicia a etapa de propagação.

Em meio aeróbio, o radical lipídico (L•) reage rapidamente com o oxigênio formando o radical peroxila (LOO•), o qual pode retirar um hidrogênio alílico (fracamente ligado) de um outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono e promovendo uma reação em cadeia (propagação). A reação do radical peroxila (LOO•) com o átomo de hidrogênio alílico gera um hidroperóxido lipídico (LOOH).

O término da reação em cadeia da lipoperoxidação (etapa de terminação) ocorre quando dois radicais peroxila (LOO•) reagem entre si formando um produto não radicalar (sem radical), ou quando retiram um átomo de hidrogênio de uma molécula sem gerar outro radical.



**Figura 1.** Ilustração esquemática das três etapas que compõem o processo de oxidação lipídica.

### 3. 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 C<sub>4</sub>, 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).

O capim-elefante cortado com 60 dias de idade fornece apenas os nutrientes suficientes para a manutenção de vacas com produção diária de cinco a seis quilogramas de leite (Deresz *et al.*, 1997). Já o capim cortado com 45 dias de idade, fornece nutrientes para manutenção e produção de leite próxima a 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 maior número de ciclos de corte durante o ano (Soares, 2002). 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 tende a causar aumento nos custos do sistema.

Uma série de alterações na estrutura e composição química das plantas forrageiras ocorre à medida que seu ciclo vegetativo avança. É comum que se observe redução na relação folha/haste e, dessa forma, variação tanto nos teores quanto na composição dos lípides presentes na planta (McDonald *et al.*, 1999; Elgersma *et al.*, 2003). A composição de fibras do capim-elefante permite que o pH ruminal se mantenha próximo à faixa considerada ótima para a absorção de ácidos graxos voláteis (AGV) e para a atividade dos

microrganismos celulolíticos, principais responsáveis pela bio-hidrogenação (BH) dos AG no rúmen (Lopes, 2002).

Apesar da baixa concentração de lipídeos totais nos tecidos das plantas forrageiras, estes ainda são a mais importante fonte de AG da dieta dos ruminantes não suplementados com concentrados ricos em lipídeos, influenciando, dessa forma, o perfil dos AG secretados no leite (Dewhurst *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2012). Mesmo animais submetidos a dietas suplementadas com lipídeos têm sua gordura láctea influenciada pela variedade e quantidade do volumoso consumido (Lopes *et al.*, 2011).

Sendo os lipídeos característicos de folhas metabolicamente ativas (Fernandes *et al.*, 2007), durante o período de maturidade vegetal, observa-se sensível redução nos teores de lípidos. Isso ocorre porque a alta proporção de folhas, caracterizada por serem ricas em galactolipídeos (mono e di-galactosildiglicerídeos), sulfolipídeos (sulfoquinovosildiglicerídeos), fosfolipídeos (principalmente, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol e fosfatidiletanolamina) e outros glicolipídeos ricos em ácido  $\alpha$ -linolênico (C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15) e abundantes nos cloroplastos, mitocôndrias, retículo endoplasmático, membranas celulares e nas superfícies externas das folhas (ceras), cede lugar ao tecido fibroso que compõe as hastes (Harfoot e Hazlewood, 1988; Jenkins, 1993; Drackley, 2000). Sendo estas, pobres em lípidos, por serem metabolicamente menos ativas e pouco fotossintetizantes.

De modo geral, o ácido  $\alpha$ -linolênico é o AG mais afetado pela maturidade vegetal e, conseqüentemente, pelas mudanças na relação folha/haste (Van Soest, 1994; Dewhurst *et al.*, 2001). Segundo Fernandes *et al.* (2007), gramíneas de clima tropical como o capim-elefante possuem teores de ácido  $\alpha$ -linolênico superiores a 30% (g/100 g de AG totais) no período pré-maturidade.

Dewhurst *et al.* (2002), estudando gramíneas de clima temperado, não observaram alterações significativas na fração lipídica das plantas quando o intervalo de corte foi inferior a 30 dias, sugerindo que cortes em períodos pré-maturação impedem que haja alterações significativas na quantidade e composição da fração lipídica. Dessa forma, sempre que ocorre o pastejo ou o corte mecânico, a planta modifica sua fisiologia, iniciando novo período de crescimento, elevando novamente a relação folha/haste, retardando o aumento da quantidade de tecidos fibrosos e a emissão de inflorescências que provocam diminuição do teor de AG nas plantas forrageiras.

Boufaïed *et al.* (2003) publicaram um extenso artigo com o objetivo de quantificar os reais impactos de fatores como estágio de desenvolvimento (pós-brotação, pré maturidade, início da floração), nível de adubação nitrogenada (0 e 120 kg de N/ha), método de conservação (ensilagem, murchamento, fenação), período do ano (verão, inverno), espécie (diversos) e cultivar (diversos) sobre o perfil de AG de diversas forrageiras. Os autores observaram que as concentrações dos AG C16:0, linoleico,  $\alpha$ -linolênico e a soma total de AG reduziram ( $P < 0,01$ ), respectivamente, em 15, 16, 31 e 23% entre os estágios de desenvolvimento de pós-brotação e início da floração; que a adubação nitrogenada gerou incremento ( $P < 0,01$ ) de 18, 12, 40 e 26%, respectivamente, nas concentrações destes AG, sendo que a adubação com P não causou efeitos significativos ( $P > 0,05$ ); que o corte e posterior conservação das forragens reduziram ( $P < 0,01$ ) os teores desses AG; e que as concentrações desses AG foram maiores ( $P < 0,01$ ) durante o verão se comparado com o inverno, justificada pela maior quantidade de tecidos fotossinteticamente ativos.

A eficiência de seleção dos tecidos vegetais feita pelo ruminantes é outro fator capaz de influenciar a composição de AG consumida pelo animal. Dias (2012) conduziu experimento com o objetivo de quantificar o perfil de AG em pastos de capim-elefante cv. Pioneiro submetidos a quatro tratamentos: 90 e 120 cm de altura de entrada; combinadas com duas proporções de rebaixamento: 50 e 70%. Sendo que o estrato acima do resíduo foi dividido em duas partes: i) superior, contendo basicamente folhas e; ii) inferior, contendo relação folha:haste baixa. O autor observou que a parte superior do estrato apresentou maior disponibilidade de  $\alpha$ -linolênico (62,9 contra 61,7%) e menor de ácido palmítico (16,3 contra 20,2%) e linoleico (15,1 contra 21,1%) quando comparada com a parte inferior, independentemente do tratamento.

A literatura apresenta número reduzido de trabalhos com o objetivo de melhorar a qualidade nutricional dos AG da gordura do leite a partir da utilização de forrageiras tropicais na dieta de vacas. Os poucos estudos a esse respeito conduzidos no Brasil utilizaram, na sua maioria, animais de raças europeias puras ou dietas contendo volumosos conservados. Isso impede a verificação do real potencial de produção de rebanhos brasileiros típicos, ou seja, animais mestiços sob pastejo.

### 3.1. Impacto do fornecimento de volumosos frescos sobre o perfil de ácidos graxos do leite

Apesar da baixa concentração de lipídeos totais nos tecidos vegetais (< 46 g/kg de MS), estes ainda são a mais importante fonte de AG de dietas de ruminantes não suplementadas com fontes lipídicas, influenciando, dessa forma, o perfil dos AG secretados no leite (Dewhurst *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2012). Mesmo animais recebendo dietas com suplementação lipídica têm sua gordura láctea influenciada pela variedade e pela quantidade do volumoso fornecido (Lopes *et al.*, 2011).

Na literatura mundial, a maior parte dos trabalhos publicados que objetivaram avaliar o potencial de impacto de diferentes dietas sobre a composição dos AG do leite de fêmeas ruminantes utilizou espécies forrageiras de ciclo fotossintético C3, fornecidas, principalmente, sob a forma de fenos ou silagens (Lopes *et al.*, 2011).

Os motivos pelos quais os sistemas de produção de leite utilizam forrageiras conservadas são variados. Os principais estão relacionados à ocorrência de intempéries climáticas, como invernos ou secas rigorosas; à intensificação da produção, condição necessária em regiões com pouca disponibilidade de área ou de preço de terra muito alto; ou simplesmente devido à maior viabilidade econômica desses alimentos.

Nas quatro últimas décadas, foi observada clara mudança nos sistemas de produção de leite no mundo, de propriedades predominantemente pastoris e de baixo emprego de tecnologia para sistemas intensivos ou semi-intensivos que exigem emprego de tecnologias mais avançadas em menores áreas. No decorrer desse período, percebeu-se a ocorrência de alterações na composição dos AG do leite e de seus derivados, fazendo com que a ingestão, por parte dos consumidores, de AG essenciais e de ácido linoleico conjugado (CLA – *Conjugated Linoleic Acid*) (C18:2 *cis*-9 *trans*-11) entrasse em declínio e a de saturados se elevasse (Elgersma *et al.*, 2003; Dewhurst *et al.*, 2006, Khan *et al.*, 2012).

Segundo esses autores, devido às altas concentrações de AGPI nos tecidos fotossintetizantes dos vegetais (0,58 ± 0,160 g de C18:3 ω-3/g de AG totais), o leite secretado por vacas alimentadas com forrageiras verdes frescas, especialmente as pastejadas, apresenta proporções de C18:3 ω-3 e do ácido rumênico (CLA *cis*-9 *trans*-11), bem como relação AG insaturados:saturados, superiores às do leite e derivados, produzidos por animais alimentados com silagem ou feno como única fonte de volumoso (Tabela 2). Essa variação se deve, principalmente, às alterações ocorridas nos lípides dos tecidos vegetais durante os processos de conservação. Estes processos são responsáveis pela ocorrência de lesões nos tecidos celulares, que desencadeiam intensa perda de AGPI por oxidação (Khan *et al.*, 2009).

A oxidação dos AGPI dos tecidos vegetais pode ocorrer de duas maneiras: por auto-oxidação, em razão da sua exposição direta ao ar; ou pela ação de enzimas celulares como as α-dioxigenase e as lipoxigenases (LOX). A oxidação catalisada pelas enzimas LOX é o caminho metabólico mais comum nesses casos. O conjunto de reações catalisadas pelas enzimas LOX tem como substratos o ácido linoleico (C18:2 *cis*-9 *cis*-12 - AL), o ácido α-linolênico (C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15) e o ácido araquidônico (C20:4 *cis*-5 *cis*-8 *cis*-11 *cis*-14), sendo conhecida como Via da Lipoxigenase (Feussner e Wasternack, 2002; Farmaky *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2009) (Figura 2).

De forma simplificada, a Via da Lipoxigenase é um conjunto de reações intracelulares desencadeadas no momento em que o tecido vegetal é lesionado. Essas reações utilizam ácido linoleico, α-linolênico ou araquidônico na forma livre como substratos para a síntese de diversos compostos voláteis.

Após o corte, as forrageiras a serem conservadas podem passar pelo processo de picagem, desidratação ou por ambos. Nesse momento, as células lesionadas estimulam a ativação dos genes responsáveis pela síntese das enzimas lipases e peroxidases. As lipases têm como função hidrolisar as ligações ésteres presentes nos diversos lipídeos vegetais – mono, di ou triglicerídeos, galactolipídeos, sulfolipídeos, fosfolipídeos e outros glicolipídeos ricos em ácido α-linolênico – para que ocorra a liberação dos AG. Estes AG livres servem de substrato para as enzimas 9-LOX ou 13-LOX recém-sintetizadas, responsáveis pela oxidação dos átomos de Carbono 9 e 13 da cadeia carbônica, dando origem ao (9S)- ou (13S)-hidroperóxido, respectivamente (Feussner e Wasternack, 2002; Farmaky *et al.*, 2007). Em seguida, os ácidos linoleico, os α-linolênico ou os araquidônico-hidroperóxidos podem ser convertidos a uma variada gama de compostos voláteis, como cetonas, hidróxidos, aldeídos, alcoois ou éteres. Esse caminho é definido pelo perfil enzimático presente no meio que, por sua vez, depende da espécie vegetal em que o processo ocorre (Fall *et al.*, 1999; Feussner e Wasternack, 2002).

Quando comparados os impactos dos diferentes processos de conservação de forragens sobre o conteúdo de AG dos vegetais, percebe-se que a ensilagem é mais eficiente na manutenção da composição original dos lípides que a fenação. Tal fato se explica pelo rápido estabelecimento de ambiente anaeróbio após a compactação do material a ser ensilado, dificultando a ocorrência do processo oxidativo (Khan *et al.*, 2012).

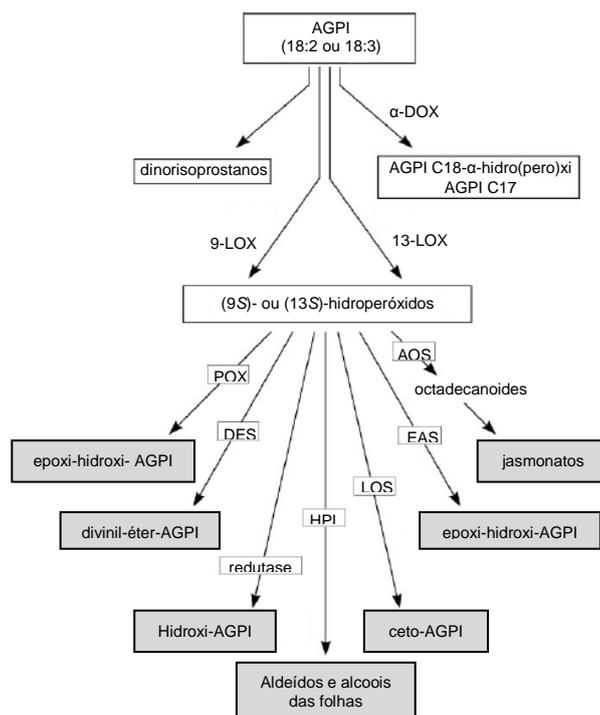
**Tabela 2.** Comparação dos efeitos dos volumosos pastejados e conservados sobre as concentrações de ácidos graxos insaturados do leite de vacas (g/100 g de ácidos graxos totais)

Referências	Tipos de volumosos	C18:3 ω-3			C18:2 ω-6			CLA cis-9 trans-11			C18:1 cis-9		
		Verde	Conservado	P <sup>1</sup>	Verde	Conservado	P <sup>1</sup>	Verde	Conservado	P <sup>1</sup>	Verde	Conservado	P <sup>1</sup>
Timmen e Patton (1988)	Pasto e silagem	0,84	0,36	-	2,20	2,27	-	1,34	0,27	-	25,2	17,0	-
Aii <i>et al.</i> (1988)	Pasto e feno	1,65	1,29	<0,01	2,34	2,51	ns	-	-	-	26,6	31,3	<0,01
Kelly <i>et al.</i> (1998a)	Pasto e silagem	0,95	0,25	<0,01	2,25	2,62	<0,05	1,09	0,46	<0,01	34,7	26,6	<0,01
White <i>et al.</i> (2001)	Pasto e silagem	0,71	0,38	<0,01	1,82	2,49	<0,01	0,72	0,41	<0,01	23,1	23,3	ns

Referências	Tipos de volumosos	C12:0			C14:0			C16:0			C18:0		
		Verde	Conservado	P <sup>1</sup>									
Timmen e Patton (1988)	Pasto e silagem	3,43	4,80	-	10,4	12,6	-	26,6	35,4	-	10,0	6,5	-
Aii <i>et al.</i> (1988)	Pasto e feno	3,22	2,36	<0,01	10,8	8,2	<0,01	27,2	26,6	ns	10,4	10,8	<0,05
Kelly <i>et al.</i> (1998a)	Pasto e silagem	1,70	2,59	<0,01	6,7	9,4	<0,01	24,2	30,7	<0,01	13,2	15,0	<0,05
White <i>et al.</i> (2001)	Pasto e silagem	2,65	2,34	<0,01	10,2	9,4	<0,01	31,2	31,7	ns	13,4	15,4	<0,01

<sup>1</sup>significativo quando P<0,05; ns – não significativo. Adaptado de Dewhurst *et al.* (2006)



**Figura 2.** Figura esquemática da Via da Lipoxigenase. AOS, aleno oxido sintase; DES, divinil éter sintase;  $\alpha$ -DOX,  $\alpha$ -dioxigenase; EAS, epóxi-álcool sintase; HPLI, hidroxiperoxido liase; LOX, lipoxigenase; POX, peroxigenase; AGPI, ácido graxo poli-insaturado. Adaptado de Feussner e Wasternack (2002)

O grau de maturação é outro fator que impacta diretamente a composição de AG das forrageiras. Sabe-se que tanto o perfil de AG quanto a quantidade total de gorduras são influenciadas por ele (Dewhurst *et al.*, 2006). Em forrageiras tropicais, o conteúdo de AG e a proporção de C18:3  $\omega$ -3 é alto em plantas jovens e reduz-se com a maturidade. Em plantas pré-senescentes (pré-floração), observa-se forte relação entre o conteúdo de clorofila, ou seja, de tecidos fotossintetizantes, e os teores de C18:3  $\omega$ -3 e de AG totais (Dewhurst *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2012).

Diante do exposto, percebe-se que os experimentos que tenham por objetivo maximizar a produção e a secreção de AG do leite, com funções benéficas à saúde humana, deverão evitar volumosos conservados e utilizar, preferencialmente, forrageiras frescas pré-floração.

#### 4. O metabolismo dos lipídeos no rúmen

O metabolismo gástrico dos lipídeos advindos da dieta exerce grande influência sobre a composição da gordura dos produtos originados dos ruminantes. Os AG insaturados, destacando-se o  $\alpha$ -linolênico e o linoleico, são encontrados em abundância nas forrageiras verdes e em outros alimentos, mas se apresentam em concentrações baixas na carne e no leite (Jenkins *et al.*, 2008). A predominância de gordura saturada nesses produtos faz com que o seu consumo seja frequentemente associado ao aumento da incidência de doenças coronarianas (Menotti *et al.*, 1999).

Os recentes avanços na identificação cromatográfica dos diversos AGPI e dos isômeros de CLA, combinados com suas propriedades promotoras da saúde humana e do desempenho animal, têm renovado o interesse do meio científico em aprofundar seus esforços no processo de BH e sua regulação em nível ruminal. Os estudos mais recentes estão agora direcionados para a descoberta de novos AG intermediários e de suas possíveis ações bioativas, para a identificação e classificação dos diversos microrganismos ruminantes presentes no processo de BH e para a predição do efluxo ruminal de AG insaturados e de outros intermediários da BH por meio da modelagem matemática (Jenkins *et al.*, 2008).

Os quatro estômagos dos ruminantes, em especial o rúmen, funcionam como barreira a impedir que os AG insaturados provenientes da dieta alcancem o intestino delgado com sua estrutura molecular intacta. As duas principais transformações por que passam os AG da dieta no rúmen são a lipólise e a bio-hidrogenação (Beam *et al.*, 2000; NRC, 2001; Jenkins *et al.*, 2008).

#### 4.1. A lipólise

O processo de lipólise é quimicamente definido como a hidrólise enzimática de lipídeos – mono, di ou triglicerídeos, galactolipídeos, sulfolipídeos, fosfolipídeos, entre outros – que gera como produtos finais AG livres e uma molécula receptora, normalmente glicerol ou galactosídeos (Drackley, 2000). Nos ruminantes, assim que os lipídeos presentes na dieta alcançam o rúmen, ocorre extensa hidrólise das ligações ésteres dos mesmos por uma grande variedade de enzimas lipolíticas microbianas conhecidas por lípases ou lipases. Esse passo é pré-requisito e limitante para que ocorra a BH ruminal dos AG insaturados (Harfoot e Hazlewood, 1988; Bauman *et al.*, 2003).

A primeira clivagem, isto é, a retirada do primeiro AG da estrutura dos lipídeos, é o passo limitante do processo, sendo os seguintes efetuados mais facilmente (Noble *et al.*, 1974). Segundo Palmquist e Kinsey (1993), quanto maior o grau de insaturação, maior a taxa de ocorrência de lipólise (Tabela 3).

**Tabela 3.** Taxa de lipólise ruminal de diferentes triglicerídeos

Fonte de gordura	Relação Insaturados:Saturados	Taxa de lipólise (mg/L/h)
Óleos vegetais	$\geq 3,0$	225
Gordura animal	1,0	40
Gordura animal hidrogenada	0,5	12

Adaptado de Palmquist e Kinsey (1993)

A hidrólise dos lipídeos da dieta é causada predominantemente por enzimas produzidas pelas bactérias ruminais, havendo pouca influência de protozoários ciliados, saliva ou lipases presentes nas plantas (Harfoot e Hazlewood, 1988; Bauman *et al.*, 2003; Dehority, 2003) e nenhuma dos fungos (Dehority, 2003). Essas lipases, produzidas principalmente pelas bactérias das espécies *Anaerovibrio lipolytica* e *Butyrivibrio fibrisolvens*, são enzimas extracelulares capazes de hidrolisar por completo os acilglicerois a AG livres mais glicerol, com pequena produção de mono e diglicerídeos (Jenkins, 1993).

Em sistemas de produção a pasto, o perfil de lipídeos que chega ao rúmen é reflexo direto da composição das folhas das forrageiras. As folhas verdes são ricas em lípides, sendo que essa fração é composta majoritariamente por galactolipídeos (mono e di-galactosildiglicerídeos), sulfolipídeos (sulfoquinovosildiglicerídeos), fosfolipídeos (principalmente, fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol e fosfatidiletanolamina) e outros glicolipídeos ricos em ácido  $\alpha$ -linolênico (Harfoot e Hazlewood, 1988; Jenkins, 1993; Drackley, 2000). Em dietas com forragens conservadas e/ou ricas em concentrado, o perfil lipídico ingerido é reflexo direto do tipo e da quantidade de grão utilizado. Os principais lipídeos presentes nesse tipo de dieta são, em geral, os triglicerídeos ricos em ácido linoleico (Ribeiro, 2009a).

Conforme discutido anteriormente, os métodos de conservação de forragem, como a ensilagem e a fenação, levam à diminuição da concentração de AG no rúmen devido à atividade oxidativa respiratória celular, à formação de polímeros, assim como à atividade das enzimas vegetais e dos microrganismos (Elgersma *et al.*, 2003; Dewhurst *et al.*, 2006). Assim, a utilização de meios de conservação de forragens tende a provocar alterações na fração lipídica dos vegetais e, conseqüentemente, sobre a disponibilidade de AG livres no rúmen e passíveis de absorção intestinal.

O pH ruminal é outro importante fator de impacto sobre a lipólise. Como anteriormente apresentado, os principais microrganismos responsáveis pela síntese de enzimas lipolíticas são as bactérias das espécies *A. lipolytica* e *B. fibrisolvens*, sendo viáveis predominantemente em ambiente ruminal não ácido, ou seja, com pH acima de 6,0 (Jenkins, 1993).

Van Nevel e Demeyer (1996) estudaram o impacto da variação do pH ruminal sobre a lipólise de lípides de origem vegetal ao adicionar diferentes quantidades de óleo de soja (40 ou 80 mg) em 10 mL de amostras de líquido ruminal com pHs distintos (6,8; 6,3; 5,9; 5,6 e 5,2). As incubações duraram seis horas e as taxas de lipólise foram calculadas a partir da redução da presença de triglicerídeos nos meios. Os autores observaram que somente em incubações utilizando líquido ruminal com pH inferior a 6,0 houve redução significativa na taxa de lipólise, sendo a inibição menor quanto menor fosse o pH (Tabela 4). Em um mesmo pH, a inibição da lipólise foi mais pronunciada nas incubações com 80 mg de óleo de soja. Tais resultados permitiram aos autores concluir que, apesar da taxa de lipólise ser influenciada por diversos fatores, a redução do pH

ruminal a partir da utilização de dietas ricas em concentrado podem ser estratégia para se proteger parcialmente os AG presentes na dieta contra a lipólise e, por consequência, contra a BH.

**Tabela 4.** Influência do pH do líquido de rúmen sobre a taxa de lipólise *in vitro* após seis horas de incubação

pH	Soma <sup>1</sup>	Inibição <sup>2</sup>
<b>40 mg de óleo de soja</b>		
6,8	30,89 <sup>a</sup>	-
6,3	29,56 <sup>a</sup>	4,13 <sup>a</sup>
5,9	27,34 <sup>a</sup>	11,44 <sup>a</sup>
5,6	18,90 <sup>b</sup>	39,05 <sup>b</sup>
5,2	14,54 <sup>b</sup>	52,38 <sup>b</sup>
<b>80 mg de óleo de soja</b>		
6,8	58,72 <sup>a</sup>	-
6,3	58,62 <sup>a</sup>	-0,82 <sup>a</sup>
5,9	38,58 <sup>b</sup>	33,29 <sup>b</sup>
5,6	30,86 <sup>b</sup>	46,62 <sup>b</sup>
5,2	14,96 <sup>c</sup>	74,52 <sup>c</sup>

<sup>1</sup>Soma em mg dos ácidos graxos C16:0, 18:0, 18:1, 18:2 e 18:3 na forma de triglicerídeos; <sup>2</sup>inibição da lipólise calculada pela redução (%) nas concentrações de triglicerídeos em relação ao pH 6,8; <sup>a,b</sup>letras diferentes na coluna indicam valores diferentes (P<0,05); Adaptado de Van Nevel e Demeyer (1996).

#### 4.2. A bio-hidrogenação ruminal

Harfoot e Hazlewood (1988) definiram a BH ruminal como o processo de conversão dos AG insaturados a saturados, via quebra (hidrogenação) das duplas ligações, catalisada por enzimas microbianas, tendo como produtos intermediários, AG *trans* (Figuras 3, 4 e 5).

Os principais substratos da BH no rúmen são os ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico ricamente encontrados nas forragens verdes e grãos das dietas dos ruminantes. A BH completa desses ácidos resulta na síntese de ácido esteárico (C18:0), fazendo com que ele seja o AG de maior concentração no líquido que eflui do rúmen e, conseqüentemente, na digesta que chega ao duodeno (Bauman *et al.*, 2003; Lock e Bauman, 2011).

A taxa de BH se eleva com o grau de insaturação dos AG (Beam *et al.*, 2000). Na maioria das dietas, a BH do ácido linoleico e linolênico varia entre 70 e 95%, e 85 e 100%, respectivamente (Doreau e Ferlay, 1994; Glasser *et al.*, 2008c). Essa taxa reduz-se quando há fornecimento de dietas ricas em concentrado. Segundo Bauman *et al.* (2003) isso ocorre devido à queda do pH ruminal e, conseqüentemente, à inibição da lipólise microbiana (Bauman *et al.*, 2003).

Muito se discute sobre o real motivo da ocorrência da BH dos AG no ambiente ruminal. Alguns autores sustentam a teoria de que ela seria uma forma de controle da concentração ruminal de H<sup>+</sup> (Ulyatt *et al.*, 2002). Mas a teoria mais aceita atualmente afirma que a hidrogenação dos AG agiria como uma ferramenta de controle da fluidez das membranas celulares dos microrganismos e, conseqüentemente, da sua permeabilidade (Dehority, 2003).

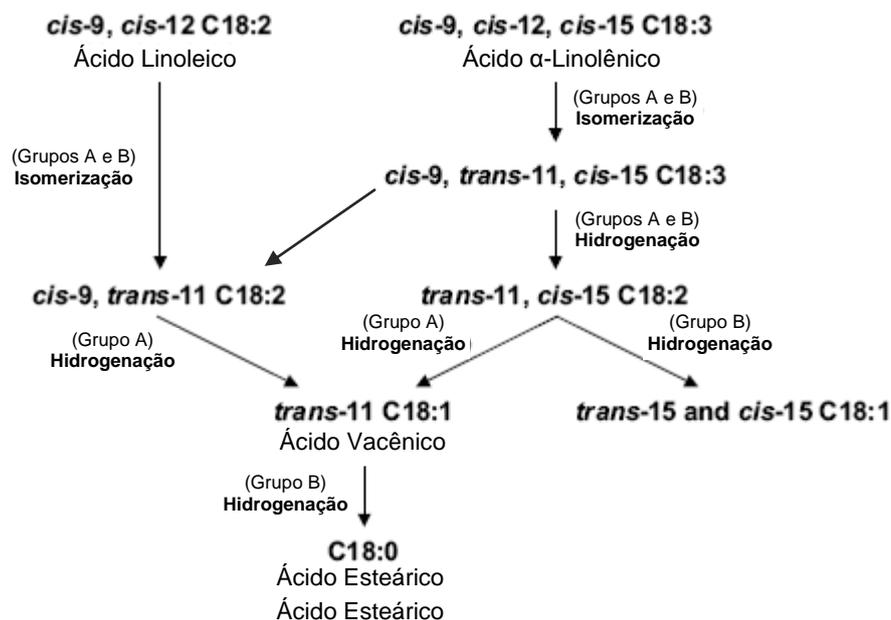
#### 4.3. Microrganismos envolvidos na bio-hidrogenação

##### 4.3.1 Bactérias

##### 4.3.1.1. Bio-hidrogenação sob pH ruminal não-ácido

As bactérias ruminais envolvidas com a principal rota de BH de AG no rúmen são dispostas em dois diferentes grupos (A e B) com base em suas ações metabólicas (Kemp e Lander, 1984). Para que haja BH completa dos AGPI da dieta, torna-se necessária a ação de ambos os grupos.

O grupo A, composto principalmente por bactérias fibrolíticas butirôgenicas, sendo as principais representantes *B. fibrisolvens*, *Ruminococcus albus* e *R. flavifaciens*, é extremamente eficiente em hidrogenar os AGPI livres no rúmen, tendo como principal produto intermediário o ácido rumênico (CLA *cis-9 trans-11*) e, como final, o ácido vacênico C18:1 *trans-11* (Figura 3). No entanto, nem toda bactéria produtora de butirato produz o mesmo perfil enzimático. As *Eubacterium* e *Clostridium* spp., por exemplo, utilizam o linoleato e linolenato como substratos, mas produzem produtos intermediários e finais diferentes.



**Figura 3.** Principais rotas metabólicas de bio-hidrogenação dos ácidos linoleico e α-linolênico no rúmen sob pH não-ácido. Adaptado de Khanal e Dhiman (2004)

O grupo B é representado pelo *Fusocillus* spp. e pelo *Clostridium proteoclasticum* – reclassificado como *Butyrivibrio proteoclasticus*. Atualmente, estas são as únicas bactérias isoladas no rúmen capazes de converter AG poli-insaturados a ácido estearico C18:0 (Harfoot e Hazlewood, 1988; Jenkins *et al* 2008, Buccioni *et al.*, 2012).

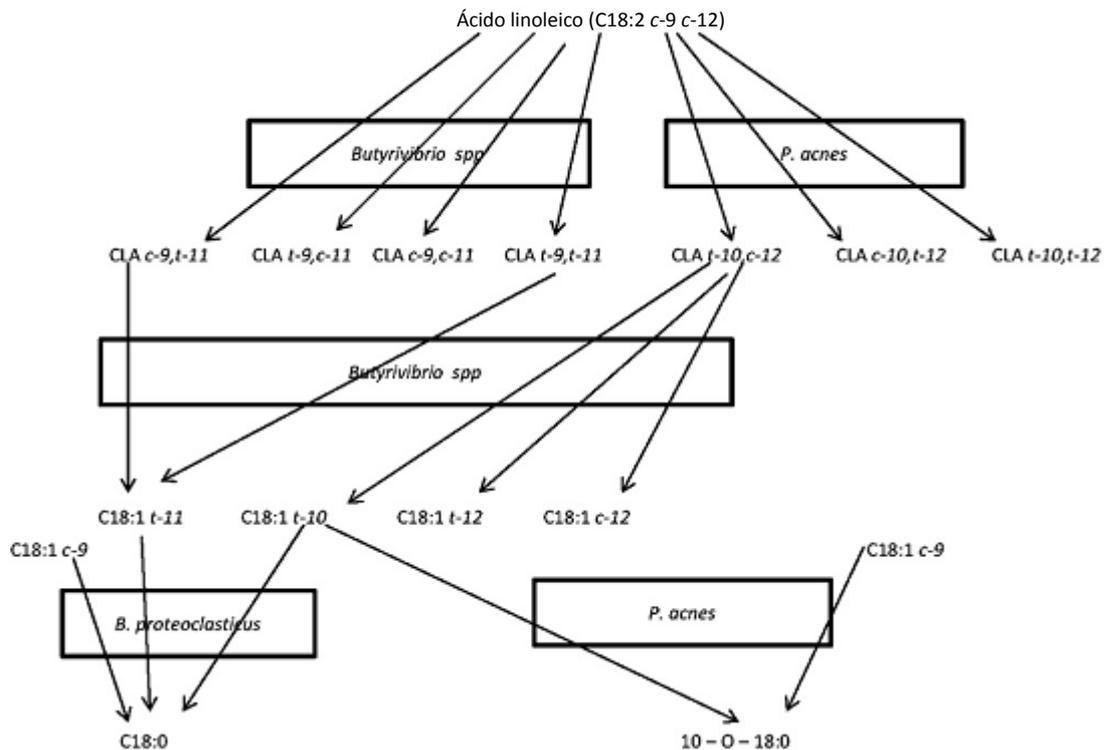
O primeiro passo do processo de BH dos AG ruminais é a isomerização das duplas ligações *cis-12* para *trans-11*, resultando em AG conjugados di ou trienoicos, seguida da hidrogenação das duplas ligações *cis-9*, formando o ácido vacênico C18:1 *trans-11*. O passo final consiste na hidrogenação das duplas ligações *trans-11*, produzindo o ácido estearico C18:0, C18:1 *trans-15* ou C18:1 *cis-15* (Khanal e Dhiman, 2004).

Sabe-se que o grupo A é numericamente muito superior ao grupo B. Essa diferença faz com que a ocorrência do último passo da cascata de reações seja limitada, fazendo com que a concentração do ácido vacênico se eleve, tornando-o o principal produto da BH ruminal.

Ao compreender as rotas metabólicas da BH dos AG no rúmen, entende-se porque o aumento da concentração de AGPI na dieta causa simultaneamente incremento nas concentrações de AG mono-insaturados e diminuição na concentração de saturados no rúmen (Fellner *et al.*, 1995).

Em 2010, McKain *et al.* publicaram resultados de um experimento *in vitro* avaliando as rotas de BH e quantificando o grau de hidrogenação de isômeros de CLA e AG C18:1 em culturas de diferentes categorias de bactérias metabolizadoras de AG insaturados no rúmen, entre elas: *B. fibrisolvens* (grupo A, pH não-ácido), *Propionibacterium acnes* (pH ácido) e *B. proteoclasticus* (grupo B) (Figura 4).

Os autores observaram que as rotas são totalmente dependentes dos tipos de microrganismos presentes no meio e, conseqüentemente, do pH. Segundo os autores, três principais rotas sobressaíram: uma primeira, responsável por converter os isômeros de CLA, produtos da isomerização do ácido linoleico, à C18:1 *trans-11*; uma segunda, só encontrada em meio ácido e responsável por converter os isômeros geométricos do CLA 10, 12 à C18:1 *trans-10* ou *cis-12*; e uma terceira, protagonizada pela *B. proteoclasticus*, responsável por converter uma extensa gama de AG monoenoicos a ácido estearico. Confirmando, assim, as rotas anteriormente propostas por Khanal e Dhiman (2004).



**Figura 4.** Principais rotas metabólicas de bio-hidrogenação dos isômeros de CLA avaliadas em culturas bacterianas *in vitro*. Fonte: McKain *et al.* (2010), modificado.

A redução do CLA *cis*-9 *trans*-11 para C18:1 *trans*-11 é catalisada pela enzima *trans*-11 ácido octadecadienoico redutase (Palmquist *et al.*, 2005). Hughes *et al.* (1982) citados por Palmquist *et al.* (2005) isolaram essa enzima da membrana plasmática de *B. fibrisolvens* e observaram atividade máxima em faixa de pH entre 7,2 e 8,2.

Alguns suplementos dietéticos, como o óleo de peixe e outras fontes de AGPI, 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. Esse fato ocorre devido à ação deletéria desses lipídeos sobre as bactérias do Grupo B (Bauman *et al.*, 2003).

Ainda não está claro qual realmente é o comportamento dos microorganismos ruminais e, conseqüentemente, da BH dos AG, em situações de altas concentrações de AGPI no rúmen. Beam *et al.* (2000) conduziram um experimento que objetivou identificar fatores que influenciavam as taxas de lipólise e de BH dos AG no rúmen. Em vacas leiteiras recebendo dieta suplementada com óleo de soja, os autores verificaram que a taxa de lipólise do óleo declinava de 44%/h para menos de 30%/h quando se aumentava a sua adição 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. Já Shingfield *et al.* (2008) observaram aumentos lineares na BH dos ácidos oleico ( $P = 0,009$ ), linoleico ( $P < 0,001$ ) e linolênico ( $P < 0,001$ ) à medida que se aumentou o fornecimento de óleo (0; 250; 500 e 750 g de óleo de girassol/dia, equivalente a 0; 1,7; 3,3 e 5,0% do consumo diário de MS) via sementes de girassol na dieta de quatro vacas em lactação alimentadas à base de silagem de capim.

Beam *et al.* (2000) também observaram que, comparado com o AG C18:2, as taxas de BH do C18:1 foram ainda menores (3,6%/h, em média). A taxa de BH foi maior com o incremento do grau de insaturação da cadeia carbônica dos AG. Baseando-se nestes achados, os autores concluíram que a elevação das concentrações de ácido linoleico na dieta tende 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.

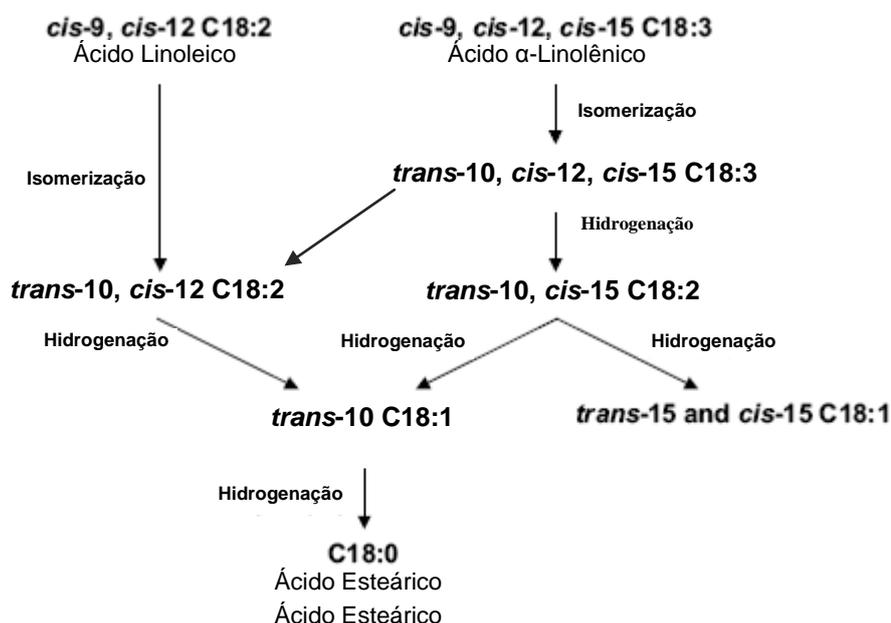
Estudos mais recentes têm verificado que os derivados polifenólicos vegetais, sendo o tanino o principal exemplo, são capazes de reduzir eficientemente os processos de lipólise e BH no rúmen, permitindo maior aporte (25 a 35%) de AG mono e poli-insaturados e menor (20%) de saturados aos tecidos (Cabiddu *et al.*, 2010; Rana *et al.*, 2012). Tais resultados sugerem que a adição dietética de algumas espécies de leguminosas – como a *Terminalia chebula*, a *Vicia sativa* (ervilhaca; avica) ou a *Trifolium incarnatum*

(trevo violeta) – podem agir como eficiente ferramenta na elevação dos teores de AG insaturados que saem do rúmen e, conseqüentemente, na melhoria da qualidade da gordura dos produtos de origem animal.

#### 4.3.1.2. Bio-hidrogenação sob pH ruminal baixo

Dietas ricas em carboidratos (CHO) rapidamente fermentáveis e/ou pobres em fibras tendem a reduzir o pH ruminal e, como consequência, alterar a população microbiana. Essa alteração de pH causa redução numérica nos grupos de bactérias dos grupos A e B e selecionam espécies resistentes ao ambiente ácido como a *Megasphaera elsdenii*, causando, assim, mudanças drásticas nas rotas de BH ruminal (Kim *et al.*, 2002).

As bactérias acidófilas, além de reduzir as taxas de lipólise e, com isso, as de BH ruminal, alteram os caminhos metabólicos direcionando para a síntese do AG C18:1 *trans*-10 e para o CLA *trans*-10 *cis*-12, este último, conhecido por reduzir o teor de gordura do leite (Figura 5) (Bauman *et al.*, 1999; Baumgard *et al.*, 2002).

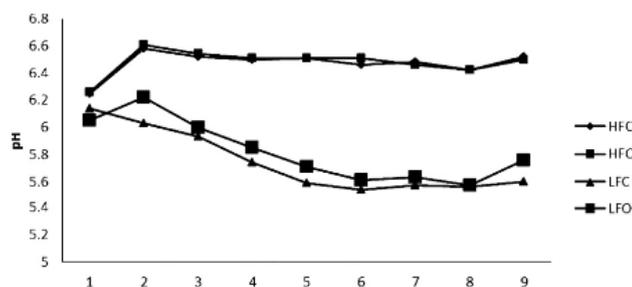


**Figura 5.** Principais rotas metabólicas de bio-hidrogenação dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico no rúmen sob pH baixo. Adaptado de Khanal e Dhiman (2004).

Gudla *et al.* (2012) forneceram quatro dietas com dois níveis de volumoso – alto (70% MS) ou baixo (30% MS) – e de óleo – 50% óleo de peixe e 50% óleo de soja a 0 ou 2 % da MS – para quatro bovinos fistulados no duodeno, objetivando investigar os efeitos da variação do pH ruminal e do teor de óleo da dieta sobre algumas cepas de bactérias e, conseqüentemente, sobre a BH ruminal. Os autores observaram que as concentrações de C18:1 *trans*-11 e CLA *cis*-9 *trans*-11 foram maiores ( $P < 0,01$ ) nos tratamentos com alto volumoso e com a adição de óleo; que as concentrações de C18:1 *trans*-10 e CLA *trans*-10 *cis*-12 foram maiores ( $P < 0,01$ ) nos tratamentos com baixo volumoso e adição de óleo; e que a adição de óleo elevou significativamente a concentração de AG *trans*. Os autores também observaram que a concentração das bactérias *B. fibrisolvens*, *R. albus*, *R. flavifaciens*, *Anaerovibrio lipolytica* e *B. proteoclasticum* foram maiores ( $P < 0,03$ ) nas dietas ricas em volumosos.

Tais resultados são explicados principalmente pela variação do pH ruminal causado pelas diferentes proporções de CHO fermentáveis (Figura 6). Sendo essas bactérias sensíveis a ambientes ruminiais ácidos, é compreensível que haja menor taxa de BH e, por consequência, menores concentrações de AG *trans*.

No entanto, como a redução do pH ruminal, em geral, ocorria concomitantemente ao fornecimento de dietas ricas em concentrado, não ficava claro qual desses fatores era o real causador das alterações das rotas da BH. Com o objetivo de responder a esse questionamento, Fuentes *et al.* (2009) publicaram resultados de um experimento comparando os efeitos de dois pHs (6,4 *versus* 5,6) e duas relações volumoso:concentrado (70:30 *versus* 30:70) em arranjo fatorial 2 x 2 sobre os AG efluentes de um meio de cultura de fluxo contínuo e sobre os principais microrganismos associados à BH.



**Figura 6.** Efeitos das concentrações de volumoso e de óleo na dieta de bovinos sobre o pH ruminal. HFC: alto volumoso (70V:30C), sem adição de óleo; HFO: alto volumoso (70V:30C), adição de 2% de óleo na MS (50% óleo de peixe e 50% óleo de soja); LFC: baixo volumoso (30V:70C), sem adição de óleo; LFO: baixo volumoso (30V:70C), adição de 2% de óleo na MS. Fonte: Gudla *et al.* (2012)

Os autores observaram que o pH igual a 5,6 reduziu os fluxos dos AG C18:0, C18:1 *trans*-11 e CLA *cis*-9 *trans*-11 e elevou os dos AG C18:1 *trans*-10, C18:2  $\omega$ -6, C18:3  $\omega$ -3, C18:2 *trans*-11 *cis*-15 e CLA *trans*-10 *cis*-12 (Tabela 5). Esse pH também reduziu o número de bactérias das espécies *A. lipolytica* (72,1 versus 32,7 pg/10 ng de DNA total) e *B. fibrisolvens* (1395,4 versus 588 pg/10 ng de DNA total). A dieta rica em concentrado reduziu os fluxos de C18:1 *trans*-10 e C18:1 *trans*-11, e elevou os de C18:1 *cis*-9, C18:2  $\omega$ -6, C18:3  $\omega$ -3 e CLA *trans*-10 *cis*-12. Esses resultados permitiram verificar que o pH, e não a relação volumoso:concentrado da dieta, é o principal fator regulador da BH de AG no rúmen e que a redução do pH direciona as rotas metabólicas da BH para a síntese dos AG C18:1 *trans*-10 e CLA *trans*-10 *cis*-12.

**Tabela 5.** Efeitos do pH (6,4 versus 5,6) e da relação volumoso:concentrado (V:C) da dieta (BC: baixo concentrado 70:30; AC: alto concentrado 30:70) sobre o efluxo de ácidos graxos em cultura de fluxo contínuo (g/100 g de AG C18) no período de 1 hora pós-ingestão

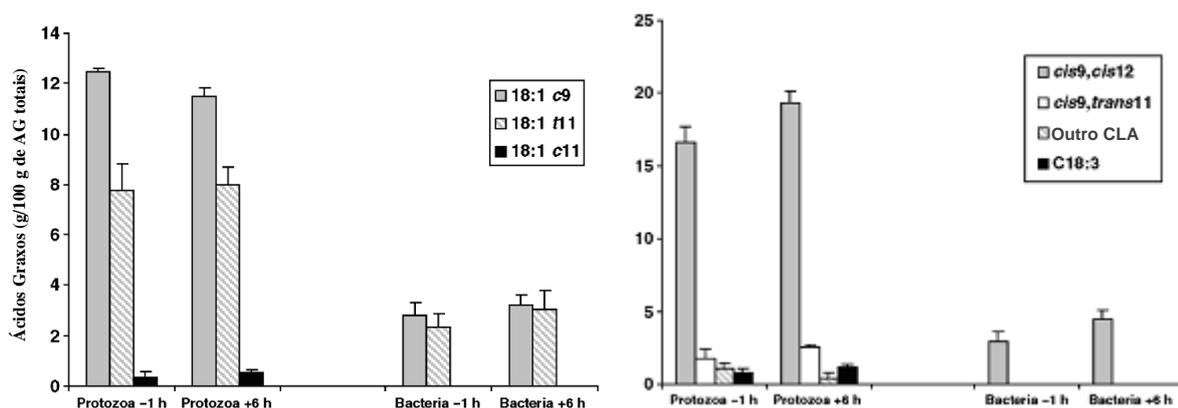
Ácidos Graxos	BC		AC		Valores de P		
	6,4	5,6	6,4	5,6	V:C	pH	V:C x pH
C18:0	47,8	11,8	48,5	10,2	0,872	<0,001	0,683
C18:1 <i>trans</i> -10	1,82 <sup>c</sup>	27,1 <sup>a</sup>	0,35 <sup>c</sup>	18,3 <sup>b</sup>	0,027	<0,001	0,095
C18:1 <i>trans</i> -11	5,71 <sup>a</sup>	1,06 <sup>c</sup>	3,21	0,39 <sup>c</sup>	0,008	<0,001	0,085
C18:1 <i>cis</i> -9	14,1 <sup>c</sup>	20,6 <sup>b</sup>	15,8 <sup>c</sup>	24,9 <sup>a</sup>	0,012	<0,001	0,077
C18:2 $\omega$ -6	17,7	27,4	18,9	31,8	0,049	<0,001	0,229
C18:2 <i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15	0,15	1,04	0,12	1,18	0,430	<0,001	0,268
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	0,11	0,03	0,07	0,004	0,175	0,005	0,693
CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0,14	0,47	0,17	0,60	0,022	<0,001	0,128
C18:3 $\omega$ -3	3,53 <sup>c</sup>	5,11 <sup>b</sup>	4,97 <sup>b</sup>	7,92 <sup>a</sup>	<0,001	<0,001	0,064

<sup>a,b</sup> Tetras diferentes na linha indicam valores diferentes (P<0,05); Fonte: Fuentes *et al.* (2009)

#### 4.3.2. Protozoários

Sabe-se que a defaunação da digesta não impede a ocorrência da BH ruminal (Dawson e Kemp, 1969 citados por Jenkins *et al.*, 2008), sugerindo, então, contribuição limitada dos protozoários nesse processo. No entanto, a maior parte da biomassa e, aproximadamente, três quartos dos AG de origem microbiana presentes no rúmen advêm dos protozoários (Williams e Coleman, 1992). Nos protozoários, esses lípides são consideravelmente – duas a três vezes – mais insaturados, em comparação com aqueles presentes nas bactérias (Figura 7) (Devillard *et al.*, 2006).

Or-Rashid *et al.* (2007) estudaram a composição de AG de *mix* de bactérias e protozoários que deixavam o abomaso de vacas alimentadas com silagem de milho e feno de alfafa sem suplementação lipídica e observaram que as concentrações de AG na estrutura dos protozoários eram expressivamente mais ricas em AGPI (P = 0,001), CLA (P = 0,003) e ácido vacênico (P = 0,001) (Tabela 6). Os resultados sugerem que esses microrganismos possuem papel importante na definição dos AG incorporados à carne e ao leite desses animais.



**Figura 7.** Perfil dos principais AG insaturados presentes na composição de bactérias e de protozoários ruminais isolados 1 e 6 horas após a ingestão de alimentos. Adaptado de Devillard *et al.* (2006)

**Tabela 6.** Composição de ácidos graxos C18 (g/100 g de ácidos graxos) de bactérias e protozoários ruminais presentes no abomaso de vacas alimentadas com silagem de milho e feno de alfafa sem suplementação lipídica

Ácido graxo	Bactéria	Protozoário	EPM	P <sup>1</sup>
18:0	42,7	18,9	1,8	0,009
18:1 <i>trans</i> -11	2,046	6,561	0,33	0,001
18:1 <i>trans</i> Totais	3,60	9,66	0,37	0,007
18:1 <i>cis</i> Totais	3,15	8,89	0,46	0,008
18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	1,486	7,125	0,110	<0,001
18:3 ω-3	0,338	1,459	0,052	<0,001
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	0,154	1,324	0,038	0,002
CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0,015	0,022	0,0023	0,01
CLA Total	0,281	1,905	0,065	0,003
Saturados Cadeia Média	37,5	46,1	0,87	0,02
Saturados Cadeia Longa	51,6	23,1	1,5	0,004
Saturados Totais	89,0	69,2	0,92	<0,001
Monoinsaturados Totais	8,31	19,1	0,71	0,001
Poli-insaturados ω-6 Totais	1,90	7,47	0,12	<0,001
Poli-insaturados ω-3 Totais	0,44	1,53	0,046	<0,001

<sup>1</sup> significância. Adaptado de: Or-Rashid *et al.* (2007)

Diferentes espécies de protozoários ciliados apresentam distintas composições de AG. Em espécies maiores, como as fibrolíticas ciliadas *Ophryoscolex caudatus* e *Epidinium ecaudatum caudatum*, as concentrações de CLA e ácido vacênico são, aproximadamente, dez vezes maiores em comparação com aquelas observadas em algumas espécies de menor tamanho, como as *Entodinium nanellum* (Devillard *et al.*, 2006; Jenkins *et al.*, 2008).

Apesar de serem ricos em CLA, ácido vacênico e outros AG insaturados, os protozoários não são capazes de sintetizar esses AG devido à ausência de genes responsáveis pela síntese das enzimas ácido graxo desaturases (Devillard *et al.*, 2006). Descobriu-se mais tarde que tais concentrações de AG explicam-se devido à alta taxa de incorporação de AG advindos da ingestão da parede celular de bactérias, essas sim, sintetizadoras e incorporadoras dos isômeros de CLA, C18:1 *trans* e AG insaturados (Jenkins *et al.*, 2008).

Yanez-Ruiz *et al.* (2006) avaliaram o fluxo duodenal em novilhas e observaram que entre 12 e 15% dos lípides microbianos, entre 30 e 43% do CLA (*cis*-9 *trans*-11 e *trans*-10 *cis*-12) e 40% do ácido vacênico C18:1 *trans*-11 eram originados de protozoários. Tais observações comprovam que, apesar de não serem

capazes de sintetizar tais AG, os protozoários possuem papel fundamental na sua disponibilização para os animais hospedeiros.

### 4.3.3. Fungos

Os fungos anaeróbios, por serem numericamente inferiores e metabolicamente menos ativos que as bactérias, apresentam pouca influência sobre o processo de metabolismo de AG. No entanto, eles podem contribuir para o metabolismo lipídico no rúmen devido à capacidade de síntese da enzima  $\Delta^9$ -desaturase, também conhecida por estearoil-CoA desaturase, por algumas espécies (por exemplo, *Piromyces communis*), utilizando ácidos esteárico e vacênico como substratos para a síntese de ácido oleico C18:1 *cis*-9 e CLA *cis*-9 *trans*-11, respectivamente (Nam e Garnsworthy, 2007).

## 5. Modos de fornecimento da dieta

De modo geral, os principais métodos de fornecimento dos alimentos em sistemas de produção de bovinos leiteiros restringem-se ao método de pastejo, cujo fornecimento do concentrado é feito de forma fracionada ou única no dia, ou por meio do sistema de mistura total. O termo mistura total, derivado do inglês *Total Mixed Ration* (TMR), designa a mistura constituída de alimentos volumosos e ingredientes concentrados que são fornecidos ao animal em uma mistura única e homogênea.

Esse modo de fornecimento de dieta tem por objetivos principais assegurar o consumo balanceado de nutrientes a fim de suprir requerimentos nutricionais específicos; impedir o desbalanceamento da dieta devido à seleção dos ingredientes; permitir maior estabilidade do ambiente ruminal, principalmente relacionada à menor variação do pH, já que o consumo de concentrados é sempre acompanhado da ingestão de alimentos volumosos; reduzir a incidência de distúrbios digestivos e metabólicos; facilitar o fornecimento da dieta em regimes de confinamento; e reduzir a competição entre animais (Coppock *et al.*, 1981; Assis, 1997).

Em sistemas de produção de leite no Brasil, é mais comum que ocorra a ingestão do volumoso por meio de pastejo, e o fornecimento da suplementação energético-proteica em cochos no momento ou imediatamente após as ordenhas (uma ou duas) (Costa *et al.*, 2003). Entretanto, esse modo de fornecimento de dieta tende a causar impactos negativos no ambiente ruminal, induzindo à mudanças não-desejáveis nas rotas de bio-hidrogenação ruminal e, conseqüentemente, nas concentrações de AG intermediários (Dewhurst *et al.*, 2006).

Assim, imagina-se que a mistura total e o fornecimento fracionado do concentrado ajam de maneiras distintas no meio ambiente ruminal e, por consequência, nas rotas de BH ruminal e sobre os AG secretados pela glândula mamária.

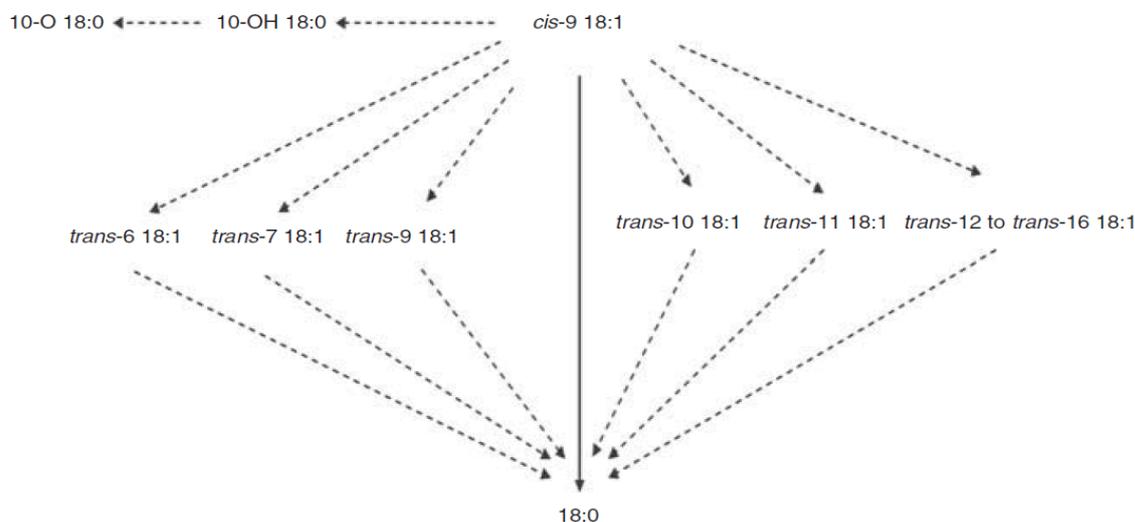
## 6. Produtos intermediários da bio-hidrogenação ruminal

A busca em estabelecer as rotas bioquímicas secundárias da BH ruminal tem recebido atenção especial do meio científico nos últimos anos. Estudos *in vivo* da digesta de caprinos e bovinos têm revelado extensa gama de isômeros de CLA e C18:1 *trans* anteriormente desconhecida, e sugerem que muitas outras rotas de intermediários ainda necessitam ser estudadas. Os itens a seguir – 6.1 a 6.4 – apresentam as últimas descobertas relativas aos AG intermediários da BH dos ácidos oleico, vacênico, linoleico e linolênico.

### 6.1. Ácido oleico

A BH do ácido oleico é frequentemente apresentada como um passo único e direto para a formação do ácido esteárico, sem que haja qualquer intermediário. No entanto, Jenkins *et al.* (2006) mostraram que é muito comum a ocorrência de isomerização *cis* ou *trans* (*cis/trans*) desse AG, influenciada pela presença de diferentes espécies de bactérias no ambiente ruminal. Esses autores propuseram que a rota de BH do ácido oleico pode ocorrer tanto diretamente para o ácido esteárico como para formar AG intermediários com cadeias oxigenadas (10-OH 18:0 e 10-O 18:0) e com duplas ligações entre os carbonos 6 e 16 da cadeia carbônica (Figura 8). Essa teoria é reforçada pelo fato de que vacas leiteiras alimentadas com dietas ricas em ácido oleico tendem a secretar leite com maiores teores de AG C18:1 *trans* (Selner e Schultz, 1980).

Segundo Doreau *et al.* (2009), estudos *in vitro* indicam que o grau de BH ruminal do ácido oleico é inferior ao dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico (Tópico 4.2), variando entre 58 e 87%.



**Figura 8.** Rotas metabólicas de bio-hidrogenação do ácido oleico. Fonte: Shingfield *et al.* (2010).

Algumas espécies de bactérias são capazes de alterar a configuração *cis* dos seus AG de membrana para a configuração *trans*. Elas lançam mão desse engenhoso artifício com o objetivo de reduzirem a permeabilidade das suas membranas celulares agindo, assim, como dispositivo de proteção contra substâncias inibidoras do crescimento ou outras injúrias externas (Okuyama *et al.*, 1991 citados por Jenkins *et al.*, 2008).

Kemp *et al.* (1975) observaram que algumas bactérias do gênero *Fusocillus* eram capazes de converter ácido oleico a C18:1 *trans*. Esta conversão foi estudada mais recentemente por Mosley *et al.* (2006), usando ácido oleico marcado com  $^{13}\text{C}$  incubado *in vitro* em culturas de bactérias ruminais. A incubação resultou na detecção do  $^{13}\text{C}$  tanto em moléculas de ácido esteárico como em vários tipos de isômeros C18:1 *trans* com duplas ligações entre os carbonos 6 a 16.

Estudos adicionais demonstraram que a isomerização do ácido oleico pode ser drasticamente alterada pelas condições ruminais. Abu-Ghazaleh *et al.* (2005) verificaram que tanto a redução do pH – de 6,5 para 5,5 – como o incremento na taxa de passagem da fase líquida – de 5 para 10% - de um meio de cultura de fluxo contínuo inibiram a formação de duplas ligações em posições inferiores ao do carbono 10.

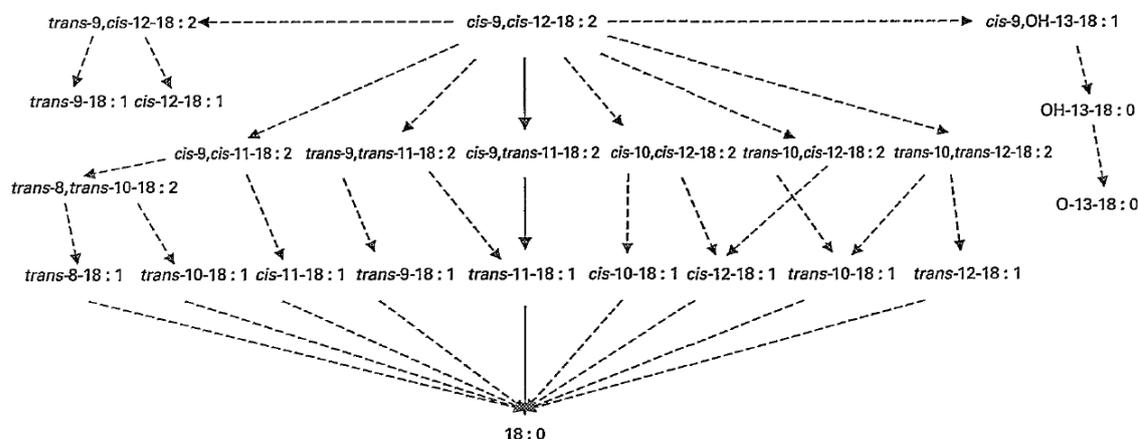
## 6.2. Ácido vacênico

Durante o processo de BH do ácido vacênico, o principal AG C18:1 *trans* encontrado no rúmen, ocorre a formação de diversos isômeros intermediários *cis/trans* da mesma forma que se dá com o ácido oleico (Laverroux *et al.*, 2011). Esses autores coletaram líquido de rúmen de animais adaptados com duas dietas: rica em grãos (40% de volumoso + 60% de concentrado); e rica em volumoso (100% de volumoso). Ao líquido ruminal foi adicionado ácido vacênico marcado com  $^{13}\text{C}$  e, após 0, 5 e 24 horas de incubação *in vitro*, quantificou-se a síntese de AG contendo esse isótopo na cadeia carbônica. Os autores encontraram  $^{13}\text{C}$  não só no ácido esteárico, mas em todos os isômeros C18:1 *cis* e *trans* identificados em cromatografia gasosa (*cis*-7 a *cis*-14 e *trans*-6 a *trans*-16). Desde as 5 h pós-incubação já foi possível verificar intensa taxa de isomerização. As quantidades de  $^{13}\text{C}$  encontradas nas cadeias carbônicas mostraram que 95% do ácido vacênico adicionado nas culturas foi saturado durante as primeiras 5 horas de incubação em líquido ruminal vindo da dieta rica em grão, contra 78% daquele originado da dieta rica em volumoso, não havendo diferença entre tratamentos após 24 horas de incubação.

Os resultados sugerem que o incremento da relação volumoso:concentrado permite elevar a taxa de isomerização e reduzir a de saturação do ácido vacênico, permitindo, assim, a formação de variada gama de isômeros *cis/trans*.

### 6.3. Ácido linoleico

O conhecimento sobre as rotas de hidrogenação do ácido linoleico permaneceu inalterado até bem recentemente. Ainda em 2007, Ribeiro *et al.* propuseram que a conversão desse AG em ácido esteárico produzia apenas dois intermediários – CLA *cis-9 trans-11* e C18:1 *trans-11*. No entanto, hoje já se sabe que existe uma vasta gama de intermediários do ácido linoleico no conteúdo ruminal e, conseqüentemente, na carne e no leite de ruminantes (Shingfield *et al.*, 2010) (Figura 9).



**Figura 9.** Rotas metabólicas de bio-hidrogenação do ácido linoleico. Fonte: Shingfield *et al.* (2010).

Vários estudos *in vivo* e *in situ* relataram a existência de isômeros de CLA com duplas ligações variando entre C7 e C9 a C12 e C14 (Tabela 7). Na maioria dos trabalhos, o isômero *cis-9 trans-11* foi o mais prevalente no conteúdo ruminal de bovinos, sendo o único passível de identificação por meio das antigas técnicas de análise cromatográfica. A disponibilização de colunas mais longas – 100 m ou mais – para o cromatógrafo gasoso, somado a novas técnicas de espectroscopia de massa tornou possível a separação e a identificação de isômeros de CLA secundários (Jenkins *et al.*, 2008).

**Tabela 7.** Referências de trabalhos que identificaram isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA) no conteúdo ruminal, de acordo com a posição e a geometria das duplas ligações. Adaptado de Jenkins *et al.* (2008)

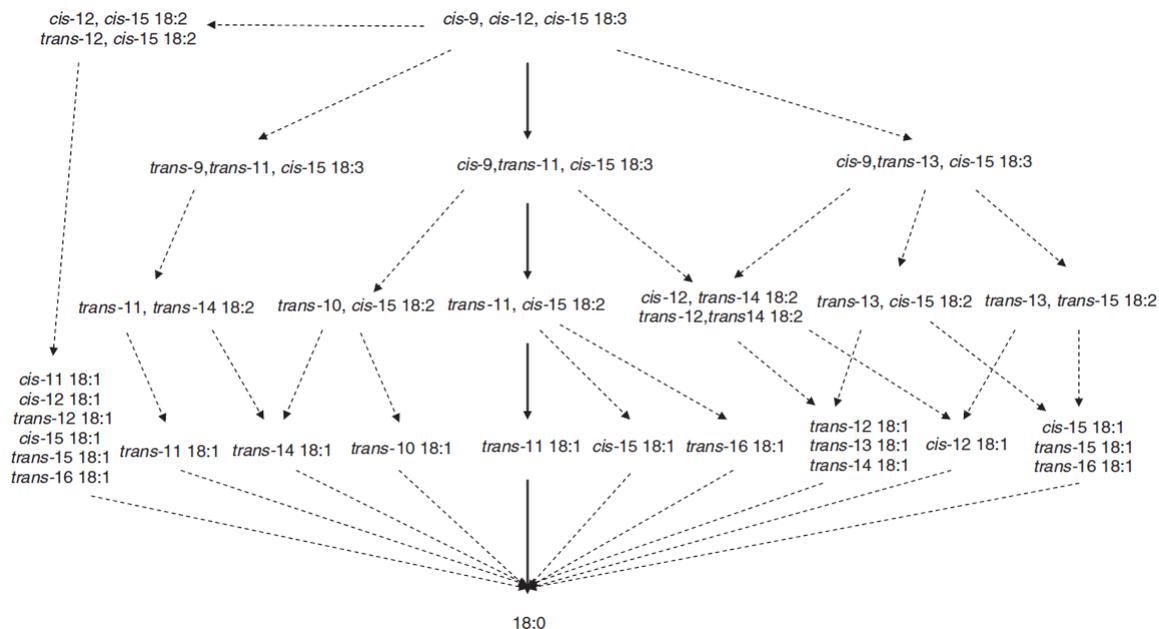
Posição das insaturações	<i>cis / cis</i>	<i>cis / trans</i>	<i>trans / cis</i>	<i>trans / trans</i>
7, 9			a	a b
8, 10			a e	a b d
9, 11	c d e	a b c d	e	a b d
10, 12		e	a b c d e	a b d
11, 13	d	a b d e	a b e	a b c d e
12, 14		b		

a = Piperova *et al.* (2002); b = Shingfield *et al.* (2003); c = Loor *et al.* (2002a); d = Duckett *et al.* (2002); e = Loor *et al.* (2004).

O isômero de CLA *trans-10 cis-12* vem chamando a atenção nos últimos tempos tanto por sua concentração como pela ação sobre a fisiologia da fêmea ruminante em lactação. Kim *et al.* (2002) e Ando *et al.* (2004) demonstraram que algumas linhagens de bactérias *Megasphaera*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* eram capazes de produzir quantidades significativas desse isômero. Esses gêneros ocorrem no rúmen em baixas concentrações e, principalmente, sob condição de baixo pH ruminal. Isso explica a origem das rotas metabólicas apresentadas anteriormente na Figura 5.

### 6.4. Ácido linolênico

Poucos estudos se dispuseram a analisar os isômeros do ácido linolênico presentes no conteúdo ruminal, dificultando, assim, a descoberta de novos intermediários e a expansão do conhecimento das possíveis rotas de BH (Jenkins *et al.*, 2008). A recente descoberta da existência de inúmeros intermediários C18:1, C18:2 e C18:3 originados da BH do ácido  $\alpha$ -linolênico (sumarizada na Figura 10) indica que as rotas metabólicas sugeridas atualmente para descrever a BH apresentam, na verdade, apenas uma pequena fração de todos os intermediários que realmente são formados no rúmen (Shingfield *et al.*, 2010).



**Figura 10.** Rotas metabólicas de bio-hidrogenação do ácido α-linolênico. Fonte: Shingfield *et al.* (2010).

Estudando o fluxo duodenal de vacas em lactação alimentadas com dietas convencionais, Loor *et al.* (2004) observaram a presença dos isômeros C18:3 *cis-9 trans-12 cis-15*, *cis-9 trans-12 trans-15* e *trans-9 trans-12 trans-15*. Ao adicionarem óleo de linhaça – importante fonte de ácido α-linolênico - na dieta, esses autores reportaram aumento ( $P < 0,05$ ) considerável (+45%) na concentração desses três AG.

Destailats *et al.* (2005) observaram que dois AG linolênicos conjugados (C18:3 *cis-9 trans-11 cis-15* e C18:3 *cis-9 trans-13 cis-15*) estavam presentes em concentrações razoáveis (0,3%) em todas as amostras de gordura do leite de vacas por eles analisadas. Os autores propuseram que ambos os isômeros seriam os intermediários iniciais da BH do ácido linolênico e que seriam subsequentemente reduzidos a dois dienos não conjugados (C18:2 *trans-11 cis-15* e C18:2 *cis-9 trans-13*) e dois dienos conjugados (CLA *cis-9 trans-11* e CLA *trans-13 cis-15*).

Nessa mesma linha de pesquisa, Wasowska *et al.* (2006) apresentaram rota alternativa de BH do ácido linolênico onde, segundo eles, somente seria possível a formação de dois isômeros C18:3 (*cis-9 trans-11 cis-15* e *trans-9 trans-11 cis-15*) e um C18:2 não conjugado (*trans-11 cis-15*), mas não seria possível a formação de C18:2 conjugados.

Mais recentemente, essa teoria foi questionada por Lee e Jenkins (2011). Os autores adicionaram ácido α-linolênico (C18:3 *cis-9 cis-12 cis-15*) marcado com o isótopo  $^{13}\text{C}$  em amostras de líquido ruminal (pH 6,5) e avaliaram a velocidade de desaparecimento desse AG e a formação de novos AG contendo esse isótopo na cadeia carbônica. Após 48 h de incubação *in vitro*, observaram aumento na concentração de oito isômeros de CLA contendo  $^{13}\text{C}$ . Os isômeros de CLA com maiores elevações na concentração foram o CLA *cis-12 cis-10*; CLA *cis-9 cis-11* e CLA *trans-8 trans-10*, com elevações de 21,7%; 20,1% e 21,1%, respectivamente. Os cinco isômeros restantes, incluindo o CLA *cis-9 trans-11*, apresentaram elevação média de 15% nas suas concentrações. Observou-se também aumento na concentração de grande variedade de AG C18:2 e C18:3 não conjugados e parcialmente conjugados.

Diante da complexidade e das incertezas observadas, percebe-se que ainda há muito que se pesquisar sobre as rotas da BH do ácido linolênico no rúmen.

## 7. Síntese de novo de ácidos graxos nos ruminantes

Em condições aeróbias, as células eucarióticas dos organismos multicelulares oxidam as suas fontes orgânicas de energia a  $\text{CO}_2$  e água. Essa fase aeróbia do catabolismo energético celular é conhecida como respiração celular. A respiração celular é dividida em três estágios: Glicólise, Ciclo do Ácido Cítrico (CAC ou Ciclo de *Krebs*) e Fosforilação Oxidativa (Nelson e Cox, 2004).

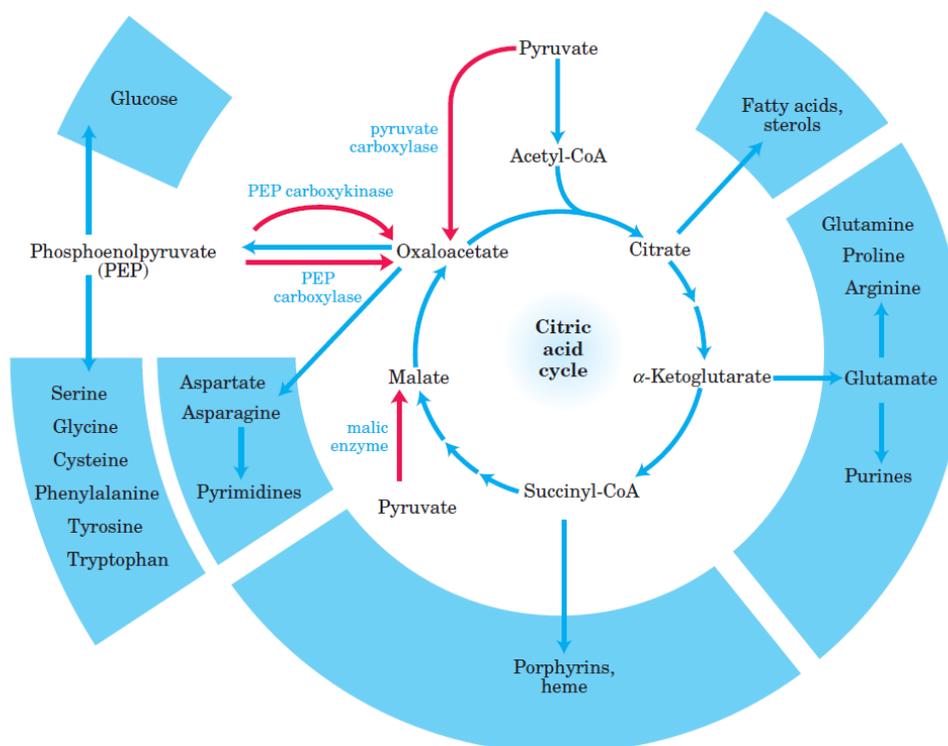
Durante a glicólise, que ocorre no citosol celular, as moléculas de glicose são oxidadas, produzindo fragmentos de três carbonos na forma de Piruvato. Uma vez que o Piruvato atravessa a parede mitocondrial, é convertido em Acetil-CoA. Na matriz mitocondrial, dependendo do *status* fisiológico ou da espécie animal, alguns aminoácidos (AA), AG e, no caso específico dos ruminantes, o ácido graxo volátil (AGV) acetato também pode ser convertido a Acetil-CoA e encaminhado para o primeiro passo do CAC (Nelson e Cox, 2004).

O CAC é a rota final comum da oxidação aeróbia dos CHO, lipídeos e proteínas, já que a glicose, os AG e a maioria dos AA são metabolizados a Acetil-CoA ou alguma outra molécula intermediária do ciclo. Ele também exerce papel central na gliconeogênese, lipogênese e na interconversão de AA (Nelson e Cox, 2004).

Durante o CAC, as moléculas de Acetil-CoA são oxidadas produzindo CO<sub>2</sub> e energia. A energia liberada pela oxidação é conservada na redução de três moléculas de NAD<sup>+</sup>, um FAD e na produção de um ATP. Apesar de o ciclo gerar diretamente apenas um ATP por giro, as quatro oxidações são capazes de gerar elevado fluxo de elétrons na cadeia respiratória via NADH e FADH<sub>2</sub> (Nelson e Cox, 2004).

No terceiro e último estágio da respiração celular, essas coenzimas são também oxidadas, gerando prótons (H<sup>+</sup>) e liberando elétrons. Estes são transferidos para moléculas de O<sub>2</sub> em um complexo conjunto de reações químicas entre moléculas eletrocarreadoras, chamado cadeia respiratória. Durante as transferências de elétrons, grande quantidade de energia é liberada e conservada na forma de ATP, que é utilizado, então, no trabalho celular (Nelson e Cox, 2004).

Nas células dos organismos aeróbios, o CAC pode agir tanto de forma catabólica, degradando moléculas orgânicas para a síntese de energia (ATP, GTP, NADH ou FADH<sub>2</sub>), quanto anabólica, sintetizando compostos necessários para as reações bioquímicas dos diversos tecidos. A esses caminhos bioquímicos alternativos não usuais é dado o nome de Reações Anapleróticas (Figura 11).



**Figura 11.** Papel do Ciclo do Ácido Cítrico no anabolismo celular. Fonte: Nelson e Cox (2004)

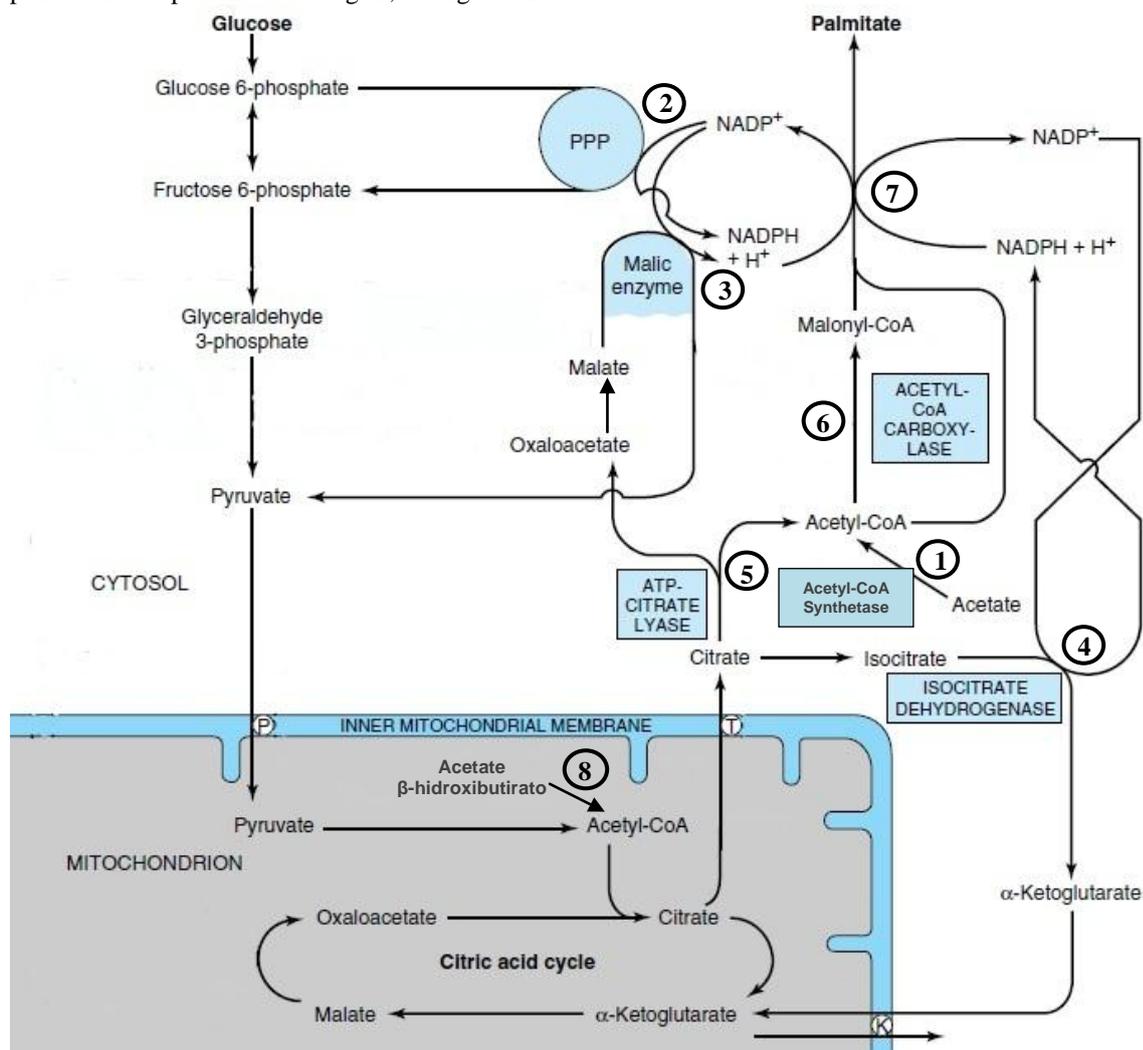
Além do importante papel no catabolismo oxidativo dos CHO, AG e AA, o ciclo gera precursores para diversas outras rotas metabólicas. O  $\alpha$ -cetoglutarato e o Oxaloacetato produzidos durante o CAC podem, por exemplo, servir de precursores para a síntese dos AA aspartato e glutamina por transaminação simples. Já o citrato, sintetizado no início do giro, pode originar tanto energia, na forma de NADPH, quanto Acetil-CoA na matriz citoplasmática, estando ambos presentes no processo de síntese *de novo* e na elongação da cadeia carbônica dos AG no citoplasma celular (Nelson e Cox, 2004).

O termo *síntese de novo* caracteriza o processo de síntese de novas moléculas a partir de precursores advindos do sangue. No caso dos AG, caracteriza a síntese de cadeias carbônicas pequenas e médias – menores ou iguais a 16 carbonos – a partir de moléculas altamente energéticas, como os AA, os CHO, os AGVs ou, até mesmo, outros AG.

O leite dos ruminantes normalmente contém entre 3 e 5 % de gordura total, dependendo de uma série de fatores como nutrição, estágio de lactação e genótipo (Chilliard *et al.*, 2003a). A gordura láctea é composta basicamente por triglicerídeos (TG) – entre 96 e 98% - sendo os AG de cadeia de 4 a 18 carbonos, os mais abundantes (Jensen, 2002). Os AG incorporados aos TG são derivados de duas fontes principais: captação de AG pré-formados originados da circulação periférica; e *síntese de novo* de AG nas células secretoras da glândula mamária. A *síntese de novo* de AG nos bovinos participa com, aproximadamente, 60% (em base molar) ou 40% (em peso) do total de AG secretados no leite (Bauman e Davis, 1974, citados por Shingfield *et al.*, 2010).

Nas fêmeas em lactação, a glândula mamária torna-se o principal local de síntese de AG, ultrapassando até mesmo o tecido adiposo e o fígado (Baticz *et al.*, 2002). No tecido mamário das fêmeas ruminantes, o acetato é o principal precursor de AG, agindo tanto como fonte de carbono quanto como de energia para realização das reações químicas. Essa é uma estratégia interessante, já que os ruminantes são naturalmente hipoglicêmicos. A pouca glicose produzida durante a digestão pode ser poupada e utilizada em outras rotas metabólicas, como a síntese de lactose, por exemplo.

As células do epitélio mamário sintetizam os AG de cadeia curta e média usando, basicamente, o acetato e o  $\beta$ -hidroxibutirato como substratos. Os AG sintetizados *de novo* respondem por todo os C4 a C12, 95% dos C14 e, aproximadamente, 50% dos C16:0 secretados no leite, enquanto que todo AG com cadeia carbônica igual ou superior a 18 é proveniente da circulação sanguínea (Chilliard *et al.*, 2000). O processo bioquímico responsável pela síntese de AG nas células mamárias como um todo é extremamente complexo, sendo os pontos-chave apresentados a seguir, na Figura 12:



**Figura 12.** Representação esquemática das rotas metabólicas relacionadas à síntese de ácidos graxos no tecido mamário dos ruminantes. Adaptado de Murray *et al.* (2003)

a) Síntese do Acetil-CoA: o acetil-CoA, molécula chave na síntese de AG, pode ser originada diretamente do acetato e do  $\beta$ -hidroxibutirato livre no citoplasma por meio da ação da enzima Acetil-CoA Sintetase (passo 1 da Figura 12), ou a partir da lise do citrato pela ação da ATP Citrato Liase (passo 5 da Figura 12). O primeiro caminho é a principal fonte de C para os AG.

b) Formação da Malonil-CoA a partir da Acetil-CoA: a conversão do acetato a malonil-CoA, catabolizada pela enzima Acetil-CoA Carboxilase, é um processo irreversível (passo 6 da Figura 12). Essa reação é considerada o principal ponto de regulação da lipogênese.

c) O complexo Ácido Graxo Sintase (AGS) recebe os grupos Acetil e Malonil: as cadeias de carbono dos AG são montadas em um processo cíclico repetitivo pela ação do complexo enzimático AGS, que acrescenta dois carbonos – vindos do grupo malonil – a um acetil originado do Acetato ou do  $\beta$ -hidroxibutirato em cada ciclo. Esse fato explica porque toda gordura sintetizada na glândula mamária dos ruminantes tem cadeia carbônica par.

d) O complexo AGS libera o AG recém-formado: quando a cadeia chega a 16 carbonos (Palmitato) o AG deixa o ciclo pela ação da Tioesterase ou Deacilase – uma das sete enzimas que compõem o complexo AGS. Na glândula mamária, existem vários tipos de Tioesterases, sendo que cada uma é responsável por liberar o AG com determinado comprimento de cadeia – C8, C10 ou C12 (Nelson e Cox, 2004).

### 7.1. Fontes de carbono utilizadas na síntese de ácidos graxos

O acetato, principal produto da digestão microbiana no rúmen, pode seguir dois caminhos no processo de síntese dos AG: entrar passivamente no citosol e lá sofrer a ação da enzima Acetil-CoA Sintetase (passo 1 da Figura 12), para que seja convertido diretamente a acetil-CoA; ou entrar na mitocôndria para depois ser oxidado a acetil-CoA (passo 8 da Figura 12). Como as paredes mitocondriais são impermeáveis ao Acetil-CoA, torna-se necessária sua conversão ao citrato para posterior reação com a ATP Citrato Liase (passo 5 da Figura 12) e retorno à forma de acetil.

Para Bauman e Davis (1974), a utilização de glicose e acetato mitocondrial como fontes de carbono para o esqueleto dos AG recém-sintetizados parece ser restrito em ruminantes devido a, pelo menos, dois fatores: a atividade da Piruvato Desidrogenase (enzima responsável pela conversão do piruvato a Acetil-CoA) é extremamente baixa nos tecidos dos ruminantes; e a atividade da ATP-Citrato Liase, responsável pela clivagem do citrato a acetil-CoA no citosol, é muito baixa no tecido mamário dos ruminantes. Assim, o citrato, advindo tanto da glicose quanto do acetato intramitocondrial, não seria fornecedor de carbono em quantidades significativas.

Smith e Prior (1986), comparando a lipogênese no tecido adiposo de ovinos e bovinos, relataram, assim como Bauman e Davis (1974), que a baixa atividade da ATP-Citrato Liase realmente limitaria a síntese de AG nos ovinos, mas que seria improvável que essa enzima também agisse como limitante nos tecidos dos bovinos. Assim, os dados indicariam que o argumento proposto por Bauman e Davis (1974) não seria válido para ambas as espécies. Tal fato pode ser confirmado pelos dados apresentados na Tabela 8, publicada por Hanson e Ballard (1967), que sugerem que a ação da ATP Citrato Liase nos bovinos é muito superior à dos ovinos, não permitindo, então, generalizações entre espécies.

**Tabela 8.** Atividade das enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos ( $\mu$ moles/min/g de tecido)

Enzima	Reação	Animais		
		Cobaias	Ovinos	Bovinos
ATP-Citrato Liase	citrato→acetil-CoA	53	9	24
Malato Desidrogenase	malato→piruvato	323	67	63
Acetil-CoA Sintetase	acetato→acetil-CoA	39	125	75

Adaptado de Hanson e Ballard (1967)

Os dados da Tabela 8 também sugerem que tanto o acetato – ou o  $\beta$ -hidroxibutirato – intramitocondrial, substrato para enzima a ATP-Citrato liase, quanto o acetato citoplasmático, substrato para a Acetil-CoA Sintetase, são fontes importantes de carbono para a síntese de AG nos bovinos.

## 7.2. Fontes de energia utilizadas na síntese de ácidos graxos

A síntese de AG requer quantidades significativas de energia que, na sua maioria, vem na forma de NADPH originado do citoplasma. Teoricamente, são necessárias 14 moléculas de NADPH – o equivalente a 35 ATP – para que ocorra a síntese de uma molécula de ácido palmítico (palmitato). Suas principais fontes no tecido mamário são a descarboxilação oxidativa da glicose-6-fosfato no Ciclo das Pentoses ou Pentose Fosfato (passo 2 da Figura 12); a descarboxilação oxidativa do malato, catalisada pela Malato Desidrogenase (passo 3 da Figura 12); e a descarboxilação oxidativa do isocitrato citoplasmático, catalisada pelo ciclo da Isocitrato Desidrogenase (passo 4 da Figura 12) (Murray *et al.* (2003).

A contribuição de energia que cada um desses ciclos oferece para a ocorrência da síntese de AG nas células dos bovinos ainda é controversa. Smith *et al.* (1983) propuseram que de 33 a 43% do NADPH utilizado na síntese de AG a partir do acetato na glândula mamária de vacas seria originado no ciclo das pentoses, de 36 a 60% da Isocitrato Desidrogenase e uma pequena fração pela Malato Desidrogenase. Já Smith e Prior (1986) estimaram entre 51 a 67% originado do ciclo das pentoses, sendo o restante fornecido pelas outras vias em proporções não conhecidas.

Deve-se então ter em mente que a ação da enzima malato desidrogenase pouco contribui para a lipogênese e que o ciclo das pentoses e o ciclo da isocitrato desidrogenase são as duas principais fontes de energia para a ocorrência desse processo.

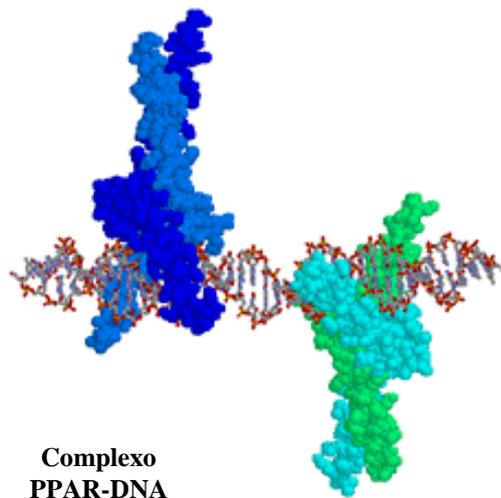
## 8. Controle da lipogênese mamária

Durante o fornecimento de uma dieta redutora do pH ruminal para vacas em lactação (relação volumoso:concentrado de 25:70, mais adição de 5% de óleo de soja), Piperova *et al.* (2000) observaram que a secreção de gordura no leite reduzia drasticamente (-42,9% em relação ao teor,  $P < 0,001$ ; e -43,3% em relação à produção diária,  $P < 0,001$ ). Numa análise mais detalhada, os autores verificaram que houve comprometimento na atividade das enzimas mamárias Acetil-CoA Carboxilase (-62%,  $P < 0,001$ ), responsável pela conversão do Acetil-CoA a Malonil-CoA (passo 6 da Figura 12); e AGS (-44%,  $P < 0,001$ ), responsável pela utilização do Malonil-CoA na elongação da cadeia carbônica da molécula de AG (passo 7 da Figura 12). Em suas conclusões, os autores sugeriram que AG intermediários, sintetizados durante a BH ruminal parcial, em pH reduzido, em especial o isômero CLA *trans*-10 *cis*-12, seria o responsável pela redução das atividades das referidas enzimas.

Essa teoria foi amplamente discutida em diversos experimentos posteriores (Baumgard *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2002; de Veth *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Rudolph *et al.*, 2005; Sampath e Ntambi, 2005; Harvatine *et al.*, 2006). Outros estudos a esse respeito sugeriram que outros AG, além do CLA *trans*-10 *cis*-12, também seriam capazes de reduzir a lipogênese por meio da inibição da transcrição de enzimas e proteínas. Entre os já identificados inclui-se o CLA *trans*-9 *cis*-11 (Perfield *et al.*, 2007).

A síntese *de novo* de gordura na glândula mamária pode ser regulada nos seguintes momentos: durante a transcrição do DNA para a síntese de RNAm; durante a tradução do RNAm no processo de síntese de enzimas; ou diretamente sobre a atividade enzimática (Baumgard *et al.*, 2002). A regulação da síntese lipídica e o papel dos AGPI nessa regulação têm sido extensivamente estudados em roedores e em culturas celulares, especialmente hepatócitos (Sampath e Ntambi, 2005). Esses modelos animais permitem estudar de forma eficiente o modo como os produtos intermediários da BH ruminal regulam a síntese de gordura.

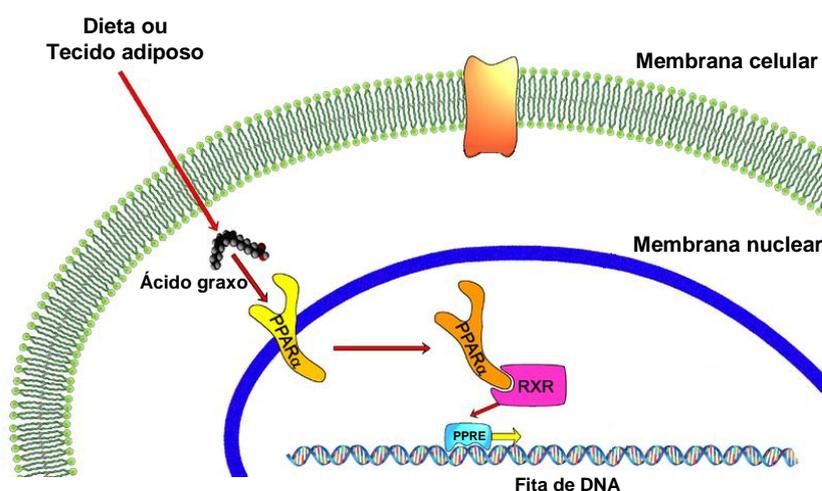
Apesar de fatores diversos interagirem durante a lipogênese nos tecidos, a expressão de enzimas-chave e de proteínas específicas desse processo é regulada por poucos e bem caracterizados “fatores de transcrição”. Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam a um local específico da fita de DNA, a fim de controlar a taxa de transcrição (leitura da fita de DNA para formação do RNAm) de determinados genes (Figura 13). Esse controle ocorre no momento do recrutamento das RNA polimerases, que são as enzimas responsáveis pela transcrição da informação genética do DNA para a forma de RNA. Os fatores de transcrição podem agir como estimuladores, inibidores ou bloqueadores desse processo (Lee e Young, 2000).



**Figura 13.** Domínio de ligação DNA-PPAR: interação responsável pela regulação da transcrição do segmento de DNA. Fonte: <http://www.rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/cholesterol.htm>

A maior parte dos AGPI, incluindo-se os isômeros de CLA, tem a capacidade de agir em determinados tecidos, ativando alguns fatores de transcrição, conhecidos como PPAR, do inglês *Peroxisome Proliferator Activated Receptors*. São esses PPAR, na sua forma ativada (coativador 1), que se ligam a genes específicos da fita de DNA, fazendo com que sua transcrição seja regulada positiva ou negativamente (Desvergne e Wahli, 1999).

De forma mais detalhada, o mecanismo de regulação gênica ocorre quando os AG advindos da dieta ou da mobilização das reservas lipídicas, se interiorizam nas células e se ligam aos subtipos ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) correspondentes de PPAR localizados na membrana nuclear. Em seguida, os PPAR na sua forma ativada (coativador 1) se ligam a derivados do ácido retinoico chamados RXR (*Retinoid X Receptor*), formando um heterodímero que se une a um PPRE no DNA. Os PPREs, do inglês *Peroxisome Proliferator Responsive Element*, são regiões específicas da fita de DNA, sendo alvos da ação e, conseqüentemente, da regulação dos PPAR (Figura 14) (Benjamin e Spener, 2009).



**Figura 14.** Mecanismo de regulação da transcrição gênica mediado por ácidos graxos poli-insaturados originados da dieta ou das reservas adiposas. Adaptado de Benjamin e Spener (2009)

Assim, os AGPI e os isômeros de CLA podem afetar a transcrição de uma grande variedade de genes envolvidos na síntese de enzimas responsáveis pela regulação de diversos processos metabólicos, imunológicos ou inflamatórios (Benjamin e Spener, 2009).

Dentre as rotas metabólicas reconhecidas influenciadas pelos AGPI e pelo CLA, incluem-se a síntese das enzimas MEK (*Mitogen-activated protein kinase*) e ERK (*extracellular signal-related kinase*), responsáveis pela sinalização autócrina/parácrina para ação das interleucinas-6 e -8 responsáveis pela delipidação (mobilização dos AG) dos adipócitos (Brown *et al.*, 2004). Outras transcrições influenciadas são as responsáveis pela síntese dos HNF-4 $\alpha$  (*Hepatocyte Nuclear Factor*), de alguns receptores hepáticos, e dos fatores transcricionais presentes na glândula mamária conhecidos por SREBP (Sampath e Ntambi, 2005).

Baumgard *et al.* (2002) propuseram que as proteínas conhecidas por *sterol response element-binding protein 1* (SREBP1) teriam papel de destaque entre os reguladores da síntese lipídica. Tal proposição foi baseada na observação das ações regulatórias do metabolismo lipídico, desempenhadas pelo grupo de fatores de transcrição do qual o SREBP1 faz parte. Essa proteína é expressa em duas formas distintas: SREBP1a, envolvida predominantemente na regulação do metabolismo do colesterol, e SREBP1c, responsável pela regulação da síntese de AG em geral.

Moon *et al.* (2002) observaram, em culturas de células bovinas e de roedores, que a SREBP1c ativada por certos AGPI inibia a transcrição de alguns genes bastante ativos nesse tipo de célula. Segundo os autores, essa inibição desencadeava grande parte das respostas antilipogênicas celulares.

As SREBP1c são intensamente sintetizadas nas células mamárias e estão relacionadas à estimulação da transcrição dos genes relacionados à síntese de enzimas lipogênicas como a AGS e a Lipoproteína Lipase, esta última responsável pelo transporte trans-membrana dos AG e triglicerídeos presentes no plasma (Moon *et al.*, 2002).

Peterson *et al.* (2004) foram os primeiros pesquisadores a investigar a ativação da SREBP1 nos tecidos bovinos e observaram reduções significativas na concentração dessa proteína durante infusões do CLA *trans*-10 *cis*-12 em culturas de células do epitélio mamário. Posteriormente, Harvatine *et al.* (2006) observaram redução na síntese de proteínas envolvidas na transcrição e ativação das SREBPs no tecido mamário de vacas submetidas à infusão intra-abomasal do CLA *trans*-10 *cis*-12 ou recebendo dietas ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis.

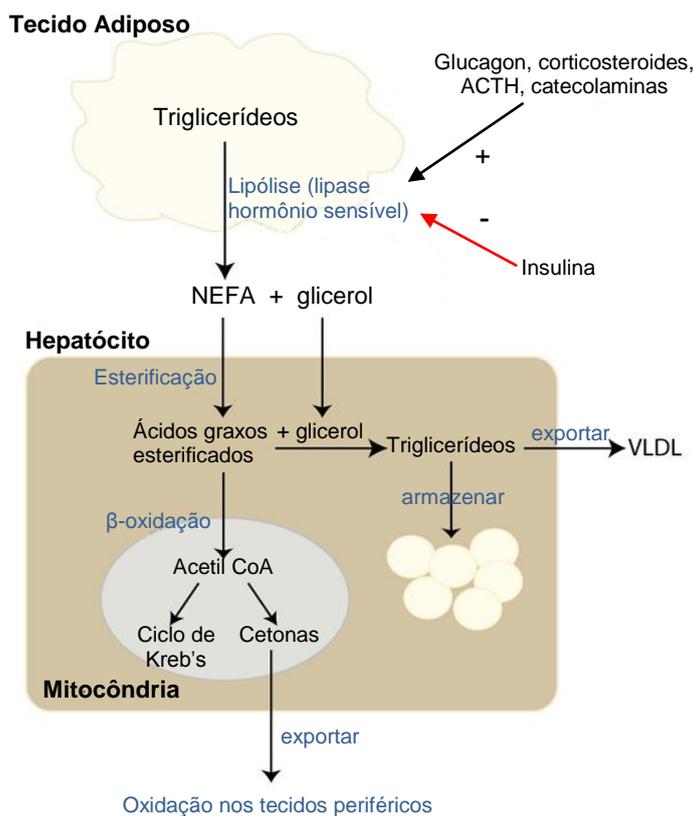
Rudolph *et al.* (2005) observaram que a inativação artificial total do gene responsável pela codificação da SREBP1 resultou em decréscimo de 41% ( $P < 0,05$ ) no teor de gordura do leite. Curiosamente, esse decréscimo é semelhante à redução máxima observada em vacas submetidas à síndrome da baixa gordura do leite.

Observações como essas fornecem fortes evidências de que essa proteína tem papel central na regulação da síntese de AG nas células do epitélio mamário dos bovinos.

## **9. Origem dos ácidos graxos não esterificados (AGNE) do plasma sanguíneo**

Em períodos de *deficit* energético, os bovinos hidrolisam – via lipólise – os triglicerídeos (TG) armazenados no tecido adiposo a fim de utilizar os ácidos graxos não-esterificados (AGNE) resultantes dessa reação como fonte alternativa de energia.

Essa reação de hidrólise é catalisada pela enzima Lipase Hormônio-Sensível (*hormone sensitive lipase* - HSL) dando origem a três moléculas de ácidos graxos (AG) e uma de glicerol (Adewuyil *et al.*, 2005). A HSL, sintetizada no citosol dos adipócitos, é estimulada pela presença de hormônios hiperglicêmicos e aceleradores do metabolismo como o glucagon, catecolaminas, ACTH, corticosteroides e GH, e é inibida pela presença da insulina (Figura 15).



**Figura 15.** Esquema simplificado da rota de mobilização das gorduras de reserva e seu metabolismo nos hepatócitos. Fonte: [www.ahdc.vet.cornell.edu](http://www.ahdc.vet.cornell.edu)

As moléculas de AGNE liberadas no plasma, por serem hidrofóbicas, necessitam que se liguem a uma molécula de albumina facilitando, assim, a sua internalização celular. Quando absorvidos pelos hepatócitos, os AGNE são re-esterificados, podendo, então, seguir as duas rotas seguintes (Figura 15):

a) Podem recombinar com o glicerol para formar TG e, em seguida, serem armazenados em lipoproteínas do tipo VLDL para posterior liberação plasmática, ou, se absorvidas em excesso, serem armazenadas nos hepatócitos causando, eventualmente, um quadro clínico conhecido por lipidose ou esteatose hepática.

Estudos sobre o assunto sugerem que os hepatócitos dos ruminantes são pouco eficientes em metabolizar grandes quantidades de AGNE. Isso ocorre principalmente porque essas células não são capazes de sintetizar quantidades suficientes da apolipoproteína de superfície *Apo B100* responsável pela manutenção da integridade estrutural e auxiliadora da captação celular da VLDL (Grummer *et al.*, 1988; Klepper *et al.*, 1988; Pullen *et al.*, 1988).

Pullen *et al.* (1988) demonstraram em estudos *in vitro* que a exportação de triglicerídeos pelos hepatócitos bovinos via VLDL é extremamente baixa, comprovando que esse processo é, de fato, importante na etiologia da esteatose hepática e, conseqüentemente, da cetose.

b) Podem entrar nas mitocôndrias e serem utilizadas na síntese de moléculas energéticas (ATP, GTP, NADH e FADH<sub>2</sub>), necessárias na gliconeogênese, via CAC ou na síntese de corpos cetônicos como a acetona, acetoacetato e β- hidroxibutirato (Eaton *et al.*, 1996). Dentro das mitocôndrias, os AGNE sofrem β-oxidação dando origem ao Acetil-CoA. Esse Acetil-CoA inicia o CAC combinando com uma molécula de oxaloacetato para formar o citrato. Mas, caso a concentração de oxaloacetato esteja baixa, o que é comum em períodos de balanço energético negativo, já que ele é consumido na gliconeogênese, o Acetil-CoA acaba sendo utilizado na formação de corpos cetônicos.

A concentração de AGNE no sangue tem sido utilizada como ferramenta indicativa do grau de mobilização das reservas corporais de gordura. Níveis elevados de AGNE no plasma indicam que a ingestão de energia via dieta, no dado momento, é insuficiente para suprir as necessidades dos tecidos. Esse quadro clínico é

comumente observado em vacas leiteiras de alta produção nos períodos pré e pós-parto imediato (puerpério), e em primíparas em lactação, devido à demanda aguda por energia.

Vacas leiteiras de alta produção durante o período de transição (peri-parturientes) normalmente ficam em balanço energético negativo devido à alta demanda causada pelo feto e pela produção de leite. Esse balanço negativo, quando excessivo, tende a causar problemas gastrointestinais (deslocamento de abomaso), metabólicos (cetose clínica) e infecciosos (metrite) no puerpério.

Fora do período de transição, o processo de mobilização de reservas no tecido adiposo é pouco significativo, já que os animais normalmente são submetidos a um regime dietético balanceado para atender à demanda do momento. Assim, a concentração plasmática de AGNE é considerada biomarcador do balanço energético do animal.

## 10. Origem dos ácidos graxos do plasma sanguíneo

Os ácidos graxos, resultantes do processo de digestão, que aportam ao duodeno para serem absorvidos são, posteriormente, transportados pela circulação sanguínea em diferentes formas moleculares, destacando-se, a dos lípides neutros e dos fosfolípides. O grupo dos lípides neutros é composto pelas moléculas de mono, di e triglicerídeos e pelos ésteres de colesterol (Contreras *et al.*, 2010).

Há diferenças na incorporação dos AG entre os triglicerídeos (TG) e as frações plasmáticas não triglicerídeas (NTG - ésteres de colesterol e fosfolípides) (Abughazaleh *et al.*, 2003). Segundo estes autores, os AG poli-insaturados (ácido linoleico,  $\alpha$ -linolênico e isômeros de CLA) que escapam da biohidrogenação ruminal são preferencialmente incorporados às frações NTG, sendo estes, os principais componentes lipídicos do plasma, participando com, aproximadamente, 95% dos lípides totais.

Já os TG e os AG livres, que representam, respectivamente, menos de 5% e 1% dos lípides plasmáticos, incorporam, preferencialmente, os AG saturados (oriundos da dieta ou da mobilização do tecido adiposo), monoinsaturados *trans* e os isômeros de CLA, com exceção do CLA *trans*-10 *cis*-12 (Abughazaleh *et al.*, 2003). Os TG são mais prontamente utilizados (alto *turnover*) pelos tecidos, dentre eles o mamário, que os ésteres de colesterol e os fosfolípides plasmáticos (Christie, 1981; Loor *et al.*, 2002b). Por isso, o perfil de AG dos TG representa mais fielmente o perfil absorvido e, conseqüentemente, o secretado pela glândula mamária.

Tanto os lípides neutros quanto os fosfolípides são carreados por lipoproteínas, como os quilomicrons, as lipoproteínas de muito baixa densidade (*very low density lipoprotein* – VLDL), as lipoproteínas de baixa densidade (*low density lipoprotein* – LDL) e as lipoproteínas de alta densidade (*high density lipoprotein* – HDL) que têm por objetivo manter os lípides em meio aquoso e facilitar sua absorção pelos tecidos (Contreras *et al.*, 2010).

Resultados de experimentos permitem inferir que, além da seletividade pela forma molecular de transporte, também existe seletividade na distribuição dos AG entre as lipoproteínas plasmáticas e na remoção dos AG pelo tecido (Contreras *et al.*, 2010). A avaliação dessa seletividade se torna fundamental para a compreensão da dinâmica dos AG originados da dieta em vacas em lactação. Palmquist (1976) verificou que a taxa de remoção dos TG presentes na VLDL em vacas em lactação é maior se comparada à dos TG presentes na LDL. Estudando o fluxo plasmático pela glândula mamária, o autor estimou que 70% dos TG plasmáticos foram hidrolizados e colocados à disposição para secreção no leite.

Num experimento em que se objetivou avaliar os efeitos do fornecimento de dietas baseadas em volumoso fornecido fresco ou conservado suplementado com gordura (óleo de canola e sebo) sobre o perfil de AG do leite e do plasma de vacas sob pastejo, Ward *et al.* (2003) observaram que a fração VLDL concentrava teores de AG saturados palmítico e esteárico superiores aos da LDL + HDL (24,21 e 36,46 contra 10,04 e 15,08 g/100 g de AG totais, respectivamente) nas dietas. A fração LDL + HDL apresentou maiores proporções de AG poli-insaturados linoleico e  $\alpha$ -linolênico se comparada à VLDL (41,72 e 6,75 contra 9,30 e 1,63 g/100 g de AG totais, respectivamente), comprovando, assim a seletividade na incorporação dos AG insaturados (AGI) pelas lipoproteínas LDL + HDL.

Thivierge *et al.* (1998) observaram que em momentos de altas concentrações plasmáticas, os fosfolípides também são importantes fornecedores de AG para a glândula mamária, tornando-se plausível a teoria de que os AG presentes tanto nos TG quanto nos fosfolípides podem ser utilizados pela glândula mamária quando suas concentrações plasmáticas se elevam devido à suplementação dietética com óleos vegetais.

## 11. Origens da glicose plasmática

Nos animais monogástricos, a glicose plasmática pode ser originada da digestão dos CHO presentes na dieta, da degradação do glicogênio hepático (glicogenólise) ou da produção de glicose a partir de precursores de AA nos hepatócitos (gluconeogênese) (McGarry *et al.*, 1987).

A fisiologia digestiva dos ruminantes permitiu que eles desenvolvessem a capacidade de digerir carboidratos estruturais vegetais – via ação dos microrganismos ruminais – e utilizar nitrogênio não proteico a partir da fermentação microbiana no rúmen (Goff e Horst, 1997). Por esses motivos, eles podem utilizar fontes alternativas de alimento, mas, em compensação, produzem e absorvem muito pouca glicose, já que ela é gerada via gluconeogênese hepática a partir dos AGVs, principalmente do propionato produzido durante a fermentação bacteriana de carboidratos no rúmen (Antunes *et al.*, 2011).

O metabolismo energético dos bovinos está adaptado para a utilização dos AGVs como principal fonte de energia e tende a direcionar a escassa glicose disponível para utilizações mais nobres, como a síntese de lactose pela glândula mamária. Segundo Baird *et al.* (1979), a alta demanda de glicose para a síntese de lactose no tecido mamário é a principal responsável pelos baixos níveis plasmáticos de glicose encontrados em vacas em lactação.

Em ruminantes, os níveis de glicose circulante geralmente são baixos e relativamente constantes, exceto durante o período de transição, quando a demanda por energia se eleva de forma aguda, podendo fazer com que o animal desenvolva quadros metabólicos como cetose e esteatose hepática.

Poucos trabalhos têm associado a suplementação lipídica com os níveis plasmáticos de glicose. Garnsworthy (2002) relatou que a disponibilidade plasmática de glicose para os tecidos tende a ser menor quando há substituição do amido por gordura na dieta, e essa substituição leva à menor produção de propionato no rúmen, que sabe-se, apresenta papel de destaque como precursor de glicose no metabolismo de ruminantes.

## 12. Origens da ureia plasmática

A proteína bruta presente nos alimentos fornecidos aos ruminantes é composta por uma fração degradável (PDR) e outra não degradável no rúmen. A degradação ruminal da PDR ocorre pela ação de vasta gama de enzimas secretadas pelos microrganismos, sendo as proteases, peptidases e deaminases as principais (Santos, 2011). Esses microrganismos utilizam os peptídeos, aminoácidos e amônia originados dessa degradação na síntese de proteína microbiana e multiplicação celular.

Quando a velocidade de degradação ruminal da proteína excede a velocidade de utilização dos compostos nitrogenados ou em momentos de desbalanço entre o N e a energia, ocorre elevação na concentração ruminal desses compostos. Nesses momentos de alta disponibilidade ruminal de N, observam-se elevadas concentrações sanguíneas de ureia. Conforme verificado por diversos autores citados por Rennó *et al.* (2000), a concentração plasmática de ureia é positivamente relacionada com a ingestão de compostos nitrogenados pelo animal.

O excesso de amônia produzido no rúmen atravessa a parede ruminal, entra na corrente sanguínea e é removido da circulação portal pelo fígado, onde entra no ciclo da ureia (Russel *et al.*, 1992). No ciclo da ureia, a amônia reage com o CO<sub>2</sub> mitocondrial para formar carbamilsulfato, na presença de carbamilsulfato-sintetase. Apenas metade do N-ureico é originário da amônia livre, sendo o N restante proveniente do aspartato citoplasmático, que atua como doador específico de N na conversão da citrulina em arginina (Visek, 1979).

A ureia recém-sintetizada é liberada na circulação sanguínea, sendo parte dela reciclada no rúmen, por meio da saliva ou por difusão através do epitélio ruminal, e outra, excretada via urina e leite (Lobley *et al.*, 1995). Segundo Nolan (1993), a transferência da ureia para a saliva é equivalente ao produto do fluxo salivar pela concentração de ureia na saliva e corresponde de 30 a 60% da concentração sanguínea. Já a transferência através do epitélio ruminal ocorre por difusão passiva, sendo que a camada epitelial queratinizada constitui barreira para o movimento da ureia. Para contornar esse problema, as bactérias que proliferam nas camadas epiteliais cornificadas do rúmen produzem urease permitindo, assim que a amônia recém-formada passe mais facilmente por essa barreira.

Segundo Malnic e Marcondes (1986), a ureia plasmática é eliminada por meio dos rins, por filtração glomerular e reabsorção tubular por processo passivo, secundário à reabsorção de fluidos. Assim, a quantidade de ureia excretada via urina é influenciada por estas funções, além de ser, de acordo com Harmeyer e Martens (1980), alterada, principalmente, pela concentração plasmática, explicando-se, assim, a alta correlação entre esses dois parâmetros.

### 13. Gordura láctea e a nutrição humana

Dentre os componentes do leite, a gordura é a fração mais passível de modulação e tem papel primordial na definição das propriedades físicas, organolépticas e industriais dos produtos lácteos. Em média, o leite bovino possui 33 g de lípidos totais (gordura) por litro, sendo que, dessa fração, os triglicérides representam, aproximadamente, 95% e são compostos por AG originados da dieta ou sintetizados *de novo* na glândula mamária (Tópico 7). Esses AG possuem comprimento de cadeia carbônica entre 4 e 24 carbonos, com diferentes graus de saturação (German *et al.*, 2009).

Outros lípidos presentes no leite são os diacilgliceróis (aproximadamente, 2% da fração lipídica), colesterol (menos de 0,5%), AG livres (menos de 0,5%) e fosfolípidos (aproximadamente, 1%). Todos estes são originados do retículo endoplasmático das células mamárias, sendo responsáveis pela formação da membrana que delimita os glóbulos de gordura (German *et al.*, 2009).

Tanto o teor de gordura como a composição de AG do leite são diretamente influenciados pela manipulação da dieta, sendo que quanto maior a proporção de volumoso na dieta, maior o teor de gordura. A relação entre a composição da gordura láctea e a nutrição é complexa, mas, simplificada, o que se observa é que o fornecimento de dietas ricas em volumosos conservados para vacas leiteiras tende a elevar a secreção de gordura saturada; quando se fornecem volumosos verdes e tenros ou suplementação rica em AG insaturados, há elevação da secreção de AG insaturados (Chilliard *et al.*, 2000; Lock e Bauman, 2011).

Apesar da gordura do leite possuir concentrações significativas de AG reconhecidamente benéficos à saúde humana (C18:1 *cis*-9, CLA *cis*-9 *trans*-11, AG  $\omega$ -6, AG  $\omega$ -3, entre outros), tem-se observado redução no consumo de leite por parte da sociedade ocidental nas últimas décadas. Esse fenômeno tem ocorrido principalmente devido ao fato de parte considerável dessa gordura (~60%) ser composta por AG saturados, podendo, assim, contribuir para o desenvolvimento de doenças cardíacas e vasculares (DCV) e para o aumento da resistência à insulina (Haug *et al.*, 2007).

#### 13.1. Ácidos graxos saturados

Os AG de cadeia carbônica saturada compreendem cerca de 60% do total presente na gordura do leite (Lock e Bauman, 2011). Essa é uma característica pouco interessante do ponto de vista nutricional, pois, há tempos, o conceito de alimentação saudável se tornou sinônimo de dieta magra, ou seja, com baixas quantidades de gordura, em especial de AG saturados de cadeia média (C12:0, C14:0 e C16:0), que, no caso do leite, participam com 30 a 50% da gordura total.

A Sociedade Brasileira de Cardiologia (Sposito *et al.*, 2007) e a *American Heart Association* (Gidding *et al.*, 2009) recomendam que o consumo de gordura saturada seja inferior a 7% do total diário de energia ingerida. Essa recomendação nutricional tem por objetivo reduzir as taxas plasmáticas de colesterol ruim (LDL – *Low Density Lipoprotein*) e o risco de desenvolvimento de DCV, doenças coronarianas e aumento da resistência à insulina.

Embora evidências associem o consumo de gordura saturada ao aumento dos níveis plasmáticos de LDL e da possibilidade de ocorrência de DCV, à hipertrigliceridemia e ao aumento da resistência à insulina (Lamarche *et al.*, 1999; Tonstad e Hjermann, 2003; Goff *et al.*, 2005; St. Pierre *et al.*, 2005), vários estudos recentes têm sugerido que essa associação pode ser menos evidente do que se imaginava originalmente (Smedman *et al.*, 1999; Haug *et al.*, 2007; German *et al.*, 2009; Parodi, 2009; Palmquist, 2010; Lock e Bauman, 2011; Huth e Park, 2012).

A explicação para essa teoria se baseia no fato de que as diversas fontes de gordura da dieta contêm distintos perfis de AG saturados e insaturados. Assim, cada alimento deve afetar de maneira diferente o metabolismo das lipoproteínas, bem como contribuir com quantidades significativas de outros nutrientes, alterando os potenciais riscos de ocorrência de DCV (Huth e Park, 2012).

Taubes (2001) revisou trabalhos publicados num período de 50 anos e concluiu que há pouca ou nenhuma evidência de que uma dieta pobre em gordura saturada seja capaz de prolongar a expectativa de vida da população como um todo. Essa conclusão foi reforçada por diversos artigos com intervenções de larga escala como o de Howard *et al.* (2006). Esses autores publicaram os resultados da maior intervenção nutricional já feita até aquela data, envolvendo cerca de 50 mil mulheres durante o período de oito anos, e não observaram diferenças nos riscos de ocorrência de DCV, coronarianas ou acidente vascular cerebral (AVC) entre o grupo submetido à dieta com altas porções de vegetais, frutas, grãos e com restrição de gorduras, daquele grupo submetido à dieta sem restrições de qualquer tipo. Resultados como esses sugerem que a relação entre o consumo de gorduras saturadas e a incidência de hipercolesterolemia e DCV é mais complexa do que se imagina (Parodi, 2009)

Diversos artigos (Sandstrom *et al.*, 1992; Eichholzer e Stahelin, 1993; Fehily *et al.*, 1993; Markmann *et al.*, 1994; Smedman *et al.*, 1999; Ness *et al.*, 2000; Warensjö *et al.*, 2004; Seidel *et al.*, 2005; Alonso *et al.*, 2009; Fonollá *et al.*, 2009; Warensjö *et al.*, 2009) e estudos utilizando meta-análises (Elwood *et al.*, 2004, Hoppe *et al.*, 2006; Haug *et al.*, 2007; Elwood *et al.*, 2008; German *et al.*, 2009; Elwood *et al.*, 2010; Siri-Tarino *et al.*, 2010; Warensjö *et al.*, 2010; Lock e Bauman, 2011; Huth e Park, 2012; Kratz *et al.*, 2012) encontraram associação negativa entre a ingestão de gordura láctea e o aumento do risco de ocorrência de DCV, coronarianas, AVC ou diabetes, independentemente da quantidade de gordura ingerida.

Resultados de diversos estudos intervencionais de curta duração com o objetivo de avaliar os biomarcadores das DCV indicaram que dietas ricas em gorduras advindas do leite fluido integral ou da manteiga foram capazes de elevar as concentrações de LDL plasmático; contudo, também elevaram as de HDL (*High Density Lipoprotein*, o colesterol bom). Assim, essas gorduras podem não afetar ou, por outro lado, reduzir a relação colesterol total:HDL, que é considerada um dos melhores indicadores do risco aterogênico (Mensink *et al.*, 2003; Lock e Bauman, 2011; Huth e Park, 2012).

Dentre os AG saturados presentes na gordura do leite, os de cadeia carbônica média com número par de C – ou seja, os ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0) – são capazes de elevar os níveis plasmáticos de colesterol total e LDL, contribuindo, conseqüentemente, para o desenvolvimento de doenças cardíacas (Insel *et al.*, 2004; Lock e Bauman, 2011).

Os demais AG saturados do leite podem desempenhar ações benéficas específicas. O ácido butírico (C4:0) é conhecido modulador das funções gênicas e, por isso, pode desempenhar importante papel na prevenção do câncer (German, 1999). Os ácidos caprílico (C8:0) e capríco (C10:0) podem apresentar atividade antiviral e, no caso específico do caprílico, observou-se ação inibitória sobre o crescimento de alguns tipos de tumores (Thormar *et al.*, 1994) e sabe-se que o ácido esteárico (C18:0) não é capaz de elevar o LDL plasmático e nem é aterogênico (Grundy, 1994; Mensink *et al.*, 2003)

Diante do apresentado, percebe-se que, apesar da contribuição dos produtos lácteos para o aumento da ingestão de gorduras saturadas de cadeia média, ainda não há suficientes evidências científicas de que o seu consumo esteja associado ao aumento dos riscos de desenvolvimento de DCV, coronarianas ou de resistência à insulina. Portanto, sugestões relacionadas à restrição de alimentos lácteos devem ser feitas de forma criteriosa.

### 13.2. Ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada

Os ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada (AGCIR) estão presentes em concentrações entre 7 e 15% da gordura do leite e tecido adiposo de animais que fazem fermentação simbiótica, como os ruminantes (Polidori *et al.*, 1993; Rojas *et al.*, 1994; Jenkins, 1995) e em quantidades desprezíveis nas plantas (Diedrich e Henschel, 1990).

Segundo Kaneda (1991), os AGCIR secretados pela glândula mamária são originados, principalmente, dos fosfolípidos de membrana das bactérias ruminais. Fazem parte desse grupo os AG C13:0 *iso*, C14:0 *iso*, C15:0, C15:0 *iso*, C15:0 *anteiso*, C16:0 *iso*, C17:0, C17:0 *iso* e C17:0 *anteiso*. Os AG ímpares de cadeia carbônica inferior a 13 (C5:0, C7:0, C9:0 e C11:0) advêm do processo de lipogênese incompleta nos microrganismos ou na glândula mamária, e o AG ímpar insaturado C17:1 *cis*-9 é sintetizado somente na glândula mamária pela ação da enzima  $\Delta^9$ -desaturase, tomando como substrato o C17:0 (Fievez *et al.*, 2003).

Assim como no tecido mamário e adiposo, a síntese *de novo* de AG nas células bacterianas ocorre a partir de diversas reações de condensação entre moléculas de malonil-coenzima A (CoA – dois carbonos) e acetil-

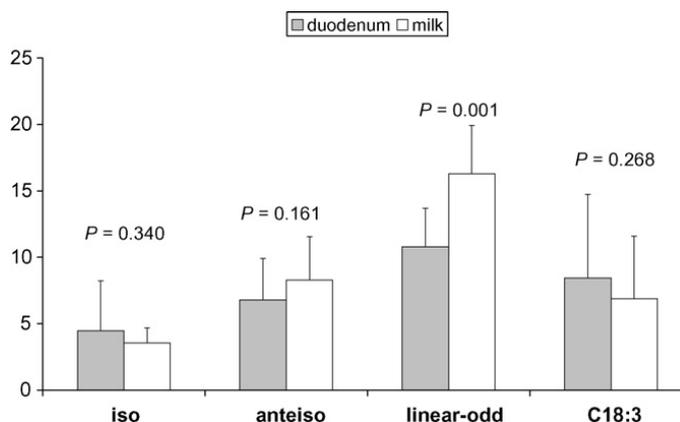
CoA (dois carbonos), sendo este utilizado como *primer*, obtendo-se o ácido palmítico como principal produto final. Já na síntese de AG de cadeia ímpar, uma molécula de propionil-CoA (três carbonos) é utilizada como *primer*, ao invés do Acetil-CoA (Fulco, 1983).

O perfil de AGCIR presente na bactéria é determinado, principalmente, pelo tipo de AGS produzido pelo microorganismo, fazendo com que eventuais mudanças no perfil dos AGCIR que deixam o rúmen seja reflexo unicamente das variações quantitativas de determinadas espécies (Vlaeminck *et al.*, 2006b).

O aumento da relação volumoso:concentrado (V:C) da dieta resulta em elevação do teor de AGCIR secretado no leite, em especial dos AG C14:0 *iso* e C15:0 *iso*. Esse comportamento reflete as alterações ocorridas nas populações microbianas (Vlaeminck *et al.*, 2006b). Tajima *et al.* (2001) observaram que quando há elevação na relação V:C, ocorre redução numérica na população de bactérias amilolíticas (*e.g.*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminobacter amylophilus*, *Succinivibrio dextrinosolvens*) e concomitante elevação na população de celulolíticas (*e.g.*, *R. flavefaciens*, *B. fibrisolvens*) ricas em AG C14:0 *iso* e C15:0 *iso*, explicando, assim, o aumento da sua secreção.

Vacas leiteiras recebendo dietas suplementadas com óleos vegetais ricos em ácidos linoleico (Fievez *et al.*, 2003; Collomb *et al.*, 2004; Rego *et al.*, 2005) ou linolênico (Collomb *et al.*, 2004; Loor *et al.*, 2005) têm a secreção de AGCIR do leite reduzida pela ação deletéria desses AG sobre os microrganismos ruminais.

Por muito tempo pensou-se que a gordura presente nos alimentos volumosos e os fosfolípidos de membrana dos microrganismos fossem as únicas fontes de AGCIR dos ruminantes. Mas descobriu-se que os AG ímpares de cadeia linear e seus isômeros *anteiso* também podem ser sintetizados na glândula mamária a partir da utilização de uma molécula de propionil-CoA ao invés do acetil-CoA, e de metilmalonil-CoA ao invés do malonil-CoA, respectivamente, durante a lipogênese mamária (Massart-Leëm *et al.*, 1983; Smith, 1994). Numa compilação de dados referentes a oito artigos, Vlaeminck *et al.* (2006b) conseguiram ilustrar essa afirmação (Figura 16).



**Figura 16.** Comparação entre o fluxo duodenal e a secreção láctea de ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada (g/dia). Adaptado de Vlaeminck *et al.* (2006b)

Há muito já se sabe que o perfil de AG do soro sanguíneo humano é reflexo direto da composição de AG dos alimentos ingeridos. Desse modo, os níveis subcutâneos (Wolk *et al.*, 1998) e séricos (Smedman *et al.*, 1999; Warensjö *et al.*, 2004) dos AG C15:0 e C17:0 têm sido utilizados como marcadores do consumo humano de gorduras de ruminantes. Essa relação tem sido bastante utilizada em trabalhos que tentam relacionar o consumo desses produtos com o surgimento de doenças crônicas (Smedman *et al.*, 1999, Warensjö *et al.*, 2009). Além disso, alguns trabalhos também têm estudado seu potencial como marcador a fim de quantificar (Vlaeminck *et al.*, 2005) e identificar (Vlaeminck *et al.*, 2004, 2006a) as diferentes classes microbianas que deixam o rúmen.

Alguns estudos também têm demonstrado que os AG de cadeia ramificada têm uma ação anticâncer considerável. Yang *et al.* (2000) mostraram que o isômero C15:0 *iso* foi capaz de inibir, tanto em experimentos *in vitro* quanto *in situ*, o crescimento de diversas linhagens de células cancerígenas. Experimentos *in vitro* ulteriores comprovaram que outros AG *iso*, assim como o C15:0 *anteiso*, apresentam ação inibitória sobre células causadoras do câncer de mama humano (Wongtangintharn *et al.*, 2004).

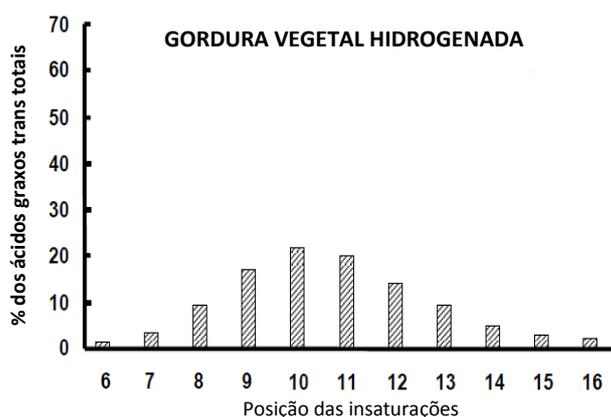
Em seu artigo, Lock e Bauman (2004) questionam o porquê de os isômeros de CLA receberem muito mais atenção dos estudiosos sobre esse assunto do que os AG de cadeia ramificada, já que estes têm ação citotóxica equivalente e apresentam-se em concentrações muito superiores às dos diversos isômeros CLA presentes na gordura dos ruminantes.

### 13.3. Ácidos graxos *trans*

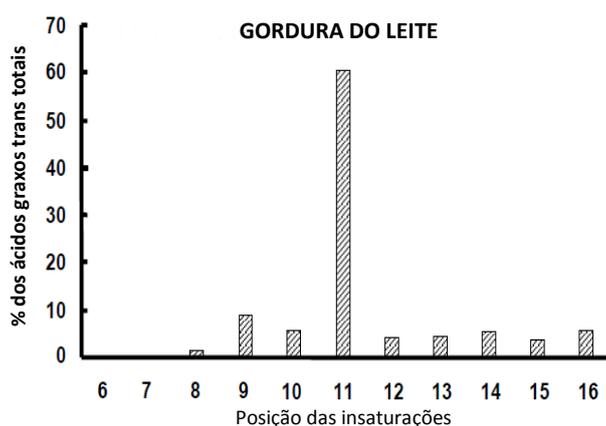
As duplas ligações presentes nos ácidos graxos insaturados (AGI) são, na sua maioria, da configuração *cis*, mas o interesse pelos ácidos graxos *trans* (AGT) tem aumentado nos últimos anos, devido à sua associação com o aumento dos riscos de ocorrência de doenças coronarianas e de outras doenças crônicas. Nas moléculas de AG presentes nos alimentos, as duplas ligações *trans* podem ser formadas de duas maneiras: por meio de processos químicos ocorridos durante a formação dos óleos vegetais parcialmente hidrogenados (OVPH), e durante o processo de BH ruminal dos AGPI (Tópico 6).

Os AGT mais presentes na dieta humana são os AG monoinsaturados com comprimento de cadeia carbônica igual a 18 (C18:1*trans*). Os OVPH contêm entre 40 e 60% de AGT sendo o C18:1 *trans*-9, C18:1 *trans*-10, C18:1 *trans*-11 e C18:1 *trans*-12 os principais isômeros (Figura 17a). Já nas gorduras originadas dos ruminantes, o isômero em maior concentração é o ácido vacênico (C18:1 *trans*-11) (Figura 17b). Essas diferenças de perfil isomérico das gorduras dos alimentos são de fundamental importância, porque a posição das insaturações influencia diretamente tanto as propriedades fisiológicas quanto a reatividade bioquímica desses AG (Lock *et al.*, 2005).

a)



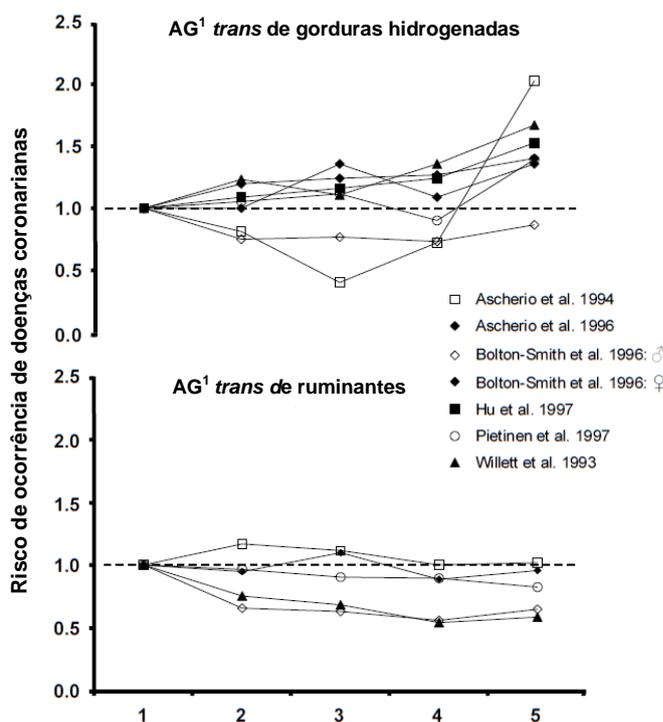
b)



**Figura 17.** Distribuição típica dos ácidos graxos C18:1 *trans* presentes na gordura do leite e em óleos vegetais parcialmente hidrogenados. Adaptado de Lock *et al.* (2005)

Nos últimos anos, a relação entre a ingestão de AGT e a saúde humana, particularmente em relação a doenças coronarianas, tem sido bastante estudada e tem-se demonstrado, de forma consistente, que dietas com quantidades significativas de AGT levam ao aumento das concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL, e reduzem as de HDL (Lock e Bauman, 2011).

Em boa parte desses estudos, os resultados têm sido extrapolados a fim de sugerir que o consumo de qualquer alimento que seja fonte de AGT esteja associado com o aumento do risco de ocorrência de doenças coronarianas. Entretanto, quando foram estudadas mais criteriosamente as questões epidemiológicas, percebeu-se que a associação positiva entre a ingestão desses AG e o risco de desenvolvimento de doenças coronarianas pode ser explicada exclusivamente pela ingestão de AGT originados de processos industriais, na sua maioria OVPH (Warensjö, *et al.*, 2004; Lock *et al.*, 2005, Uauy *et al.*, 2009). Por outro lado, observa-se associação negativa entre o consumo de AGT originado dos ruminantes e o risco de desenvolvimento de doenças coronarianas (Figura 18).



**Figura 18.** Risco relativo de ocorrência de doenças coronarianas causadas pelo aumento da ingestão de ácidos graxos *trans* originados de gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas e da gordura de ruminantes. <sup>1</sup>ácidos graxos. Adaptado de Lock *et al.* (2005)

Em estudo realizado com 191 pacientes recém-submetidos ao exame de angiografia coronariana, Hodgson *et al.* (1996) avaliaram a associação da presença de AG *trans* no sangue (ácido palmitelaídico C16:1 *trans*-9; ácido elaídico C18:1 *trans*-9; C18:1 *trans*-10; ácido vacênico C18:1 *trans*-11, C18:1 *trans*-12 e o ácido linoelaídico C18:2 *trans*-9 *trans*-12) com os riscos de ocorrência de doenças coronarianas. Após ajustes relacionados a características como idade, sexo, fumo, nível de atividade física, hipertensão e concentração sérica de colesterol, observou-se associação positiva entre a ocorrência de doenças coronarianas e as concentrações do ácido elaídico ( $P = 0,0300$ ) e o C18:1 *trans*-10 ( $P = 0,0434$ ). Já a associação de doenças coronarianas com os consumos dos AG palmitelaídico, vacênico, C18:1 *trans*-12 e linoelaídico não foram significantes ( $P = 0,1189$ ;  $0,7651$ ;  $0,0582$  e  $0,8793$ , respectivamente)

As diferentes capacidades dos alimentos fontes de AGT em gerar doenças coronarianas se justificam pelas diferenças existentes entre os perfis isoméricos dos alimentos. Um importante aspecto relacionado a esse assunto é o fato de que, aproximadamente, 19 a 30% do ácido vacênico, ricamente presente na gordura láctea, pode ser convertido a ácido rumênico pela ação da enzima  $\Delta^9$ -desaturase nos tecidos humanos (Turpeinen, 2002; Parodi, 2009). Esse isômero de CLA tem um importante caráter funcional, que será apresentado no Tópico 13.8.3.

#### 13.4. Ácido palmitelaídico

A elevação dos níveis plasmáticos de AGNE e dos AG saturados livres, em especial do ácido palmítico, tem sido considerada uma das principais responsáveis pela patogênese da resistência à insulina e, por consequência, pela redução da disponibilidade de glicose para os tecidos. Inversamente, a elevação das

concentrações de certos AG mono e poli-insaturados originados da dieta, tem sido relacionada à correção do controle glicêmico (Dimopoulos *et al.*, 2006). Nesse sentido, o ácido palmitelaídico (C16:1 *trans*-9) tem-se destacado como importante regulador glicêmico, apesar de seus mecanismos de ação ainda serem uma incógnita. As suas principais fontes são os óleos de peixe e, principalmente, as gorduras dos ruminantes (Destailats *et al.*, 2000).

### 13.5. Ácido vacênico

Como apresentado no Tópico 13.3, o ácido vacênico ou *trans*-vacênico é o principal AGT secretado na gordura do leite, participando com 1 a 10% do conteúdo total de AG (Haug *et al.*, 2007). O principal responsável por essa variação é o tipo de dieta fornecida ao animal, sendo que quanto maior as concentrações de AGPI da dieta, maior a sua secreção na gordura láctea. Isso ocorre porque ele é o principal produto intermediário da BH ruminal dos AGPI (Figuras 3 e 4).

O ácido vacênico é o único AGT descrito pela literatura como intermediário da BH ruminal dos AGPI da dieta. No entanto, muitos outros isômeros C18:1 *trans* podem ser encontrados no fluido ruminal (Katz e Keeney, 1966) ou na gordura do leite (Parodi, 1976) (Figuras 8, 9 e 10). Acredita-se que eles se originem de migrações das insaturações dos diversos intermediários da BH (Griinari e Bauman, 1999).

Segundo Haug *et al.* (2007), o ácido vacênico tem uma característica ímpar entre os AG lácteos ao agir de maneiras opostas (prejudicial e benéfica) sobre o metabolismo de quem o consome. Isso ocorre porque, como a maioria dos AGT, ele tende a elevar as concentrações plasmáticas de colesterol total, LDL, e reduzir as concentrações plasmáticas de HDL e, com isso, as chances de ocorrência de infarto do miocárdio (Mensink e Katan, 1990; Ascherio *et al.*, 1999; Meijer *et al.*, 2001; Clifton *et al.*, 2004).

Em contrapartida, outros estudos não observaram nenhum tipo de ação prejudicial do ácido vacênico sobre os parâmetros plasmáticos (Willett *et al.*, 1993; Tricon *et al.*, 2006). Isso se explica, em parte, pelo fato dele ser precursor do ácido rumênico na glândula mamária dos ruminantes, onde, aproximadamente, 90% desse AG é formado via ação da enzima  $\Delta^9$ -desaturase (Kay *et al.*, 2004), e por sua conversão nos tecidos humanos. Alguns estudos (Adlof *et al.*, 2000; Turpeinen *et al.*, 2002; Kuhnt *et al.*, 2006) estabeleceram taxas de conversão média do ácido vacênico a rumênico em diversos tecidos humanos iguais a 30; 19 e 25%, respectivamente.

Diante do exposto, percebe-se que ainda é necessário que se descubra o real papel do ácido vacênico sobre a saúde humana.

### 13.6. Ácido oleico

O leite é uma excelente fonte de ácido oleico (C18:1 *cis*-9), representando entre 20 e 25% do total de AG da gordura láctea, fazendo com que ele seja o AG monoinsaturado de maior concentração neste alimento (USDA, 2005). Ele é originado, predominantemente, da síntese endógena envolvendo a captação de ácido esteárico (C18:0) pela glândula mamária com posterior dessaturação pela ação da enzima  $\Delta^9$ -desaturase. A quantidade de ácido oleico de origem dietética que chega à glândula mamária é mínima, consequência da BH ruminal (Lock e Bauman, 2011).

Segundo Haug *et al.* (2007), dois terços do ácido esteárico absorvido pela glândula mamária é utilizado pela  $\Delta^9$ -desaturase. Isso explica, em parte, a alta concentração do ácido oleico no leite. Outros importantes substratos para a ação dessa enzima são os ácidos mirístico, palmítico e vacênico que dão origem aos AG miristoleico, palmitoleico e rumênico, respectivamente (Bauman e Lock, 2006).

O ácido oleico é reconhecidamente benéfico à saúde humana por ser capaz de reduzir as concentrações plasmáticas de colesterol, LDL e de triglicerídeos (De Lorgeril *et al.*, 1994; Carter *et al.*, 1997; Kris-Etherton *et al.*, 1999; Mensink *et al.*, 2003; Nicolosi *et al.*, 2004).

### 13.7. Ácidos graxos poli-insaturados

Os AGPI estão presentes no leite em concentração aproximada de 2 g/L, sendo o ácido linoleico  $\omega$ -6 (ALL - C18:2 *cis*-9 *cis*-12), o ácido  $\alpha$ -linolênico  $\omega$ -3 (C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15) e os isômeros de CLA seus principais representantes (Parodi, 1997; Jensen, 2002; O'Donnell-Mengaro *et al.*, 2011).

As famílias  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 abrangem ácidos graxos que apresentam insaturações separadas apenas por um carbono metilênico, com a primeira insaturação no sexto e terceiro carbono, respectivamente, enumerado a partir do grupo metil terminal (Martin *et al.*, 2006). As tentativas em aumentar os teores de AG  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 na gordura do leite normalmente envolvem a suplementação da dieta com ingredientes ricos em ácidos linoleico (soja, girassol) e  $\alpha$ -linolênico (linhaça, óleo de peixe, forrageiras C3), respectivamente (Lock e Bauman, 2004). Entretanto, a concentração de AG  $\omega$ -3 na gordura láctea é, geralmente, muito baixa (menos de 0,5% em dietas não suplementadas e até 2% em dietas suplementadas com fontes lipídicas), sendo o ácido  $\alpha$ -linolênico o principal isômero (Jensen, 2002).

O interesse nutricional pelos AG  $\omega$ -3 se justifica pelos benefícios observados na manutenção da saúde humana, na prevenção de doenças crônicas como as DCV, de desordens inflamatórias e neurológicas, e na síntese de outros AG essenciais de cadeias carbônicas longas (AGPI-CL) (Young e Conquer, 2005; Yashodhara *et al.*, 2009). O ácido  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ -3) é o principal substrato endógeno na síntese ácido eicosapentaenoico (EPA) C20:5 *cis*-5 *cis*-8 *cis*-11 *cis*-14 *cis*-17, docosahexaenoico (DHA) C22:6 *cis*-4 *cis*-7 *cis*-10 *cis*-13 *cis*-16 *cis*-19 e o docosapentaenoico (DPA) C22:5 *cis*-7 *cis*-10 *cis*-13 *cis*-16 *cis*-19 que, posteriormente, são convertidos a eicosanoides. Estes AG têm importante papel no controle da agregação plaquetária e, por consequência, na redução de doenças coronarianas (Haug *et al.*, 1992). Já o ácido linoleico ( $\omega$ -6) é o principal substrato endógeno na síntese do ácido araquidônico (C20:4 *cis*-5 *cis*-8 *cis*-11 *cis*-14).

Devido às altas concentrações dos AG  $\omega$ -6 na dieta dos países ocidentais, os eicosanoides produzidos a partir do ácido araquidônico, especificamente as prostaglandinas, os tromboxanos, os leucotrienos e as lipoxinas, são formados em maiores quantidades do que os produtos formados a partir dos AG  $\omega$ -3. Os eicosanoides produzidos a partir do araquidônico são biologicamente ativos já em quantidades muito pequenas e, se eles são formados em grandes quantidades, podem contribuir para a formação de trombos e de ateromas; para desordens imunológicas, particularmente em pessoas sensíveis; e para a proliferação celular (carcinomas). Assim, dietas com quantidades excessivas de AG  $\omega$ -6 mudam o estado fisiológico para um que é pró-trombótico e pro-agregatório, com o aumento da viscosidade do sangue e vasoconstrição (Simopoulos, 2008).

Segundo Martin *et al.* (2006), os AG  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 competem pelas enzimas envolvidas nas reações de dessaturação ( $\Delta^4$ ,  $\Delta^5$ ,  $\Delta^6$  e  $\Delta^9$ -desaturases) e alongamento da cadeia carbônica. Embora essas enzimas tenham maior afinidade pelos ácidos da família  $\omega$ -3, a conversão do ácido  $\alpha$ -linolênico em AGPI-CL é fortemente influenciada pelos níveis de ácido linoleico na dieta. Assim, a razão entre a ingestão diária de alimentos fontes de AG  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 – relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3 – assume grande importância na nutrição humana.

As razões entre 2:1 e 3:1 têm sido recomendadas por vários autores, por possibilitar maior conversão do ácido  $\alpha$ -linolênico a DHA, alcançando o máximo em torno de 2,3:1. Estudos cinéticos efetuados em humanos submetidos a dietas com razões  $\omega$ -6: $\omega$ -3 entre 6:1 e 8:1 demonstraram que a conversão do  $\alpha$ -linolênico a EPA e DHA foi prejudicada e variou de 8% a 21% e de 0% a 9%, respectivamente. Por outro lado, dietas baseadas em razões  $\omega$ -6: $\omega$ -3 inferiores a 1:1 não são recomendadas, por inibirem a transformação do ácido linoleico a AGPI-CL (Martin *et al.*, 2006).

A relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3 na gordura láctea tende a ser baixa se comparada à maioria dos alimentos de origem não-marinha. Essa relação é altamente influenciada pelo regime alimentar, permitindo que os produtos de ruminantes sejam fonte importante de AG  $\omega$ -3 na dieta humana (Haug *et al.*, 2007).

Resultados de estudos clínicos a esse respeito obtidos nas últimas décadas têm demonstrado: - diminuição de 70% na taxa de mortalidade em pacientes com doença cardiovascular, quando a razão ácido linoleico: $\alpha$ -linolênico na dieta foi reduzida de 15:1 para 4:1; - redução nas inflamações decorrentes da artrite reumatoide, quando a razão  $\omega$ -6: $\omega$ -3 da dieta esteve entre 3:1 e 4:1, condição que foi alcançada pela suplementação com EPA, DHA e linoleico; - diminuição dos sintomas decorrentes da asma, quando a razão  $\omega$ -6: $\omega$ -3 da dieta esteve ao redor de 5:1, sendo que em 10:1 os sintomas foram intensificados (Martin *et al.*, 2006).

### 13.8. Ácidos linoleicos conjugados

Nos dias de hoje, a qualidade nutricional constitui-se aspecto fundamental no momento da escolha dos alimentos. Isso tem ocorrido devido à preocupação, por parte de alguns consumidores, com relação aos

potenciais benefícios à saúde oferecidos por esses alimentos, recentemente definidos como “alimentos funcionais”.

Os ingredientes funcionais mais celebrados e estudados da atualidade são os isômeros conjugados do CLA, AG encontrados principalmente nas gorduras dos produtos derivados dos ruminantes. CLA é um termo geral que caracteriza um grupo de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico (ácido octadecadienoico C18:2 *cis*-9 *cis*-12), com ligações duplas conjugadas variando entre 6-8 a 12-14 (Collomb *et al.*, 2004).

Para cada isômero posicional, quatro pares de isômeros geométricos são possíveis (*e.g.*, *cis*, *trans*; *trans*, *cis*; *cis*, *cis*; e *trans*, *trans*). O termo CLA abrange, portanto, 28 isômeros posicionais e geométricos, dos quais 25 já foram identificados na gordura láctea (Steinhart *et al.*, 2003; Kramer *et al.*, 2004) e apenas o ácido rumênico (C18:2 *cis*-9 *trans*-11), o CLA *trans*-7 *cis*-9, o CLA *trans*-10 *cis*-12, o CLA *trans*-9 *cis*-11 e o CLA *trans*-9 *trans*-11 possuem, até o momento, comprovada atividade biológica (Collomb *et al.*, 2004).

Os produtos lácteos e cárneos fornecem, respectivamente, cerca de 70 e 25% do total de CLA presente na dieta de estadunidenses (Ritzenthaler *et al.*, 2001) e europeus (Parodi, 2003), e compreende de 0,4 a 4,8% do total de AG da gordura do leite (Khanal e Dhiman, 2004; Palmquist *et al.*, 2005). Dentre os diversos isômeros existentes, o ácido rumênico é o predominante na gordura do leite, compreendendo entre 75 e 90% do total (Lock e Bauman, 2004; Khanal e Dhiman, 2004; Delmonte *et al.*, 2005; Palmquist *et al.*, 2005).

O segundo isômero de CLA mais comum é o CLA *trans*-7 *cis*-9, representando cerca de 10% do total (Yurawecz *et al.*, 1998; Corl *et al.*, 2002; Piperova *et al.*, 2002; Palmquist *et al.*, 2005). Sua concentração pode variar bastante, dependendo da concentração do ácido oleico da dieta, e chegar a 40% do total de CLA (Piperova *et al.*, 2000). O restante do CLA é composto por outros isômeros presentes em concentrações sempre muito baixas (<1%) (Bauman *et al.*, 2003), apesar de alguns deles (CLA *trans*-10 *cis*-12 e CLA *trans*-9 *cis*-11) variarem consideravelmente e possuírem ações fisiológicas importantes (Haug *et al.*, 2007).

### 13.8.1. A biossíntese dos ácidos linoleicos conjugados

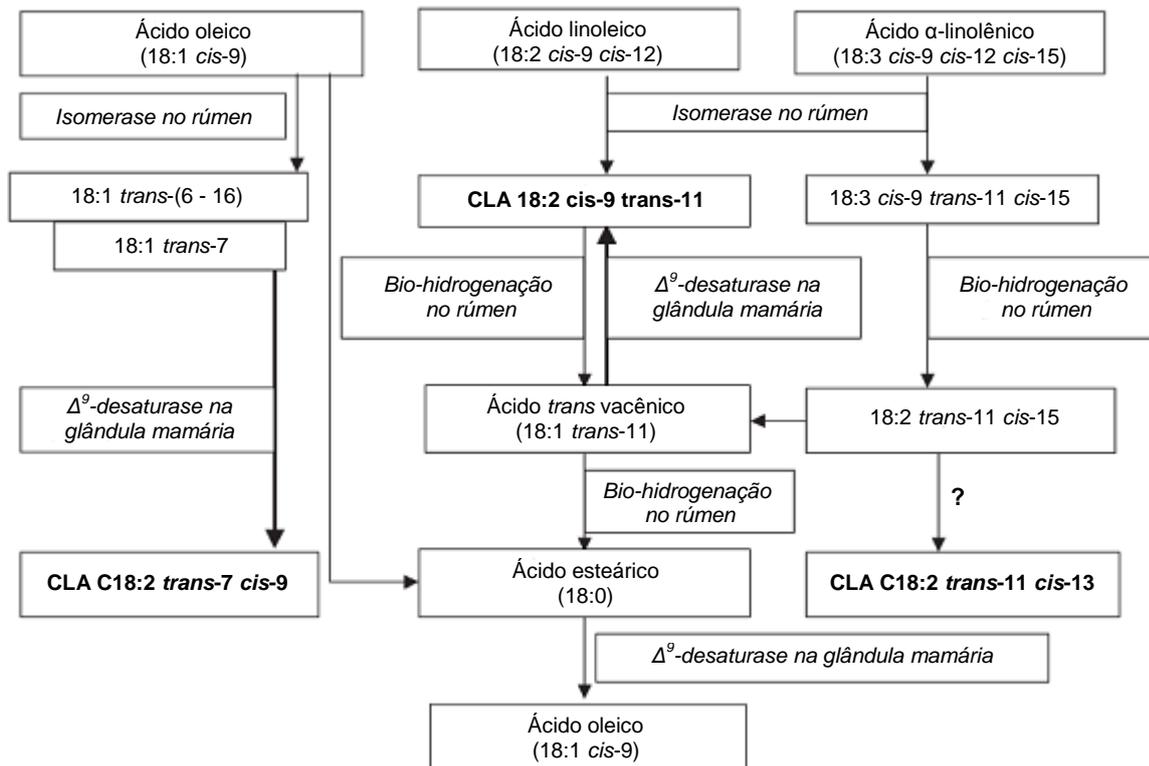
Corl *et al.* (2002) observaram forte correlação positiva entre a ingestão diária de: a) ácido oleico ou linoleico com a concentração do isômero CLA *trans*-7 *cis*-9 na gordura do leite; b) ácido linoleico com os isômeros CLA *trans*-10 *trans*-12, CLA *trans*-9 *trans*-11, CLA *trans*-8 *trans*-10, CLA *trans*-7 *trans*-9, CLA *trans*-8 *cis*-10, CLA *trans*-7 *cis*-9, CLA *trans*-10 *cis*-12, CLA *trans*-9 *trans*-11 e o ácido rumênico; c) ácido  $\alpha$ -linolênico com os isômeros *cis/trans* e *trans/cis*-12/14 e *trans*-11 *cis*-13; sugerindo, então, que esses AG (ácido oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico) sejam os principais precursores dos isômeros de CLA secretados no leite (Figura 19).

O ácido rumênico é um conhecido intermediário da BH ruminal dos ácido linoleico e  $\alpha$ -linolênico. Inicialmente, imaginou-se que essa fosse sua única origem nos ruminantes. No entanto, Griinari *et al.* (2000) demonstraram que, na verdade, a maior parte (58-77%) desse isômero é sintetizada na glândula mamária pela ação da enzima  $\Delta^9$ -desaturase, utilizando o ácido vacênico como substrato. Assim, qualquer estratégia que objetive elevar o teor de ácido rumênico na gordura do leite deve focar no aumento do fluxo extra-ruminal do ácido vacênico e da atividade da enzima  $\Delta^9$ -desaturase no tecido mamário (Figura 20).

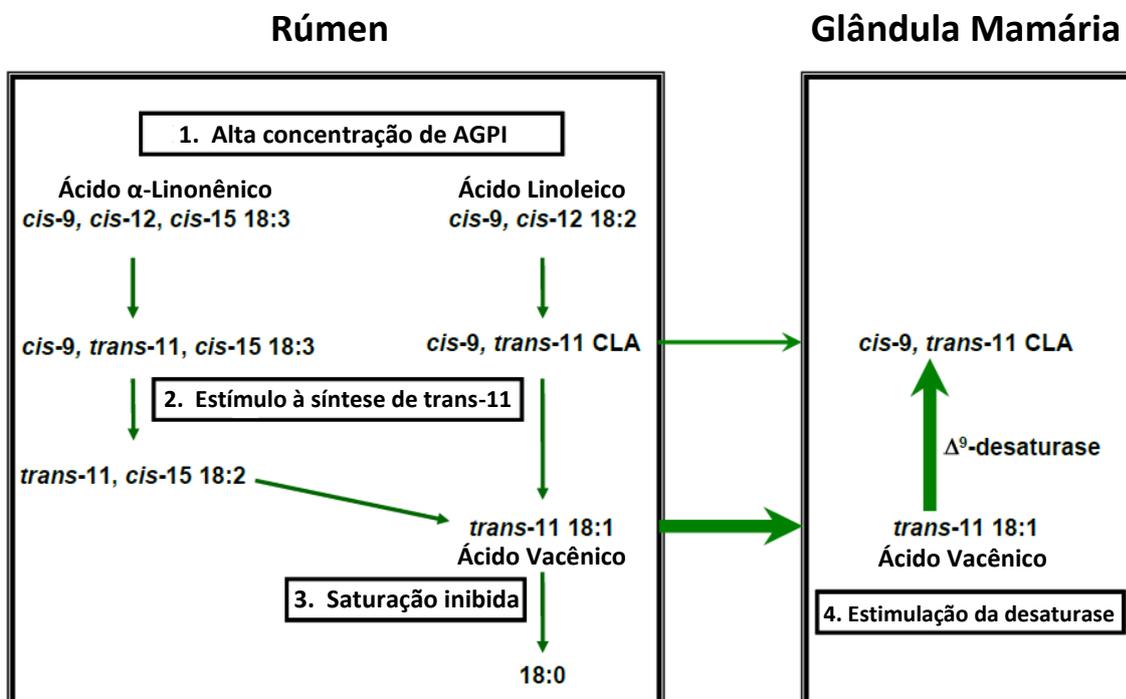
Segundo Bauman e Lock (2006), a secreção láctea de ácido rumênico pode ser afetada tanto por fatores dietéticos como por variações individuais. Podem-se observar diferenças superiores a três vezes na secreção desse isômero de CLA entre indivíduos de um mesmo rebanho. Segundo os autores, esse comportamento se explica, principalmente, pelas diferenças na síntese e atividade da enzima  $\Delta^9$ -desaturase.

Segundo Corl *et al.* (2002), o isômero CLA *trans*-7 *cis*-9 só pode ser sintetizado a partir da ação da enzima  $\Delta^9$ -desaturase do tecido mamário, utilizando como substrato o AG *trans*-7 advindo da BH incompleta do ácido oleico (Figura 19). Essa afirmação é reforçada pelo fato desse isômero de CLA não ser encontrado no fluido ruminal e estar presente em quantidades mínimas no fluido duodenal (Piperova *et al.*, 2002).

A origem do isômero CLA *trans*-10 *cis*-12 era desconhecida até que Kim *et al.* (2002) perceberam que bactérias *Megasphaera elsdenii* da cepa YJ-4 eram capazes de converter ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico a CLA *trans*-10 *cis*-12 (Figura 5). Essa é uma bactéria fermentadora de lactato que se desenvolve no rúmen de animais alimentados com dietas ricas em grãos, ou seja, redutoras de pH.



**Figura 19.** Rotas metabólicas da formação dos isômeros de CLA e seus precursores em ambiente ruminal não-ácido. Adaptado de Collomb *et al.* (2004)



**Figura 20.** Rotas metabólicas da síntese ruminal e endógena do ácido rumênico (CLA cis-9 trans-11) em bovinos leiteiros. Adaptado de Bauman e Lock (2006)

Os teores lácteos desse isômero são sempre muito baixos, mas se elevam em vacas alimentadas com dietas ricas em AGPI, apresentando pH ruminal abaixo de 6,0 (Bauman e Griinari, 2001; Piperova *et al.*, 2002). O CLA trans-10 cis-12 exerce papel fundamental no metabolismo de gorduras ao controlar a lipogênese mamária (Baumgard *et al.*, 2000; Baumgard *et al.*, 2002, Peterson *et al.*, 2003).

A origem do isômero CLA *trans*-9 *cis*-11 ainda não está bem definida, mas artigos dedicados à esse fim sugerem que, assim como o CLA *trans*-10 *cis*-12, ele seja originado da BH incompleta dos AG poli-insaturados presentes na dieta. Assim como o CLA *trans*-10 *cis*-12, a secreção láctea do CLA *trans*-9 *cis*-11 tem sido relacionada com a depressão da lipogênese mamária induzida pela nutrição (Perfield *et al.*, 2007).

### 13.8.2. A atividade da enzima $\Delta^9$ -desaturase

A estearoil-CoA desaturase (SCD) ou delta-desaturase é uma importante enzima presente em vários tecidos dos ruminantes, em especial o adiposo e mamário, que tem por finalidade primária converter os AG saturados em monoinsaturados por meio da introdução de uma dupla ligação entre os átomos 9 e 10 da cadeia carbônica. A SCD também pode catalizar a reação de dessaturação de um largo espectro de AG monoinsaturados, incluindo o ácido vacênico, a fim de gerar o ácido rumênico (Ntambi e Miyazaki, 2004). Assim, a busca pela elevação da sua atividade se torna de grande interesse quando se objetiva a maximização do conteúdo de diversos AG benéficos na gordura do leite (Jacobs *et al.*, 2011).

Corl *et al.* (2001) observaram que cerca de 78% de todo ácido rumênico secretado na gordura do leite era advindo da síntese mamária. Além do vacênico, as conversões do C10:0 a C10:1 *cis*-9, C12:0 a C12:1 *cis*-9 e, principalmente, as do C14:0 a C14:1 *cis*-9, C16:0 a C16:1 *cis*-9 e ácido esteárico a oleico também são reguladas pela SCD nas células mamárias (Ntambi e Miyazaki, 2004). Segundo estes autores, a ação da enzima sobre estes AG não é uniforme, sendo que o C16:0 e o esteárico são favorecidos. Soyeurt *et al.* (2008) observaram que, em média, 40% do ácido esteárico absorvido do plasma pela glândula mamária é convertido em oleico, fazendo com que mais de 50% do oleico secretado no leite bovino seja oriundo da ação da SCD.

Nas fêmeas ruminantes em lactação, o SCD tipo 1 – o tipo mais presente e ativo nos tecidos dos ruminantes – é abundantemente sintetizado na glândula mamária e desempenha papel importante na produção da gordura do leite. No entanto, sua atividade é influenciada por uma série de fatores (Bernard *et al.*, 2008).

A maioria dos estudos que examinaram os efeitos de fatores nutricionais sobre a atividade mamária da SCD em vacas leiteiras, utilizou dietas que causavam redução da lipogênese, ou seja, ricas em carboidrato rapidamente fermentável ou ricas em AGPI. Harvatine e Bauman (2006) e Peterson *et al.* (2003) observaram redução ( $P < 0,05$ ) na expressão mamária da SCD1 em vacas alimentadas com essas dietas. A adição de óleo de peixe, rico em AGPI e conhecidamente redutor da lipogênese, resultaram numa redução significativa na expressão de mRNA SCD1 na glândula mamária (Ahnadi *et al.*, 2002).

Jacobs *et al.* (2011) observaram intensa redução na expressão de mRNA SCD1 na glândula mamária de vacas alimentadas com óleo de soja (fonte de ácido linoleico), sendo que o mesmo comportamento não foi observado nos animais alimentados com óleo de colza (fonte de ácido oleico) ou óleo de linhaça (fonte de ácido  $\alpha$ -linolênico). Segundo os autores, a expressão mamária da SCD1 pareceu ser mais sensível ao fornecimento dietético de linoleico do que ao fornecimento de oleico ou  $\alpha$ -linolênico, sugerindo, então, que a expressão da SCD na glândula mamária bovina responde diferentemente aos diversos AG presentes na dieta.

Outros fatores dietéticos e fisiológicos, citados por Soyeurt *et al.* (2008), capazes de afetar a expressão da SCD são: - o número de lactações; - o período da lactação (início, pico e fim de lactação), sendo que a atividade sobre os AG C14:0 e C16:0 se eleva à medida que a lactação avança; - a raça, sendo que o índice de desaturase (concentração do AG monoinsaturado/concentração do saturado) observado nas raças Jersey e Pardo-Suíço são inferiores ao do observado na raça Holandês; - os teores de gordura ou proteína do leite, já que foram observadas em diversos experimentos correlações negativas entre esses componentes lácteos e os teores de C14:1 *cis*-9, C16:1 *cis*-9 e oleico da gordura.

Griinari *et al.* (2000) avaliaram, dentre outros, o grau de atividade da SCD  $\Delta^9$ -desaturase sobre os diferentes AG saturados na glândula mamária de vacas em lactação. Para isso, utilizaram o ácido esterílico, um potente inibidor da ação da  $\Delta^9$ -desaturase, para comparar as concentrações dos AG monoinsaturados *cis*-9 e do ácido rumênico em momentos de presença ou ausência do ácido esterílico. Os autores observaram que as infusões abomasais do ácido esterílico reduziram as concentrações de ácido rumênico e elevaram proporcionalmente as de vacênico. Comportamento semelhante foi observado pelos pares de AG afetados pela ação da desaturase, quais sejam, o C14:0 e C14:1 *cis*-9, o C16:0 e C16:1 *cis*-9 e o ácido esteárico e oleico, demonstrando, assim, importante papel da enzima  $\Delta^9$ -desaturase sobre o perfil de AG lácteo. Em termos de valores, os autores sugeriram que a enzima  $\Delta^9$ -desaturase é responsável por cerca de 64% do

ácido rumênico presente no leite e por cerca de 70% do C14:1 *cis*-9 advindos da dessaturação do ácido vacênico e do C14:0, respectivamente.

Kay *et al.* (2005) estudaram o impacto do pastejo sobre a atividade da  $\Delta^9$ -desaturase na glândula mamária de vacas e observaram que, apesar da glândula ser insensível à ação da insulina, a presença de altas concentrações elevam o índice de desaturase e, conseqüentemente, o conteúdo de AG monoinsaturados *cis*-9 e de ácido rumênico na gordura do leite. Nos tratamentos em que os animais pastejaram, observaram-se baixas concentrações plasmáticas de insulina e altos teores lácteos de ácido rumênico e outros AG monoinsaturados *cis*-9. Os autores concluíram que os altos teores de ácido rumênico comumente encontrados na gordura do leite de vacas mantidas sob pastejo são, principalmente, reflexo da alta produção de ácido vacênico e, de forma secundária e muito menos importante, devido à atividade e/ou expressão da  $\Delta^9$ -desaturase.

### 13.8.3. Potenciais benefícios do consumo de CLA

Os potenciais efeitos benéficos atribuídos aos isômeros CLA *cis*-9 *trans*-11 e CLA *trans*-10 *cis*-12 (anticarcinogênico, antiaterogênico, antidiabetogênico, imunomodulador, osteosintético e apoptótico), e até mesmo os efeitos negativos (formação de esteatose esplênica e hepática, indução de carcinogênese cólica e hiperinsulinemia) foram embasados, principalmente, em resultados de experimentos utilizando culturas celulares ou modelos animais, com poucas, mas concretas, evidências geradas a partir de estudos com humanos (Wahle *et al.*, 2004; Toomey *et al.*, 2006; Benjamin e Spener, 2009).

Outro detalhe que deixa margem para questionamentos da efetividade desses AG é o fato de que a grande maioria dos estudos com esse foco utilizou na dieta animal suplementação de CLA sintetizado industrialmente, ou seja, não originada de alimentos advindos dos ruminantes. Assim, a atividade fisiológica atribuída ao CLA originado dos produtos de ruminantes ainda precisa de comprovações científicas mais consistentes.

Por serem os isômeros de CLA predominantes na gordura dos ruminantes, o ácido rumênico e o CLA *trans*-10 *cis*-12 são o foco principal da maior parte dos estudos. O interesse por esses isômeros foi estimulado pelos resultados obtidos em estudos utilizando CLA disponível comercialmente, que é composto por uma mistura de quantidades semelhantes desses dois isômeros (aproximadamente, 40% cada um). Nos trabalhos mais recentes, no entanto, tem havido tendência à utilização dos isômeros isoladamente em produtos com grau de pureza superior a 90% (Benjamin e Spener, 2009).

Segundo Belury (1995), os isômeros de CLA são passíveis de acúmulo nos tecidos animais e humanos em quantidades significativas, independentemente da forma de fornecimento, seja via alimentos naturalmente enriquecidos ou por suplementação da dieta sob a forma de óleo. Assim como os AGPI da dieta, os isômeros de CLA e seus metabólitos são rapidamente incorporados aos fosfolípidos de membrana e à fração lipídica dos diversos tecidos (Ip *et al.*, 1991; Belury, 1995).

Além disso, metabólitos alongados e desaturados de CLA originados da dieta já foram identificados em diversos estudos *in vivo*. A descoberta de que esses isômeros podem ser convertidos endogenamente a C18:3, C20:3 e C20:4 conjugados indica novas possibilidades para pesquisas futuras e sugere competição desses AG com outras famílias de AGPI, em particular com os AG  $\omega$ -6 (Banni *et al.*, 2001). Isso sugere, mais uma vez, que o metabolismo de AG no tecido humano é muito mais complexo do que se imaginava inicialmente.

Os tópicos finais apresentados a seguir apresentam de forma sucinta as descobertas relacionadas à ação dos dois principais isômeros de CLA sobre a fisiologia celular e animal e suas atribuições à saúde humana.

#### 13.8.3.1. Ação anticarcinogênica

Os efeitos do CLA sobre a saúde dos seus consumidores foi estudado, inicialmente, em relação ao câncer. Estudos subsequentes com modelos animais e culturas celulares demonstraram que o CLA *cis*-9 *trans*-11 possuía realmente ação anticarcinogênica para diversos tipos de tumores (Ha *et al.*, 1987; Whigham *et al.*, 2000; Belury, 2002; Corl *et al.*, 2003; Parodi, 2003).

Ip *et al.* (1996) observaram que o consumo de manteiga naturalmente enriquecida com ácido rumênico produzida a partir da manipulação dietética de vacas leiteiras foi capaz de reduzir a incidência e o tamanho

de tumores mamários em ratas. Mais recentemente, os mesmos autores verificaram que tanto o ácido rumênico quanto o CLA *trans*-10 *cis*-12 foram eficientes em reduzir a formação de lesões pré-malignas nas glândulas mamárias de ratas após seis semanas da administração de agentes carcinogênicos (Ip *et al.*, 2002). Resultados como esses são a principal razão do enorme interesse pelos alimentos funcionais que contêm CLA em sua composição.

Kritchevsky (2003) publicaram revisão citando ações inibitórias do CLA sobre o desenvolvimento de tumores de pele, estômago, cólon e mama quimicamente induzidos. Estudos *in vitro* de células mieloides leucêmicas de ratos (Lui *et al.*, 2005) e células colorretais e prostáticas humanas (Palombo *et al.*, 2002); e estudos *in vivo* de cânceres de mama (Chajes *et al.*, 2003; McCann *et al.*, 2004) e de próstata em humanos (Ochoa *et al.*, 2004) apresentaram efeitos antiproliferativos significativos gerados pela ação do CLA.

Dados publicados por Larsson *et al.* (2005) sugerem que o consumo de alimentos lácteos enriquecidos com o isômero de CLA *cis*-9 *trans*-11 podem reduzir o risco de desenvolvimento de câncer colorretal. Ip *et al.* (1996) observaram que a ingestão de 0,05 a 0,5% de CLA na dieta foi capaz de reduzir o aparecimento de tumores mamários de ratas tratadas com 7,12-dimetilbenzeno, substância reconhecidamente causadora de câncer.

#### **13.8.3.2. Ação antiobesidade**

A suplementação dietética com o isômero de CLA *trans*-10 *cis*-12 tem apresentado resultados efetivos na redução do percentual da gordura corporal e na elevação do percentual de massa magra corporal de modelos animais e humanos (Akahoshi *et al.*, 2004; Syvertsen *et al.*, 2007). Estudos realizados com roedores, suínos e bovinos sugerem que os efeitos do CLA *trans*-10 *cis*-12 sobre a composição corporal ocorrem tanto devido à redução na deposição de gordura no tecido adiposo como pela elevação da taxa de lipólise nesse tecido (Azain, 2004) e potencializado, possivelmente, com o aumento da oxidação de AG nas células musculares e adipócitos (Perez-Matute *et al.*, 2007). Segundo Benjamin e Spener (2009), além da perda de gordura e do peso corporal total, o consumo de CLA reduziu as concentrações plasmáticas de LDL e do colesterol total.

Tanto o ácido rumênico quanto o CLA *trans*-10 *cis*-12 foram eficientes na redução da síntese e deposição de lipídeos nos adipócitos em modelo animal e em humanos (Mersmann, 2002). Além disso, o CLA *trans*-10 *cis*-12 também foi capaz de elevar o metabolismo basal, reduzir a diferenciação dos pré-adipócitos, reduzir a lipogênese e elevar a lipólise e a oxidação de AG (Salas-Salvados *et al.*, 2006).

#### **13.8.3.3. Ação antiaterosclerótica**

A aterosclerose é uma doença progressiva que acomete artérias de diâmetro médio a calibroso, caracterizada pelo acúmulo de lipídeos no interior das células inflamatórias, pela aderência de plaquetas, pela proliferação celular e pela deposição de cálcio nas paredes arteriais (Benjamin e Spener, 2009).

Alguns estudos com modelos animais (Gavino *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2000; Ostrowska *et al.*, 2002; Kritchevsky, 2003; Navarro *et al.*, 2003; Valeille *et al.*, 2004) e humanos (Noone *et al.*, 2002; Roche *et al.*, 2002; Smedman *et al.*, 2004; Tricon *et al.*, 2004a; Tricon *et al.*, 2006) mostraram que a suplementação dietética com óleo composto por uma mistura de isômeros de CLA (ácido rumênico e CLA *trans*-10 *cis*-12), mas, especialmente, com ácido rumênico puro, afetou de forma positiva o conteúdo plasmático de colesterol. No entanto, boa parte desses estudos salientou que ainda é cedo para que haja posicionamento com relação a esse assunto.

#### **13.8.3.4. Ação antidiabetogênica**

A diabetes pode ser causada pela baixa produção de insulina (tipo I), pela resistência dos tecidos à ação da insulina (tipo II), ou por ambas as causas. A suplementação dietética com CLA *trans*-10 *cis*-12 pode reduzir os sintomas dessa doença, especialmente a do tipo II (Belury *et al.*, 2003; Brown e McIntosh, 2003).

Experimentos com o objetivo de investigar os mecanismos pelo qual o CLA age em nível celular apresentaram dados sugerindo que seus alvos primários de ação são os fatores de transcrição presentes na membrana nuclear, quais sejam: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , SREBP1c (Tópico 8.1) e LXR- $\alpha$  (*Liver X receptor- $\alpha$* ) (Taylor *et al.*, 2004; Syvertsen *et al.*, 2007). Aparentemente, portanto, os efeitos da ação do CLA no

metabolismo da glicose são efeitos secundários mediados pela forma ativada (coativador 1) dos fatores de transcrição como o PPAR $\gamma$  (Hammarstedt *et al.*, 2003). Outra possível ação do CLA na redução da hiperinsulinemia é por meio do estímulo à secreção da adiponectina, hormônio secretado pelos adipócitos, recentemente descoberto, que tem a capacidade de aumentar a sua sensibilidade à insulina (Nagao *et al.*, 2003).

Assim, tornam-se necessários mais estudos com o objetivo de determinar a capacidade do CLA, em especial do isômero CLA *trans*-10 *cis*-12 de influenciar o metabolismo de glicose e lipídeos e, assim, auxiliar no tratamento da diabetes tipo II e de outras mazelas relacionadas à resistência à insulina.

#### 13.8.3.5. Imunomodulação

Estudos *in vitro*, com a utilização de células imunológicas, e *in vivo*, em modelo animal, demonstraram que diversos isômeros de CLA têm a capacidade de modular a função imunológica. No entanto, diferentemente dos resultados observados em modelo animal, o *mix* de CLA consumido por mulheres jovens saudáveis não foi capaz de alterar nenhum dos índices relativos ao *status* imunológico testado, sugerindo que a suplementação de CLA por curtos períodos não trouxe nenhum benefício ao sistema imunológico (Kelley *et al.*, 2000, Tricon *et al.*, 2004b).

O'Shea *et al.* (2004) e Ringseis *et al.* (2006) observaram que os isômeros CLA *cis*-9 *trans*-11 e CLA *trans*-10 *cis*-12 foram capazes de inibir a liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) induzida por eicosanoide nas células da musculatura lisa vascular, afetando, assim, a apresentação de antígeno. O TNF $\alpha$  é uma citocina mediadora da apoptose celular conhecida por ter citotoxicidade contra células tumorais.

Estudos demonstraram que os isômeros CLA *cis*-9 *trans*-11 e CLA *trans*-10 *cis*-12 foram capazes de desencadear respostas imunológicas inatas e adaptativas (Albers *et al.*, 2003; O'Shea *et al.*, 2004; He *et al.*, 2007). Essa característica se deve à capacidade do CLA de modificar os fatores ou mediadores imunológicos como os eicosanoides (Cheng *et al.*, 2003), citocinas (Hur e Park, 2007) e produção de imunoglobulinas (Ramakers *et al.*, 2005).

Os efeitos imunomodulatórios do CLA podem ser aplicados na produção animal como uma alternativa ao uso de antibióticos ou como modo de melhorar a resposta às vacinações, conferindo resistência a doenças (Benjamin e Spener, 2009).

#### 13.8.4. Outras considerações a respeito do consumo de CLA

A heterogeneidade dos resultados de estudos *in vivo* e *in vitro*, e o número ainda limitado de estudos clínicos em humanos tem impedido que o meio científico defina com segurança os isômeros de CLA como sendo nutrientes funcionais.

Um outro aspecto importante é o fato de que a maioria dos estudos clínicos utilizaram misturas sintéticas puras, com predominância do ácido rumênico e do CLA *trans*-10 *cis*-12, como fontes de CLA. Esse fato gera dúvidas com relação ao real potencial nutracêutico da gordura láctea, visto que para que haja a ingestão de quantidades significativas dos isômeros benéficos, deve-se ingerir grandes quantidades de AG não necessariamente benéficos como os AG saturados de cadeia média e os monoinsaturados *trans*, por exemplo. Cria-se, então, limitação principalmente para aqueles indivíduos com problemas relacionados a DCV e pessoas com sobrepeso (Benjamin e Spener, 2009).

## CAPÍTULO I

### Consumo, produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite de vacas Holandês recebendo níveis crescentes de óleo de girassol em dietas à base de capim-elefante picado

#### RESUMO

O experimento teve por objetivo avaliar os efeitos de diferentes níveis de inclusão de óleo de girassol (OG) (0; 1,3; 2,5 e 3,7% em base de matéria seca) em dieta à base de capim-elefante picado sobre o consumo de nutrientes, os parâmetros sanguíneos, a produção, a composição e o perfil de ácidos graxos (AG) do leite e do plasma de doze vacas primíparas da raça Holandês. As primíparas foram distribuídas em três quadrados latinos (QL) 4 x 4, sendo que cada fase teve duração de 15 dias (10 destinados à adaptação às dietas e 5 às coletas de dados e amostras). A inclusão de diferentes níveis de óleo de girassol (OG) à dieta influenciou somente o consumo diário de carboidratos não fibrosos ( $P = 0,0004$ ), de extrato etéreo ( $P < 0,0001$ ) e de OG ( $P < 0,0001$ ). Os consumos de ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1 *cis*-9), linoleico (C18:2 *cis*-9 *cis*-12) e  $\alpha$ -linolênico (C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15) elevaram-se linearmente ( $P < 0,001$ ) com a adição de OG às dietas, destacando-se o aumento de 473% e 328% observados para o ácido linoleico e oleico, respectivamente. Não se observou influência ( $P > 0,05$ ) das dietas sobre nenhum dos parâmetros plasmáticos avaliados. A adição de níveis crescentes de OG não influenciou ( $P > 0,05$ ) a produção de leite total, a corrigida para 3,5 % de gordura, a eficiência produtiva dos animais e nem a produção diária dos componentes lácteos, mas causou aumento linear do teor de gordura ( $P = 0,0015$ ) e do teor de extrato seco total ( $P = 0,0203$ ) sem, no entanto, influenciar ( $P > 0,05$ ) os teores dos demais componentes do leite. Nem o teor nem a produção diária de proteína foram influenciadas ( $P > 0,05$ ). A redução ( $P < 0,0001$ ) de 38% nos teores de ácidos graxos de cadeia carbônica ímpar ou ramificada na gordura do leite e os baixos teores totais de proteína sugerem ter havido algum comprometimento no crescimento da microbiota do rúmen. A suplementação de dietas à base de capim-elefante picado com a adição de níveis inferiores a 3,7% de óleo de girassol melhorou a qualidade da gordura láctea do ponto de vista da nutrição humana. Tais benefícios foram decorrentes da redução ( $P < 0,0001$ ) dos teores dos AG de cadeia curta (C4:0 a C10:0) e média (C12:0 a C16:0); da elevação dos teores de ácido oleico ( $P < 0,0001$ ) e dos isômeros de CLA, em especial do ácido rumênico ( $P < 0,0001$ ), em 26 e 244%, respectivamente; da elevação ( $P < 0,0001$ ) dos valores absolutos da relação entre os ácidos graxos hipo e hipercolesterolêmicos; além da elevação dos índices de aterogenicidade ( $P < 0,0001$ ) e trombogenicidade ( $P < 0,0001$ ). Tais resultados permitiram concluir que o fornecimento de OG ao nível de 3,7% da matéria seca da dieta foi eficiente no sentido de incrementar a qualidade nutricional da gordura láctea.

Palavras-chave: ácido linoleico conjugado, consumo, manejo alimentar, metabólito sanguíneo, *Pennisetum purpureum*, TMR

#### ABSTRACT

*This experiment aimed to evaluate the effects of different levels of sunflower oil (0, 1.3, 2.5 and 3.7% of diet DM) on nutrient intake, blood parameters, milk production and composition and milk and plasma fatty acids (FA) profile of twelve primiparous Holstein cows fed elephant-grass based diet. The cows were divided into three 4 x 4 Latin-square (LS). Each phase of the LS extended by 15 days (10 days for diet adaptation and 5 for data and samples collection). The inclusion of different levels of sunflower oil (SO) influenced only the daily consumption of non-fiber carbohydrates ( $P = 0.0004$ ), of ether extract ( $P < 0.0001$ ) and of SO ( $P < 0.0001$ ). Palmitic (C16:0), stearic (C18:0), oleic (C18:1 *cis*-9), linoleic (C18:2 *cis*-9 *cis*-12) and  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15) intake increased linearly ( $P < 0.001$ ) by adding SO to diets. The diets did not influence any plasma parameters evaluated. The addition of increasing levels of SO did not affected ( $P > 0.05$ ) total and corrected to 3.5% fat milk production, animal efficiency and productivity or the milk components daily productions, but linearly increased milk fat ( $P = 0.0015$ ) and total solids content ( $P = 0.0203$ ). Neither the level nor the daily protein production were affected ( $P > 0.05$ ) by the different levels of SO. The 38% reduction ( $P < 0.0001$ ) in total odd or branched chain FA in milk fat and the low total protein levels suggest that the rumen microbial growth had been impaired. Chopped elephantgrass based diet supplementation with SO levels below 3.7% improved the quality of milk fat. The improve of the milk fat*

quality, in a 3.7% SO supplemented elephantgrass based diet, were caused by a series of factors: – the reduction ( $P<0.0001$ ) of the short (C4:0 to C10:0) and medium (C12:0 to C16:0) chain FA levels; – the elevation of the oleic acid levels ( $P<0.0001$ ); – the improve of the CLA isomers concentrations, especially the rumenic acid ( $P<0.0001$ ); – the elevation ( $P<0.0001$ ) of the ratio between hypo and hypercholesterolemic FA; – the higher atherogenicity ( $P<0.0001$ ) and thrombogenicity ( $P<0.0001$ ) indexes. These results suggests that providing a 3.7% SO supplemented elephantgrass based diet was efficient in order to enhance the nutritional quality of milk fat.

**Keywords:** blood metabolites, conjugated linoleic acid, intake, feed management, Pennisetum purpureum, TMR

## INTRODUÇÃO

Inúmeros trabalhos foram realizados com o objetivo de alterar a composição da gordura láctea, tornando-a mais adequada ao consumo humano (Gama *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2008). Neste sentido, com foco na redução do risco de doenças cardiovasculares tem-se buscado a diminuição dos teores dos ácidos graxos (AG) saturados de cadeia média, como láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), e o incremento da concentração do ácido oleico (C18:1 *cis*-9) no leite (Dewhurst *et al.*, 2006). Por suas propriedades anticarcinogênicas tem sido também alvo das pesquisas elevar as concentrações dos ácidos linoleicos conjugados (CLA), cujo principal isômero presente no leite bovino é o ácido rumênico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11), bem como de seu precursor na glândula mamária, o ácido vacênico (C18:1 *trans*-11) (Dewhurst *et al.*, 2006).

Na maioria dos trabalhos em que foi demonstrado o potencial da suplementação de dietas de vacas leiteiras com fontes lipídicas de origem vegetal ricas em ácidos linoleico e/ou  $\alpha$ -linolênico em alterar positivamente o perfil de AG da gordura do leite (Collomb *et al.*, 2006) foram utilizadas espécies forrageiras frescas de ciclo fotossintético C3, ou forrageiras C4 fornecidas, principalmente, sob a forma de fenos e silagens. Nos processos de fenação e ensilagem podem ocorrer perdas oxidativas de AG poli-insaturados, principalmente  $\alpha$ -linolênico (Dewhurst *et al.*, 2006), que nas plantas forrageiras é o principal substrato lipídico para formação do ácido vacênico via processos de bio-hidrogenação no rúmen, e subsequente dessaturação para ácido rumênico na glândula mamária (Elgersma *et al.*, 2006). Por esta razão, o leite de vacas alimentadas com forrageiras fornecidas frescas apresenta potencialmente maior relação de AG insaturados:saturados, maiores concentrações de AG poli-insaturados e de CLA que o obtido do leite de vacas recebendo dietas baseadas em forragens conservadas (Elgersma *et al.*, 2006; Gama *et al.*, 2008).

O objetivo desse experimento foi avaliar os efeitos da inclusão de níveis crescentes (0; 1,3; 2,5 e 3,7% da MS) de óleo de girassol em dietas à base de capim-elefante picado fornecido a vacas primíparas Holandês sobre o consumo de nutrientes, a produção e composição do leite, os parâmetros plasmáticos e sobre o perfil de AG do leite e do plasma desses animais.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado, no Campo Experimental José Henrique Bruschi, de propriedade da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco a 435 metros de altitude, 21° 37' de latitude Sul e 43° 18' de longitude Oeste, na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. O clima da região é classificado como Cwa, mesotérmico (Köppen), com precipitação média anual de 1.500 mm.

Foram utilizadas doze vacas primíparas da raça Holandês que, no dia anterior ao início do experimento, estavam com  $95 \pm 25$  dias pós-parto, produzindo  $16,5 \pm 2,8$  kg de leite/dia e pesando  $448 \pm 35$  kg em média. Os animais foram distribuídos em três quadrados latinos (QL) 4 x 4. Os QL foram balanceados para efeito residual, onde todos os tratamentos foram precedidos pelos demais o mesmo número de vezes (Sampaio, 2002). Cada bloco continha três animais cuja distribuição foi idealizada de modo a torná-los os mais homogêneos possíveis, considerando os dias em lactação, a produção de leite e o peso corporal. Cada fase do QL teve duração de 15 dias, sendo os dez primeiros destinados à adaptação às dietas e os cinco últimos, às coletas de dados e amostras, totalizando 60 dias de período experimental.

A utilização exclusiva de primíparas ocorreu devido à disponibilidade desses animais no Campo Experimental no momento que precedeu o início do experimento. Não houve, contudo, o objetivo específico de estudar tal categoria.

Os animais foram alojados em curral do tipo *free-stall*, com camas individuais forradas com areia, bebedouros coletivos, cochos para suplementação mineral e sistema de limpeza de pista por *flushing*. As ordenhas foram feitas mecanicamente, duas vezes ao dia (às 6:00 h e às 14:00 h) e a produção de leite registrada diariamente durante todo o período experimental.

As instalações de ordenha eram compostas por uma sala de espera e uma sala de ordenha com fosso central e sistema de contenção para 16 animais (8 x 8) em posicionamento semi-paralelo a 60°. O sistema de ordenha da marca Alfa-Laval era composto por unidade de vácuo VPB77, pulsadores eletrônicos EP100 com regulador automático, unidade de ordenha modelo *Harmony* auxiliada por extratores de teteiras automáticas com braço de serviço, medidores de vazão MM25, unidades final SR60 e de limpeza C100E.

As pesagens dos animais foram feitas na parte da manhã dos três primeiros dias de cada fase do QL e nos três últimos dias do experimento, em balança digital da marca Toledo modelo MGR-2000 (Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda, São Bernardo do Campo, SP), sendo considerada como peso final, a média dos três dias. Não houve jejum prévio.

Todos os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo número 280/2010.

## 1. Dietas experimentais

Originalmente, as dietas experimentais (tratamentos) a serem avaliadas no presente experimento foram formuladas pelo programa SPARTAN (versão 2.0; *Michigan State University*, MI, EUA) com base nas exigências nutricionais estabelecidas pelo NRC (2001) para essa categoria animal (primíparas de 450 kg de peso corporal, 16 kg de leite/dia com 3,5% de gordura) de modo a conterem teores de OG iguais a 0; 1,5; 3,0 e 4,5%, e relação volumoso:concentrado igual a 60:40, em base de matéria seca (MS).

O estabelecimento dos níveis de OG em 0; 1,5; 3,0 e 4,5% foi feito com o objetivo de comparar os resultados com aqueles observados por Ribeiro (2009a) em experimento semelhante, mas utilizando óleo de soja como principal fonte de AG insaturados. Entretanto, devido às diferenças nos teores de MS, fibra e proteína do capim-elefante considerados no momento da formulação das dietas com aqueles observados no decorrer do período experimental, houve desbalanços nas dietas e, conseqüentemente, variação na relação volumoso:concentrado e nos teores de OG e de energia inicialmente planejados.

A formulação e a composição química estimadas das dietas calculadas pelo programa SPARTAN são apresentadas na Tabela 1. Na Tabela 2, é apresentada a formulação e a composição real das dietas avaliadas no experimento.

**Tabela 1.** Formulação e composição química das dietas experimentais originalmente estabelecidas

Ingredientes <sup>1</sup>	Dietas (% da matéria seca)			
	Controle	1,5% OG <sup>2</sup>	3,0% OG	4,5% OG
Capim-elefante	60,4	60,6	60,5	59,9
Fubá de milho	10,8	9,7	8,9	8,2
Farelo de soja	16,5	17,2	17,1	17,6
Polpa cítrica	10,8	9,5	8,9	8,2
Núcleo vitamínico-mineral	1,5	1,5	1,5	1,5
Óleo de girassol	0,0	1,5	3,0	4,5
<b>Composição química<sup>1</sup></b>				
Matéria seca – MS (%)	26,4	26,3	26,4	26,5
Proteína bruta (% da MS)	15,1	15,2	15,1	15,2
Fibra em detergente neutro (% da MS)	47,1	46,9	46,6	46,1
Extrato etéreo (% da MS)	2,1	3,5	5,0	6,4
Energia líquida de lactação (Mcal/kg)	1,51	1,57	1,62	1,68

<sup>1</sup>Valores estimados pelo SPARTAN (*Michigan State University*, versão 2.0); <sup>2</sup>OG = óleo de girassol.

**Tabela 2.** Formulação e composição química real das dietas experimentais

Ingredientes	Dietas (% da matéria seca)			
	Controle	1,3% OG <sup>1</sup>	2,5% OG	3,7% OG
Capim-elefante	67,4	67,6	67,5	66,9
Milho moído	8,9	7,9	7,3	6,8
Farelo de soja	13,6	14,1	14,1	14,5
Polpa cítrica	8,9	7,8	7,3	6,7
Núcleo vitamínico-mineral	1,3	1,3	1,3	1,3
Óleo de girassol	0,00	1,28	2,50	3,74
Composição química <sup>2</sup>				
Matéria seca – MS (%)	28,7	29,8	29,5	30,8
Proteína bruta (% da MS)	12,4	12,8	12,1	12,4
Fibra em detergente neutro (% da MS)	53,2	53,4	53,5	53,5
Fibra em detergente ácido (% da MS)	33,0	32,8	32,9	32,9
Extrato etéreo (% da MS)	1,6	3,0	4,2	5,1
Concentração de ácidos graxos (g/100 g de AG totais)				
C16:0 (g/100 g de AG)	24,423	22,087	21,763	21,483
C18:1 <i>cis</i> -9 (g/100 g de AG)	10,278	9,364	9,532	9,394
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 (g/100 g de AG)	28,457	31,374	33,103	33,658
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 (g/100 g de AG)	21,693	20,994	20,835	20,759

<sup>1</sup>OG = óleo de girassol; <sup>2</sup>Valores médios nos quatro períodos de coleta.

Assim, os tratamentos oferecidos, em base de MS, foram os seguintes:

- Controle: capim-elefante picado + suplemento concentrado sem adição de OG;
- 1,3% OG: capim-elefante picado + suplemento concentrado com adição de 1,3% de OG;
- 2,5% OG: capim-elefante picado + suplemento concentrado com adição de 2,5% de OG;
- 3,7% OG: capim-elefante picado + suplemento concentrado com adição de 3,7% de OG.

Foi utilizado o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach) picado como única fonte de volumoso e foram fornecidas na forma de mistura completa (*Total mixed ration* - TMR) com relação volumoso:concentrado de 67:33, em base de MS. Como esperado, elas foram isofibrosas, isoproteicas e apresentaram teores de energia uniformemente crescentes.

As dietas foram fornecidas *ad libitum* 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), em cochos cobertos dotados de portões eletrônicos do tipo *calan-gate* (*American Calan Inc.*, Northwood, NH, EUA), instalados em curral *free-stall*, com acesso livre à água e à mistura mineral. As quantidades oferecidas foram ajustadas diariamente antes do fornecimento da refeição, tomando por base a pesagem das sobras, a fim de permitir 10% de sobras.

O capim-elefante foi cortado de capineira pré-estabelecida, situada próximo ao local de realização do experimento. No período pré-experimental, o solo da capineira foi corrigido e adubado conforme recomendações agrônômicas. Foram feitos cortes de uniformização de forma escalonada, objetivando-se formar faixas de capim-elefante de diferentes idades de rebrota, a fim de se obter uniformização da qualidade da forragem no momento da colheita. Os cortes de uniformização deveriam garantir colheitas de gramínea com composição bromatológica condizente com a idade de crescimento de 40 a 48 dias, mas devido ao excesso de chuvas ocorrido no período pré-experimental, principalmente no mês de janeiro (Tabela 3), o crescimento da forragem não foi o esperado, impedindo, assim, a utilização do material na idade e composição bromatológica desejadas (Tabela 4). Assim, a idade média do capim-elefante utilizado durante o experimento foi de, aproximadamente, 70 dias.

**Tabela 3.** Temperaturas médias máximas (T<sub>máx</sub>) e mínimas (T<sub>mín</sub>) e precipitação entre os meses de novembro de 2008 e março de 2009

Mês / Ano	T <sub>máx</sub> <sup>1</sup> (°C)	T <sub>mín</sub> <sup>2</sup> (°C)	Precipitação (mm)
Novembro / 2008	27,7	17,7	195,8
Dezembro / 2008	30,0	20,0	200,0
Janeiro / 2009	30,2	20,6	288,7
Fevereiro / 2009	29,1	19,7	105,1
Março / 2009	32,1	21,4	179,2

<sup>1</sup>Média das temperaturas máximas diárias observadas no mês; <sup>2</sup>Média das temperaturas mínimas diárias observadas no mês.

O capim-elefante foi cortado e transportado para o local do experimento a cada dois dias, sempre pela manhã. Após cada corte, o capim era abrigado em galpão coberto até o momento da picagem em picadeira móvel da marca Menta modelo S20T (Menta Mit Máquinas Agrícolas LTDA, Cajuru, SP), impulsionada e deslocada por trator Valmet modelo 88 (Valtra, Mogi das Cruzes, SP). A picagem do capim foi sempre realizada momentos antes do fornecimento das refeições. Devido ao fato de terem sido consumidas em, no máximo, 48 horas após seu corte, pressupôs-se que o material mantivesse seu conteúdo lipídico íntegro, com ação mínima da oxidação bacteriana e das lípases endógenas.

**Tabela 4.** Composição bromatológica e digestibilidade *in vitro* da matéria seca do capim-elefante picado coletado durante os períodos de coleta das quatro fases dos Quadrados Latinos

	1ª fase	2ª fase	3ª fase	4ª fase	Valadares <i>et al.</i> (2010) <sup>1</sup>
Matéria seca, MS (%)	20,7	23,5	25,1	25,6	20,8
Proteína bruta (% da MS)	6,1	6,7	5,8	5,0	8,4
Extrato etéreo (% da MS)	1,2	1,3	1,3	1,2	2,6
Fibra em detergente neutro <sup>2</sup> (% da MS)	77,0	74,1	75,6	76,3	75,0
PIDN <sup>3</sup> (% da MS)	1,56	1,63	1,5	1,38	-
Fibra em detergente ácido <sup>2</sup> (% da MS)	51,3	49,3	47,5	49,3	43,9
Lignina (% da MS)	7,8	8,1	8,4	8,9	8,2
Cinzas (% da MS)	9,7	9,5	8,0	8,3	8,1
Digestibilidade <i>in vitro</i> da MS (%)	56,2	57,8	55,4	53,9	62,1
Concentração de ácidos graxos (g/100 g de AG totais)					
C18:1 <i>cis</i> -9	3,971	5,268	3,541	3,434	-
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	16,706	18,751	18,565	19,914	-
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	28,853	27,267	35,009	34,700	-

<sup>1</sup>Valores referentes ao capim-elefante com 61 a 90 dias apresentados por Valadares Filho *et al.* (2010);

<sup>2</sup>Valores corrigidos para cinzas; <sup>3</sup>Proteína insolúvel em detergente neutro.

O preparo dos concentrados, formulados com fubá de milho, farelo de soja, polpa cítrica, óleo de girassol e núcleo vitamínico-mineral, ocorreu a cada 14 dias. A polpa cítrica substituiu metade do fubá de milho em todas as dietas. A sua inclusão teve como objetivo principal alterar os padrões de fermentação ruminal a partir da substituição de parte do amido pela pectina. A pectina induz maior formação de acetato e menor de propionato permitindo, assim, minimizar possíveis reduções indesejáveis no pH ruminal (Leiva *et al.*, 2000; Hall, 2001; Eifert, 2004). Os resultados das análises bromatológicas dos concentrados coletados em cada fase do QL são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Composição química média dos concentrados nas quatro fases do Quadrado Latino

Composição Química	Nível de inclusão de óleo de girassol (% da matéria seca da dieta)			
	Controle	1,3%	2,5%	3,7%
Matéria seca, MS (%)	87,8	88,1	88,2	88,5
Proteína bruta (% da MS)	25,6	26,7	24,7	25,7
Extrato etéreo (% da MS)	2,4	6,5	10,0	13,0
Fibra em detergente neutro <sup>1</sup> (% da MS)	14,1	13,2	12,6	15,1
PIDN <sup>2</sup> (% da MS)	5,06	4,69	4,69	5,63
Cinzas (% da MS)	8,0	8,2	8,1	7,5

<sup>1</sup>Valores corrigidos para cinzas; <sup>2</sup>Proteína insolúvel em detergente neutro.

O núcleo mineral (Matsuda – Top Milk Núcleo, S. S. Paraíso, MG) utilizado na formulação dos concentrados foi misturado ao sal branco (NaCl) na proporção 1:1 e disponibilizado para os animais durante todo o período experimental em cochos específicos para esse fim. A formulação do núcleo vitamínico-mineral está apresentada na Tabela 6.

**Tabela 6.** Formulação do núcleo vitamínico-mineral

Mineral/Vitamina	Concentrações <sup>1</sup>
Cálcio (g)	255 (mín.) – 268 (máx.)
Fósforo (g)	76
Enxofre (g)	20
Magnésio (g)	30
Cobalto (mg)	60
Cobre (mg)	850
Iodo (mg)	65
Manganês (mg)	2.000
Selênio (mg)	20
Zinco (mg)	6.000
Ferro (mg)	1.000
Flúor (mg)	760 (máx.)
Vitamina A (U.I./kg)	220.000
Vitamina E (U.I./kg)	500

<sup>1</sup>Níveis mínimos de garantia por quilograma de produto.

## 2. Determinação do consumo

O consumo individual de alimentos foi determinado nos cinco dias de coleta de cada fase do QL, a partir da diferença entre a quantidade de sobras recolhidas pela manhã e o material total oferecido a cada indivíduo no dia anterior.

A estimativa do consumo diário dos nutrientes da dieta, em kg/dia, foi calculada a partir da multiplicação do peso (em base de matéria seca) do material consumido pelo teor médio do nutriente presente no alimento e nas respectivas sobras individuais. Foram também calculados a ingestão de nutrientes em relação ao consumo diário de MS (% da MS), o consumo de MS e FDN em porcentagem do peso corpóreo (%pc).

### 3. Avaliação da composição química e do perfil de ácidos graxos da dieta

Nos cinco dias de coleta de cada fase do QL, foram realizadas amostragens diárias do capim-elefante picado, dos concentrados, das dietas completas e das respectivas sobras individuais, sendo transformadas em compostas representativas da fase do QL a que se referem e por vaca por fase do QL (sobras individuais). Também foram coletadas amostras dos quatro tipos de concentrado após o preparo da mistura no 1º e no 14º dia, com o objetivo de avaliar possíveis alterações no perfil de ácidos graxos causadas por oxidação durante o período de armazenamento.

Após a coleta, todas as amostras foram armazenadas a -10°C. Depois de descongeladas, as amostras de volumoso, concentrado, oferecido e sobras, foram pré-secadas 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 no Laboratório de Análises de Alimentos da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG) quanto aos teores de MS a 105°C, cinzas, proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas (cFDN), fibra em detergente ácido corrigida para cinzas (cFDA), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN), celulose e lignina segundo AOAC (1990). Utilizou-se a enzima amilase durante as análises de fibra das amostras de concentrado.

Amostras do capim-elefante picado, dos suplementos concentrados e de seus ingredientes também foram analisadas quanto ao perfil de AG. Para tanto, depois de coletadas e congeladas (-10°C), elas foram liofilizadas em liofilizador modelo FD18 (Labconco, Kansas City, MO, EUA), moídas a 1 mm e, posteriormente, encaminhadas ao Laboratório de Óleos Essenciais e Aromas da Embrapa Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro, RJ). As amostras foram homogeneizadas e trituradas em *blender* e a análise dos teores de gorduras saturada e insaturada foi realizada segundo o Método oficial 996.06, da AOAC (1990). A metilação dos AG seguiu protocolo proposto por Hartman e Lago (1973).

Os ésteres metílicos obtidos foram analisados por cromatografia em fase gasosa em cromatógrafo modelo HP 5890 series II da Hewlett Packard com detector ionização de chama (FID), utilizando-se coluna capilar de sílica fundida de 60 m x 0,32 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de fase estacionária de ciano propil siloxano, com 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 volume igual a 1 µL de solução 2% em diclorometano. A temperatura do detector de ionização de chama foi de 280°C e o fluxo de gás carreador (H<sub>2</sub>) foi de 2,5 mL/min (medido a 40°C).

A identificação dos ésteres metílicos dos AG foi realizada por comparação dos tempos de retenção com padrões da NU-CHEK (Elysian, IL., EUA) números 62, 79 e 87. O teor de cada AG em relação ao peso de amostra de concentrado e de forragem foi calculado utilizando o peso do padrão interno e os fatores de conversão do método 996.06 (AOAC, 1990). Para cálculo do teor de AG foi realizada normalização interna.

O OG utilizado no experimento, da marca SIOL (Siol Alimentos, Barueri, SP), também foi amostrado para análise do perfil de AG. A metilação das amostras de OG ocorreu por transmetilação alcalina de acordo com Christie (1982), com modificações (Chouinard *et al.*, 1999). A determinação dos AG foi realizada no Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora - MG) em cromatógrafo gasoso, modelo 6890N (*Agilent Technologies*) com detector de ionização de chama (FID), utilizando-se coluna capilar de sílica fundida *Varian* (Palo Alto, CA, EUA), modelo CP-Sil-88, de 100 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,2 µm de fase estacionária de ciano propil siloxano. As condições da corrida (fluxo dos gases e gradiente de temperatura do forno e injetor) foram descritas por Kramer *et al.* (2001) com modo de divisão de fluxo (*split*) numa razão de 50:1. A identificação dos ésteres metílicos dos AG presentes no OG ocorreu da mesma maneira que nos alimentos.

A determinação da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) do capim-elefante oferecido em cada fase do QL foi realizada no Laboratório de Digestibilidade da Embrapa Gado de Leite (Coronel Pacheco, MG), segundo a metodologia descrita por Tilley e Terry (1963). Não foram realizadas análises de DIVMS nas sobras.

As amostras de capim-elefante utilizadas nas análises foram obtidas do *pool* de amostras coletadas nos cinco dias de coleta de cada fase do QL. Elas foram pré-secadas em estufa de ventilação forçada (TE-394/3, Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP) regulada para a 55°C por 72 horas e moídas a 1 mm antes de serem analisadas. As amostras foram digeridas em triplicata por 96 h.

#### 4. Avaliação da produção e composição do leite

O registro das produções individuais de leite foi realizado nos cinco dias de coleta de amostras de cada fase do QL a partir da soma das produções das duas ordenhas diárias aferidas por meio de medidores de vazão da marca Alfa-Laval modelo MM25.

A produção de leite corrigida (PLC) para 3,5% de gordura (PLC3,5%) foi calculada segundo Sklan *et al.* (1992), por meio da seguinte fórmula:

$$\text{PLC}_{3,5\%} = (0,432 + 0,1625 \times \% \text{ de gordura do leite}) \times \text{produção de leite em kg/dia}$$

Neste mesmo período, foram coletadas em frascos plásticos de 50 mL contendo uma pastilha de bronopol como conservante (AOAC, 1990) amostras individuais para a determinação da composição físico-química do leite. A coleta foi feita por meio de dispositivo acoplado à ordenhadeira e, após a homogeneização do leite ordenhado, foram coletadas em alíquotas de 2/3 e 1/3 (respectivamente nas ordenhas da manhã e da tarde) com o objetivo de obter amostras representativas da produção individual no período de 24 horas. As amostras foram mantidas sob refrigeração (<10°C), por período nunca superior a 24 horas, até o momento das análises (teores de gordura, lactose, proteína, extrato seco total e desengordurado e contagem de células somáticas), realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG), no equipamento Bentley 2000 (*Bentley Instruments*).

A avaliação da contagem de células somáticas (CCS), expressa em células/mL, foi convertida para o sistema de escore linear (EL), cuja amplitude varia de 0 a 10, segundo recomendações propostas por Dabdoub e Shook (1984). A conversão foi realizada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{EL} = (\log_2 (\text{CCS} / 100.000)) + 3$$

Segundo os autores, o EL de uma glândula mamária sadia deve ser inferior a 4 (equivalente a 330.000 células/mL de leite).

O aumento anormal da CCS do leite é reflexo da presença de infecções intramamárias. Esse aumento exerce influência sobre a composição do leite, reduzindo a concentração dos constituintes normais e elevando a de constituintes sanguíneos, como albumina, imunoglobulinas e alguns íons (Wilson *et al.*, 2004). Apesar de aparentemente a CCS não ser afetada pela adição de lipídios à dieta, tornou-se necessária sua avaliação com o objetivo de verificar se a sanidade mamária influenciou a composição do leite no presente experimento.

A eficiência produtiva (EP), índice que permite verificar a eficiência de conversão do alimento consumido em leite secretado, foi calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\text{EP} = \text{consumo de MS/produção de leite em kg/dia}$$

#### 5. Avaliação do perfil de ácidos graxos do leite

No primeiro dia de coletas de dados e de amostras de cada fase do QL também foram obtidas amostras individuais de leite das 12 vacas, em frascos plásticos de 50 mL sem conservante. Estas amostras foram congeladas e armazenadas (-10°C) visando à posterior determinação do perfil de AG no Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG).

No dia do preparo, as amostras de leite foram descongeladas e homogeneizadas com o auxílio do aparelho de ultrassom modelo T660/H da marca Elma (Schwing, Alemanha). O processo de extração lipídica baseou-se no procedimento proposto pela AOAC (*Official Method* 985.05). Em 1,0 mL de amostra, foram adicionados hidróxido de amônio 25%, etanol 94%, dietil-éter e hexano (0,2; 1,0; 2,5 e 2,5 v/v). A única modificação em relação ao procedimento original foi a substituição do éter de petróleo pelo hexano como solvente. A fase superior contendo a gordura (~40 mg) foi transferida para outro tubo de ensaio e evaporada completamente com a utilização de fluxo de gás nitrogênio.

Durante a obtenção dos AG metil-éster, que ocorreu por transmetilação alcalina, de acordo com Christie (1982) com modificações (Chouinard *et al.*, 1999), foram utilizados 40 µL de solução reagente recém-preparada (1,75 mL de metanol e 0,4 mL de metóxido de sódio – MeONa). Este procedimento foi 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). Em

seguida, o conteúdo foi neutralizado pela adição de 60 µL de solução de ácido oxálico (1,0 g de ácido oxálico em 30 mL de dietil-éter), os resíduos de metanol e água foram retirados pela adição de 200 mg de cloreto de cálcio e, após centrifugação, o líquido foi transferido para recipientes do tipo *vial* com tampas plásticas com septos de Poli Tetra Fluoretileno (PTFE).

A concentração de cada AG presente nas amostras – expressa em g/100 g de AG totais – foi calculada a partir da multiplicação da relação das suas áreas sob as curvas (picos) em relação à área total do cromatograma (%) pela produção diária de gordura total. As concentrações dos AG de cadeia carbônica par de 4 a 18 foram corrigidas por fatores de conversão segundo Wolff *et al.* (1995).

Com o objetivo de facilitar a interpretação do comportamento de síntese e secreção de alguns AG chave, foram calculados alguns somatórios e relações entre eles. Essas relações estão apresentadas a seguir:

Σ CLA: Somatório dos ácidos linoleicos conjugados (CLA) *cis*-9 *trans*-11 + *trans*-7 *cis*-9; CLA *trans*-9 *cis*-11 e CLA *trans*-10 *cis*-12;

Σ Inibidores: Somatório dos inibidores da lipogênese mamária (CLA *trans*-9 *cis*-11 e CLA *trans*-10 *cis*-12);

Σ Saturados Cadeia Par Curta, Média, Longa e Total: Somatório dos AG saturados de cadeia carbônica par curta (4 a 10 carbonos), média (12 a 16 carbonos), longa (≥18 carbonos) e da soma de todos eles, respectivamente;

Σ AGCIR: Somatório dos AG de cadeia carbônica ímpar linear e ramificada (*anteiso*, *iso*);

Σ *Anteiso*: Somatório dos AG de cadeia ímpar ramificada *anteiso*;

Σ *Iso*: Somatório dos AG de cadeia ímpar ramificada *iso*;

Σ Impares Lineares: Somatório dos AG de cadeia carbônica linear ímpar;

Σ Monoinsaturados Pares: Somatório de AG com insaturações únicas *cis*, *trans* e da soma de todos eles;

Σ C18:1: Somatório dos AG monoinsaturados de cadeia carbônica igual a 18;

Σ Poli-insaturados: Somatório dos AG poli-insaturados com ligações (*cis*, *cis*) nas posições ω-3 e ω-6;

Σ C18 ω-6 *trans*: Somatório dos AG de cadeia carbônica igual a 18 com saturações *trans* na posição ω-6;

Hipo:hiper: Relação entre o somatório dos AG hipocolesterolêmicos (C18:1 *cis*-9; C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15; C20:5 ω-3 e C22:6 ω-3) e o somatório dos AG hipercolesterolêmicos (C12:0; C14:0 e C16:0);

ω-6:ω-3: Relação entre o somatório dos AG ω-6 e o somatório dos AG ω-3;

Delta 12, 14, 16, 18 e CLA: Relação calculada a partir da divisão dos AG monoinsaturados *cis*-9 pelos seus isômeros saturados, permitindo, assim, verificar o grau de atividade e seletividade de substrato pela enzima Δ<sup>9</sup>-desaturase;

Índice de Aterogenicidade = {(C12:0 + (4 x C14:0) + C16:0)}/(ΣAGMI + Σω6 + Σω3), onde ΣAGMI é o somatório dos AG monoinsaturados, segundo (Ulbricht e Southgate, 1991);

Índice de Trombogenicidade = (C14:0 + C16:0 + C18:0)/{(0,5 x ΣAGMI) + (0,5 x Σω6) + (3 x Σω3) + (Σω3 / Σω6)}, onde ΣAGMI é o somatório dos AG monoinsaturados, segundo (Ulbricht e Southgate, 1991);

## 6. Parâmetros sanguíneos

As amostras de sangue foram coletadas via punção da veia coccígea, após a ordenha da manhã do último dia de coletas de cada fase dos QLs utilizando tubos a vácuo contendo solução do ácido etilenodiaminotetraacético tripotássico (EDTA-K<sub>3</sub>) a 10% como anticoagulante. Essas amostras foram imediatamente centrifugadas (1.500 g por 15 min) para separação do plasma. As alíquotas destinadas à análise das concentrações de glicose, ureia, AG não-esterificados (AGNE) e à identificação do perfil de AG foram acondicionadas em microtubos (capacidade de 2 mL) com tampa, previamente identificados, e congelados a -10°C.

As concentrações plasmáticas de glicose foram determinadas pelo método enzimático da glicose oxidase (*kit* Glicose PAP ref. 84 da LabTest<sup>®</sup> Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG); as de ureia, pelo método enzimático-colorimétrico da urease (*kit* Ureia CE ref. 27 da LabTest<sup>®</sup> Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG) e AGNE (*kit* NEFA C, Wako Pure Chemicals Industries).

A análise qualitativa dos AG presentes no plasma sanguíneo seguiu o procedimento de transmetilação direta (*one step*) proposto por Masood *et al.* (2005). Em 50 µL de amostra foram adicionados 1,9 mL de metanol e 100 µL de cloreto de acetila; a solução resultante foi mantida em banho-maria a 95°C por 60 minutos. Após

seu resfriamento, adicionou-se 1,5 mL de hexano que foi, em seguida, transferido para outro tubo de ensaio e evaporada completamente com a utilização de fluxo de gás nitrogênio. Ao final do processo, a fase apolar foi ressuspensa com 60 µL de hexano e armazenada em recipiente próprio do tipo *vial* com tampas plásticas com septos de Poli Tetra Fluoretileno (PTFE).

Durante o preparo, foram adicionados 100 µg de Butil-Hidroxi-Tolueno (BHT) – pureza >99% - (SAFC, St. Louis, MO, EUA) por amostra, com o objetivo de impedir possíveis oxidações lipídicas durante o preparo das amostras (Masood *et al.*, 2005).

A determinação dos AG nas amostras de plasma foram realizadas no Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora - MG) em cromatógrafo gasoso, modelo 6890N, da *Agilent Technologies*, com detector de ionização de chama (FID), utilizando-se coluna capilar de sílica fundida *Varian* (Palo Alto, CA, EUA), 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 (fluxo dos gases e gradiente de temperatura do forno e injetor) foram descritas por Kramer *et al.* (2001), com modo de divisão de fluxo (*split*) numa razão de 1:1 (*splitless*). A identificação dos ésteres metílicos dos AG do leite ocorreu de forma semelhante à dos alimentos e leite.

## 7. Procedimentos estatísticos

Os resultados de consumo e digestibilidade de nutrientes, produção de leite, parâmetros plasmáticos, composição e perfil de AG do plasma e do leite foram analisados por meio de modelos mistos, utilizando-se o procedimento MIXED do SAS versão 9.0 (P<0,05). A escolha da matriz de co-variância foi realizada com base no Critério de Informação Akaike-AIC (Wolfinger, 1993), adotando-se as seguintes fontes de variação: QL, vaca dentro de QL, período, níveis de OG e interação QL *versus* níveis.

Foram considerados efeitos fixos os níveis de inclusão do OG nas dietas e como efeitos aleatórios período, vaca, vaca (QL) e QL. Os efeitos linear e quadrático foram analisados por contrastes ortogonais utilizando o comando CONTRAST do SAS versão 9.0.

Estudos de regressão e correlação foram realizados para algumas variáveis foi feito por meio do procedimento CORR e REG do SAS versão 9.0, correlação de Pearson (P<0,05).

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 1. Consumo de alimentos

A inclusão de diferentes níveis de óleo de girassol (OG) à dieta não influenciou (P>0,05) o consumo diário da matéria seca (MS), das fibras insolúveis em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA) ou da proteína bruta (PB), tanto em kg/dia como em relação ao peso corporal (g/kg de pc ou em %pc), conforme apresentado na Tabela 1. As exceções se referem ao consumo diário de carboidratos não fibrosos (CNF) (P = 0,0004), de extrato etéreo (EE) (P<0,0001), de OG (P<0,0001) e dos diversos ácidos graxos (AG), reflexo do aumento da adição de OG nas dietas. Não houve interação entre QL x tratamento (P>0,05) para nenhuma das variáveis avaliadas.

Segundo o NRC (2001), a previsão de consumo diário de nutrientes (em base de MS) para a categoria animal avaliada – primíparas da raça Holandês com 450 kg de peso corporal, produzindo 15,0 kg de leite/dia contendo 3,5% de gordura e 2,75% de PB – é de 13,1 kg de MS; 13,0% ou 1,70 kg de PB, no máximo de 8,0% ou 1,05 kg de EE e, no mínimo, 28,0% ou 3,67 kg de FDN. Os consumos diários de MS e PB não alcançaram os valores estimados pelo NRC (2001). Tais resultados explicam-se, em parte, pela diferença entre a composição química da dieta estimada e a realmente fornecida aos animais (Tabelas 1 e 2 do Material e Métodos). Como explicado anteriormente, essa diferença ocorreu devido às variações nos teores de MS, FDN e PB do capim-elefante entre o momento da formulação das dietas e os obtidos no decorrer do experimento, apesar dos cuidados culturais tomados com a capineira durante o período pré-experimental.

**Tabela 1.** Consumos diários de nutrientes de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total

Variável	Nível de inclusão de OG na MS da dieta (%)				EPM <sup>1</sup>	Valores de P		Equações de regressão	r <sup>2</sup>
	0,0	1,3	2,5	3,7		L	Q		
	kg/dia								
MS	10,8	11,5	10,8	11,1	0,3551	0,9545	0,4230	-	-
FDN	5,79	6,13	5,80	5,93	0,2010	0,8880	0,4002	-	-
FDA	3,58	3,76	3,56	3,64	0,1235	0,9617	0,4820	-	-
PB	1,34	1,46	1,31	1,38	0,0526	0,7085	0,3450	-	-
CNF	3,54	3,52	3,28	3,21	0,1059	0,0004	0,7097	$\hat{y} = 3,576 - 0,097X$	0,17
EE	0,175	0,344	0,449	0,568	0,0129	<0,0001	0,0010	$\hat{y} = 0,187 + 0,105X$	0,93
OG	0,000	0,149	0,271	0,414	0,0077	<0,0001	0,5942	$\hat{y} = 0,00067 + 0,11115X$	0,98
	g de alimento/kg de peso corporal								
MS	24,4	25,5	24,6	25,1	0,9061	0,5499	0,6024	-	-
FDN	13,0	13,6	13,2	13,4	0,5187	0,4812	0,5615	-	-
	% do peso corporal								
MS	2,44	2,55	2,46	2,51	0,0908	0,5626	0,5846	-	-
FDN	1,30	1,36	1,32	1,34	0,0517	0,5294	0,5784	-	-
	g/dia								
C16:0	28,0	39,6	46,1	52,7	1,3454	<0,0001	0,0102	$\hat{y} = 29,02 + 6,322X$	0,63
C18:0	4,0	8,1	10,7	13,4	0,3094	<0,0001	0,0040	$\hat{y} = 4,863 + 2,950X$	0,19
C18:1 <i>cis</i> -9	20,3	48,2	68,5	86,9	1,8884	<0,0001	0,0017	$\hat{y} = 23,55 + 19,03X$	0,61
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	48,1	139,3	208,2	275,6	5,8736	<0,0001	0,0084	$\hat{y} = 51,41 + 59,97X$	0,86
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	19,2	21,8	21,2	22,3	0,6476	0,0001	0,1045	$\hat{y} = 19,76 + 0,723X$	0,20

<sup>1</sup>Erro padrão da média; r<sup>2</sup> = coeficiente de determinação.

A adição do OG às dietas substituiu parte da energia advinda dos CNF presentes no volumoso e, principalmente, no concentrado, fazendo com que a participação da energia advinda do OG se tornasse cada vez maior. Assim, uma vez que a relação volumoso:concentrado permaneceu inalterada, era de se esperar que tanto os teores presentes na dieta como o consumo diário de CNF diminuísse com o aumento dos teores de OG nas dietas. O consumo de CNF foi reduzido ( $P = 0,004$ ;  $\hat{y} = 3,576 - 0,097X$ ;  $r^2 = 0,17$ ) 9,4% do tratamento controle (0% de OG) para aquele com adição de 3,7% de OG.

O consumo diário máximo de EE sugerido pelo NRC (2001) não foi alcançado por nenhum dos tratamentos, nem mesmo pelo de maior adição de OG. Essa observação sugere que a microbiota e, por consequência, a fermentação ruminal tenha sofrido pouca ação deletéria e, com isso, pouca redução na digestibilidade dos alimentos.

Essa afirmação é reforçada pelos resultados observados por Ribeiro (2009a). Com o objetivo de avaliar os efeitos da adição de óleo de soja sobre os diferentes parâmetros fisiológicos (consumo, parâmetros ruminais) e produtivos (produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite) de vacas leiteiras, o autor forneceu quatro dietas com diferentes quantidades (0; 1,5; 3,0 e 4,5% da MS) de óleo de soja (OS) para doze vacas Holandês x Gir em lactação distribuídas em três Quadrados Latinos (QL) 4 x 4 submetidas a dietas baseadas em capim-elefante picado numa relação volumoso:concentrado (V:C) igual a 52:48. Assim como no presente experimento, o autor também não observou influência ( $P > 0,05$ ) da adição de óleo (consumo diário máximo de 980g e percentual de 7,1% de EE na MS) sobre o consumo de MS (em kg/dia e em %pc).

Da mesma maneira, Souza (2011) trabalhando com vacas Holandês x Gir com o objetivo de avaliar o efeito da adição de diferentes quantidades (0; 1,5; 3,0 e 4,5% em base de MS) de OG em dietas à base de cana-de-açúcar (V:C = 60:40, base MS), também não observou influência ( $P > 0,05$ ) da adição do óleo sobre o consumo de MS em kg/dia. Houve apenas uma tendência ( $P = 0,10$ ) de redução no consumo em percentual do peso corporal à medida que se adicionou óleo.

Com o objetivo de avaliar os efeitos da adição de 4,0% de OS combinado, ou não, com monensina sódica em dietas baseadas em silagem de milho fornecidas para vacas Holandês x Gir, Eifert *et al.* (2005) observaram que a inclusão de 4,0% de OS na MS da dieta reduziu ( $P = 0,006$ ) o consumo de matéria seca de 17,5 para 15,1 kg/dia. Em 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).

Como a proporção volumoso:concentrado das dietas oferecidas no presente experimento permaneceu fixa em 67:33 e a contribuição de gordura do capim-elefante na dieta completa foi mínima (aproximadamente, 1,2% de EE na MS), pode-se afirmar que a variação observada no perfil dos AG consumidos é reflexo direto do aumento da proporção do OG na dieta.

Os consumos de ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1 *cis*-9), linoleico (C18:2 *cis*-9 *cis*-12) e  $\alpha$ -linolênico (C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15) elevaram-se linearmente ( $P < 0,001$ ) com a adição de OG às dietas, destacando-se o aumento de 473% e 328% observados para o ácido linoleico e ácido oleico, respectivamente. Elevações tão substanciais se explicam pela maior proporção desses AG na composição do OG (Tabela 5).

## 2. Parâmetros plasmáticos

As concentrações plasmáticas de ácidos graxos não-esterificados (AGNE), glicose e ureia não foram influenciadas ( $P > 0,05$ ) pelo aumento da quantidade de OG na dieta (Tabela 2), sendo os valores médios de 0,315 mmol/L; 54,67 mg/dL e 29,78 mg/dL, respectivamente.

Durante períodos de déficit energético, ocorre lipólise das moléculas de triglicerídeos (TG) armazenadas no tecido adiposo dando origem aos AGNE. Estes, em seguida, entram na circulação sanguínea para serem transportados para o fígado ou para os órgãos e tecidos que necessitam de energia. Por isso, a concentração plasmática de AGNE determinada no sangue tem sido utilizada como parâmetro de avaliação do grau de mobilização das reservas corporais e, conseqüentemente, do *deficit* energético no dado momento. Níveis elevados de AGNE em vacas indicam que o consumo de energia via dieta não está sendo suficiente para suprir as necessidades demandadas para produção de leite, crescimento fetal ou, no caso de vacas primíparas, também para crescimento corporal.

**Tabela 2.** Parâmetros plasmáticos de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total

Variável	Nível de inclusão de OG na MS da dieta (%)				EPM <sup>1</sup>	Valores de P	
	0,0	1,3	2,5	3,7		L	Q
AGNE (mmol/L)	0,310	0,304	0,315	0,329	0,0351	0,4872	0,6407
Glicose (mg/dL)	54,79	54,10	54,88	54,70	1,4621	0,9627	0,7701
Ureia (mg/dL)	29,38	30,36	28,95	30,27	2,3700	0,7066	0,8194

<sup>1</sup>Erro padrão da média.

Segundo Ospina *et al.* (2010), os momentos ideais para se avaliar os níveis de AGNE no plasma de bovinos leiteiros, a fim de se evitar a ocorrência da síndrome metabólica no puerpério (deslocamento de abomaso, retenção de placenta, metrite e cetose clínica), é cerca de 14 dias pré e 14 dias pós-parto. Segundo os autores, no período pré-parto as concentrações de AGNE devem permanecer inferiores a 0,300 mmol/L e no pós-parto nunca superiores a 0,600 mmol/L. Tomando-se tais valores como referência e levando-se em consideração o período de lactação e a categoria animal utilizada, as concentrações de AGNE observadas no presente experimento sugerem que a dieta forneceu energia suficiente para suprir às demandas dos animais, mesmo sendo o consumo de MS inferior ao predito pelo NRC (2001).

Na Tabela 3 é apresentada uma síntese de resultados de experimentos onde utilizaram-se diferentes fontes de gordura na dieta de vacas. Apesar do fornecimento de dietas com níveis crescentes de energia, Souza (2011) observou aumento ( $P = 0,0147$ ) nos teores plasmáticos de AGNE à medida que se elevou os níveis de OG na dieta. O autor sugere que esse comportamento ocorreu em razão do maior consumo de ácidos graxos originados das dietas, proporcionando aumento do transporte de lipídeos no sangue.

É interessante que se observe o comportamento das concentrações plasmáticas de AGNE observadas por Kay *et al.* (2005) e Carriquiry *et al.* (2009) (Tabela 3). O primeiro experimento obteve concentrações bastante reduzidas (0,100 mmol/L), reflexo da baixa produção leiteira (18,9 kg), característica de final de período de lactação e, o segundo, obteve valores sensivelmente mais elevados (0,415 mmol/L), reflexo da alta produção (41,3 kg/dia) e, conseqüente, mobilização lipídica do tecido adiposo.

Os níveis de glicose circulante no plasma de ruminantes geralmente são baixos – pouco superior a 50 mg/dL – e se mantêm relativamente constantes (Lucy, 2011). Durante a lactação, concomitante ou não com a prenhez, há aumento na demanda por glicose pela glândula mamária, para a síntese de lactose. Essa demanda pode ser parcialmente suprida pela mobilização das reservas adiposas. Assim, demandas agudas por glicose podem fazer com que o animal desenvolva quadros metabólicos de cetose ou esteatose hepática. De acordo com o exposto, era mesmo de se esperar que o comportamento da glicose no presente experimento fosse semelhante ao dos AGNE, ou seja, estável (Tabela 2).

Amorocho *et al.* (2009), Mourthé *et al.* (2012a), Souza (2011) e Barletta *et al.* (2012) testando níveis, e Alevato *et al.* (2012) testando modos de fornecimento de óleos vegetais na dieta de vacas em lactação não observaram influência ( $P > 0,05$ ) dos tratamentos sobre os teores plasmáticos desses animais (Tabela 3).

A qualidade nutricional da dieta fornecida a ruminantes interfere diretamente na concentração plasmática de ureia. Geralmente, em dietas com baixos teores de PB observam-se concentrações baixas de ureia plasmática, entretanto, mesmo havendo ingestão adequada de PB, se os níveis de energia forem baixos, haverá aumento na concentração de ureia plasmática. Isso ocorre porque a digestão microbiana das proteínas é reduzida e, conseqüentemente, há formação ruminal de amônia que é absorvida pela mucosa e metabolizada pelo fígado, transformando-a em ureia (Gonzalez *et al.*, 2000). Assim, já que a sua concentração plasmática é influenciada basicamente pela relação energético-proteica fornecida ao animal, não faria sentido comparar os teores obtidos no presente experimento com os observados em outros trabalhos.

Apesar do consumo de PB ter sido inferior ao predito pelo NRC (2001), os valores médios de ureia plasmática encontrados no presente experimento estão dentro da faixa de normalidade estabelecida por Swesson e Reece (1993) para essa espécie animal, que é de 20 a 40 mg/dL. Níveis superiores a 40 mg/dL caracterizam desbalanço energético-proteico e são tidos como deletérios para a reprodução de vacas leiteiras.

**Tabela 3.** Concentrações de ácidos graxos não-esterificados (AGNE – mmol/L), glicose (mg/dL) e ureia (mg/dL) no plasma de vacas em lactação recebendo dietas suplementadas com óleos vegetais

Referência	Categoria animal/Estágio da lactação	Produção leiteira (kg/dia)	Dietas				AGNE (mmol/L)	Glicose (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
			Volumoso	Suplemento lipídico (base MS)	Composição (base MS)	V:C <sup>1</sup>			
Kay <i>et al.</i> (2005)	Vacas Holandês no final de lactação	18,9	Silagem de milho, pasto (C3) e feno	10% de caroço de algodão	18,2% PB	72,5:27,5	0,100	65,1	39,5
Loor <i>et al.</i> (2005)	Vacas Holandês em pico de lactação	26,0	Silagem de milho	5,0% de óleo de girassol	-	65:35	0,177	54,0	25,7
Amorocho <i>et al.</i> (2009)	Vacas Holandês em pico de lactação	29,0	Silagem de milho e feno de alfafa	0; 1,5 e 3,0% de óleo de peixe	18,3% PB	41,5:58,5	-	55,1 – 57,8	11,0 – 12,0
Carriquiry <i>et al.</i> (2009)	Vacas Holandês em pico de lactação	41,3	Silagem de milho e feno de alfafa	10% de girassol grão	8,6% EE e 18,1% PB	74:26	0,415	57,9	-
Souza (2011)	Vacas mestiças Holandês x Gir em pico de lactação	18,5	Cana-de-açúcar	0; 1,5; 3,0 e 4,5% de óleo de girassol	5,9% EE e 12,6% PB	60:40	0,140; 0,170; 0,190 e 0,220	55,3; 58,7; 56,9 e 62,4	-
Alevato <i>et al.</i> (2012)	Primíparas Holandês em pico de lactação	16,5	Capim-elefante	4,5% de óleo de girassol	6,8% EE e 15,1% PB	60:40	-	56,1 – 62,5	36,2 – 43,6
Barletta <i>et al.</i> (2012)	Primíparas Holandês em pico de lactação	30,0	Silagem de milho	0; 8; 16 e 24% de grão de soja	3,0; 4,5; 5,9 e 7,3% EE e 16,8% PB	50:50	-	63,5; 66,5; 62,5 e 65,7	38,6; 39,9; 41,0 e 38,9
Mourthé <i>et al.</i> (2012a)	Vacas mestiças Holandês x Gir em pico de lactação	20,2	Pasto de braquiária	0 e 3,9% de grão de soja tostado	6,2% EE e 15,0% PB	-	0,220 e 0,280	56,0 e 56,8	-

<sup>1</sup>Relação volumoso:concentrado

### 3. Desempenho produtivo e composição centesimal do leite

A determinação da composição dos principais constituintes do leite (gordura, lactose e proteína) é fundamental para as indústrias de laticínios por ser fator preponderante para o rendimento industrial dos produtos lácteos (Leite, 2006). São, também, fundamentais para os produtores rurais, cuja remuneração tem sido baseada na qualidade higiênica e composicional do leite (Lopes et al., 2012c).

Dentre os componentes lácteos utilizados para estabelecer os valores a serem pagos ao produtor, estão a composição, a contagem de células somáticas (CCS) e a contagem bacteriana total. Em relação à composição, o teor de gordura é a variável de maior impacto nos sistemas de pagamento pela qualidade, seguido pelo teor de proteína (Fonseca, 2001). Assim, torna-se mister a busca pela maximização desses componentes, mas, no caso específico das pesquisas relacionadas à alteração do perfil lipídico via alteração de dieta, o desafio é ainda maior devido à possibilidade de ocorrência da redução da síntese *de novo* de AG, causada pelo fornecimento de fontes lipídicas na dieta (Harvatine e Bauman, 2006).

A adição de níveis crescentes de OG não influenciou ( $P>0,05$ ) a produção de leite total, a corrigida para 3,5 % de gordura e nem a eficiência produtiva dos animais. O aumento dos níveis de OG na dieta causou incremento linear dos teores de gordura ( $P = 0,0015$ ) e de extrato seco total ( $P = 0,0203$ ) sem, no entanto, influenciar ( $P>0,05$ ) os teores dos demais componentes do leite. A produção diária dos componentes lácteos não foi influenciada ( $P>0,05$ ) pela inclusão de OG nas dietas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Desempenho produtivo e composição do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total

Variável	Nível de inclusão de OG na MS da dieta (%)				EPM <sup>1</sup>	Valor de P	
	0,0	1,3	2,5	3,7		L	Q
Produção de leite (kg/dia)							
Total	14,9	14,9	14,4	14,9	1,3336	0,7241	0,4224
Corrigida p/ 3,5% gordura	14,5	14,9	14,5	15,0	1,3858	0,5335	0,8959
Eficiência produtiva <sup>2</sup>							
3,5%	1,34	1,29	1,35	1,36	0,0948	0,5510	0,5005
Teores (%)							
gordura	3,36	3,51	3,56	3,59	0,0958	0,0015 <sup>5</sup>	0,1978
proteína	2,72	2,73	2,74	2,72	0,0792	0,7556	0,4113
lactose	4,30	4,32	4,27	4,29	0,0967	0,1984	0,8937
EST <sup>3</sup>	11,34	11,51	11,51	11,52	0,1414	0,0203 <sup>6</sup>	0,0961
Produção (kg/dia)							
gordura	0,499	0,523	0,513	0,530	0,0496	0,2539	0,8491
proteína	0,403	0,403	0,391	0,405	0,0292	0,9027	0,5431
lactose	0,642	0,646	0,619	0,642	0,0689	0,7517	0,5988
EST	1,687	1,716	1,659	1,715	0,1616	0,8899	0,7744
Escore linear para CCS <sup>4</sup>	2,47	2,53	3,11	2,84	0,5916	0,1313	0,4982

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup>Eficiência Produtiva = produção de leite (kg) / consumo de MS (kg); <sup>3</sup>EST: extrato seco total; <sup>4</sup>EL =  $(\log_2(\text{CCS}/100.000))+3$ ; <sup>5</sup> $\hat{y} = 3,395 + 0,059X$ ;  $r^2 = 0,07$ ; <sup>6</sup> $\hat{y} = 11,401 + 0,039X$ ;  $r^2 = 0,02$ .

A ausência de influência ( $P>0,05$ ) dos tratamentos sobre as variáveis referentes à produção de leite está coerente com o comportamento do consumo diário de MS (Tabela 1). Entretanto, esse comportamento contrapõe-se ao aumento do consumo de energia. Ou seja, apesar das vacas terem ingerido dieta proporcionalmente mais rica em energia (+0,06 Mcal/kg de MS à medida que se aumentou o teor de OG; Tabela 1 do Material e Métodos), esse aumento não se converteu em maior produção de leite. Assim, apesar

da eficiência produtiva também não ter sofrido influência do incremento de OG ( $P>0,05$ ), uma vez que sua fórmula leva em conta apenas o consumo de MS, pode-se dizer que a eficiência de conversão da energia da dieta em leite reduziu-se com o aumento dos teores de OG.

Comportamento semelhante, foi observado por Ribeiro (2009a) e Souza (2011). Em ambos os experimentos, a adição de níveis crescentes de óleo de soja e girassol, respectivamente, e, conseqüentemente, de energia à dieta não influenciou ( $P>0,05$ ) a produção de leite.

Parte da baixa eficiência de utilização de energia observada em vacas alimentadas com gordura vegetal pode ser explicada pelo fato dos microrganismos ruminais não utilizarem a gordura dietética como fonte de energia (Santos, 2011), reduzindo a eficiência de síntese de propionato e, conseqüentemente, de glicose, principal precursor de lactose na glândula mamária. Dessa maneira, a estabilidade nas concentrações plasmáticas de glicose (Tabela 2) ajuda a explicar a ausência de influência ( $P>0,05$ ) dos tratamentos sobre os teores e a produção diária de lactose (Tabela 4).

Apesar da adição de OG não ter causado efeito sobre o teor de lactose e, embora seja considerado o componente lácteo de menor variação percentual (Manson, 2003), os seus valores absolutos ficaram no limite inferior (4,3%) estabelecido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), via Instrução Normativa nº62 (Brasil, 2011). A IN62 determina que os teores de lactose, gordura, proteína e extrato seco total sejam superiores a 4,3; 3,0; 2,9 e 11,4%, respectivamente, para que o leite cru refrigerado possa ser considerado normal e, por isso, aceito pela indústria de laticínios sem penalização à remuneração paga ao produtor.

Teores de lactose próximos a 4,3%, como os observados no presente experimento, sugerem aporte reduzido de glicose à glândula mamária, contrariando a normoglicemia apresentada na Tabela 2.

Respostas imunológicas desencadeadas por infecções intramamárias (mastite) tendem a aumentar a permeabilidade vascular, permitindo o extravasamento de proteínas de origem sanguínea (albumina, imunoglobulinas) e de células brancas do sangue, comumente chamadas de células somáticas. Estas alterações mamárias fazem com que ocorram alterações composicionais no leite como o aumento dos teores de proteína, gordura e da CCS, e redução dos teores de lactose e sólidos totais (Santos, 2002; Wilson *et al.*, 2004). Corroborando essas afirmações, as amostras de leite de rebanhos com altas CCS avaliadas por Machado *et al.* (2000) apresentaram maior porcentagem de gordura e proteína, e menores de lactose.

A redução dos teores de lactose em animais com altas CCS é resultado da menor capacidade de síntese de lactose pelo epitélio mamário infectado, da utilização da lactose pelos patógenos intramamários e da perda de lactose para os interstícios celulares, decorrente do aumento de permeabilidade das membranas (Machado *et al.*, 2000).

Segundo Leite (2006), mudanças significativas nas concentrações dos componentes lácteos ocorrem somente a partir de CCS superiores a  $5,0 \times 10^5$  células/mL (equivalente ao escore linear 4,5) para proteína e lactose e  $10^6$  células/mL (equivalente ao escore linear 6,0) para gordura. A conversão da CCS para escala logarítmica (escore linear) permite a análise do seu comportamento, já que esta não apresenta distribuição normal (Souza, 2011).

O presente experimento utilizou a fórmula de conversão proposta por Dabdoutb e Shook (1984) que relataram que a glândula mamária sadia deve apresentar escore linear inferior a 4,0 ou  $3,2 \times 10^5$  células/mL. Dado os baixos escores lineares das amostras do presente experimento (Tabela 4), pode-se inferir que não houve influência da sanidade da glândula mamária sobre os teores de lactose ou quaisquer outros componentes centesimais do leite. Ressalte-se, ainda, que não se observou efeito ( $P>0,05$ ) dos níveis de inclusão do OG nas dietas sobre o escore linear de CCS (Tabela 4).

Nem o teor nem a produção diária de proteína do leite foram influenciadas ( $P>0,05$ ) pelos diferentes níveis de adição de OG nas dietas. Entretanto, os valores absolutos observados (próximos a 2,7%) ficaram aquém do valor mínimo estabelecido pela IN nº 62. Tais resultados reforçam a afirmação de que não houve infecções mamárias. Entretanto, não há como sugerir que a microbiota ruminal tenha sofrido ação inibitória pelo OG a ponto de comprometer o desenvolvimento populacional e reduzir o aporte de aminoácidos (AA) à glândula mamária, já que também foram oferecidas dietas com baixos níveis de gordura (1,6% e 3,0% de EE, no caso do tratamento Controle e 1,3% de OG, respectivamente). Assim, os dados disponíveis no presente experimento não permitem confirmar se realmente houve comprometimento da microbiota pela ação do OG ou se as exigências proteicas, do animal ou dos microrganismos, foram comprometidas.

Segundo Cant *et al.* (1993), a síntese das proteínas do leite, especialmente as caseínas, depende do aporte eficiente de AA à glândula mamária, via irrigação sanguínea. 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 da síntese proteica mamária.

A suplementação de dietas com ingredientes ricos em AG poli-insaturados de cadeia longa, especialmente em ácido linoleico e  $\alpha$ -linolênico, tende a reduzir a síntese *de novo* de AG na glândula mamária e, conseqüentemente, diminuir o teor e a secreção diária de gordura no leite (Piperova *et al.*, 2000; Moon *et al.*, 2002). Entretanto, observou-se elevação ( $P = 0,0015$ ) de 6,8% no teor de gordura do leite dos animais submetidos à dieta com 3,7% de OG em relação ao grupo controle (0% de OG). Tal comportamento pode ser explicado pela ação simultânea de diversos fatores. O incremento da ingestão de gordura, devido ao concomitante aumento dos teores de OG nas dietas, permite que maiores quantidades de AG sejam absorvidas e aportem à glândula mamária aumentando, assim, a secreção de gordura no leite. A elevada relação V:C (67:33) utilizada e a alta concentração de FDN do capim-elefante (Tabela 4, Material e Métodos) certamente evitaram eventual queda de pH ruminal e conseqüente formação do isômero de CLA *trans-10 cis-12*, derivado da biohidrogenação (BH) ruminal do ácido linoleico e  $\alpha$ -linolênico, que é o principal AG responsável pela síndrome da depressão do teor de gordura do leite (Baumgard *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2002). Apesar do CLA *trans-10 cis-12* e dos demais inibidores da lipogênese mamária estarem presentes na gordura das amostras avaliadas, eles apresentaram concentrações baixas ( $<0,022$  e  $<0,086$  g/100 g de AG totais, respectivamente; Tabela 7). Concentrações estas aparentemente incapazes de agir de forma deletéria sobre a síntese *de novo* de AG.

Os teores de extrato seco total do leite se elevaram ( $P = 0,02$ ) cerca de 1,6% - entre o grupo controle e o que recebeu 3,7% de OG - em resposta ao aumento dos teores de gordura e à manutenção dos seus outros constituintes lácteos. O valor absoluto do tratamento controle foi inferior ao valor mínimo exigido pela IN nº 62. Esse comportamento se explica devido aos relativamente baixos teores de proteína e lactose observados (Tabela 4).

Assim como no presente experimento, Ribeiro (2009a) não observou influência ( $P > 0,05$ ) da adição de níveis crescentes (0; 1,5; 3,0 e 4,5%) de óleo de soja sobre a produção de leite, de proteína ou de lactose. Entretanto, a produção ( $P = 0,03$ ) e os teores ( $P < 0,01$ ) de gordura foram sensivelmente reduzidos, alcançando valores absolutos inferiores a 3,0%. O escore linear de CCS e o teor de proteína se elevaram ( $P = 0,02$  e  $P = 0,03$ , respectivamente), sendo que a proteína se manteve sempre acima dos valores estabelecidos pela IN62. Segundo o autor, a redução da gordura láctea se explica pelo aumento ( $P < 0,001$ ) das concentrações dos inibidores da lipogênese mamária causada pelos baixos valores de pH ruminal, reflexo da relativamente baixa relação V:C (50:50). Já o aumento do teor e da secreção de proteína foi explicado em parte pela maior permeabilidade vascular causada pelo comprometimento sanitário e conseqüente aumento do escore linear de CCS.

Souza (2011) também observou redução no teor ( $P = 0,001$ ) e na secreção diária ( $P = 0,023$ ) de gordura láctea. O autor observou intensa elevação ( $P < 0,0001$ ) nos teores de CLA *trans-10 cis-12* no leite.

Ribeiro *et al.* (2012) avaliaram a influência de dois tipos de óleo de girassol (alto e médio teores de ácido oleico) e de dois diferentes modos de fornecimento de concentrado (mistura completa - TMR e fracionado duas vezes ao dia) em dieta à base de capim-elefante picado, sobre a composição do leite de vacas Holandês x Gir fistuladas no rúmen. A concentração de OG na dieta foi de 4,5% (% da MS) e a relação V:C de 60:40. Os autores observaram teores de gordura, proteína e lactose inferiores aos valores mínimos estabelecidos pela IN 62.

#### **4. Perfil de ácidos graxos dos alimentos**

##### **4.1. Capim-elefante**

Na Tabela 1 dos Anexos é apresentada a variação dos perfis de AG das amostras de capim-elefante coletadas durante os períodos de adaptação (dia 1 e dia 5) e de coleta de dados (dia 10 e dia 15) de cada uma das quatro fases do QL. Ressalte-se que a evolução dos dias apresentada na tabela não representa, necessariamente, o aumento da maturidade do capim fornecido aos animais.

Os AG predominantes nas amostras analisadas foram o mirístico (C14:0), com concentrações variando de 1,5 a 2,3% (g/100 g de AG totais); palmítico (C16:0; de 23,1 a 31,1%), esteárico (C18:0; de 2,1 a 3,8%), oleico (C18:1 *cis*-9; de 3,0 a 5,7%), linoleico (C18:2 *cis*-9 *cis*-12; de 16,5 a 24,0%) e  $\alpha$ -linolênico (C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15; de 22,6 a 39,9%).

Os resultados corroboram a afirmação feita por Harwood (1980) e Van Soest (1994) de que esses são os AG mais abundantes (~90% do total) nos lípides de origem vegetal. Os AG saturados, monoinsaturados e poli-insaturados participaram com 35,2 a 49,4%; 5,7 a 10,4%; e 41,4 a 58,0% do montante total, respectivamente.

Da mesma forma que no presente experimento, Ribeiro (2009a) coletou amostras de capim-elefante com idade aproximada de 70 dias, advindas de capineira submetida a cortes de uniformização e adubação. O autor acompanhou a composição das amostras semanalmente durante as oito semanas de duração do experimento e observou intervalos nas concentrações de ácido mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico nas amostras, respectivamente, de 0,7 a 1,6%; de 27,9 a 42,5%; de 3,5 a 5,6%; de 5,9 a 11,6%; de 17,1 a 25,9% e de 12,8 a 22,6%. As somas dos AG saturados, mono e poli-insaturados variaram de 40,3 a 62,2%; de 5,9 a 13,0%, e de 31,5 a 48,5%.

Ao se comparar esses resultados com os do presente experimento, percebe-se que os teores de ácido  $\alpha$ -linolênico obtidos por Ribeiro (2009a) foram sensivelmente inferiores, sugerindo, então, a utilização de capim-elefante mais maduro. Suposição esta, reforçada ao se comparar as composições bromatológicas e as digestibilidades dos capins utilizados nos dois experimentos.

Perez *et al.* (2008) coletaram amostras de diferentes variedades de capim-elefante com idade média de 60 dias e observaram as seguintes concentrações de AG: palmítico – 22,0 a 40,0%; esteárico – 2,0 a 4,0%; oleico – 2,0 a 8,0%, linoleico – 14,0 a 28,0% e  $\alpha$ -linolênico – 22,0 a 55,0%. Já as somas dos saturados, mono e poli-insaturados variaram de 28,0 a 54,0%; 3,0 a 8,0% e 36,0 a 79,0%, respectivamente.

Deve-se chamar a atenção para o fato de que os teores de ácido  $\alpha$ -linolênico nessas amostras se assemelham com a do presente experimento, sugerindo, então, que foi utilizado material de composição lipídica típica de capins-elefante mais jovens (60 dias).

#### 4.2. Óleo de Girassol

O presente experimento utilizou óleo de girassol comestível comercial (Siol Alimentos, Barueri, SP) como principal fonte lipídica na dieta. Características como qualidade de solo, temperatura média anual, cultivar, entre outros fatores, influenciam a composição dos triglicerídeos presentes nas sementes de girassol. Assim, em 2006, o MAPA criou a Instrução Normativa N° 49 para definir padrão de composição para o óleo de girassol que se destina à comercialização e impedir a venda de produtos adulterados.

Glasser *et al.* (2008) publicaram uma metanálise com a composição média do perfil de AG de diversos óleos vegetais utilizados em trabalhos nacionais publicados nos últimos 40 anos que tiveram como objetivo verificar o impacto desses óleos sobre a produção e composição do leite de vacas. Na Tabela 5 é apresentada a composição média do perfil de AG do óleo de girassol observada no presente experimento, as composições médias encontradas por Glasser *et al.* (2008) e a exigida pela IN N°49 para comparação.

Exceto pelo ácido  $\alpha$ -linolênico, todos os demais AG constituintes do OG utilizado no experimento estão dentro das exigências impostas pela legislação vigente. O OG utilizado apresentou teor de ácido  $\alpha$ -linolênico de 0,7 g/100 g de AG totais. Apesar de ser valor absoluto baixo, ele é cerca de 233% superior ao estabelecido pela IN 49 ( $\leq 0,3\%$ ). Em termos práticos, essa alteração é bem vinda, tanto se considerarmos sua utilização pelo consumidor comum como para o fornecimento para ruminantes, por ser AG  $\omega$ -3.

**Tabela 5.** Concentração de ácidos graxos (g/100 g de AG totais) no óleo de girassol utilizado no experimento, em comparação à encontrada por Glasser *et al.* (2008) e à exigida pela Instrução Normativa N° 49

Ácidos graxos	Experimento	Glasser <i>et al.</i> (2008)	Instrução Normativa N° 49
<C12:0	0,01	-	nq
C12:0	0,02	-	≤ 0,1
C14:0	0,15	0,1	≤ 0,2
C16:0	6,9	5,1	5,0 a 7,5
C16:1	0,10	0,1	≤ 0,3
C18:0	2,8	4,3	2,7 a 6,5
C18:1 <sup>1</sup>	20,7	21,6	14,0 a 39,4
C18:1 <i>cis</i> -9	19,1	-	-
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	66,1	66,8	48,3 a 74,0
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	0,70	0,2	≤ 0,3
C20:0	0,22	-	0,1 a 0,5
C20:1	nq	-	≤ 0,3
C22:0	0,56	-	0,3 a 1,5
C22:1	nq	-	≤ 0,3
C24:0	0,25	-	≤ 0,5
C24:1	nq	-	nq
ΣSaturados	10,9	-	8,1 a 16,8
ΣMonoinsaturados	20,8	-	14,0 a 40,3
ΣPoli-insaturados	66,8	-	48,3 a 74,3

<sup>1</sup> Somatório de todos os isômeros C18:1; - : não citado; nq: detectado, mas não quantificado.

### 4.3. Concentrados

A composição de AG dos quatro concentrados utilizados no presente experimento (Tabela 2 dos Anexos) foi avaliada em dois momentos distintos: no dia do preparo (Dia 1) e no último dia de fornecimento (Dia 14). Essas avaliações tiveram como objetivo verificar se houve algum tipo de alteração composicional no perfil de AG durante o período de armazenamento.

Segundo Ribeiro (2009a), é possível que se observe algum grau de saturação ou de β-oxidação (quebra da cadeia carbônica e formação de grupos acetil) dos AG durante o período de armazenamento dos concentrados enriquecidos com óleo devido à sua exposição ao ar (O<sub>2</sub>), aos microrganismos, e às variações de temperatura ambiente. Tais transformações químicas poderiam influenciar negativamente a palatabilidade e a aceitabilidade do alimento pelas vacas, comprometendo assim, a ingestão de matéria seca, além de causar alterações no perfil de AG secretados no leite.

Na prática, quanto maior a estabilidade do óleo e, conseqüentemente, a vida útil do concentrado, maior é o intervalo entre o preparo dos concentrados e mais interessante para o produtor rural que eventualmente se interessar em alterar o perfil de AG da gordura do leite. Por isso, torna-se necessária a avaliação da vida útil desse concentrado.

O perfil de AG dos quatro diferentes concentrados permaneceu estável entre o dia de preparo e o décimo quarto dia de fornecimento. O ácido palmítico (C16:0) apresentou teores médios nos dias 1 e 14 de 12,16 e 12,41%, sendo observada nítida redução no seu teor com o incremento da adição de OG ao concentrado. O mesmo comportamento foi observado para o ácido oleico, que apresentou médias de 20,96 e 21,31%, e o ácido α-linolênico com 2,41 e 2,51%. As concentrações médias do ácido esteárico foram de 2,96 e 2,99% e não apresentaram variação entre os concentrados. Já o ácido linoleico apresentou médias iguais a 57,09 e 57,61%, e tiveram aumento nas suas concentrações à medida que se adicionou OG.

As variações no perfil de AG observadas entre os concentrados se explicam devido à substituição de parte dos ingredientes energéticos (milho e polpa cítrica) pelo OG (Tabela 1 do Material e Métodos).

## 5. Perfil de ácidos graxos do plasma sanguíneo

A adição de quantidades crescentes de OG às dietas pode ter comprometido o desenvolvimento da população microbiana ruminal, visto que as concentrações dos AG de cadeia ímpar e/ou ramificada (AGCIR) C15:0 *iso*, C15:0, C16:0 *iso*, C17:0 *iso* e C17:0, reconhecidos indicadores da atividade microbiana (Collomb *et al.*, 2004; Loor *et al.*, 2005; Rego *et al.*, 2005; Vlaeminck *et al.*, 2004, 2005, 2006a, 2006b) foram linearmente reduzidas (Tabela 6), ajudando a explicar os baixos teores de proteína do leite (Tabela 4). Confirmando esse comportamento, a análise da correlação entre a concentração plasmática dos AGCIR e o consumo de OG foi altamente negativa ( $r = -0,90$ ;  $P < 0,0001$ ). Entretanto, essa aparente redução da atividade da população microbiana parece não ter sido suficiente a ponto de comprometer o consumo de MS e das frações fibrosas da dieta (FDN e FDA) ou a produção diária de leite.

As concentrações plasmáticas dos AG de cadeia curta (C4:0 a C10:0) foram muito baixas, a ponto de apenas o C10:0 apresentar teores significativos. Esse comportamento corrobora com os resultados observados em experimentos semelhantes (Loor *et al.*, 2002b; Abughazaleh *et al.*, 2003; Petit, 2003; Ward *et al.*, 2003; Kay *et al.*, 2005; Loor *et al.*, 2005; Contreras *et al.*, 2010).

A metodologia utilizada no presente experimento no preparo das amostras destinadas à quantificação dos AG presentes no plasma (transmetilação ácida direta proposta por Masood *et al.*, 2005), não é capaz de permitir a quantificação dos AG nas diferentes frações lipoproteicas. Assim, os teores de AG apresentados na Tabela 6 dizem respeito somente ao perfil de AG totais e não ao perfil de frações lipídicas específicas.

De maneira geral, a concentração lipídica de AG no plasma de ruminantes recebendo dieta suplementada com óleo vegetal é sensivelmente mais elevada se comparada à de animais alimentados com dietas não suplementadas (Christie, 1981). Não foi possível quantificar (mg de AG/mL de plasma) os AG plasmáticos, sendo, então, feita apenas a avaliação qualitativa dos mesmos.

**Tabela 6.** Concentração (g/100 g de AG totais) de ácidos graxos no plasma de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total

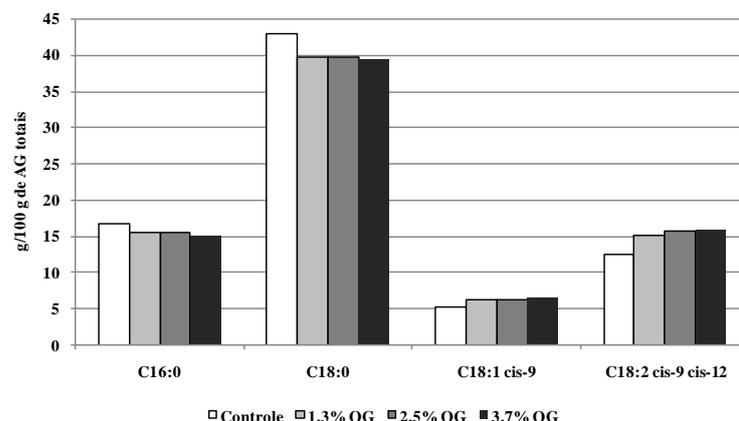
Ácidos graxos	Dietas				EPM <sup>1</sup>	Valor de P		Equações de regressão	r <sup>2</sup>
	Controle	1,3% OG	2,5% OG	3,7% OG		L	Q		
C10:0	1,264	1,190	1,172	1,128	0,0541	0,0534	0,7620	-	-
C11:0 + C10 <i>cis</i> -9	0,051	0,043	0,057	0,046	0,0089	0,9598	0,7579	-	-
C12:0	0,026	0,038	0,027	0,042	0,0084	0,3321	0,8539	-	-
C14:0	0,306	0,362	0,300	0,284	0,0284	0,1896	0,1246	-	-
C14:1 <i>cis</i> -9	2,047	1,778	1,784	1,718	0,0673	0,0008	0,1006	$\hat{y} = 2,001 - 0,084X$	0,26
C15:0 <i>iso</i>	0,236	0,242	0,221	0,206	0,0227	0,0161	0,2913	$\hat{y} = 0,237 - 0,008X$	0,05
C15:0 <i>anteiso</i>	0,374	0,384	0,348	0,347	0,0387	0,1246	0,7502	-	-
C15:0	0,496	0,526	0,455	0,440	0,0303	0,0014	0,1584	$\hat{y} = 0,508 - 0,018X$	0,11
C16:0 <i>iso</i>	0,150	0,161	0,137	0,121	0,0119	0,0001	0,0337	$\hat{y} = 0,150 + 0,009X - 0,005X^2$	0,19
C16:0	16,614	15,552	15,441	14,964	0,2769	<0,0001	0,0297	$\hat{y} = 16,46 - 0,414X$	0,38
C16:1 <i>cis</i> -9	0,730	0,729	0,658	0,979	0,0786	0,0062	0,0041	$\hat{y} = 0,730 - 0,090X + 0,039X^2$	0,13
C17:0 <i>iso</i>	0,221	0,211	0,182	0,176	0,0137	<0,0001	0,8473	$\hat{y} = 0,221 - 0,012X$	0,21
C17:0 <i>anteiso</i>	0,462	0,531	0,635	0,720	0,0454	<0,0001	0,7273	$\hat{y} = 0,439 + 0,075X$	0,49
C17:0	0,821	0,786	0,697	0,655	0,0177	<0,0001	0,6833	$\hat{y} = 0,825 - 0,047X$	0,72
C18:0	42,872	39,643	39,695	39,326	1,0005	0,0046	0,0792	$\hat{y} = 42,11 - 0,875X$	0,17
C18:1 <i>trans</i> -10	0,052	0,082	0,099	0,111	0,0071	<0,0001	0,1667	$\hat{y} = 0,056 + 0,016X$	0,54
C18:1 <i>trans</i> -11	0,325	0,529	0,801	1,120	0,0600	<0,0001	0,6191	$\hat{y} = 0,290 + 0,219X$	0,80
C18:1 <i>cis</i> -9 + <i>trans</i> -15	5,144	6,187	6,200	6,536	0,3657	0,0009	0,1746	$\hat{y} = 5,399 + 0,332X$	0,18
ΣC18:1	6,826	8,519	8,923	9,768	0,4495	<0,0001	0,2120	$\hat{y} = 7,118 + 0,745X$	0,43
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	12,504	15,132	15,621	15,780	0,6469	0,0001	0,0258	$\hat{y} = 12,42 + 2,570X - 0,463X^2$	0,34

*continua*

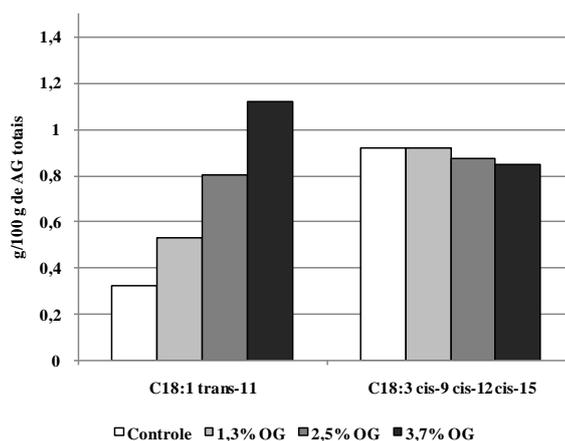
Ácidos graxos	Diets				EPM <sup>1</sup>	Valor de P		Equações de regressão	r <sup>2</sup>
	Controle	1,3% OG	2,5% OG	3,7% OG		L	Q		
C18:3 <i>cis</i> -6 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	0,315	0,319	0,308	0,315	0,0223	0,8812	0,9303	-	-
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	0,920	0,915	0,872	0,844	0,0610	0,1680	0,7586	-	-
C20:0	0,347	0,313	0,313	0,293	0,0107	0,0006	0,4721	$\hat{y} = 0,342 - 0,013X$	0,26
C20:1 <i>cis</i> -11	0,044	0,024	0,037	0,037	0,0083	0,7267	0,1044	-	-
C20:2 $\omega$ -6	0,044	0,044	0,038	0,048	0,0066	0,7784	0,3448	-	-
C20:3 $\omega$ -3	0,574	0,632	0,557	0,527	0,0315	0,1021	0,1433	-	-
C20:4 $\omega$ -6	0,730	0,796	0,800	0,746	0,0774	0,8274	0,2510	-	-
C20:5 $\omega$ -3	0,104	0,112	0,104	0,094	0,0103	0,3977	0,4075	-	-
C22:0	0,264	0,300	0,315	0,326	0,0136	0,0002	0,2726	$\hat{y} = 0,269 + 0,017X$	0,32
C23:0	0,523	0,501	0,477	0,451	0,0178	<0,0001	0,8500	$\hat{y} = 0,529 - 0,020X$	0,26
C24:0	0,104	0,115	0,140	0,120	0,0162	0,0748	0,0872	-	-

<sup>1</sup>Erro padrão da média

As Figuras 1 e 2 apresentam as variações dos teores plasmáticos dos principais AG entre os diversos tratamentos avaliados.



**Figura 1.** Teores plasmáticos dos ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1 *cis*-9) e linoleico (C18:2 *cis*-9 *cis*-12) em vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total.



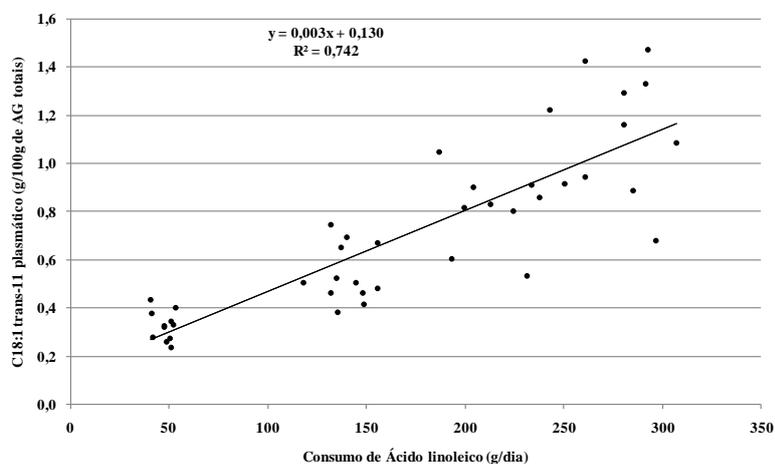
**Figura 2.** Teores plasmáticos dos ácidos vacênico (C18:1 *trans*-11) e  $\alpha$ -linolênico (C18:2 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15) em vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total

Dentre os AG saturados de cadeia média (C12:0 a C16:0), somente o ácido palmítico apresentou concentrações plasmáticas mais expressivas (Tabela 6). Apesar do incremento no consumo diário desse AG ( $P < 0,0001$ ) à medida que se adicionou OG à dieta (Tabela 1), observou-se redução linear ( $P < 0,0001$ ) das suas concentrações no plasma (Tabela 6). Esse comportamento se explica porque, apesar do aumento da ingestão em valores absolutos, proporcionalmente, sua participação dentro da dieta diminuía com a adição de OG (de 26,2% no tratamento Controle para 19,7% no 3,7%OG). Além disso, a síntese desse AG no rúmen é considerada baixa, fazendo com que o processo de BH e a atividade microbiana no rúmen não sejam fatores determinantes da sua concentração plasmática (Bauman *et al.*, 2003; Lock e Bauman, 2011).

As concentrações plasmáticas dos ácidos esteárico, vacênico, oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico são mais intensamente moduladas pela BH ruminal. Segundo Christie (1981) e Looor *et al.* (2002b), o ácido esteárico tende a ser o AG predominante no plasma, especialmente em animais consumindo dietas suplementadas com óleos vegetais ricos em ácidos oleico e linoleico e cuja atividade ruminal dos microrganismos fibrolíticos não tenha sido comprometida.

Corroborando com o relatado por esses autores, o ácido esteárico foi o AG que apresentou as maiores concentrações plasmáticas (Tabela 6). Entretanto, observou-se redução linear ( $P = 0,0046$ ) nas suas concentrações à medida que o consumo de OG se elevou (Tabela 6). Isto sugere que, apesar dos elevados consumos do ácido esteárico e de seus precursores (ácido linoleico e  $\alpha$ -linolênico), a taxa de BH ruminal e,

em especial, o último passo feito pelas bactérias do Grupo B (Kemp e Lander, 1984) provavelmente tenha sido inibida, reduzindo sua síntese e permitindo o acúmulo de ácido vacênico. Um dos motivos dessa inibição pode ter sido o alto aporte de AGPI no rúmen, causando ação deletéria à microbiota e, conseqüente, redução na atividade microbiana (Bauman *et al.*, 2003). Suposição esta, reforçada pela redução ( $P < 0,05$ ) nos teores plasmáticos dos AGCIR (Tabela 6); pela correlação negativa ( $r = -0,42$ ;  $P = 0,0049$ ) observada entre o consumo de ácido linoleico e a concentração plasmática do esteárico; e positiva entre o consumo de ácido linoleico e a concentração de ácido vacênico no plasma ( $r = 0,86$ ;  $P < 0,0001$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Relação entre a concentração do ácido vacênico no plasma (g/100 g de AG totais) e o consumo de ácido linoleico (g/dia) de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol na matéria seca total.

Outro fator que pode ter influenciado na redução dos teores plasmáticos dos AG palmítico e esteárico foram os baixos valores de AGNE no plasma (Tabela 2). Dado que a maior parte dos AG mobilizados do tecido adiposo constitui-se dos AG palmítico e esteárico, valores aumentados de AGNE no plasma, de modo geral, determinam concomitante aumento nos teores destes AG (Contreras *et al.*, 2010). Assim, pode-se inferir que, devido às baixas concentrações de AGNE observadas, o perfil de AG apresentado pelo plasma é reflexo direto da BH dos AG advindos da dieta.

Os teores plasmáticos do ácido oleico elevaram-se linearmente ( $P = 0,0009$ ) com o incremento de OG na dieta (Tabela 6). Esse aumento é reflexo, principalmente, do aumento do seu consumo diário e do fato deste AG ser menos biohidrogenado no rúmen se comparado com os AGPI. Segundo Looor *et al.* (2004) e Doreau *et al.* (2009), a taxa de BH ruminal do ácido oleico é, aproximadamente, 58 a 87% menor que as dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico. Já os teores plasmáticos do ácido linoleico apresentaram comportamento quadrático ( $P = 0,0001$ ) com o incremento de OG na dieta (Tabela 6). A partir da derivação da sua equação de regressão, observou-se que o zênite na concentração de ácido esteárico (16,0g/ 100 g de AG totais) ocorreu aos 2,8% de OG. Um dos fatores que agiram para que o ácido linoleico apresentasse esse comportamento foi o alto aporte dietético desse AG no rúmen (Tabela 1) e conseqüente redução da atividade dos microrganismos responsáveis pela sua BH (Grupos A e B), como proposto por Bauman *et al.* (2003). Outro importante fator, descrito detalhadamente por Abughazaleh *et al.* (2003), diz respeito às diferenças na incorporação dos AG entre os triglicerídeos e as frações plasmáticas não triglicerídeas (NTG - ésteres de colesterol e fosfolípides). Segundo esses autores, os AG poli-insaturados, em especial o ácido linoleico, que escapam da BH ruminal são preferencialmente incorporados às frações NTG, sendo estes, os principais componentes lipídicos do plasma, participando com, aproximadamente, 95% dos lípides totais.

O consumo de dietas suplementadas com os AG poli-insaturados linoleico e  $\alpha$ -linolênico, de modo geral, promove incremento no fluxo e na absorção intestinal de AG intermediários da BH ruminal, destacando-se o ácido vacênico (Laverroux *et al.*, 2011), precursor na síntese de CLA *cis-9 trans-11* na glândula mamária (Adlof *et al.*, 2000; Turpeinen *et al.*, 2002; Kuhnt *et al.*, 2006). No presente experimento, a concentração do ácido vacênico elevou-se linearmente ( $P < 0,0001$ ) com o incremento de OG na dieta (Tabela 6). O aumento de 344% nos teores plasmáticos do ácido vacênico considerando as dietas sem e com 3,7% de inclusão de OG indica que houve expressiva taxa de BH dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico consumidos pelas vacas.

A BH incompleta dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico também resulta na produção de AG conjugados no rúmen, dos quais o CLA *trans-10 cis-12*, originado exclusivamente da BH dos AGPI, é comumente o

isômero predominante (Khanal e Dhiman, 2004). Entretanto, mesmo nas dietas suplementadas com OG, que promoveram elevado consumo dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico, não foram observadas concentrações expressivas desse AG conjugado no plasma das vacas (Tabela 6). Esse comportamento foi, provavelmente, resultado do controle do pH ruminal exercido pela alta relação V:C das dietas que possivelmente impediu que o pH apresentasse valores inferiores a 6,0 causando, assim, o desenvolvimento das bactérias acidófilas *Megasphaera elsdeni*, responsáveis por converter ácido linoleico e  $\alpha$ -linolênico a CLA *trans*-10 *cis*-12 (Bauman e Griinari, 2001; Kim *et al.*, 2002; Piperova *et al.*, 2002).

As concentrações dos demais isômeros de CLA, em especial do CLA *cis*-9 *trans*-11, ficaram abaixo da concentração mínima detectável pelo método de análise plasmática utilizado, significando que praticamente a totalidade desse isômero de CLA secretada no leite foi sintetizada na glândula mamária. Griinari *et al.* (2000) demonstraram que de 58 a 77% desse isômero secretado na gordura láctea é sintetizada na glândula mamária a partir da ação da enzima  $\Delta^9$ -desaturase, utilizando o ácido vacênico como substrato.

Com exceção dos AG C20:0, C22:0 e C23:0, os demais AG, saturados ou insaturados, com 20 ou mais carbonos em sua cadeia não apresentaram variação em função do nível de OG na dieta ( $P > 0,05$ ; Tabela 6). Esse comportamento se explica pelo fato da principal fonte desses AG na dieta (capim-elefante) ter sido fornecido em proporções fixas durante todo o experimento, além do fato de que esses AG não são substratos importantes para a ação das enzimas microbianas (Bauman *et al.*, 2003; Lock e Bauman, 2011).

Ressalte-se que a maior parte dos artigos onde avaliaram-se os teores de AG no plasma de vacas lactantes alimentadas com dietas suplementadas com óleos vegetais apresentam dados discriminados entre as frações lipídicas (fosfolípidos, mono, di e triglicerídeos e ésteres de colesterol) e as lipoproteínas (quilomicrons, VLDL, LDL e HDL), não apresentando os teores totais, com o agravante de que um número ainda menor avaliou o fornecimento de óleo em níveis, dificultando, assim, a comparação com os resultados obtidos no presente experimento.

## 6. Perfil de ácidos graxos do leite

### 6.1. Ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada

O C15:0, AG de cadeia ímpar que junto com o C17:0 compõe a membrana das bactérias amilolíticas (Vlaeminck *et al.*, 2004), apresentou redução na concentração da gordura do leite de, aproximadamente, 66%, comparando as dietas sem inclusão ou com 3,7% de OG. Da mesma maneira, o somatório das concentrações dos AGCIR também foi reduzido linearmente ( $P < 0,0001$ ), nesse caso, em cerca de 68% entre os tratamentos Controle e aquele com 3,7% de OG.

Levando-se em conta o fato de que todos os AGCIR presentes na gordura do leite são sintetizados exclusivamente pelos microrganismos ruminais (Kaneda, 1991), provavelmente, pode ter havido algum comprometimento no crescimento da microbiota do rúmen. Essa afirmação é reforçada pelos baixos teores de proteína e lactose do leite (Tabela 4).

Apesar da redução dos teores plasmáticos e lácteos dos AGCIR (Tabelas 6 e 7, respectivamente) e dos baixos teores de proteína e lactose no leite (Tabela 4), não foram observados efeitos negativos ( $P > 0,05$ ) da inclusão de OG nas dietas sobre o consumo de MS, a produção de leite ou o teor de gordura do leite. Isto sugere que a atividade da população microbiana tenha sido reduzida a ponto de diminuir a fermentação ruminal e, conseqüentemente, a síntese de acetato e propionato (substratos para a síntese de gordura e lactose na glândula mamária, respectivamente), mas não o suficiente a ponto de comprometer a degradabilidade da dieta.

Entretanto, para que haja elevação dos teores e/ou da secreção de gordura no leite deve ocorrer maior aporte de AG na glândula mamária e/ou maior taxa de síntese *de novo* de AG (Jensen, 2002). No presente experimento, provavelmente ocorreu o maior aporte de AG associado a uma sutil redução da fermentação ruminal e a baixos teores de AG inibidores da lipogênese (CLA *trans*-10 *cis*-12 e CLA *trans*-9 *cis*-11), já que os teores de gordura no leite se elevaram ( $P = 0,0015$ ; Tabela 4).

**Tabela 7.** Concentração (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos da gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total

Ácidos graxos	Dietas				EPM <sup>1</sup>	Valor de P		Equações de regressão	r <sup>2</sup>
	Controle	1,3% OG	2,5% OG	3,7% OG		L	Q		
C4:0	3,524	3,420	3,054	2,970	0,0648	<0,0001	0,8587	$\hat{y} = 3,521 - 0,162X$	0,52
C6:0	1,733	1,513	1,280	1,144	0,0466	<0,0001	0,2500	$\hat{y} = 1,724 - 0,165X$	0,72
C8:0	0,869	0,722	0,571	0,505	0,0313	<0,0001	0,0925	$\hat{y} = 0,860 - 0,103X$	0,68
C10:0	1,742	1,343	1,046	0,910	0,0713	<0,0001	0,0231	$\hat{y} = 1,700 - 0,234X$	0,66
C11:0 + C10 <i>cis</i> -9	0,239	0,166	0,120	0,105	0,0103	<0,0001	0,0004	$\hat{y} = 0,235 - 0,068 + 0,009X^2$	0,75
C12:0	2,050	1,531	1,247	1,090	0,0797	<0,0001	0,0069	$\hat{y} = 1,966 - 0,262X$	0,67
C12:0 <i>cis</i> -9	0,133	0,119	0,101	0,105	0,0140	0,0784	0,4880	-	-
C13:0	0,100	0,073	0,053	0,056	0,0066	<0,0001	0,0072	$\hat{y} = 0,099 - 0,029X + 0,005X^2$	0,46
C14:0	9,173	7,590	6,439	5,840	0,2961	<0,0001	0,0125	$\hat{y} = 8,851 - 0,903X$	0,63
C14:1 <i>cis</i> -9	0,823	0,580	0,469	0,419	0,0485	<0,0001	0,0126	$\hat{y} = 0,796 - 0,217X + 0,031X^2$	0,53
C15:0	1,477	1,225	1,057	0,977	0,0317	<0,0001	<0,0001	$\hat{y} = 1,430 - 0,136X$	0,79
C15:0 <i>iso</i>	0,380	0,309	0,254	0,229	0,0119	<0,0001	0,0164	$\hat{y} = 0,368 - 0,042X$	0,69
C15:0 <i>anteiso</i>	0,691	0,570	0,495	0,452	0,0218	<0,0001	0,0020	$\hat{y} = 0,674 - 0,066X$	0,69
C16:0	31,229	24,696	22,174	19,832	0,8060	<0,0001	<0,0001	$\hat{y} = 30,516 - 5,110X + 0,604X^2$	0,80
C16:1 <i>cis</i> -9	1,547	1,020	1,005	0,867	0,0971	<0,0001	0,0125	$\hat{y} = 1,511 - 0,405X + 0,066X^2$	0,40
C16:0 <i>iso</i>	0,320	0,285	0,236	0,207	0,0096	<0,0001	0,5953	$\hat{y} = 0,327 - 0,033X$	0,73
C17:0	0,739	0,665	0,622	0,568	0,0312	<0,0001	0,4430	$\hat{y} = 0,746 - 0,046X$	0,36
C17:1 <i>cis</i> -9	0,357	0,288	0,261	0,215	0,0149	<0,0001	0,3411	$\hat{y} = 0,351 - 0,036X$	0,50
C17:0 <i>iso</i>	0,504	0,441	0,408	0,393	0,0113	<0,0001	0,0093	$\hat{y} = 0,505 - 0,056X + 0,007X^2$	0,61
C17:0 <i>anteiso</i>	0,670	0,595	0,569	0,507	0,0349	0,0021	0,8605	$\hat{y} = 0,676 - 0,046X$	0,25
C18:0	9,810	14,584	15,696	16,641	0,6698	<0,0001	<0,0001	$\hat{y} = 10,202 + 3,863X - 0,574X^2$	0,67

*continua*

Ácidos graxos	Dietas				EPM <sup>1</sup>	Valor de P		Equações de regressão	r <sup>2</sup>
	Controle	1,3% OG	2,5% OG	3,7% OG		L	Q		
C18:1 <i>trans</i> -4	0,008	0,034	0,050	0,050	0,0035	<0,0001	<0,0001	$\hat{y} = 0,009 + 0,027X - 0,004X^2$	0,71
C18:1 <i>trans</i> -5	0,008	0,026	0,035	0,037	0,0027	<0,0001	0,0026	$\hat{y} = 0,009 + 0,018X - 0,003X^2$	0,62
C18:1 <i>trans</i> -6 a 8	0,123	0,257	0,381	0,415	0,0179	<0,0001	0,0079	$\hat{y} = 0,143 + 0,081X$	0,77
C18:1 <i>trans</i> -9	0,226	0,350	0,428	0,522	0,0161	<0,0001	0,3560	$\hat{y} = 0,239 + 0,075X$	0,77
C18:1 <i>trans</i> -10	0,166	0,392	0,526	0,554	0,0507	<0,0001	0,0566	$\hat{y} = 0,212 + 0,102X$	0,43
C18:1 <i>trans</i> -11	1,835	3,109	4,387	5,727	0,2789	<0,0001	0,1372	$\hat{y} = 1,782 + 1,061X$	0,76
C18:1 <i>trans</i> -12	0,200	0,482	0,699	0,856	0,0334	<0,0001	0,0600	$\hat{y} = 0,228 + 0,175X$	0,84
C18:1 <i>trans</i> -13 + <i>trans</i> -14	0,212	0,404	0,515	0,685	0,0371	<0,0001	0,3938	$\hat{y} = 0,224 + 0,119X$	0,66
C18:1 <i>trans</i> -16	0,326	0,503	0,596	0,715	0,0504	<0,0001	0,4507	$\hat{y} = 0,348 + 0,101X$	0,55
C18:1 <i>cis</i> -9 + <i>trans</i> -15	21,572	24,807	26,717	27,082	0,8682	<0,0001	0,0036	$\hat{y} = 22,46 + 1,465X$	0,39
C18:1 <i>cis</i> -11	1,340	1,440	1,569	1,498	0,0449	<0,0001	0,0060	$\hat{y} = 1,386 + 0,048X$	0,14
C18:1 <i>cis</i> -12	0,335	0,551	0,733	0,796	0,0330	<0,0001	0,0113	$\hat{y} = 0,332 + 0,214X - 0,024X^2$	0,76
C18:1 <i>cis</i> -13	0,078	0,091	0,111	0,100	0,0089	0,0020	0,0362	$\hat{y} = 0,078 + 0,018X - 0,003X^2$	0,15
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -12	0,057	0,092	0,118	0,131	0,0064	<0,0001	0,0580	$\hat{y} = 0,063 + 0,020X$	0,65
C18:2 <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -12 + <i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15	0,071	0,061	0,054	0,050	0,0047	0,0001	0,3864	$\hat{y} = 0,069 - 0,006X$	0,24
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	1,628	1,648	1,678	1,549	0,0688	0,4163	0,1920	-	-
C18:3 <i>cis</i> -6 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	0,020	0,019	0,015	0,013	0,0009	<0,0001	0,7797	$\hat{y} = 0,020 - 0,002X$	0,47
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	0,212	0,171	0,156	0,139	0,0097	<0,0001	0,0415	$\hat{y} = 0,211 - 0,019X$	0,42
C20:0	0,145	0,158	0,158	0,147	0,0085	0,8627	0,1123	-	-
C20:1 <i>cis</i> -11	0,046	0,049	0,056	0,051	0,0018	0,0017	0,0300	$\hat{y} = 0,048 + 0,001X$	0,06
C20:2 $\omega$ -6	0,024	0,021	0,018	0,017	0,0015	<0,0001	0,3349	$\hat{y} = 0,024 - 0,002X$	0,29
C20:3 $\omega$ -6	0,063	0,058	0,046	0,043	0,0031	<0,0001	0,6564	$\hat{y} = 0,062 - 0,006X$	0,39

*continua*

Ácidos graxos	Dietas				EPM <sup>1</sup>	Valor de P		Equações de regressão	r <sup>2</sup>
	Controle	1,3% OG	2,5% OG	3,7% OG		L	Q		
C20:4 ω-6	0,146	0,118	0,098	0,083	0,0049	<0,0001	0,1091	$\hat{y} = 0,144 - 0,017X$	0,69
C20:5 ω-3	0,077	0,062	0,055	0,052	0,0065	0,0055	0,3595	$\hat{y} = 0,074 - 0,007X$	0,18
C21:0	0,037	0,041	0,041	0,041	0,0018	0,0612	0,2470	-	-
C22:0	0,068	0,086	0,085	0,086	0,0035	0,0001	0,0021	$\hat{y} = 0,069 + 0,017X - 0,003X^2$	0,30
C22:6 ω-3	0,017	0,008	0,006	0,004	0,0034	0,0044	0,1879	$\hat{y} = 0,015 - 0,003X$	0,17
C23:0	0,019	0,022	0,022	0,019	0,0049	0,8632	0,2149	-	-
C24:0	0,020	0,016	0,015	0,014	0,0017	0,0106	0,4483	$\hat{y} = 0,019 - 0,002X$	0,16
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	0,872	1,224	1,611	2,128	0,1352	<0,0001	0,4129	$\hat{y} = 0,813 + 0,334X$	0,58
CLA <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11	0,030	0,040	0,052	0,065	0,0070	<0,0001	0,7526	$\hat{y} = 0,029 + 0,009X$	0,34
CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0,022	0,015	0,018	0,021	0,0038	0,9376	0,1657	-	-
Σ CLA <sup>3</sup>	0,924	1,279	1,681	2,214	0,1428	<0,0001	0,4004	$\hat{y} = 0,860 + 0,343X$	0,57
Σ Inibidores	0,052	0,055	0,070	0,086	0,0086	0,0002	0,2941	$\hat{y} = 0,047 + 0,009X$	0,23
Σ Saturados Pares									
Curta	7,864	7,000	5,949	5,534	0,1810	<0,0001	0,1471	$\hat{y} = 7,814 - 0,664X$	0,71
Média	42,449	33,813	29,858	26,748	0,9777	<0,0001	<0,0001	$\hat{y} = 41,589 - 6,915X + 0,777X^2$	0,81
Longa	10,043	14,844	15,954	16,887	0,6737	<0,0001	<0,0001	$\hat{y} = 10,438 + 3,892X - 0,581X^2$	0,66
Total	60,302	55,646	51,750	49,177	0,8278	<0,0001	0,0801	$\hat{y} = 59,55 - 2,961X$	0,70
Σ AGCIR <sup>2</sup>	5,533	4,679	4,142	3,769	0,0945	<0,0001	0,0097	$\hat{y} = 5,555 - 0,763X + 0,076X^2$	0,86
Σ <i>Anteiso</i>	1,359	1,166	1,065	0,959	0,0479	<0,0001	0,2848	$\hat{y} = 1,335 - 0,112X$	0,55
Σ <i>Iso</i>	1,205	1,034	0,898	0,829	0,0218	<0,0001	0,0040	$\hat{y} = 1,190 - 0,104X$	0,80
Σ Ímpares Lineares	2,970	2,477	2,177	1,984	0,0471	<0,0001	0,0018	$\hat{y} = 2,972 - 0,439X + 0,047X^2$	0,88

continua

Ácidos graxos	Dietas				EPM <sup>1</sup>	Valor de P		Equações de regressão	r <sup>2</sup>
	Controle	1,3% OG	2,5% OG	3,7% OG		L	Q		
Σ Monoinsaturados Par									
<i>cis</i>	25,886	28,653	30,769	30,917	0,9137	<0,0001	0,0163	$\hat{y} = 26,64 + 1,371X$	0,33
<i>trans</i>	3,113	5,555	7,614	9,565	0,3974	<0,0001	0,5257	$\hat{y} = 3,206 + 1,731X$	0,80
Total	28,994	34,209	38,420	40,451	0,8421	<0,0001	0,0026	$\hat{y} = 29,85 + 3,103X$	0,74
Σ Poli-insaturados									
$\omega$ -3 <i>cis cis</i>	0,308	0,242	0,219	0,195	0,0120	<0,0001	0,0343	$\hat{y} = 0,300 - 0,029X$	0,50
$\omega$ -6 <i>cis cis</i>	1,880	1,864	1,855	1,705	0,0714	0,0541	0,2709	-	-
Hipo:hiper	0,516	0,749	0,916	1,026	0,0536	<0,0001	0,0256	$\hat{y} = 0,559 + 0,138X$	0,64
$\omega$ -6: $\omega$ -3	6,2	7,8	8,5	8,8	0,3197	<0,0001	0,0355	$\hat{y} = 6,228 + 1,443X - 0,198X^2$	0,50

<sup>1</sup>Erro padrão da média;

<sup>2</sup>Ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada;

<sup>3</sup>As fórmulas utilizadas nos cálculos das relações foram apresentadas no Material e Métodos

Ribeiro (2009a) relatou que a adição crescente (0; 1,5; 3,0 e 4,5% da MS) de óleo de soja em dieta baseada em capim-elefante picado reduziu linearmente ( $P < 0,01$ ) os teores dos AGCIR na gordura do leite de vacas Holandês x Gir. Como também observado no presente experimento, este autor não relatou comprometimento do consumo de MS ou da produção de leite. Entretanto, segundo ele, houve ação deletéria das adições intermediárias de óleo sobre a concentração ruminal de propionato ( $P < 0,05$ ) e a taxa de degradação ( $P = 0,04$ ) da MS do capim-elefante.

Souza (2011) avaliou dietas baseadas em cana-de-açúcar suplementada com níveis crescentes de OG e também observou redução ( $P < 0,05$ ) nos teores de AGCIR na gordura do leite de vacas Holandês x Gir e ausência ( $P > 0,05$ ) de influência sobre o consumo de MS e produção de leite. Entretanto, o autor não observou efeito ( $P > 0,05$ ) da adição de OG sobre os parâmetros de degradabilidade da MS.

## 6.2. Ácidos graxos saturados de cadeias carbônicas pares curtas e médias

Segundo Baldwin e Polounsky (1977), todos os AG saturados de cadeia inferior a 14 carbonos e 50% do ácido palmítico secretados na gordura láctea são originados da síntese *de novo* na glândula mamária. Por isso, suas concentrações e teores lácteos são utilizados como indicador do grau de lipogênese mamária.

Todos os AG de cadeias curta (C4:0 a C10:0) e média (C12:0 a C16:0) com número par de C tiveram suas concentrações linearmente reduzidas ( $P < 0,0001$ ) na gordura do leite com a inclusão crescente de OG nas dietas (Tabela 7). O teor do ácido palmítico, principal AG de cadeia média da gordura do leite, e o somatório das concentrações dos AG saturados de cadeia média com número par de C foram reduzidos ( $P < 0,0001$ ) em 63%, comparando-se os tratamentos sem inclusão e com 3,7% de OG. Esse comportamento, somado à afirmação de Baldwin e Polounsky (1977), reforça a hipótese apresentada no Tópico anterior de que a síntese *de novo* de AG na glândula mamária tenha sido comprometida e que o aumento dos teores de gordura do leite tivesse sido causado pelo maior aporte de AG de cadeia longa na glândula mamária. Outro fator que corrobora essa hipótese é o fato de que, apesar dos inibidores da lipogênese mamária (CLA *trans*-10 *cis*-12 e CLA *trans*-9 *cis*-11) estarem presentes na gordura das amostras de leite e terem apresentado aumento linear ( $P = 0,0002$ ) em função do incremento de OG nas dietas, eles apresentaram concentrações relativamente baixas ( $< 0,086$  g/100 g de AG totais; Tabela 7), suficientes apenas para promover leves reduções sobre a síntese *de novo* dos AG de cadeia curta e média, mas insuficiente para causar impacto negativo sobre os teores de gordura no leite.

Do ponto de vista da nutrição humana, a redução da síntese *de novo* e, conseqüentemente, dos teores dos AG de cadeia média no leite é extremamente interessante, visto que esses AG são tidos como responsáveis pelo aumento dos níveis plasmáticos de LDL, dos riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, doenças coronarianas, hiperglicemia e aumento da resistência à insulina (Goff *et al.*, 2005; St. Pierre *et al.*, 2005; Gidding *et al.*, 2009).

Assim como no presente experimento, Ribeiro (2009a), Mourthé (2012a) e Souza (2011) também observaram redução na lipogênese mamária, devido à diminuição ( $P < 0,05$ ) dos teores de AG de cadeia curta e média com número par de C, sem que, no entanto, observassem algum grau de comprometimento da concentração (mMol/ 100mL) de acetato ou observassem concentrações significativas dos AG inibitórios da síntese *de novo*.

## 6.3. Ácidos graxos saturados de cadeias carbônicas pares longas

Segundo Baldwin e Polounsky (1977), todos os AG lácteos saturados com 18 ou mais C na cadeia são originados da dieta. Dentre eles, o ácido esteárico é o que, normalmente, apresenta os teores mais elevados no leite.

O teor de ácido esteárico na gordura láctea está associado a três fatores: i) ao consumo desse AG na dieta; ii) ao grau de BH por que passam os AG poli-insaturados no rúmen (Bauman *et al.*, 2003; Loor *et al.*, 2005; Lock e Bauman, 2011), sendo que essa relação ocorre porque o esteárico é o produto final desse processo. Assim, quanto maior a concentração de esteárico no leite maior foi a ocorrência de BH completa sobre os AG poli-insaturados no rúmen. Entende-se por BH completa, a ação das bactérias do Grupo B representada pelas *Fusocillus* spp. e *Butyrivibrio proteoclasticum* (Jenkins, 2008); iii) à atividade das enzimas desaturase presentes nas células mamárias, em especial a  $\Delta^9$ -desaturase, responsáveis pela introdução de uma dupla ligação entre os átomos 9 e 10 da cadeia carbônica do ácido esteárico (Ntambi e Miyazaki, 2004). Soyeurt *et al.* (2008) observaram que, em média, cerca de 40% do ácido esteárico absorvido do plasma pela glândula

mamária é convertido em oleico, fazendo com que mais de 50% do oleico secretado no leite bovino seja oriundo da ação da enzima desaturase.

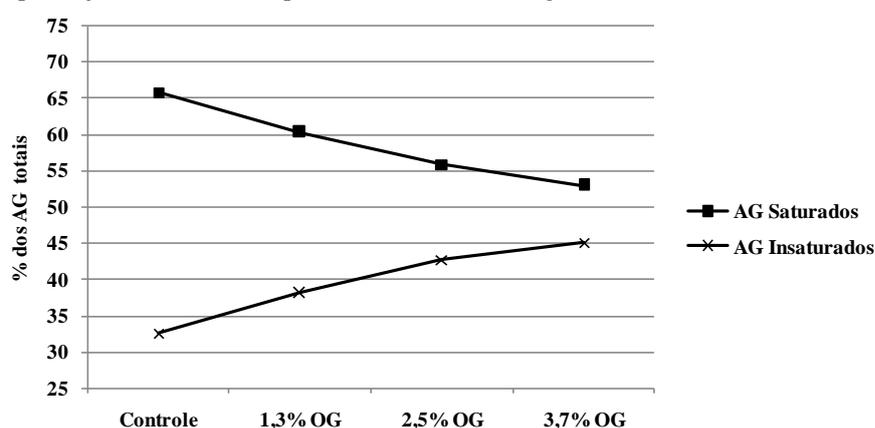
As concentrações de ácido esteárico na gordura do leite apresentaram comportamento quadrático em função do incremento de OG nas dietas (Tabela 7). A partir da derivação da sua equação de regressão, observou-se que o zênite na concentração de ácido esteárico (16,7g/ 100 g de AG totais) no leite ocorreu aos 3,4% de OG.

A grande variedade de fatores que influenciam o teor do ácido esteárico na gordura do leite dificulta a interpretação do seu comportamento. Dentre os principais fatores responsáveis pelo seu aumento plasmático e lácteo, está o fato de que o seu consumo se elevou (Tabela 1) com o incremento de OG nas dietas. O incremento de OG nas dietas também acarretou elevação no consumo de AGI (ácido oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico; Tabela 1), substratos da BH ruminal e, conseqüentemente, da formação do ácido esteárico. Entretanto, as concentrações plasmáticas do ácido esteárico observadas foram decrescentes em função do nível de inclusão de OG na dieta ( $P = 0,0046$ ) resultado da incorporação preferencial desse AG pelos triglicerídeos, que respondem a somente cerca de 5% dos lípides plasmáticos (Abughazaleh *et al.*, 2003). Os demais AG saturados de cadeia carbônica par apresentaram concentrações baixas (<0,2 g/100 g de AG totais; Tabela 7). Comportamento este esperado já que não há nenhuma rota metabólica celular conhecida para sua síntese (Yashodhara *et al.*, 2009), além de sua concentração nos alimentos ser naturalmente baixa.

#### 6.4. Ácidos graxos insaturados

Dois fatores influenciam diretamente o consumo e, conseqüentemente, a secreção láctea de AGI pelos ruminantes: – o fornecimento de volumoso jovem com alta relação folha:haste e rico em tecidos metabolicamente ativos caracterizados pela abundância de lipídeos ricos em ácido  $\alpha$ -linolênico (Fernandes *et al.*, 2007); – a suplementação lipídica, em especial, com grãos ou óleos vegetais ricos em ácido oleico, linoleico ou  $\alpha$ -linolênico (Elgersma *et al.* 2003; Bauman e Lock, 2006).

No presente experimento, apesar da elevação dos teores do ácido esteárico, os teores dos AG saturados totais (pares e ímpares) reduziram em cerca de 25% entre os tratamentos com inclusão de 0% e 3,7% de OG, passando de 65,8% para 52,9% dos AG totais secretados no leite (Tabela 7). Já as concentrações dos AG insaturados totais foram elevadas em, aproximadamente, 39%, comparando-se as dietas com 0% e com 3,7% de OG. Alterações composicionais, como as ilustradas na Figura 4, são de fundamental importância quando se tem por objetivo melhorar a qualidade nutricional da gordura.



**Figura 4.** Teores de ácidos graxos (AG) saturados e insaturados na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total.

Ribeiro (2009a) apresentou comportamento semelhante para as concentrações dos AG saturados e insaturados. Houve redução ( $P<0,01$ ) de 25% e incremento ( $P<0,05$ ) de 43%, respectivamente, nas concentrações dos AG saturados e insaturados na gordura do leite de vacas Holandês x Gir, quando comparadas dietas com 0% e 4,5% de inclusão de óleo de soja. Já Souza (2011) observou variações ainda maiores. Os teores dos AG saturados totais (pares e ímpares) reduziram em cerca de 32% entre os tratamentos com inclusão de 0% e 4,5% de OG, passando de 77,4% para 52,9% dos AG totais secretados no leite. Já as concentrações dos AG insaturados totais foram elevadas em, aproximadamente, 90%, passando de 23,8% para 45,4% dos AG totais.

#### 6.4.1. Ácidos graxos monoinsaturados *cis*

Segundo o USDA (2005), os AG monoinsaturados *cis* secretados pela glândula mamária das fêmeas bovinas estão presentes em concentrações entre 23 e 32% do total de AG da gordura láctea, sendo que o ácido oleico, seu principal representante, participa com, aproximadamente, 93% desse montante.

Os AG monoinsaturados *cis* podem ser originados de três diferentes fontes: i) diretamente da dieta, ao passarem pelo ambiente ruminal sem que sejam modificados pelas enzimas microbianas; ii) dos passos intermediários da BH dos AG poli-insaturados (Shingfield *et al.*, 2010) e iii) da ação da enzima  $\Delta^9$ -desaturase sobre o ácido esteárico na glândula mamária. Segundo Haug *et al.* (2007), dois terços de todo ácido esteárico absorvido pela glândula mamária é metabolizado pela enzima  $\Delta^9$ -desaturase, explicando, em parte, a alta concentração do ácido oleico no leite. No presente experimento, a secreção dos isômeros monoenoicos C18:1 *cis* foi altamente correlacionada com os consumos de OG, e em especial, de ácido linoleico (Tabela 8).

**Tabela 8.** Correlações entre os consumos de óleo de girassol (OG) e de ácido linoleico e a secreção láctea dos isômeros C18:1 *cis* identificados na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total

Consumo	Isômero C18:1			
	<i>cis</i> -9	<i>cis</i> -11	<i>cis</i> -12	<i>cis</i> -13
OG	r = 0,60 P = 0,0049	r = 0,34 P = 0,0234	r = 0,86 P < 0,0001	r = 0,34 P = 0,0201
Ácido linoleico	r = 0,60 P < 0,0001	r = 0,37 P = 0,0148	r = 0,85 P < 0,0001	r = 0,38 P = 0,0112

r = correlação; P = significância

O ácido oleico é reconhecidamente benéfico à saúde humana por ser capaz de reduzir os teores plasmáticos de colesterol LDL e de triglicerídeos (De Lorgeril *et al.*, 1994; Carter *et al.*, 1997; Kris-Etherton *et al.*, 1999; Mensink *et al.*, 2003; Nicolosi *et al.*, 2004). Assim, torna-se interessante o desenvolvimento de técnicas que incrementem suas concentrações na gordura láctea.

No presente experimento, foi observado efeito linear crescente (P < 0,0001) para concentração de ácido oleico no leite em função do incremento de OG na dieta (Tabela 7). Em média, o ácido oleico representou 86% dos AG monoinsaturados *cis* totais, enquanto que os C18:1 *cis* participaram com 26 a 31% dos AG totais da gordura láctea. Estes valores estão dentro do intervalo apresentado pelo USDA (2005).

Diferentemente do presente experimento, Souza (2011) observou elevação apenas nos teores dos isômeros C18:1 *cis*-9 (P = 0,04) e C18:1 *cis*-12 (P < 0,001), enquanto que os demais isômeros e sua somatória não apresentaram influência (P > 0,05) da adição de OG à dieta. Já Mourthé (2012a), observou elevação (P < 0,05) dos teores lácteos de todos os isômeros octadecenoicos (C18:1) avaliados além dos seus somatórios. Este autor observou teores de oleico de 19,8; 22,6; 24,1 e 25,9 g/100 g de AG total para os tratamentos T0 (sem adição de óleo de soja); 1,3%OS; 2,6%OS e 3,9%OS, respectivamente, representando, em média, 86% dos AG monoinsaturados totais, assim como no presente experimento.

#### 6.4.2. Ácidos graxos monoinsaturados *trans*

No OG utilizado no presente experimento, o ácido linoleico correspondeu a 66,1% dos AG totais (Tabela 5) permitindo, então, elevada diferença no consumo desse AG entre os tratamentos com 0 e 3,7% de OG (48,1 *versus* 275,6 g/dia, respectivamente). O elevado consumo de ácido linoleico está diretamente associado à secreção mamária dos AG C18:1 *trans* já que a BH ruminal do ácido linoleico (e também do oleico e  $\alpha$ -linolênico) gera uma vasta gama de intermediários, dentre eles, os isômeros octadecenoicos *trans* (Shingfield *et al.*, 2010).

Na Tabela 9 são apresentadas as correlações entre o consumo do OG e dos principais AG presentes na sua composição, quais sejam, oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico, com os isômeros monoinsaturados C18:1 *trans*. Percebe-se que as correlações foram todas altamente positivas, sendo que o linoleico apresentou valores mais elevados se comparado com o oleico e  $\alpha$ -linolênico.

**Tabela 9.** Correlações entre os consumos de óleo de girassol, de ácido oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico e a secreção láctea dos isômeros *trans* na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com níveis crescentes de óleo de girassol na matéria seca total

Consumo	Isômero C18:1									
	<i>trans</i> -4	<i>trans</i> -5	<i>trans</i> -6 a 8	<i>trans</i> -9	<i>trans</i> -10	<i>trans</i> -11	<i>trans</i> -12	<i>trans</i> -13 + <i>trans</i> -14	<i>trans</i> -16	$\Sigma$ <i>trans</i>
<b>Óleo de Girassol</b>	r = 0,76 P<0,0001	r = 0,75 P<0,0001	r = 0,86 P<0,0001	r = 0,90 P<0,0001	r = 0,67 P<0,0001	r = 0,85 P<0,0001	r = 0,91 P<0,0001	r = 0,85 P<0,0001	r = 0,73 P<0,0001	r = 0,88 P<0,0001
<b>Oleico</b>	r = 0,68 P<0,0001	r = 0,67 P<0,0001	r = 0,69 P<0,0001	r = 0,71 P<0,0001	r = 0,52 P = 0,0004	r = 0,65 P<0,0001	r = 0,72 P<0,0001	r = 0,67 P<0,0001	r = 0,49 P = 0,0008	r = 0,68 P<0,0001
<b>Linoleico</b>	r = 0,72 P<0,0001	r = 0,69 P<0,0001	r = 0,82 P<0,0001	r = 0,85 P<0,0001	r = 0,63 P<0,0001	r = 0,79 P<0,0001	r = 0,86 P<0,0001	r = 0,79 P<0,0001	r = 0,73 P<0,0001	r = 0,83 P<0,0001
<b>Linolênico</b>	r = 0,34 P = 0,024	r = 0,33 P = 0,0313	r = 0,36 P<0,0170	r = 0,44 P = 0,0035	r = 0,36 P = 0,0183	r = 0,32 P = 0,0368	r = 0,39 P<0,0101	r = 0,39 P = 0,0095	r = 0,30 P = 0,0500	r = 0,36 P = 0,0178

r = correlação ; P = significância

O interesse pelos AG *trans* tem aumentado nos últimos anos, devido à sua associação com o aumento dos riscos de ocorrência de doenças coronarianas e de outras doenças crônicas (Lock e Bauman, 2011).

A gorduras originadas dos ruminantes são ricas em AGI *trans* (Lock *et al.*, 2005). No presente experimento, os teores desses AG se elevaram ( $P < 0,0001$ ) com o fornecimento de OG, participando com 10,7; 16,2; 20,0 e 23,6% do total dos isômeros C18:1 para as dietas com 0; 1,3; 2,5 e 3,7% de OG, respectivamente.

Dentre os AG *trans*, o vacênico (C18:1 *trans*-11) é o isômero presente em maior concentração na gordura do leite, participando com 1 a 10% do conteúdo total de AG (Haug *et al.*, 2007). O principal responsável por essa variação é o tipo de dieta fornecida ao animal, sendo que quanto maior a concentração de AGPI da dieta, maior a sua secreção na gordura láctea. Isso ocorre porque ele é o principal produto intermediário da BH ruminal dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico (Khanal e Dhiman, 2004). Confirmando essas afirmações, observou-se incremento nas concentrações plasmáticas do ácido vacênico ( $P < 0,0001$ ) em função da inclusão de OG na dieta (Tabela 6) sendo observado aumento de 345% entre o tratamento controle e o com 3,7% de OG. Como reflexo, foi também observado incremento ( $P < 0,0001$ ) em seus teores lácteos com a suplementação das dietas com OG (Tabela 7). A adição de OG permitiu aumento de cerca de 312% considerando as dietas com 0 e 3,7% de OG.

O ácido vacênico é importante no estudo da gordura láctea pelo fato dele ser precursor de, aproximadamente, 90% do ácido rumênico secretado no leite por meio da ação da enzima  $\Delta^9$ -desaturase na glândula mamária dos ruminantes (Kay *et al.*, 2004), e também por sua conversão a ácido rumênico nos tecidos humanos (Turpeinen *et al.*, 2002; Parodi, 2009).

#### 6.4.3. Ácidos graxos poli-insaturados

Os AGPI estão presentes na gordura láctea numa concentração próxima de 2,0 g/L, sendo o ácido linoleico  $\omega$ -6, o  $\alpha$ -linolênico  $\omega$ -3 e os isômeros de CLA seus principais representantes (Parodi, 1997; Jensen, 2002; O'Donnell-Mengaro *et al.*, 2011). As estratégias para aumentar os teores dos AG  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 no leite normalmente envolvem a utilização de alimentos ricos em ácido linoleico (*e.g.* soja, girassol) e  $\alpha$ -linolênico (*e.g.* linhaça, óleo de peixe, forrageiras C3) (Lock e Bauman, 2004).

As concentrações lácteas dos AG  $\omega$ -6 são dependentes do seu nível de ingestão e do grau de BH ruminal. Já a concentração de AG  $\omega$ -3 na gordura láctea é, geralmente, muito baixa – menos de 0,5% em dietas não suplementadas e até 2,0% em dietas suplementadas com fontes lipídicas –, sendo o ácido  $\alpha$ -linolênico o principal isômero (Jensen, 2002).

No presente experimento, o teor lácteo dos AG  $\omega$ -6 permaneceu estável ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos, com média de 1,825 g/100 g de AG total. Esse comportamento se explica devido à estabilidade ( $P > 0,05$ ) observada na concentração láctea do ácido linoleico, AG  $\omega$ -6 de maior concentração (aproximadamente, 89% do total) com média igual a 1,626 g/100 g de AG total.

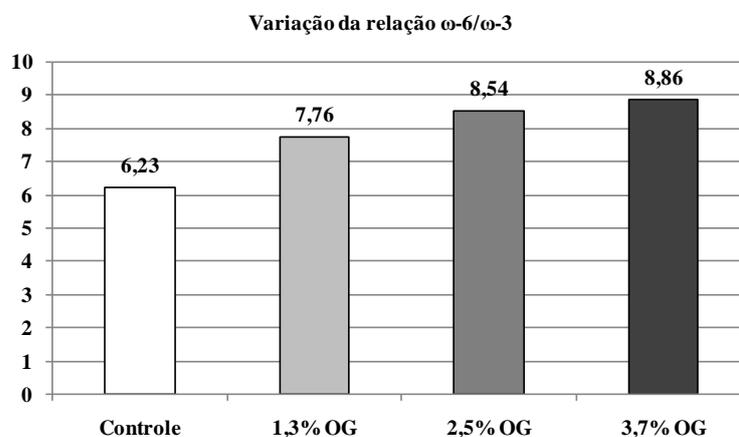
O comportamento do ácido linoleico foi diferente dos demais  $\omega$ -6, quais sejam, C20:2; C20:3 e C20:4 cujas concentrações no leite foram reduzidas ( $P < 0,05$ ) com a adição de OG à dieta (Tabela 7).

Os teores dos AG  $\omega$ -3  $\alpha$ -linolênico, C20:5 e C22:6 foram reduzidos ( $P < 0,0001$ ) com a inclusão de OG na dieta (Tabela 7). No caso específico do  $\alpha$ -linolênico, apesar do seu consumo ter sido crescente ( $P = 0,0001$ ) à medida que houve incremento no fornecimento de OG à dieta (Tabela 1), sua concentração plasmática estável, mas com tendência ( $P = 0,0610$ ) de redução (Tabela 6), sugere elevação no grau de BH com o aumento do seu aporte no rúmen. Essa mesma sugestão vale para o ácido linoleico, que, da mesma forma que o  $\alpha$ -linolênico, também apresentou aumento de consumo ( $P < 0,0001$ ) com a inclusão de OG na dieta mas, entretanto, não apresentou variação ( $P = 0,4163$ ) nos seus teores lácteos. Esse comportamento corrobora com os resultados obtidos em ensaios realizados *in vitro* ou *in vivo* onde foram observados aumentos nas taxas aparentes de BH dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico em função do incremento de óleos vegetais nas dietas de vacas em lactação (Shingfield *et al.*, 2008; Hassim *et al.*, 2010; Buccioni *et al.*, 2012).

A relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3 é um importante parâmetro utilizado para classificar a qualidade nutricional das gorduras, óleos e dietas. Dietas com relações entre 2:1 e 3:1 têm sido as mais recomendadas, por possibilitar maior conversão do ácido  $\alpha$ -linolênico a ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 *cis*-4 *cis*-7 *cis*-10 *cis*-13 *cis*-16 *cis*-19), alcançando o máximo em torno de 2,3:1. Na gordura láctea, essa relação tende a ser mais elevada, sendo altamente influenciada pelo regime alimentar, permitindo que alguns produtos de ruminantes se tornem importantes fontes de AG  $\omega$ -3 na dieta humana (Haug *et al.*, 2007).

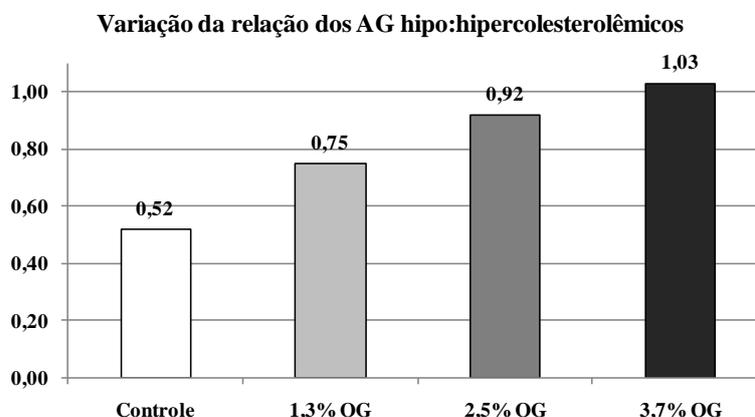
No presente experimento, a relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3 apresentou comportamento quadrático ( $P = 0,0355$ ) com a inclusão de OG à dieta (Tabela 7). A partir da derivação da sua equação de regressão, observou-se que o zênite da relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3 (8,86) ocorreu aos 3,6% de OG. Tal comportamento se explica devido à redução nos teores de  $\omega$ -3 e estabilidade nos de  $\omega$ -6. O aumento da relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3 é indesejável do ponto de vista de saúde humana já que, apesar de ser um AG essencial, níveis elevados de  $\omega$ -6 são responsável por desencadear uma série de disfunções fisiológicas como a formação de trombos, de ateromas e de desordens imunológicas (Tópico 13.7 da Revisão de Literatura). Além disso, os valores ficaram acima dos 2,3:1 recomendados por Martin *et al.* (2006).

Essa relação é, de modo geral, pouco utilizada nos trabalhos que apresentam resultados de perfis de AG da gordura do leite. Uma exceção foi o artigo publicado por Petit (2003), que testaram os efeitos do tratamento de sementes de linhaça e girassol com formaldeído sobre o perfil de AG do plasma e do leite de vacas Holandês. Os autores observaram relações  $\omega$ -6: $\omega$ -3 de 2,3; 8,4; 1,7 e 8,2 para os tratamentos com sementes de linhaça e de girassol tratados, e sementes de linhaça e de girassol não tratadas com formaldeído, respectivamente. Como era de se esperar, os tratamentos à base de linhaça apresentaram relações  $\omega$ -6: $\omega$ -3 baixas já que o óleo dessa semente é rica em ácido  $\alpha$ -linolênico (57%). Já os tratamentos com a adição de girassol, fonte de ácido linoleico, apresentaram valores muito parecidos com os obtidos nos tratamentos com a adição de 2,5 e 3,7% de OG do presente experimento.



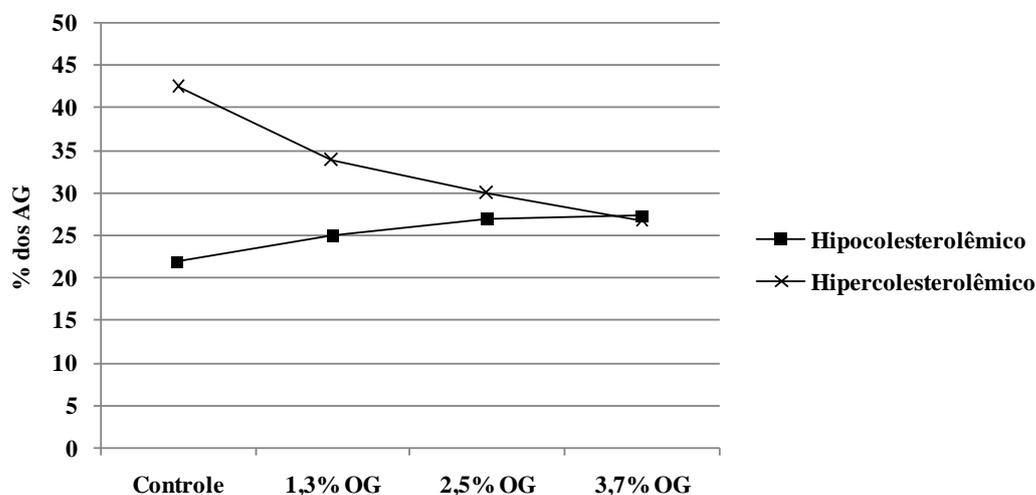
**Figura 5.** Relação entre as concentrações dos ácidos graxos  $\omega$ -6: $\omega$ -3 presentes na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total

Outra relação utilizada para avaliar a qualidade nutricional das gorduras, dos óleos e das dietas, é a proporção entre os AG hipo (C18:1 *cis*-9; C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15; C20:5  $\omega$ -3 e C22:6  $\omega$ -3) e hipercolesterolêmicos (C12:0; C14:0 e C16:0). Ressalte-se que quanto mais alto o valor desta relação, mais interessante do ponto de vista de saúde humana. No presente experimento, observou-se incremento linear neste índice ( $P < 0,0001$ ) à medida que se adicionou OG à dieta (Tabela 7 e Figura 6).



**Figura 6.** Relação entre as concentrações dos ácidos graxos hipo e hipercolesterolêmicos presentes na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total

Esse comportamento foi resultado de dois fatores agindo simultaneamente: a redução dos teores de AG saturados de cadeia carbônica média e a concomitante elevação dos teores de AG mono e poli-insaturados ( $\omega$ -6 e  $\omega$ -3) à medida em que se adicionou OG à dieta. A Figura 7 apresenta o comportamento dos teores dos AG hipo e hipercolesterolêmicos entre os tratamentos experimentais.



**Figura 7.** Concentrações dos ácidos graxos hipo e hipercolesterolêmicos na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total

Da mesma forma que no presente experimento, Lopes *et al.* (2012a; 2012b) e Mourthé *et al.* (2012b), estudando a qualidade nutricional da gordura do leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com óleo vegetal adicionadas a dietas à base de forrageiras tropicais, também observaram comportamento crescente ( $P < 0,05$ ) nas relações entre os dois grupos de AG, passando de 0,57 para 1,11; de 0,39 para 0,86 e de 0,55 para 1,19, respectivamente, entre os tratamentos com menores e maiores adições de gordura à dieta.

Com o objetivo de classificar os alimentos de acordo com sua probabilidade em predispor o homem ao risco de ocorrência de doenças coronarianas, Ulbright e Southgate (1991) propuseram a utilização de dois índices, de Aterogenicidade (IA) e de Trombogenicidade (IT), baseados nas concentrações de AG saturados de cadeia média, mono e poli-insaturados de cadeia longa presentes na fração lipídica dos alimentos.

Entretanto, a metodologia utilizada nos cálculos desses índices tem sido questionada devido ao fato de que as equações não distinguem as ações fisiológicas dos AG individualmente, mas por grupos. Dessa forma, AG monoinsaturados *trans*, cuja maioria dos isômeros são reconhecidamente maléficis à saúde (Warensjö, *et al.*, 2004; Lock *et al.*, 2005; Uauy *et al.*, 2009), são colocados no mesmo grupo dos monoinsaturados *cis*, considerados benéficos à saúde, indistintamente. Da mesma maneira, as equações também consideram os benefícios dos AG  $\omega$ -6 equivalentes aos dos  $\omega$ -3. Assim, estes índices devem ser interpretados com cautela, de preferência, juntamente com outros parâmetros como o comportamento dos AG individualmente.

Segundo Ulbright e Southgate (1991), quanto menores os valores absolutos dos índices, menor a probabilidade de que o consumo do alimento venha predispor à ocorrência de doenças cardiovasculares. No presente experimento, foi observado comportamento quadrático ( $P < 0,0001$ ;  $\hat{y} = 2,876 - 0,696X + 0,089X^2$ ;  $r^2 = 0,67$ ) nos valores do IA com a inclusão de OG na dieta, sendo a redução da ordem de 54% entre os tratamentos Controle e 3,7%OG (Tabela 10). Esse comportamento sugere que adições de OG próximas a 3,0% em dietas de vacas alimentadas à base de capim-elefante picado permitem melhora significativa da qualidade da gordura do leite com relação à predisposição de doenças aterogênicas. Suposição essa confirmada pela redução dos teores dos AG saturados e elevação dos insaturados, em especial dos ácidos oleico e linoleico.

Entretanto, apesar da redução linear ( $P < 0,0001$ ;  $\hat{y} = 3,767 - 0,285X$ ;  $r^2 = 0,47$ ) observada nos IT com a inclusão de OG na dieta (Tabela 10), os valores absolutos foram, de modo geral, mais elevados do que o esperado, provavelmente, como reflexo da elevação dos teores do ácido esteárico e redução dos AG  $\omega$ -3.

Lopes *et al.* (2008) forneceram níveis crescentes (0 a 4,5% da MS) de óleo de soja para vacas leiteiras submetidas a dietas baseadas em capim-elefante picado e observaram redução ( $P < 0,01$ ) de 38% e 25% nos IA e IT da gordura do leite, respectivamente. Esse comportamento se deveu, principalmente, à intensa queda na lipogênese mamária e, conseqüentemente, dos teores de AG saturados de cadeia carbônica curta e média ( $P < 0,01$ ; queda de cerca de 35%) e da elevação dos teores de AG insaturados totais em cerca de 67%. O mesmo comportamento foi observado por Lopes *et al.* (2012a; 2012b) e Mourthé *et al.* (2012b) que observaram reduções de 47%, 70% e 52%, respectivamente, nos índices de aterogenicidade da gordura do leite de vacas à medida que se elevou o fornecimento de óleo vegetal nas dietas a base de forrageiras tropicais. Comportamento semelhante ocorreu com o IT.

**Tabela 10.** Índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT) da gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementado com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total

Ácidos graxos	Dietas				EPM <sup>1</sup>	Valor de P <sup>2</sup>	
	Controle	1,3% OG	2,5% OG	3,7% OG		L	Q
IA	2,969	2,120	1,743	1,540	0,1207	<0,0001	<0,0001
IT	3,942	3,320	2,985	2,825	0,1329	<0,0001	0,0018

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup>significância

#### 6.4.4. Ácidos linoleicos conjugados

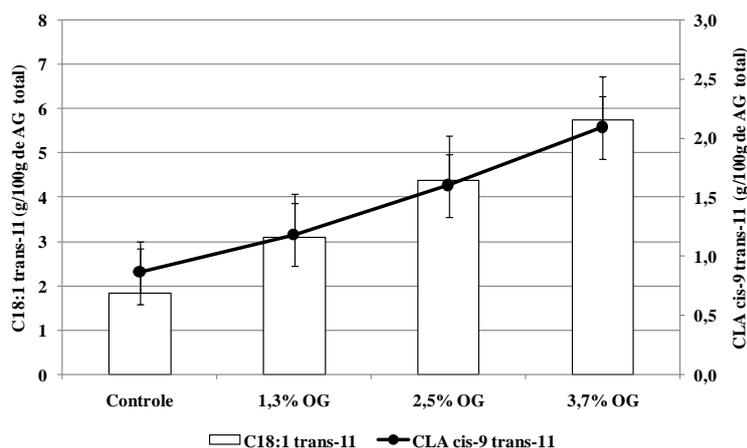
O termo ácido linoleico conjugado (CLA) caracteriza um grupo de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico, com ligações duplas conjugadas variando entre 6-8 a 12-14 (Collomb *et al.*, 2004). Esses AG, encontrados principalmente nas gorduras dos produtos derivados dos ruminantes, são hoje os ingredientes funcionais mais celebrados e estudados da atualidade devido aos seus potenciais efeitos benéficos (anticarcinogênico, antiaterogênico, antidiabético, imunomodulador, osteosintético e apoptótico) embasados, principalmente, em resultados de experimentos utilizando culturas celulares ou modelos animais, com poucas, mas concretas, evidências geradas a partir de estudos com humanos (Wahle *et al.*, 2004; Toomey *et al.*, 2006; Benjamin e Spener, 2009).

O ácido rumênico e o CLA *trans*-10 *cis*-12 são isômeros de CLA com comprovada ação fisiológica presentes na gordura dos ruminantes, por isso, são o foco da maior parte dos estudos. Entretanto, a síntese láctea do isômero CLA *trans*-10 *cis*-12 não é desejável, devido à sua ação inibitória sobre a lipogênese mamária (Bauman *et al.*, 1999; Baumgard *et al.*, 2002). Assim, tem-se pesquisado estratégias nutricionais que maximizem a secreção do ácido rumênico. Dentre estas destacam-se a utilização de pastagens formadas com forrageiras tenras e de elevado valor nutricional ricas em ácido  $\alpha$ -linolênico (Kelly *et al.*, 1998a; Dhiman *et al.*, 1999) ou suplementação das dietas com fontes de óleos ricas em ácidos linoleico e/ou  $\alpha$ -linolênico (Kelly *et al.*, 1998b).

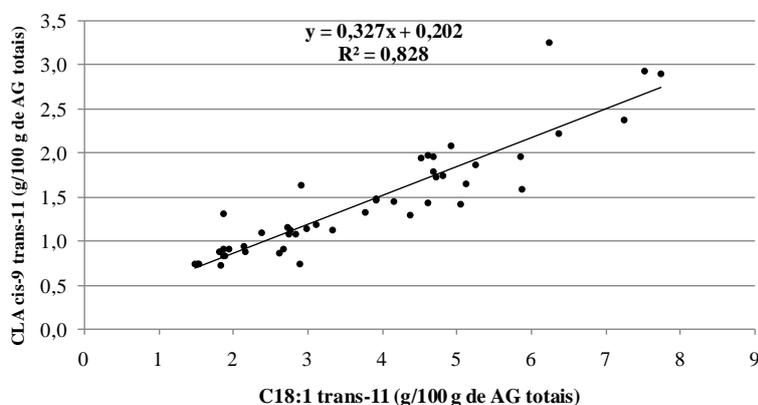
Foi observado incremento linear ( $P < 0,0001$ ) na concentração de ácido rumênico no leite com a inclusão de OG na dieta (Tabela 6), com aumento da ordem de 244% entre os tratamentos Controle e 3,7% de OG.

A síntese do ácido rumênico ocorre em dois locais distintos: no rúmen, durante a BH do ácido linoleico; e na glândula mamária pela ação da enzima  $\Delta^9$ -desaturase (Bauman *et al.*, 1999) que, segundo Griinari *et al.* (2000), é responsável por 64 a 78% da secreção deste isômero no leite. Assim, qualquer estratégia que objetive elevar o teor de ácido rumênico na gordura do leite deve focar no aumento do fluxo extra-ruminal do ácido vacênico e da atividade da enzima  $\Delta^9$ -desaturase no tecido mamário.

Assim como para o ácido rumênico, foi observado incremento linear ( $P < 0,0001$ ) na concentração de ácido vacênico no leite em função da inclusão de OG na dieta (Tabela 7). A similaridade das respostas desses dois AG indica forte influência da atividade da  $\Delta^9$ -desaturase, permitindo que ocorresse correlação altamente positiva entre eles ( $r = 0,910$  e  $P < 0,0001$ ). As Figuras 8 e 9 ilustram a relação entre esses dois AG.



**Figura 8.** Influência da adição de níveis crescentes de óleo de girassol sobre os teores dos ácidos rumênico (CLA *cis-9 trans-11*) e vacênico (C18:1 *trans-11*) na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total.



**Figura 9.** Relação entre as concentrações dos ácidos rumênico (CLA *cis-9 trans-11*) e vacênico (C18:1 *trans-11*) na gordura do leite de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total.

A concentração do CLA *cis-9 trans-11* (eixo y) aumentou 0,327 unidades a cada incremento de uma unidade de C18:1 *trans-11* (eixo x) (Figura 9). Já Ribeiro (2009a), observou coeficiente de determinação mais elevado ( $r^2=0,942$ ) e um coeficiente angular maior (0,448), sugerindo uma maior atividade da  $\Delta^9$ -desaturase.

A concentração do isômero CLA *trans-10 cis-12* no leite apresentou-se estável, não influenciada ( $P>0,05$ ) pela inclusão de OG na dieta, com valor médio de 0,019 g/100 g de AG totais (Tabela 7). Esse valor baixo é normal já que, segundo Griinari *et al.* (1998), ele pode se apresentar em níveis quase indetectáveis na gordura do leite de animais submetidos à dietas com alta relação V:C, como foi o caso do presente experimento. Segundo Haug *et al.* (2007), excetuando-se o ácido rumênico, a soma das concentrações dos demais isômeros de CLA presentes na gordura do leite nunca ultrapassa 1% do total de AG, mesmo em dietas ricas em carboidratos não fibrosos.

O isômero CLA *trans-9 cis-11* apresentou incremento linear ( $P<0,0001$ ) na sua concentração no leite em função da inclusão de OG na dieta (Tabela 6), sendo este aumento da ordem de 120% entre os tratamentos Controle e com 3,7% de OG. A origem desse isômero ainda não está bem definida, mas supõe-se que, assim como o CLA *trans-10 cis-12*, seja originado da BH incompleta dos AG poli-insaturados presentes na dieta.

De maneira geral, esses dois AG apresentam forte correlação negativa com os teores de gordura do leite (Baumgard *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2003; Gama *et al.*, 2007; Perfield *et al.*, 2007; Ribeiro, 2009a; Souza, 2011). Entretanto, no presente experimento, não se observou esse comportamento. Apesar da estabilidade das concentrações do isômero CLA *trans-10 cis-12*, o CLA *trans-9 cis-11* elevou suas

concentrações, assim como ocorreu com o teor de gordura. Esse comportamento atípico pode ser consequência dos baixos teores absolutos desses isômeros que, provavelmente, inibiram pouco a lipogênese; o suficiente para reduzir a síntese *de novo* de AG, mas incapaz de causar redução na secreção de gordura no leite devido ao maior aporte de gordura na glândula mamária.

Na Tabela 11 é apresentada uma síntese das correlações existentes entre os isômeros de CLA identificados no presente experimento (ácido rumênico; *trans-9 cis-11* e *trans-10 cis-12*) com o teor de gordura e com o consumo de OG e seus principais AG (ácido oleico, ácido linoleico e  $\alpha$ -linolênico).

**Tabela 11.** Correlações entre o teor de gordura do leite, os consumos de ácido oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico e a secreção láctea dos principais isômeros de CLA (*cis-9 trans-11*; *trans-10 cis-12* e *trans-9 cis-11*) identificados na gordura do leite de primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total

Consumo	Isômero de CLA		
	<i>cis-9 trans-11</i>	<i>trans-9 cis-11</i>	<i>trans-10 cis-12</i>
OG	r = 0,75 P < 0,0001	r = 0,60 P < 0,0001	r = 0,04 P = 0,7669
Ácido oleico	r = 0,52 P = 0,0004	r = 0,38 P = 0,0128	r = 0,04 P = 0,7947
Ácido linoleico	r = 0,72 P < 0,0001	r = 0,58 P < 0,0001	r = 0,04 P = 0,8092
Ácido $\alpha$ -linolênico	r = 0,27 P = 0,0838	r = 0,15 P = 0,3221	r = -0,12 P = 0,4485

r = correlação; P = significância

Os consumos de OG, ácido oleico e ácido linoleico apresentaram correlação positiva com o CLA *cis-9 trans-11* e CLA *trans-9 cis-11*. Comportamento condizente com o fato de que ambos advêm da BH intermediária dos AG insaturados em ambiente ruminal não ácido. Outro fato que reforça a teoria de que o pH ruminal se manteve elevado, foram as ausências de correlação entre o teor de CLA *trans-10 cis-12* e o consumo de OG e de seus AG.

Ribeiro (2009a), estudando os efeitos da adição de níveis crescentes (0; 1,5; 3,0 e 4,5% da MS) de óleo de soja para vacas leiteiras submetidas a dietas baseadas em capim-elefante picado, observou aumento de 359% nos teores do ácido rumênico entre os tratamentos 0 e 4,5% (1,28 para 4,59 g/100 g de AG totais), resultado da elevada ingestão de ácido linoleico e dos altos teores de ácido vacênico no leite (até 9,35 g/100 g de AG totais), resultantes da baixa atividade das bactérias do Grupo B em consequência da redução do pH ruminal (relação V:C de 50:50). Mesmo comportamento foi observado por Souza (2011), com aumento de 513%, 275% e 600% para os isômeros rumênico, CLA *trans-9 cis-11* e CLA *trans-10 cis-12*, respectivamente.

### 6.5. Índice de atividade da enzima desaturase

A estearoil-CoA desaturase (SCD) ou  $\Delta^9$ -desaturase é uma importante enzima presente em vários tecidos dos ruminantes, em especial o adiposo e mamário, que tem por finalidade primária converter os AG saturados em monoinsaturados, por meio da introdução de uma dupla ligação de configuração *cis* entre os átomos 9 e 10 da cadeia carbônica. A SCD também pode catalizar a reação de dessaturação de um amplo espectro de AG monoinsaturados, incluindo o ácido vacênico, a fim de gerar o ácido rumênico (Ntambi e Miyazaki, 2004).

Uma das maneiras utilizadas para inferir acerca da atividade e seletividade de substrato pela enzima  $\Delta^9$ -desaturase na glândula mamária é a utilização da relação entre os teores dos AG monoinsaturados *cis-9* e os seus isômeros saturados. No presente experimento, foram calculados os índices de desaturase para os pares C14:1 *cis-9*/C14:0, C16:1 *cis-9*/C16:0, C18:1 *cis-9*/C18:0 e ácido rumênico/ácido vacênico.

Na Tabela 12 e nas Figuras 10 a, b e c é apresentado o comportamento da atividade da  $\Delta^9$ -desaturase utilizando como substratos os AG saturados C14:0, C16:0, C18:0 e vacênico. Com exceção do par C16:1 *cis*-9/C16:0, que não apresentou variação ( $P>0,05$ ), todas as demais relações apresentaram decréscimo ( $P<0,05$ ) à medida que se elevou os níveis de OG à dieta.

Segundo Ntambi e Miyazaki (2004), a ação da  $\Delta^9$ -desaturase sobre os AG saturados não é uniforme, sendo os AG C16:0 e o esteárico os mais propensos à reação. No presente experimento, somente o par C18:1 *cis*-9/C18:0 apresentou valores destacadamente superiores (entre 2,212 e 1,657 para os tratamentos Controle e 3,7% de OG).

Jacobs *et al.* (2011) observaram intensa redução na expressão da enzima  $\Delta^9$ -desaturase na glândula mamária de vacas alimentadas com óleo de soja (fonte de ácido linoleico), sendo que o mesmo comportamento não foi observado nos animais alimentados com óleo de colza (fonte de ácido oleico) ou de linhaça (fonte de ácido  $\alpha$ -linolênico). Segundo os autores, a expressão mamária dessa enzima aparentemente foi mais sensível ao fornecimento dietético de ácido linoleico do que de oleico ou  $\alpha$ -linolênico, sugerindo, então, que a expressão da SCD na glândula mamária bovina responde diferentemente aos diversos AG presentes na dieta.

O comportamento dos índices de desaturase apresentado nas Figuras 10 a, b e c sugere que à medida que se adicionou OG e, por conseguinte, ácido linoleico, houve redução na atividade enzimática. O comportamento quadrático apresentado pelo par C18:1 *cis*-9/C18:0, sugere que a inibição da enzima  $\Delta^9$ -desaturase causada, em especial, pelo ácido linoleico, atingiu seu grau máximo (1,63) durante o fornecimento de 2,8% de OG à dieta.

O mesmo comportamento decrescente ( $P<0,05$ ) da atividade enzimática à medida que se adicionou óleo vegetal rico em AG insaturados foi observado por Mourthé (2012a) e Souza (2011) para os pares C14:1 *cis*-9/C14:0, C16:1 *cis*-9/C16:0, C18:1 *cis*-9/C18:0 e ácido rumênico/ácido vacênico.

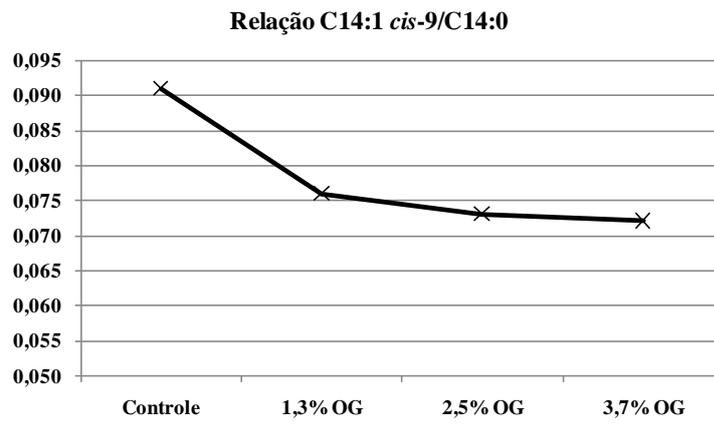
Apesar de em ambos os experimentos as quantidades consumidas de ácido linoleico terem sido consideráveis – entre 82 e 471,1 g/dia no caso de Mourthé (2012a) – os baixos valores da relação C18:1 *cis*-9/C18:0 se comparado ao presente experimento podem ser explicados por outros fatores como o número de lactações e a raça dos animais utilizadas por esses autores e o presente experimento. Segundo Soyeurt *et al.* (2008), quanto maior o número de lactações, menor a atividade das enzimas dessaturase, além disso, vacas da raça Holandês produzem mais  $\Delta^9$ -desaturase que as demais raças europeias e que algumas raças zebuínas. Tanto Mourthé (2012a) quanto Souza (2011) utilizaram vacas multíparas Holandês x Gir.

**Tabela 12.** Atividade da enzima  $\Delta^9$ -desaturase na glândula mamária de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total

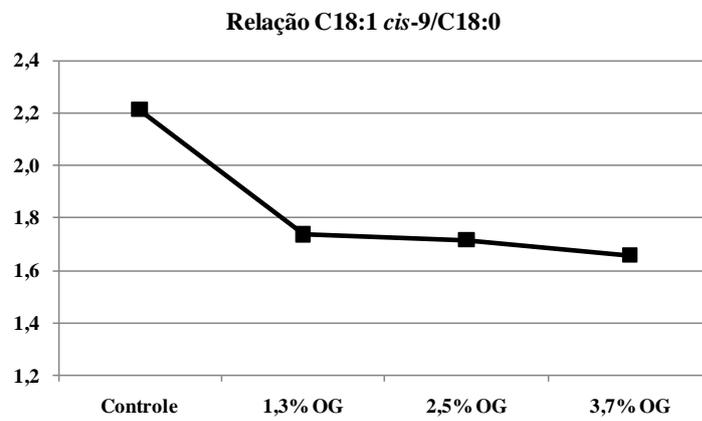
Atividade	Dietas				EPM <sup>1</sup>	Valor de P		Equações de regressão	r <sup>2</sup>
	Controle	1,3% OG	2,5% OG	3,7% OG		L	Q		
C14:1 <i>cis</i> -9/C14:0	0,091	0,076	0,073	0,072	0,0051	0,0017	0,0802	$\hat{y} = 0,085 - 0,005X$	0,14
C16:1 <i>cis</i> -9/C16:0	0,050	0,042	0,046	0,044	0,0037	0,2693	0,2716	-	-
C18:1 <i>cis</i> -9/C18:0	2,212	1,735	1,716	1,657	0,0791	<0,0001	0,0036	$\hat{y} = 2,176 - 0,385X + 0,068X^2$	0,42
ácido rumênico/ácido vacênico	0,477	0,399	0,365	0,367	0,0220	<0,0001	0,0061	$\hat{y} = 0,480 + 0,004X + 0,002X^2$	0,43

<sup>1</sup>Erro padrão da média.

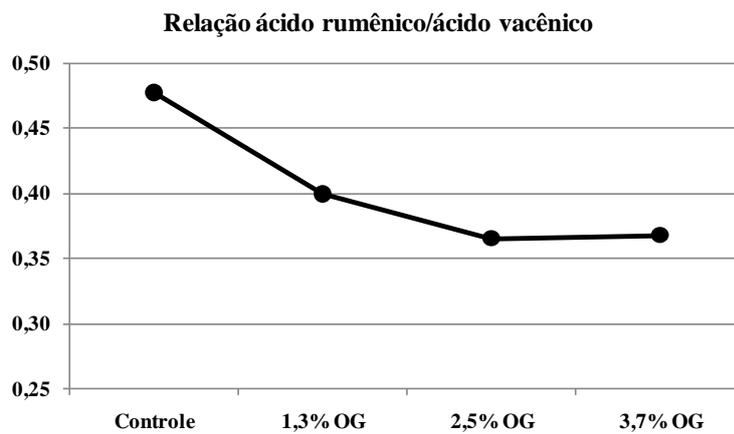
A)



B)



C)



**Figura 10.** Índice de atividade da enzima  $\Delta^9$ -desaturase na glândula mamária de vacas primíparas da raça Holandês alimentadas com dietas à base de capim-elefante picado suplementadas com 0 (Controle); 1,3; 2,5 e 3,7% de óleo de girassol (OG) na matéria seca total.

## CONCLUSÕES

A suplementação de vacas leiteiras com óleo de girassol em níveis inferiores a 3,7% da matéria seca em dietas à base de capim-elefante picado melhorou a qualidade da gordura do leite do ponto de vista da nutrição humana. Tais benefícios foram decorrentes da redução dos teores dos AG de cadeia curta e média; da elevação dos teores de ácido oleico e dos isômeros de CLA, em especial do ácido rumênico; da elevação dos valores absolutos da relação entre os ácidos graxos hipo e hipercolesterolêmicos; além da redução dos índices de aterogenicidade e trombogenicidade.

A redução de 38% nos teores de ácidos graxos de cadeia carbônica ímpar ou ramificada na gordura do leite e os baixos teores totais de proteína sugerem ter havido algum comprometimento no desenvolvimento da microbiota do rúmen à medida que se elevou a suplementação com óleo de girassol. Entretanto, nenhuma outra variável referente ao consumo e digestibilidade dos alimentos, ou relacionada à composição láctea foi influenciada pela possível redução da microbiota.

## CAPÍTULO II

### Consumo, produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com dois tipos de óleo de girassol e dois modos de fornecimento do concentrado em dietas à base de capim-elefante picado

#### RESUMO

O experimento teve por objetivo avaliar os efeitos de dois modos de fornecimento de concentrados – mistura completa ou fornecidos fracionados após cada uma das duas ordenhas diárias – contendo dois tipos de óleo de girassol (OG; 4,5% da MS da dieta) com diferentes teores de ácido oleico – alto e médio oleico – fornecidos para 32 vacas primíparas em lactação recebendo dieta à base de capim-elefante picado. As vacas foram distribuídas em delineamento de blocos casualizados em esquema fatorial 2 x 2 (modo de fornecimento do concentrado x tipo de OG). Foram estudados os efeitos dos tratamentos sobre o consumo e a digestibilidade dos nutrientes; os parâmetros sanguíneos; a produção e composição do leite; e a evolução dos perfis de ácidos graxos dos alimentos, do leite e plasma durante o período experimental. O fornecimento fracionado do concentrado, comprometeu o consumo de nutrientes ( $P < 0,0001$ ) e a população microbiana, resultando em redução dos teores lácteos ( $P < 0,0001$ ) e plasmáticos ( $P = 0,0023$ ) dos AG de cadeia curta ou ramificada, elevou a síntese e secreção ( $P < 0,05$ ) de AG não interessantes do ponto de vista nutricional, mas destacou-se pela elevação da síntese do ácido rumênico, com elevação de cerca de 50% e 67% nos teores lácteos e secreção diária, respectivamente. Entretanto, não influenciou os parâmetros plasmáticos ( $P > 0,1016$ ) ou a digestibilidade aparente de nenhum dos nutrientes avaliados ( $P > 0,05$ ). A utilização do OG rico em ácido oleico permitiu sensível melhora na qualidade nutricional dos AG da gordura láctea se comparado à qualidade da gordura produzida pela suplementação com OG contendo médio teor de ácido oleico. Tal afirmação se baseia nos menores teores de C16:0 ( $P < 0,0001$ ), monoinsaturados *trans* ( $P < 0,0001$ ) e ácido linoleico ( $P < 0,0001$ ) e elevados de ácido oleico ( $P < 0,0001$ ) lácteos que refletiram na relação entre os AG hipo e hipercolesterolêmicos ( $P < 0,0001$ ), na relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3 ( $P < 0,0001$ ), e na redução dos índices de aterogenicidade ( $P = 0,0406$ ) e trombogenicidade ( $P = 0,0062$ ), sem que, contudo, houvesse comprometimento do consumo ( $P > 0,1238$ ) e digestibilidade ( $P > 0,5080$ ) da dieta, dos parâmetros plasmáticos ( $P > 0,1139$ ) ou da produção/composição do leite ( $P > 0,5511$ ). O tipo de OG suplementado na dieta influenciou apenas os consumos diários de proteína bruta ( $P = 0,0248$ ), de carboidratos não fibrosos ( $P = 0,0021$ ), dos ácidos palmítico, oleico e linolênico ( $P < 0,0001$ ), além do consumo de MS ( $P = 0,0008$ ), de MO ( $P = 0,0008$ ) e de FDNcp ( $P = 0,0249$ ) em percentagem do peso vivo (%pc). Apesar da melhora da qualidade nutricional da gordura, observou-se redução dos teores do ácido rumênico quando da adição do OG com altos teores de ácido oleico. A análise da evolução temporal dos AG lácteos permitiu verificar que cerca de seis dias de suplementação dietética são suficientes para estabilizar importantes parâmetros de qualidade nutricional da gordura como os índices de aterogenicidade e trombogenicidade e a relação de AG hipo e hipercolesterolêmicos. Entretanto, 21 dias de suplementação não foram suficientes para permitir que os teores lácteos de ácido rumênico alcançasse seu zênite ou se estabilizassem. Os suplementos concentrados contendo tanto OG com teores altos de ácido oleico como com médios teores não apresentaram variação significativa nos perfis de AG, sugerindo suportar período de armazenamento de até 35 dias. Tais resultados permitiram concluir que, o modo fracionado de fornecimento do concentrado permitiu índices de qualidade da gordura do leite sutilmente melhores que o modo TMR e que o OG rico em ácido oleico é uma boa opção de utilização na dieta de vacas objetivando-se a melhora da qualidade nutricional da gordura láctea.

Palavras-chave: consumo, digestibilidade aparente, girassol alto oleico, manejo alimentar, metabólito sanguíneo, *Pennisetum purpureum*, TMR

#### ABSTRACT

*The experiment was carried out at a randomized 2 x 2 factorial arrangement of treatments in order to evaluate the nutrient intake and digestibilitys, the blood parameters, milk production and composition, and the evolution of food, milk and plasma FA profiles of Holstein x Gir primiparous cows (n=32) fed concentrate added with sunflower oils (SO) containing either high or medium oleic acid content (HO and*

MO) associated with two methods of concentrate feeding (TMR vs. twice a day) in elephant grass-based diets. Feeding the concentrate twice a day reduced nutrients intake ( $P < 0.0001$ ), microbial population – due to reduced milk ( $P < 0.0001$ ) and plasma ( $P = 0.0023$ ) total odd or branched chain FA –, stimulated the milk not healthy FA synthesis and secretion ( $P < 0.05$ ), but increased about 50% and 67% the rumenic acid milk fat concentration and daily secretion, respectively. However, feeding the concentrate twice a day had no effect on plasma parameters ( $P > 0.1016$ ) or on nutrients apparent digestibility ( $P > 0.05$ ). Feeding SO rich in oleic acid allowed significant improvement in the milk fat FA nutritional quality compared to SO with medium concentration fat. This assertion is based on lower levels of C16:0 ( $P < 0.0001$ ), monounsaturated trans ( $P < 0.0001$ ) and linoleic acid ( $P < 0.0001$ ) on milk fat, and on the elevated oleic acid ( $P < 0.0001$ ), hypo:hypercholesterolemic FA ratio ( $P < 0.0001$ ), in the  $\omega$ -6: $\omega$ -3 ratio ( $P < 0.0001$ ) and on the reduced rates of atherogenicity ( $P = 0.0406$ ) and thrombogenicity ( $P = 0.0062$ ). The SO type influenced only the daily intakes of crude protein ( $P = 0.0248$ ), soluble carbohydrates ( $P = 0.0021$ ), the palmitic, oleic and linolenic acid ( $P < 0.0001$  for all) and the DM intake ( $P = 0.0008$ ), organic matter ( $P = 0.0008$ ) and NDF ( $P = 0.0249$ ) as a percentage of body weight (% bw). Despite the improvement in the nutritional fat quality, there was a reduction in milk rumenic acid levels when adding oil with high levels of oleic acid. The time-dependent milk FA evolution showed that important parameters of milk fat quality – atherogenicity and thrombogenicity indexes, hypo and hypercholesterolemia ratio – stabilises about six days of supplementation. However, 21 days of supplementation were not sufficient to allow the concentration of rumenic acid reaches its zenith or to stabilize. The concentrated containing both high levels of SO with oleic acid and with average contents showed no significant variation in its FA profiles, suggesting a withstand storage period of 35 days. All the results allow to conclude that feeding the concentrate twice a day created indices of milk fat quality slightly better than TMR and SO rich in oleic acid is a good choice for use in the diet of cows aiming to improve the nutritional quality of milk fat.

**Keywords:** apparent digestibility, blood metabolites, feed management, high oleic sunflower, intake, Pennisetum purpureum, TMR

## INTRODUÇÃO

Na maioria dos trabalhos em que foi demonstrado o potencial da suplementação de dietas de vacas leiteiras com fontes lipídicas de origem vegetal ricas em ácidos linoleico e/ou  $\alpha$ -linolênico em alterar positivamente o perfil de AG da gordura do leite (Collomb *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2008) foram utilizadas espécies forrageiras de ciclo fotossintético C3, fornecidas, principalmente, sob a forma de fenos e silagens. Nos processos de fenação e ensilagem podem ocorrer perdas oxidativas de AG poli-insaturados, principalmente  $\alpha$ -linolênico (Dewhurst *et al.*, 2006), que nas plantas forrageiras é o principal substrato lipídico para formação do ácido vacênico via processos de bio-hidrogenação no rúmen, e subsequente dessaturação para ácido rumênico na glândula mamária (Elgersma *et al.*, 2006). Por esta razão, o leite de vacas alimentadas com forrageiras fornecidas frescas apresenta potencialmente maior relação de AG insaturados:saturados, maiores concentrações de AG poli-insaturados e de CLA que o obtido do leite de vacas recebendo dietas baseadas em forragens conservadas (Elgersma *et al.*, 2006; Gama *et al.*, 2008).

Fontes vegetais ricas em ácido oleico também apresentam potencial para alterar positivamente o perfil da gordura do leite, embora em menor escala quando comparadas com aquelas ricas em ácido linoleico (Collomb *et al.*, 2004). Além disso, a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras ricas em AG mono-insaturados é maior do que daquelas ricas em AG poli-insaturados (Gama *et al.*, 2008), o que pode ser considerada vantagem em termos de incremento do período de armazenamento do óleo na propriedade rural e da “vida-de-prateleira” dos derivados lácteos originados dos animais alimentados com tais óleos.

Um aspecto importante do estudo dos efeitos da inclusão de óleos em dietas de vacas leiteiras sobre os teores dos ácidos rumênico e vacênico diz respeito ao dia após início do fornecimento das dietas em que os valores máximos são alcançados, bem como à própria persistência de elevadas concentrações destes ácidos graxos no leite (Dewhurst *et al.*, 2006). Estas respostas são tempo-dependentes e estão diretamente associadas às mudanças no ambiente ruminal e nas variações das concentrações de intermediários da bio-hidrogenação, decorrentes do processo de adaptação da microbiota do rúmen à suplementação com elevados níveis de lipídeos nas dietas (Shingfield *et al.*, 2006).

A adoção da estratégia de suplementação de concentrados na forma de TMR com os alimentos volumosos, além de assegurar consumo balanceado de nutrientes para suprir requerimentos nutricionais específicos, permite maior estabilidade do ambiente ruminal, principalmente relacionado à menor variação do pH, já que

neste sistema de alimentação o consumo de concentrados é sempre acompanhado da ingestão de alimentos volumosos (Assis, 1997). Por outro lado, é comum em sistemas de produção de leite do Brasil, o fornecimento da quantidade diária por vaca dos alimentos concentrados no cocho, sobre o volumoso, parcelada ou não em função do número de ordenhas adotado na propriedade. Impactos negativos no ambiente ruminal, induzindo mudanças não-desejáveis nas rotas e nas concentrações de ácidos graxos intermediários da bio-hidrogenação ruminal (Dewhurst *et al.*, 2006) podem ocorrer ao se trabalhar com vacas de média produção de leite e/ou em sistemas de produção de leite baseados em pastagens sem adoção de suplementação volumosa no cocho, em função da quantidade de concentrados fornecida diariamente.

Os objetivos do presente experimento foram avaliar os efeitos do modo de fornecimento do concentrado rico em óleo de girassol e os efeitos da inclusão do óleo de girassol rico em ácido oleico ou com médios teores de ácido oleico sobre o consumo de nutrientes, a produção e composição do leite, os parâmetros plasmáticos e o perfil de ácidos graxos do leite e do plasma de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com dieta baseada em capim-elefante picado; verificar as mudanças temporais ocorridas durante o fornecimento das dietas sobre as concentrações dos ácidos graxos no leite; e comparar a estabilidade do perfil de ácidos graxos dos concentrados formulados com óleo de girassol rico em ácido oleico ou com médios teores de ácido oleico.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi, de propriedade da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, a 435 metros de altitude, 21° 37' de latitude Sul e 43° 18' de longitude Oeste, na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais. O clima da região é classificado como Cwa, mesotérmico (Köppen), com precipitação média anual de 1500 mm.

Em um período experimental de 21 dias, 32 vacas foram distribuídas em delineamento de blocos casualizados em esquema fatorial 2 x 2 (modo de fornecimento do concentrado x tipo de OG). Foram estudados os efeitos dos tratamentos sobre o consumo e a digestibilidade dos nutrientes; os parâmetros sanguíneos; a produção e composição do leite; e a evolução dos perfis de AG dos alimentos, do leite e plasma durante o período experimental.

As vacas primíparas Holandês x Gir (composição genética variando entre 1/2 e 15/16 de sangue Holandês) utilizadas possuíam, no dia anterior ao início do experimento, 75 ± 31 dias de lactação, produção de leite média igual a 15,4 ± 4,8 kg/dia e peso corporal médio de 444 ± 84 kg. Cada bloco continha oito animais, cuja distribuição foi idealizada de modo a torná-los os mais homogêneos possíveis, considerando dias em lactação, produção de leite e peso corpóreo.

A utilização exclusiva de primíparas ocorreu devido à disponibilidade desses animais no Campo Experimental no momento que precedeu o início do experimento. Não houve, contudo, o objetivo específico de estudar tal categoria.

Os animais foram alojados em curral do tipo *free-stall* com camas individuais forradas com areia, bebedouros coletivos, cochos para suplementação mineral e sistema de limpeza de pista por *flushing*. As ordenhas foram feitas mecanicamente duas vezes ao dia (às 6:00 h e às 14:00 h), e a produção de leite medida diariamente durante todo o período experimental.

As instalações de ordenha eram compostas por uma sala de espera, uma sala de ordenha com fosso central e sistema de contenção para 16 animais (8 x 8) em posicionamento semi-paralelo a 60°. O sistema de ordenha da marca Alfa-Laval era composto por unidade de vácuo VPB77, pulsadores eletrônicos EP100 com regulador automático, unidade de ordenha modelo *Harmony* auxiliada por extratores de teteiras automáticos com braço de serviço, medidores de vazão MM25, unidades final SR60 e de limpeza C100E.

As pesagens das vacas foram realizadas semanalmente, nos dias 1, 8, 16 e 22 do período experimental, logo após as ordenhas da manhã, em balança digital da marca Toledo modelo MGR-2000 (Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda., São Bernardo do Campo, SP), sem jejum prévio.

Todos os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo número 281/2010.

## 1. Dieta experimental

A dieta experimental teve o capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schumach) picado como única fonte de volumoso e foi formulada pelo Sistema Viçosa de Formulação de Rações (RAÇÃO 2.0 – Universidade Federal de Viçosa) com relação volumoso:concentrado igual a 60:40, em base de matéria seca (MS). O objetivo foi atender às exigências estabelecidas pelo NRC (2001) para vacas primíparas de 480 kg de peso corporal médio e produção diária de 16 kg de leite com 3,5% de gordura.

Os dois modos de fornecimento do concentrado avaliados foram: 1) mistura completa (*Total mixed ration* - TMR) com capim-elefante picado; e 2) à parte do capim-elefante picado, com a quantidade diária de concentrado fornecida parceladamente em duas vezes, logo após as ordenhas. Os OG avaliados diferiram entre si por apresentarem teores contrastantes de ácido oleico e ácido linoleico: 1) rico em ácido oleico e pobre em linoleico; e 2) teores intermediários de ácido oleico e linoleico (Tabela 5 dos Resultados e Discussão).

Assim, os quatro tratamentos avaliados, em base de MS, foram os seguintes:

- 1) Mistura completa + 4,5% de OG com teores intermediários de ácido oleico;
- 2) Mistura completa + 4,5% de OG rico em ácido oleico;
- 3) Capim elefante picado + Concentrado parcelado em duas vezes, fornecido após as ordenhas + 4,5% de OG com teores intermediários de ácido oleico;
- 4) Capim elefante picado + Concentrado parcelado em duas vezes, fornecido após as ordenhas + 4,5% de OG rico em ácido oleico.

A formulação e composição química estimadas da dieta experimental está apresentada a seguir (Tabela 1).

**Tabela 1.** Formulação e composição química estimadas da dieta experimental

Ingredientes (% da MS)		
Capim-elefante	60,0	
Fubá de milho	8,0	
Farelo de soja	18,0	
Polpa cítrica	8,0	
Núcleo vitamínico-mineral	1,5	
Óleo de girassol	4,5	
Composição Química da Dieta <sup>1</sup>		
Proteína bruta (% da MS)	15,1	
Extrato etéreo (% da MS)	6,8	
Fibra em detergente neutro (% da MS)	45,5	
Fibra em detergente ácido (% da MS)	28,6	
NDT (% da MS)	66,0	
Concentração de ácidos graxos (g/100 g de AG totais)		
	MO <sup>2</sup>	AO <sup>3</sup>
C16:0 (g/100 g de AG)	15,131	14,059
C18:1 <i>cis</i> -9 (g/100 g de AG)	14,370	21,259
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 (g/100 g de AG)	19,829	14,258
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 (g/100 g de AG)	16,769	16,266

<sup>1</sup>Valores estimados pelo Sistema Viçosa de Formulação de Rações (RAÇÃO 2.0 – Universidade Federal de Viçosa); <sup>2</sup>dieta adicionada de óleo de girassol com teores intermediários de ácido oleico; <sup>3</sup>dieta adicionada de óleo de girassol com teores intermediários de ácido oleico.

As dietas foram fornecidas *ad libitum* em cochos cobertos, dotados de portões eletrônicos do tipo *calan-gate* (*American Calan Inc.*, Northwood, NH, EUA), instalados no curral *free-stall*, com acesso livre à água e à

mistura mineral. As quantidades oferecidas foram ajustadas diariamente antes do fornecimento da refeição matutina, tomando por base a pesagem das sobras, a fim de permitir 10% de sobras.

Para os tratamentos que receberam a dieta na forma de mistura completa, o volumoso e o concentrado foram pesados, misturados e distribuídos individualmente nos cochos utilizando-se equipamento semi-automatizado e computadorizado (CALAN SUPER DATARANGER<sup>®</sup>, American Calan Inc., Northwood, NH) uma vez ao dia, após a ordenha da manhã. Já nos tratamentos com fracionamento do concentrado, as refeições foram fornecidas duas vezes ao dia, logo após as ordenhas (às 6:00 h e às 14:00 h). Primeiramente, foi fornecida aos animais metade da quantidade diária total de concentrado calculada para o dia e, após consumido por completo, era fornecida metade da quantidade diária de capim-elefante calculada para o dia.

A cada dois dias, uma amostra de capim-elefante recém-cortado e picado era coletada a fim de se avaliar o teor de MS e corrigir eventuais desbalanceamentos de dieta. Utilizou-se o procedimento por micro-ondas (Staples, 1988), por este permitir avaliação rápida.

O capim-elefante foi cortado de capineira pré-estabelecida, situada próximo ao local de realização do experimento. No período pré-experimental, o solo da capineira foi corrigido e adubado, conforme recomendações agrônômicas. Foram feitos cortes de uniformização escalonados com o objetivo de se formar faixas de capim-elefante de diferentes idades de crescimento, a fim de se obter uniformização da qualidade da forragem no momento da colheita. Os cortes de uniformização deveriam garantir colheitas de gramínea com composição bromatológica condizente com a idade de crescimento de 40 a 48 dias, mas, devido a um veranico ocorrido nos meses de janeiro e fevereiro (Tabela 2), o crescimento da forragem foi comprometido, impedindo, assim, a utilização do material na idade e composição bromatológica desejadas (Tabela 3). Assim, a idade média do capim-elefante utilizado durante o experimento foi de aproximadamente 80 dias.

**Tabela 2.** Temperaturas médias máximas (T<sub>máx</sub>) e mínimas (T<sub>mín</sub>) e precipitação entre os meses de novembro de 2010 e março de 2011.

Mês / Ano	T <sub>máx</sub> <sup>1</sup> (°C)	T <sub>mín</sub> <sup>2</sup> (°C)	Precipitação (mm)
Novembro / 2010	27,0	18,5	194,0
Dezembro / 2010	30,1	20,5	224,2
Janeiro / 2011	29,7	20,3	115,6
Fevereiro / 2011	32,1	19,7	40,2
Março / 2011	28,0	20,0	124,6

<sup>1</sup>Média das temperaturas máximas diárias observadas no mês; <sup>2</sup>Média das temperaturas mínimas diárias observadas no mês.

**Tabela 3.** Composição bromatológica e digestibilidade *in vitro* da matéria seca do capim-elefante durante o período experimental

Composição química	1ª semana	2ª semana	3ª semana
Matéria Seca, MS (%)	24,5	28,3	24,5
Proteína bruta (% da MS)	6,4	6,3	6,4
Extrato etéreo (% da MS)	3,0	1,6	2,6
Fibra em detergente neutro <sup>1</sup> (% da MS)	73,4	74,4	67,9
PIDN <sup>2</sup> (% da MS)	1,75	1,06	0,81
Fibra em detergente ácido <sup>1</sup> (% da MS)	49,3	49,2	46,9
Lignina (% da MS)	7,6	7,7	7,2
Cinzas (% da MS)	3,1	3,1	5,8
Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (%)	48,5	-	47,8
Conteúdo de ácidos graxos (g/100 g de AG totais)			
C18:1 <i>cis</i> -9	4,049	6,016	4,405
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	13,793	15,781	15,310
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	28,701	24,632	26,411

<sup>1</sup>Valores corrigidos para cinzas e proteína bruta; <sup>2</sup> Proteína insolúvel em detergente neutro.

Excetuando-se os finais de semana, o capim-elefante foi cortado e transportado diariamente para o local do experimento, sempre na parte da manhã. Após cada corte, o capim era abrigado em galpão coberto até o momento da picagem em picadeira estacionária da marca VM modelo NVME3 (Vitório Meneghin Indústria e Comércio LTDA, Barbacena, MG) impulsionada por motor elétrico de 15 cv e 220 volts da marca WEG, sempre realizada momentos antes do fornecimento das refeições. Devido ao fato de terem sido consumidas em, no máximo, 48 horas após seu corte, pressupôs-se que o material mantivesse seu conteúdo lipídico íntegro, com ação mínima da oxidação bacteriana e das lipases endógenas.

Os concentrados foram formulados com fubá de milho, farelo de soja, polpa cítrica, núcleo vitamínico-mineral e os dois diferentes OG. A polpa cítrica substituiu metade do fubá de milho na formulação da ração. A sua inclusão teve como objetivo principal alterar os padrões de fermentação ruminal pela substituição de parte do amido pela pectina. A pectina induz maior formação de acetato e menor de propionato, permitindo, assim, minimizar possíveis reduções indesejáveis no pH ruminal (Leiva *et al.*, 2000; Hall, 2001; Eifert, 2004). Os resultados das análises bromatológicas do concentrado estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Composição bromatológica média e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca dos concentrados

Composição química	Alto Oleico <sup>1</sup>	Médio Oleico <sup>1</sup>
Matéria Seca, MS (%)	88,2	88,4
Proteína bruta (% da MS)	23,4	25,5
Extrato etéreo (% da MS)	13,5	13,0
Fibra em detergente neutro <sup>2</sup> (% da MS)	15,6	14,6
PIDN <sup>3</sup> (% da MS)	2,00	1,94
Fibra em detergente ácido <sup>2</sup> (% da MS)	10,6	10,3
Celulose (% da MS)	10,3	11,6
Lignina (% da MS)	2,2	2,4
Cinzas (% da MS)	7,6	7,8
Digestibilidade <i>in vitro</i> da MS (%)	78,4	80,8

<sup>1</sup>Valores analisados; <sup>2</sup>Valores corrigidos para cinzas; <sup>3</sup>Nitrogênio insolúvel em detergente neutro.

Devido aos altos teores de óleo ( $\geq 13,0\%$ ) presentes na sua composição e à facilidade com que os AG insaturados oxidam em contato com o ar, decidiu-se por preparar as rações semanalmente, de forma a minimizar sua peroxidação lipídica e evitar alterações no perfil dos OG ingeridos e redução da ingestão voluntária de MS.

A adição de OG em níveis superiores a 4,5% da MS foi descartada, pois já se comprovou (Ribeiro, 2009b) seu impacto negativo sobre a digestibilidade da fibra no rúmen e o consumo de MS que, por sua vez, poderia influenciar negativamente o desempenho animal, além de causar quedas expressivas no teor e na produção diária de gordura no leite (Bauman *et al.*, 2005). Tais respostas tendem a se exacerbar especialmente quando se lança mão de fontes de OG predominantemente insaturados e livres no rúmen, como no caso dos usados no presente experimento.

O núcleo mineral (Matsuda – Top Milk Núcleo, S. S. Paraíso, MG) presente na formulação dos concentrados foi misturado ao sal branco (NaCl) na proporção 1:1 e disponibilizado para os animais durante todo o período experimental em cochos específicos para esse fim. A formulação do núcleo vitamínico-mineral está apresentada na Tabela 5.

**Tabela 5.** Formulação do núcleo vitamínico-mineral

Mineral/Vitamina	Concentrações <sup>1</sup>
Cálcio (g)	255 (mín.) – 268 (máx.)
Fósforo (g)	76
Enxofre (g)	20
Magnésio (g)	30
Cobalto (mg)	60
Cobre (mg)	850
Iodo (mg)	65
Manganês (mg)	2.000
Selênio (mg)	20
Zinco (mg)	6.000
Ferro (mg)	1.000
Flúor (mg)	760 (máx.)
Vitamina A (U.I./kg)	220.000
Vitamina E (U.I./kg)	500

<sup>1</sup>Níveis mínimos de garantia por quilograma de produto.

## 2. Mensuração do consumo, avaliação da composição química e perfil de ácidos graxos da dieta e seus ingredientes

O consumo individual de alimentos foi determinado diariamente usando cochos com portões eletrônicos do tipo *calan-gates* (*American Calan Inc.*, Northwood, NH, EUA), a partir da diferença entre a quantidade de sobras recolhidas pela manhã e o material total oferecido no dia anterior. A estimativa do consumo dos nutrientes da dieta foi calculada pela multiplicação do peso do material consumido pelo teor médio do nutriente presente no alimento e respectivas sobras individuais.

Amostras de capim-elefante foram coletadas em dois momentos: a cada dois dias, para que, ao final de cada semana, fossem preparadas amostras compostas desse material; e diariamente durante os cinco dias de coleta de fezes para a determinação da digestibilidade aparente dos nutrientes. Nesses cinco dias também foram coletadas alíquotas das sobras individuais.

Amostras dos dois tipos de concentrado foram coletadas logo após o seu preparo, ou seja, nos dias 0 (dia anterior ao início do experimento), 6 e 13 do período experimental. Uma parte dos concentrados preparados no dia anterior ao início do experimento foi mantida reservada, e alíquotas foram coletadas nos dias 1 (dia do preparo da batida), 7, 14, 21, 28 e 35, a fim de se verificar possíveis alterações ocorridas no perfil de AG decorrentes da oxidação lipídica na gordura dos ingredientes, em especial dos OGMO e OGAO, durante longos períodos de armazenamento.

Após a coleta, todas as amostras destinadas às análises bromatológicas foram armazenadas a -10°C. Depois de descongeladas, as amostras de capim-picado, concentrados e sobras foram pré-secadas 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, foram analisadas quanto aos teores de MS a 105°C, cinzas, fibra em detergente neutro corrigida para cinzas (cFDN), fibra em detergente ácido corrigida para cinzas (cFDA), celulose, lignina, proteína bruta (PB), Proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN) e extrato etéreo (EE) segundo AOAC (1990), no Laboratório de Análises de Alimentos da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG). Utilizou-se a enzima amilase durante as análises de fibra das amostras de concentrado.

Todas as amostras de alimentos destinadas à análise do perfil de AG foram liofilizadas em liofilizador modelo FD18 (Labconco, Kansas City, MO, EUA), moídas e mantidas a -10°C até o momento das análises.

Não foram coletadas amostras das dietas completas (TMR), para evitar eventual ocorrência de erros de amostragem, comum nesse tipo de material.

A análise qualitativa e quantitativa dos AG presentes nos alimentos seguiu o procedimento de transmetilação direta (*one step*) proposto por Sukhija e Palmquist (1988): em 1,0 g de capim ou 500 mg de concentrado foram adicionados 2,0 mL de heptano e 3,0 mL de solução de HCl em metanol (100 mL de metanol e 20 mL de cloreto de acetila); a solução resultante foi mantida em banho-maria a 90°C por 120 minutos. Após resfriamento, a fase apolar foi neutralizada e suspensa com 10,0 mL de solução de carbonato de potássio (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 6% e 1,0 mL de heptano, respectivamente. Os pigmentos foram retirados com a utilização de 200 mg de carvão ativado; os resíduos de metanol e água foram retirados pela adição de 200 mg de cloreto de cálcio.

Cada amostra recebeu ainda 4,0 mg do AG C13:0 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, EUA) com o objetivo de servir como padrão interno, possibilitando, assim, a quantificação dos demais AG (Sukhija e Palmquist, 1988).

Os AG foram determinados no Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora - MG) em cromatógrafo gasoso, modelo 6890N (*Agilent Technologies*), com detector de ionização de chama (FID), utilizando-se coluna capilar de sílica fundida *Varian* (Palo Alto, CA, EUA), modelo CP-Sil-88, de 100 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,2 µm de fase estacionária de ciano propil siloxano. As condições da corrida (fluxo dos gases e gradiente de temperatura do forno e injetor) foram descritas por Kramer *et al.* (2001), com modo de divisão de fluxo (*split*), numa razão de 10:1.

A identificação dos ésteres metílicos dos AG ocorreu por comparação com os tempos de retenção observados em padrões. Os padrões utilizados foram: FAME 37, *mix* de isômeros do Ácido Linoleico metil éster, *mix* de isômeros do Ácido Linolênico metil éster e Ácido Vacênico (C18:1 *trans*-11) metil éster da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), e LUTA – CLA 60% (28% de CLA *cis*-9, *trans*-11 e 28% de CLA *trans*-10, *cis*-12) da BASF (Floham Park, NJ, EUA). Os demais AG foram identificados com base em trabalhos diversos (Dionisi *et al.*, 2002; Roach *et al.*, 2002; Kramer *et al.*, 2004; Christie *et al.*, 2007; Cruz-Hernandez *et al.*, 2007; Destailats *et al.*, 2007; Shingfield, dados não publicados).

Os dois tipos de OG utilizados (Triângulo Alimentos, Itápolis, SP) foram amostrados em todos os dias de preparo do concentrado (dias 0, 6 e 13) para posterior avaliação do perfil de AG e, conseqüentemente, da qualidade do seu armazenamento na fábrica de ração em tambores de aço, com capacidade de 200 kg, alojados à sombra. A metilação das amostras de OG ocorreu por transmetilação alcalina de acordo com Christie (1982) com modificações (Chouinard *et al.*, 1999). A determinação e a identificação dos AG ocorreram no Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora - MG) da mesma maneira que nos alimentos, diferindo apenas com relação ao modo de divisão de fluxo (*split*), cuja razão foi de 50:1.

### 3. Digestibilidade aparente dos nutrientes

As digestibilidades aparentes da MS, MO, PB, FDN<sub>cp</sub> (FDN corrigida para cinzas e proteína), EE e carboidratos não fibrosos presentes na dieta foram estimadas utilizando os valores individuais de produção fecal calculados a partir da utilização do indicador externo óxido crômico (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Lopes, 2007).

O indicador foi fornecido aos animais via ingestão forçada, fracionado em cápsulas contendo 5,0 gramas do indicador, duas vezes ao dia (após as ordenhas), entre o décimo e o 21º dia do período experimental. Nesse período de doze dias, os sete primeiros foram destinados à estabilização da excreção de cromo, e os cinco seguintes, para as coletas de fezes, realizadas durante o fornecimento do indicador. Durante os cinco dias em que ocorreram as coletas de fezes, que foram realizadas duas vezes ao dia, logo após as ordenhas diárias, foram também amostrados o capim picado e concentrados oferecidos, além das sobras individuais para posterior análise dos teores de MS, MO, PB, FDN<sub>cp</sub>, EE e CHO não fibrosos. Os cálculos das digestibilidades aparentes dos nutrientes foram realizados segundo Berchielli *et al.* (2011):

$$DN (\%) = \frac{(MS \text{ ingerida} \times \% \text{ Nutriente}) - (MS \text{ excretada} \times \% \text{ Nutriente})}{(MS \text{ ingerida} \times \% \text{ Nutriente})} \times 100$$

Em que:

DN = digestibilidade do nutriente

MS = matéria seca

O cálculo da taxa de passagem da forragem fresca (*wet forage*) utilizada para auxiliar a compreensão do comportamento do consumo e da digestibilidade dos alimentos seguiu a fórmula proposta pelo NRC (2001):

$$k_p = 3,054 + (0,614 \times \text{cMS\%pc})$$

Em que:

K<sub>p</sub> = taxa de passagem

cMS%pc = consumo de matéria seca em percentagem do peso corporal

#### 4. Avaliação da produção e composição do leite

O registro das produções individuais de leite foi realizado diariamente durante todo o período experimental, com base na soma das produções das duas ordenhas diárias aferidas por meio de medidores de vazão da marca Alfa-Laval modelo MM25.

A produção de leite corrigida (PLC) para 3,5% de gordura (PLC3,5%) foi calculada segundo Sklan *et al.* (1992), por meio da seguinte fórmula:

$$\text{PLC}_{3,5\%} = (0,432 + 0,1625 \times \% \text{ de gordura do leite}) \times \text{produção de leite em kg/dia}$$

Nos dias 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 do período experimental, foram coletadas amostras individuais para a determinação da composição físico-química do leite. Tais coletas objetivaram comparar os tratamentos, bem como acompanhar a evolução da composição do leite a partir do fornecimento dos suplementos concentrados contendo os OG.

Nos dias 24 e 28, ou seja, após a suspensão do fornecimento das dietas experimentais e retomada do fornecimento das dietas pré-experimento (silagem de milho e concentrado sem adição de óleo), foram coletadas amostras a fim de se verificar o comportamento da composição físico-química do leite.

As amostras destinadas à avaliação físico-química, ou seja, à determinação dos teores de proteína, gordura, lactose, extrato seco total e contagem de células somáticas (CCS) foram coletadas em frascos plásticos de 50 mL contendo uma pastilha de bronopol como conservante (AOAC, 1990). As amostras foram coletadas em alíquotas de 2/3 e 1/3 (respectivamente nas ordenhas da manhã e da tarde) com o objetivo de se obter amostras representativas da produção individual no período de 24 horas. As amostras foram mantidas sob refrigeração (<10°C) até o momento das análises realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG) no equipamento Bentley® 2000 (*Bentley Instruments*, MN, EUA).

A avaliação da CCS, expressa em células/mL, foi convertida para o sistema de score linear (EL), cuja amplitude varia de 0 a 10, segundo recomendações propostas por Dabdoub e Shook (1984). A conversão foi realizada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{EL} = (\log_2 (\text{CCS}/100.000)) + 3$$

Segundo os autores, o EL de uma glândula mamária sadia deve ser inferior a 4 (equivalente a 330.000 células/mL de leite).

O aumento anormal da CCS do leite exerce influência sobre a composição do leite, reduzindo a concentração dos constituintes normais e elevando a de constituintes sanguíneos, como albumina, imunoglobulinas e alguns íons (Wilson *et al.*, 2004). Apesar de a CCS não ser afetada pela adição de lipídios à dieta, tornou-se necessária sua avaliação com o objetivo de verificar se houve influência na composição do leite no presente experimento.

A eficiência produtiva (EP), índice que permite verificar a eficiência de conversão do alimento consumido em leite secretado, foi calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\text{EP} = \text{consumo de MS/produção de leite em kg/dia}$$

## 5. Avaliação do perfil de ácidos graxos do leite

Nos dias 0, 3, 6, 9, 15, 21, 24 e 28, foram obtidas amostras individuais de leite em frascos plásticos de 50 mL sem conservante. Elas foram, em seguida, armazenadas (-10°C), visando à posterior determinação do perfil de AG no Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG).

As oito coletas efetuadas durante o experimento objetivaram avaliar a influência dos tratamentos sobre o comportamento temporal dos perfis dos ácidos graxos das amostras de leite. As amostras dos dias 24 e 28 foram coletadas a fim de se verificar o comportamento dos teores de AG do leite após a suspensão do fornecimento das dietas experimentais e retomada do fornecimento das dietas pré-experimento (silagem de milho e concentrado sem adição de óleo). Os valores médios do perfil de ácidos graxos de cada amostra foram calculados a partir da média dos dias 15 e 21.

No dia do preparo, as amostras de leite foram descongeladas e homogeneizadas com o auxílio do aparelho de ultrassom modelo T660/H da marca Elma (Schwing, Alemanha). O processo de extração lipídica baseou-se no procedimento proposto pela AOAC (*Official Method* 985.05): em 1,0 mL de amostra, foram adicionados hidróxido de amônio 25%, etanol 94%, dietil-éter e hexano (0,2; 1,0; 2,5 e 2,5 v:v. A única modificação em relação ao procedimento original foi a substituição do éter de petróleo pelo hexano como solvente. A fase superior contendo a gordura (~40 mg) foi transferida para outro tubo de ensaio e evaporada completamente com a utilização de fluxo de gás nitrogênio.

Durante a obtenção dos AG metil-éster, que ocorreu por transmetilação alcalina de acordo com Christie (1982) com modificações (Chouinard *et al.*, 1999), foi utilizado 40 µL de solução reagente recém-preparado (1,75 mL de metanol e 0,4 mL de metóxido de sódio – MeONa). Este procedimento foi 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). Em seguida, o conteúdo foi neutralizado pela adição de 60 µL de solução de ácido oxálico (1,0 g de ácido oxálico em 30 mL de dietil-éter); os resíduos de metanol e água foram retirados pela adição de 200 mg de cloreto de cálcio e, após centrifugação, o líquido foi transferido para recipientes do tipo *vial* com tampas plásticas com septos de Poli Tetra Fluoretileno (PTFE).

A determinação dos AG ocorreu no Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora - MG) em cromatógrafo gasoso, modelo 6890N (*Agilent Technologies*, UK), com detector de ionização de chama (FID), utilizando-se coluna capilar de sílica fundida *Varian Inc.* (Mississauga, ON, Canadá), modelo CP-Sil-88, de 100 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,2 µm de fase estacionária de ciano propil siloxano. As condições da corrida (fluxo dos gases e gradiente de temperatura do forno e injetor) foram descritas por Kramer *et al.* (2001), com modo de divisão de fluxo (*split*) numa razão de 50:1. A identificação dos ésteres metílicos dos AG do leite ocorreu de forma semelhante à dos alimentos.

A concentração de cada AG presente nas amostras – expressa em g/100 g de AG totais – foi calculada a partir da multiplicação da relação das suas áreas sob as curvas (picos) em relação à área total do cromatograma (%) pela produção diária de gordura total. As concentrações dos AG de cadeia carbônica par de 4 a 18 foram corrigidas por fatores de conversão segundo Wolff *et al.* (1995).

Com o objetivo de facilitar a interpretação do comportamento de síntese e secreção de alguns AG chave, foram calculados os somatórios e algumas relações entre eles. Essas relações estão apresentadas a seguir:

- Σ CLA: Somatório dos ácidos linoleicos conjugados (CLA) *cis-9 trans-11* + *trans-7 cis-9*; CLA *trans-9 cis-11* e CLA *trans-10 cis-12*;
- Σ Inibidores: Somatório dos inibidores da lipogênese mamária (CLA *trans-9 cis-11* e CLA *trans-10 cis-12*);
- Σ Saturados Cadeia Par Curta, Média, Longa e Total: Somatório dos AG saturados de cadeia carbônica par curta (4 a 10 carbonos), média (12 a 16 carbonos), longa (≥18 carbonos) e da soma de todos eles, respectivamente;
- Σ AGCIR: Somatório dos AG de cadeia carbônica ímpar linear e ramificada (*anteiso, iso*);
- Σ *Anteiso*: Somatório dos AG de cadeia ímpar ramificada *anteiso*;
- Σ *Iso*: Somatório dos AG de cadeia ímpar ramificada *iso*;
- Σ Impares Lineares: Somatório dos AG de cadeia carbônica linear ímpar;
- Σ Monoinsaturados Pares: Somatório de AG com insaturações únicas *cis, trans* e da soma de todos eles;
- Σ C18:1: Somatório dos AG monoinsaturados de cadeia carbônica igual a 18;

$\Sigma$  Poli-insaturados: Somatório dos AG poli-insaturados com ligações (*cis, cis*) nas posições  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6;  
 $\Sigma$  C18  $\omega$ -6 *trans*: Somatório dos AG de cadeia carbônica igual a 18 com saturações *trans* na posição  $\omega$ -6;  
 Hipo:hiper: Relação entre o somatório dos AG hipocolesterolêmicos e o somatório dos AG hipercolesterolêmicos;  
 $\omega$ -6: $\omega$ -3: Relação entre o somatório dos AG  $\omega$ -6 e o somatório dos AG  $\omega$ -3;  
 Delta 12, 14, 16, 18 e CLA: Relação calculada a partir da divisão dos AG monoinsaturados *cis*-9 pelos seus isômeros saturados, permitindo, assim, verificar o grau de atividade e seletividade de substrato pela enzima  $\Delta^9$ -desaturase;  
 Índice de Aterogenicidade =  $\{(C12:0 + (4 \times C14:0) + C16:0)\} / (\Sigma AGMI + \Sigma \omega 6 + \Sigma \omega 3)$ , segundo (Ulbright e Southgate, 1991);  
 Índice de Trombogenicidade =  $(C14:0 + C16:0 + C18:0) / \{(0,5 \times \Sigma AGMI) + (0,5 \times \Sigma \omega 6) + (3 \times \Sigma \omega 3) + (\Sigma \omega 3 / \Sigma \omega 6)\}$ , onde  $\Sigma AGMI$  é o somatório dos AG monoinsaturados, segundo (Ulbright e Southgate, 1991);

## 6. Parâmetros sanguíneos

As amostras de sangue foram coletadas via punção da veia coccígea, após a ordenha da manhã dos dias 0, 3, 9, 15 e 21, utilizando tubos a vácuo contendo solução do ácido etilenodiaminotetra-acético tripotássico (EDTA-K<sub>3</sub>) a 10% como anticoagulante. Essas amostras foram centrifugadas (1.500 g por 15 min) para separação do plasma. As alíquotas destinadas para análise das concentrações de glicose, ureia e identificação do perfil de AG foram acondicionadas em microtubos (2 mL) com tampa, previamente identificados, e armazenados a -10°C.

As concentrações plasmáticas de glicose foram determinadas pelo método enzimático da glicose oxidase (*kit* Glicose PAP ref. 84 da LabTest® Diagnóstico SA, Lagoa Santa, MG) e de ureia pelo método enzimático-colorimétrico da urease (*kit* Ureia CE ref. 27 da LabTest® Diagnóstico SA, Lagoa Santa, MG).

A análise qualitativa dos AG presentes no plasma sanguíneo seguiu o procedimento de transmetilação direta (*one step*) proposto por Masood *et al.* (2005). A 50  $\mu$ L de amostra foram adicionados 1,9 mL de metanol e 100  $\mu$ L de cloreto de acetila e mantidos em banho-maria a 95°C por 60 minutos. Após resfriamento, adicionou-se 1,5 mL de hexano. O volume foi, em seguida, transferido para outro tubo de ensaio e evaporado com a utilização de fluxo de gás nitrogênio. Ao final do processo, a fase apolar foi ressuspendida com 60  $\mu$ L de hexano e armazenada em recipientes do tipo *vial* com tampas plásticas rosqueáveis com septo de Poli Tetra Fluoretileno (PTFE)

Durante o preparo, foram adicionados 100  $\mu$ g de Butil-Hidroxi-Tolueno (BHT) – pureza >99% - (SAFC, St. Louis, MO, EUA) por amostra, com o objetivo de impedir possíveis oxidações lipídicas durante o preparo das amostras (Masood *et al.*, 2005).

As determinações de perfil de AG das amostras de plasma foram realizadas no Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora - MG) em cromatógrafo gasoso, modelo 6890N, da *Agilent Technologies* com detector de ionização de chama (FID), utilizando-se coluna capilar de sílica fundida *Varian* (Palo Alto, CA, EUA), modelo CP-Sil-88, de 100 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,2  $\mu$ m de fase estacionária de ciano propil siloxano. As condições da corrida (fluxo dos gases e gradiente de temperatura do forno e injetor) foram descritas por Kramer *et al.* (2001), com modo de divisão de fluxo (*split*) numa razão de 1:1 (*splitless*). A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos do leite ocorreu de forma semelhante à dos alimentos.

## 7. Procedimentos estatísticos

Os resultados foram interpretados por meio de análise de variância utilizando-se modelos mistos, com o auxílio do procedimento MIXED do SAS versão 9.0 ( $P < 0,05$ ). Foram considerados efeitos fixos óleo, modo de fornecimento do concentrado e interação modo *versus* óleo, e como efeitos aleatórios animal *versus* modo.

As médias foram estudadas utilizando-se o teste t Student ( $P < 0,05$ ), por meio do comando LSMEANS do SAS versão 9.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. Consumo de alimentos

O modo de fornecimento do concentrado – na forma de mistura total (TMR) ou fornecido após cada ordenha (Fracionado) – influenciou ( $P < 0,0009$ ) o consumo diário de todos os nutrientes avaliados, expressos tanto em kg/dia como em relação ao peso corporal (%pc) (Tabela 1). O tipo de óleo de girassol (OG) – com alto (OGAO) e médio (OGMO) teores de ácido oleico – suplementado na dieta influenciou os consumos diários de proteína bruta (PB;  $P = 0,0248$ ), de carboidratos não fibrosos (CHO não fibrosos;  $P = 0,0021$ ), dos ácidos graxos (AG) palmítico, oleico e  $\alpha$ -linolênico ( $P < 0,0001$ ), além dos consumos de MS ( $P = 0,0008$ ), de MO ( $P = 0,0008$ ) e de FDNcp ( $P = 0,0249$ ) expressos em %pc. Houve interação ( $P < 0,05$ ) entre os efeitos de modo de fornecimento do concentrado e do tipo de óleo para os consumos de extrato etéreo (EE) e de ácido linoleico (Tabela 1).

**Tabela 1.** Consumo de nutrientes de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado

Variável	TMR		Fracionado		EPM <sup>1</sup>	Efeitos			
	AO	MO	AO	MO		Modo	Óleo	Modo x Óleo	
	kg/dia								
MS	14,0	14,1	13,0	11,9	0,3373	<0,0001	0,1238	0,0566	
MO	12,8	12,8	11,9	11,8	0,3070	<0,0001	0,1074	0,0568	
FDNcp <sup>2</sup>	6,49	6,63	6,05	5,59	0,1572	<0,0001	0,2890	0,0530	
PB	1,97	1,95	1,84	1,65	0,0472	<0,0001	0,0248	0,0628	
CHO não fibrosos	3,27	3,16	3,05	2,66	0,0773	<0,0001	0,0021	0,0708	
EE	1,03	1,12	0,96	0,94	0,0257	<0,0001	0,2455	0,0401	
OG	0,630	0,636	0,587	0,536	0,0152	<0,0001	0,1229	0,0573	
	%pc								
MS	3,84	3,43	3,28	2,96	0,1466	0,0008	0,0123	0,7512	
MO	3,51	3,12	2,99	2,69	0,1336	0,0008	0,0111	0,7515	
FDNcp	1,78	1,61	1,52	1,39	0,0686	0,0009	0,0249	0,7450	
	g/dia								
Ácido palmítico	59,5	77,0	55,3	66,7	1,7353	0,0001	<0,0001	0,0771	
Ácido esteárico	17,6	19,0	16,4	16,4	0,4308	0,0001	0,1187	0,1559	
Ácido oleico	335,3	209,4	311,1	181,3	6,9765	0,0004	<0,0001	0,7723	
Ácido linoleico	112,3	206,3	104,3	178,7	4,2087	0,0001	<0,0001	0,0204	
Ácido $\alpha$ -linolênico	25,0	33,8	23,3	29,3	0,6995	0,0002	<0,0001	0,0604	

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup>fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína

As exigências nutricionais (em base de MS) para vacas primíparas de 400 kg de peso corporal, produzindo 13,6 kg de leite/dia contendo 3,5% de gordura e 2,8% de proteína, segundo o NRC (2001), são de 11,9 kg de MS; 13,2% ou 1,57 kg de PB; 61,8% ou 8,4 kg de NDT; um máximo de 5,0% ou 0,6 kg de EE e, no mínimo, 28,0% ou 3,3 kg de FDN.

Assim, os requisitos mínimos de MS, PB e FDN foram supridos por todos os tratamentos (Tabela 1). O consumo de EE excedeu entre 55 (Frac. MO) e 85% (TMR MO) às recomendações do NRC (2001).

Se for levado em consideração o valor de NDT estimado para as dietas fornecidas no experimento (Tabela 1 do Material e Métodos), pode-se, então, considerar supridas também as exigências de energia (66,0% ou 8,9 kg de NDT). Entretanto, espera-se consumo de energia inferior ao estimado devido à baixa qualidade nutricional e, conseqüente, reduzida digestibilidade apresentada pelo capim-elefante utilizado no

experimento (Tabela 3 do Material e Métodos). Essa diferença ocorreu devido às variações na qualidade da fibra do capim entre o momento da formulação das dietas e o decorrer do período experimental, apesar dos cuidados culturais tomados com a capineira durante o período pré-experimental.

O consumo de MS das vacas que receberam a dieta na forma de mistura completa (TMR) foi superior ao daquelas cujo concentrado foi fornecido pelo sistema fracionado, tanto em kg/dia ( $P < 0,0001$ ; 14,1 *versus* 12,5 kg de MS/dia) como em %pc ( $P = 0,0008$ ; 3,64 *versus* 3,12%). Isto fez com que o consumo de todos os demais nutrientes também seguisse tal comportamento (Tabela 1). Os maiores consumos observados nas dietas fornecidas sob a forma de TMR corrobora com a melhoria do ambiente ruminal, caracterizada pela menor variação de pH e maior sincronismo entre a produção e demanda de nutrientes para a microbiota do rúmen, relatada por Coppock *et al.* (1981) e Assis (1997).

O tipo de OG não influenciou ( $P = 0,1238$ ; 13,5 e 13,0 kg de MS/dia, respectivamente para as dietas com OGAO e OGMO) o consumo de MS expresso em kg/dia (Tabela 1). Neste modo de expressão somente foi observado efeito do tipo de OG sobre o consumo de PB ( $P = 0,0002$ ; 1,91 *versus* 1,80 kg/dia para as dietas com OGAO e OGMO, respectivamente) e de CHO não fibrosos ( $P = 0,0021$ ; 3,16 *versus* 2,91 kg/dia para as dietas com OGAO e OGMO, respectivamente). A ausência de efeito ( $P > 0,05$ ) do tipo de OG sobre os consumos de MS, MO, FDNcp e, provavelmente, de NDT, expressos em kg/dia, sugere que a composição de AG poli-insaturados (AGPI) dos dois OG (Dehority, 2003; Jenkins, 1993; Vlaeminck *et al.*, 2006b) não comprometeu a microbiota ruminal.

Entretanto, quando expresso em %pc, o tipo de OG fornecido influenciou o consumo de MS ( $P = 0,0123$ ; 3,56 *versus* 3,19% para as dietas com OGAO e OGMO, respectivamente), de MO ( $P = 0,0111$ ; 3,25 *versus* 2,91% para as dietas com OGAO e OGMO, respectivamente) e de FDNcp ( $P = 0,0249$ ; 1,65 *versus* 1,50% para as dietas com OGAO e OGMO, respectivamente). Esse comportamento pode ser parcialmente atribuído à variação numérica ( $P > 0,05$ ) do peso corporal observada entre os tratamentos.

Observou-se interação de efeitos de modo e de óleo sobre o consumo de EE (Tabela 1a). As vacas que receberam as dietas sob a forma de TMR, reduziram o consumo de EE durante o fornecimento de OGAO e, dentre os animais que ingeriram OGMO, houve redução do consumo no modo fracionado de fornecimento de concentrado (Tabela 1a).

**Tabela 1a.** Desdobramento das médias de consumo diário de extrato etéreo (kg/vaca)

		Modo	
		TMR	Fracionado
Óleo	Alto Oleico	1,03 <sup>Ba</sup>	0,96 <sup>Aa</sup>
	Médio Oleico	1,12 <sup>Aa</sup>	0,94 <sup>Ab</sup>

Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 0,0257.

Os consumos dos AG palmítico ( $P = 0,0001$ ; 68,272 e 60,981 g/dia), esteárico ( $P = 0,0001$ ; 18,305 e 16,402 g/dia), oleico ( $P = 0,0004$ ; 272,33 e 246,17 g/dia), linoleico ( $P = 0,0001$ ; 159,34 e 141,48 g/dia) e  $\alpha$ -linolênico ( $P = 0,0002$ ; 29,371 e 26,321 g/dia) foram todos influenciados ( $P < 0,001$ ) pelo modo de fornecimento do concentrado (Tabela 1), seguindo o mesmo comportamento observado para o consumo de MS expresso em kg/dia, ou seja, médias maiores para o modo TMR de fornecimento do concentrado.

Com relação ao tipo de OG, como não houve variação no consumo de MS expresso em kg/dia (Tabela 1), os consumos dos AG foram influenciados pela composição dos óleos em termos de AG (Tabela 5). Assim, houve efeito ( $P < 0,0001$ ) do tipo de OG sobre os consumos de AG palmítico, oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico (Tabela 1), respectivamente de 57,4 e 71,9; 323,2 e 195,3; 108,3 e 192,5; 24,1 e 31,6 g/dia para os tratamentos com OGAO e OGMO. Já o consumo de ácido esteárico, não variou ( $P = 0,1187$ ) porque seus teores nos OGAO e OGMO, além de baixos, são numericamente semelhantes (Tabela 5).

Houve interação ( $P = 0,0204$ ) de efeitos de modo e de tipo de OG sobre o consumo do ácido linoleico (Tabela 1b). Independentemente do modo de fornecimento do concentrado na dieta, os tratamentos com OGMO apresentaram maiores ( $P < 0,0001$ ) consumos de ácido linoleico se comparado ao tratamentos com OGAO. Sendo que nos tratamentos com OGMO, o modo TMR apresentou consumos mais elevados.

**Tabela 1b.** Desdobramento das médias de consumo diário do ácido linoleico (g/vaca)

		Modo	
		TMR	Fracionado
Óleo	Alto Oleico	112,34 <sup>Ba</sup>	104,27 <sup>Ba</sup>
	Médio Oleico	206,34 <sup>Aa</sup>	178,70 <sup>Ab</sup>

Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P>0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 4,2087.

Não foram encontrados artigos na literatura que comparassem dois métodos de fornecimento de concentrado em dieta à base de volumoso tropical fresco picado no cocho. Uma grande variedade de trabalhos (Murphy *et al.*, 1995; Jahreis *et al.*, 1997; White *et al.*, 2001; Bergamo *et al.*, 2003; Kay *et al.*, 2005; Butler *et al.*, 2008; Felton *et al.*, 2008; Slots *et al.*, 2009; Khiaosa-ard *et al.*, 2010; Morales-Almaraz *et al.*, 2010) estudou diferentes métodos de alimentação de vacas leiteiras, mas sempre comparando diferentes sistemas de produção (confinamento x pastejo); sistemas de produção orgânica x convencional sob pastejo; pastejo intensivo x pastejo não-intensivo) ou diferentes volumosos, na sua maioria fornecidos conservados sob a forma de silagem, em um modo de fornecimento de dieta fixo.

A ausência de influência ( $P>0,05$ ) dos tipos de OG sobre o consumo de alimentos sugere que, na concentração fornecida (4,5% base MS), o OGAO e o OGMO influenciaram de forma equivalente a população microbiana.

Casper *et al.* (1988) estudaram o fornecimento de duas dietas contendo 20% (base MS) de semente de girassol com altos teores de ácido oleico (80%) – aproximadamente 4,9% de EE e 3,8% de óleo – ou a mesma quantidade de semente de girassol com altos teores de ácido linoleico (>65%) – aproximadamente 5,8% de EE e 4,7% de óleo – em dietas à base de silagem de milho e feno de alfafa (V:C = 55:45) para vacas Holandês em lactação. Assim como no presente experimento, os autores não observaram influência ( $P>0,05$ ) dos tipos de óleo sobre o consumo de MS e nutrientes, e sugeriram que, nesse nível de suplementação de óleo, os ácidos oleico e linoleico influenciam de forma equivalente a população microbiana ruminal.

Resultados semelhantes aos de Carsper *et al.* (1988), foram obtidos também por Hristov *et al.* (2005) que avaliaram os efeitos de duas dietas fornecidas na forma de TMR, contendo 5% de óleo de cártamo (*safflower*) rico em ácido oleico (76,1%) ou em ácido linoleico (76,5%) sobre a performance produtiva de bovinos de corte; He e Armentano (2011) que forneceram duas dietas (isoproteicas e isofibrasas; V:C = 60:40; na forma de TMR) à base de silagens de alfafa e de milho suplementadas com 5% de óleo de cártamo rico nos ácidos oleico (79,1%) ou linoleico (74,7%) para vacas Holandês em lactação; e He *et al.* (2012) que forneceram duas dietas (isoproteicas e isofibrasas; 4,0% de óleo e 7,0% de EE; V:C = 50:50) à base de silagem de alfafa e silagem de milho na forma de TMR e suplementadas com concentrados adicionados de óleos contendo: - alto teor de ácido oleico e baixo de linoleico (3,32 e 1,52% da MS, respectivamente); - médio teor de ácido oleico e baixo de linoleico (2,14 e 1,52% da MS, respectivamente).

## 2. Digestibilidade aparente

Não houve efeito ( $P>0,05$ ) do modo de fornecimento do concentrado, do tipo de OG e nem da interação entre estes dois fatores sobre os coeficientes de digestibilidade aparente da MS, MO, PB, FDN<sub>cp</sub>, EE e CHO (Tabela 2). No entanto, houve tendência de efeito do modo de fornecimento do concentrado sobre as digestibilidades das frações fibrosas FDN<sub>cp</sub> ( $P = 0,0519$ ) (Tabela 2).

Comparando-se os resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2, observa-se que houve evidente efeito de modo de fornecimento do concentrado sobre o consumo de MS e nutrientes, sendo que o modo TMR apresentou valores sempre superiores, confirmando-se a hipótese proposta por Coppock *et al.* (1981) e Assis (1997) de que esse modo de fornecimento de dieta permite maior estabilidade do ambiente ruminal. Entretanto, o modo TMR não favoreceu a digestibilidade dos nutrientes, com exceção das frações fibrosas (Tabela 2). Duas podem ser as explicações para esses comportamentos: como o modo TMR promoveu maior consumo de OG e, conseqüentemente, de AGPI, a sua maior concentração pode ter provocado ação deletéria aos microrganismos, reduzindo a digestibilidade da MS e dos demais nutrientes da dieta. Outra explicação pode estar também na taxa de passagem da forragem (kp; Tabela 2), que foi maior no modo TMR ( $P = 0,0008$ ; 5,3%/h *versus* 4,9%/h entre os modos TMR e fracionado, respectivamente), proporcionando, assim, maior consumo, menor tempo de digestão e, conseqüentemente, menor digestibilidade.

**Tabela 2.** Digestibilidade aparente dos nutrientes e taxa de passagem da forragem em vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado

Digestibilidade aparente (%)	TMR		Fracionado		EPM <sup>1</sup>	Efeitos		
	AO	MO	AO	MO		Modo	Óleo	Modo x Óleo
Matéria Seca	49,4	51,1	53,9	51,8	2,1922	0,2379	0,9256	0,3770
Matéria Orgânica	50,6	52,3	55,9	53,6	2,1612	0,1308	0,8833	0,3574
Proteína Bruta	68,4	69,3	71,0	68,1	1,5422	0,6661	0,5080	0,2264
FDNcp	37,4	39,1	46,1	41,4	2,7580	0,0519	0,5706	0,2484
Extrato Etéreo	64,8	67,8	63,3	63,5	3,4237	0,3949	0,6412	0,6747
CHO não fibrosos	58,8	59,2	59,3	59,2	1,9557	0,9091	0,9473	0,9097
Taxa de passagem da forragem (%/h) <sup>2</sup>								
kp	5,4	5,2	5,1	4,9	0,0900	0,0008	0,0123	0,7512

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup>calculada segundo o NRC (2001)

Hristov *et al.* (2005) forneceram dietas suplementadas com 5% de óleo de cártamo contendo teores contrastantes de ácido oleico e linoleico e, assim como no presente experimento, os autores também não observaram influência ( $P>0,46$ ) dos tipos de óleo e dos teores de ácido oleico sobre as digestibilidades aparentes da MS, MO, PB, FDN ou da FDA das dietas.

Chamaram a atenção os baixos valores absolutos de digestibilidade (Tabela 2) dos nutrientes avaliados no presente experimento. A título de comparação, Souza (2011) trabalhando com vacas Holandês x Gir com o objetivo de avaliar o efeito da adição de diferentes níveis (0; 1,5; 3,0 e 4,5% em base de MS) de OG em dietas à base de cana-de-açúcar (V:C = 60:40, base MS) observou digestibilidades aparentes – utilizando como indicador interno a fibra insolúvel em detergente neutro indigestível (FDNi) – da MS, MO, PB e FDN médias para o tratamento com 4,5% de OG iguais a 71,5; 72,8; 71,0 e 46,5, respectivamente. Os resultados indicam que, apesar da mesma relação V:C e da baixa qualidade da fibra da cana-de-açúcar, a digestibilidade aparente dos nutrientes observada por Souza (2011) foi consideravelmente superior.

Já Cabral *et al.* (2006) avaliaram a digestibilidade aparente de dieta à base de silagem de capim elefante cortado com a avançada idade de 120 dias suplementada com 10% (base de MS) de farelo de soja fornecido para bovinos fistulados no rúmen. A dieta oferecida possuía composição química de PB, EE e FDN iguais a 10,6; 1,5 e 69,0%. A digestibilidade foi determinada utilizando como indicador interno a FDNi. Os autores observaram digestibilidades aparentes para MS, MO, PB, FDN e carboidratos não-fibrosos de 53,2; 55,2; 72,9; 49,5 e 65,9%, respectivamente. Percebe-se que, apesar da avançada idade de corte e consequente baixa qualidade do capim, e da baixa suplementação, os valores de digestibilidade apresentaram-se equivalentes ou, em determinados casos, superiores à da dieta fornecida no presente experimento cuja relação V:C foi igual a 60:40.

Em suma, os resultados da literatura sugerem que os valores de digestibilidade obtidos no presente experimento estão, provavelmente, subestimados. Essa suposição é reforçada quando se observa os valores de produção e composição do leite e as concentrações plasmáticas de glicose e AGNE que, em momento algum sugerem ter havido déficit de consumo de energia pelos animais.

Um possível causador dos baixos valores de digestibilidade aparente pode ter sido a superestimação da produção fecal quando é utilizado o indicador externo  $Cr_2O_3$ , conforme relataram diversos autores (Le Du e Penning, 1982; Carruthers *et al.*, 1988; Aroeira *et al.*, 1996).

### 3. Parâmetros plasmáticos

As concentrações plasmáticas dos ácidos graxos não-esterificados (AGNE), glicose e ureia não foram influenciadas ( $P>0,05$ ) pelo modo de fornecimento do concentrado, pelo tipo de OG nem pela interação dos fatores estudados (Tabela 3). As concentrações plasmáticas médias de AGNE, glicose e ureia foram de 0,1688 e 0,1934 mmol/L; 57,2 e 55,4 mg/dL; e 43,7 e 46,2 mg/dL para os modos TMR e fracionado,

respectivamente, e de 0,1837 e 0,1785 mmol/L; 56,6 e 55,9 mg/dL; e 46,5 e 43,4 mg/dL para os OGAO e OGMO, respectivamente.

**Tabela 3.** Parâmetros plasmáticos de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado

Variável	TMR		Fracionado		EPM <sup>1</sup>	Efeitos		
	AO	MO	AO	MO		Modo	Óleo	Modo x Óleo
AGNE (mmol/L)	0,167	0,170	0,200	0,187	0,0258	0,3247	0,8330	0,7453
Glicose (mg/dL)	57,6	56,8	55,7	55,0	1,3101	0,1016	0,4758	0,9898
Ureia (mg/dL)	45,0	42,5	48,0	44,4	1,9695	0,1920	0,1139	0,7880

<sup>1</sup>Erro padrão da média;

Segundo Ospina *et al.* (2010), no período pré-parto as concentrações de AGNE devem permanecer inferiores a 0,300 mmol/L e, até o pico de lactação, nunca superiores a 0,600 mmol/L. Tomando-se tais valores como referência e levando-se em consideração o período de lactação, a categoria animal e as médias de diversos estudos (Kay *et al.*, 2005; Loor *et al.*, 2005; Amorochio *et al.*, 2009; Carriquiry *et al.*, 2009; Souza, 2011; Alevato *et al.*, 2012; Barletta *et al.*, 2012; Mourthé *et al.*, 2012a), conclui-se pelas concentrações de AGNE observadas no presente experimento – entre 200 e 260% abaixo do valor máximo proposto por Ospina *et al.* (2010) – que as dietas forneceram energia suficiente para suprir às demandas de energia de manutenção e lactação das vacas.

Diferentemente do consumo de MS e dos demais nutrientes, não se observou variação ( $P>0,05$ ) no comportamento dos teores de AGNE entre os dois modos de fornecimento do concentrado (Tabelas 1 e 3). Essa observação, somada aos relativamente reduzidos teores plasmáticos de AGNE, reforçam a teoria de que as demandas energéticas de manutenção e produção realmente foram supridas e que não houve mobilização significativa das reservas lipídicas.

Segundo Lucy (2011), os níveis de glicose circulante no plasma de ruminantes geralmente são baixos – pouco superiores a 50 mg/dL – e se mantêm relativamente constantes. Durante a lactação, concomitante ou não com a prenhez, observa-se aumento na demanda por glicose pela glândula mamária, para a síntese de lactose. Essa demanda pode ser parcialmente suprida pela mobilização das reservas adiposas. Assim, demandas agudas por glicose podem fazer com que o animal desenvolva quadros metabólicos de cetose ou de esteatose hepática e apresente altos teores de AGNE plasmáticos.

Assim, era de se esperar que o comportamento da glicose plasmática observado no presente experimento fosse semelhante ao dos AGNE, ou seja, estável, independentemente do modo de fornecimento do concentrado ( $P = 0,1016$ ) ou do tipo de OG fornecido ( $P = 0,4758$ ) (Tabela 3).

Segundo Mourthé *et al.* (2012a), a ausência de efeito nos teores de glicose no plasma de vacas em lactação submetidas a dietas com diferentes níveis ou variedades de óleo vegetal pode indicar que os tratamentos não alteraram a concentração do seu principal precursor, o propionato. O propionato pode contribuir com até 60% da produção de glicose no ruminante (Kozloski, 2009), sendo que destes, 60 a 70% são utilizados pela glândula mamária para a produção de lactose (Fonseca e Santos, 2000).

Selner e Schultz (1980) forneceram altas doses de ácido oleico a vacas Holandês em lactação e, apesar disso, não observaram diferenças nos teores de glicose plasmática entre o tratamento com 500 g de ácido oleico e aquele sem adição desse AG ( $P>0,05$ ; 66,1 e 66,0 mg/dL para os tratamentos sem e com ácido oleico, respectivamente).

A qualidade nutricional da dieta interfere diretamente na concentração plasmática de ureia. Geralmente, dietas com baixos teores de PB provocam queda nesses níveis. Entretanto, mesmo havendo ingestão adequada de proteínas, se os níveis de energia forem baixos, haverá aumento dos níveis de ureia plasmática. Isso ocorre porque a digestão microbiana das proteínas é reduzida e, conseqüentemente, há formação local de amônia que é absorvida pela mucosa e metabolizada pelo fígado, transformando-a em ureia (Gonzalez *et al.*, 2000). Assim, como a sua concentração plasmática é influenciada basicamente pela relação energético-proteica fornecida ao animal, não há porque comparar os teores plasmáticos de ureia obtidos no presente experimento com os observados em outros trabalhos que suplementaram a dieta com óleos vegetais.

Os valores médios de ureia plasmática (Tabela 3) ficaram ligeiramente acima da faixa de normalidade estabelecida por Swesson e Reece (1993) entre 20 a 40 mg/dL para a categoria animal estudada no presente experimento. Segundo esses autores, teores plasmáticos de ureia superiores a 40 mg/dL caracterizam desbalanço energético-proteico na dieta e são tidos como deletérios para a reprodução de vacas leiteiras.

A análise da Tabela 1 sugere duas possíveis explicações para os teores ligeiramente elevados de ureia no plasma: ou o consumo de energia para essa categoria animal ficou abaixo do necessário; ou o consumo de proteína foi ligeiramente superior ao recomendado. A segunda hipótese é mais plausível visto que o consumo de PB foi 25% superior ao recomendado pelo NRC (2001) (1,97 *versus* 1,57 kg/dia) e aos fatores que têm sugerido que o consumo de NDT ficou realmente dentro dos valores esperados.

#### 4. Desempenho produtivo e composição centesimal do leite

Não houve efeito do tipo de OG ( $P > 0,05$ ) sobre as variáveis de produção e composição do leite (Tabela 4).

Observou-se influência dos modos de fornecimento do concentrado apenas sobre a eficiência produtiva dos animais ( $P < 0,0001$ ) e sobre o teor de lactose do leite ( $P = 0,0074$ ) (Tabela 4). Parâmetros como a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura e as secreções diárias de extrato seco total (EST), gordura e lactose apresentaram tendência ( $P = 0,0717$ ;  $0,0635$ ;  $0,0549$  e  $0,0584$ , respectivamente) de variação entre os diferentes modos.

**Tabela 4.** Desempenho produtivo e composição do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado

Variável	TMR		Fracionado		EPM <sup>1</sup>	Efeitos		
	AO	MO	AO	MO		Modo	Óleo	Modo x Óleo
Produção de leite (kg/dia)								
Total	13,2	12,8	14,4	13,9	0,7890	0,1496	0,5511	0,9502
corrigida para 3,5% de gordura	13,1	12,8	14,4	14,2	0,7710	0,0717	0,7548	0,9748
Eficiência produtiva <sup>2</sup>								
3,5%	0,95	0,93	1,13	1,26	0,0512	<0,0001	0,2756	0,1237
Teores (%)								
gordura	3,49	3,51	3,56	3,65	0,1371	0,4200	0,6809	0,7711
proteína	2,78	2,84	2,88	2,74	0,0604	0,9848	0,9630	0,1098
lactose	4,35	4,24	4,36	4,48	0,0453	0,0074	0,9803	0,0128
EST <sup>3</sup>	10,63	10,58	10,80	10,87	0,1705	0,1731	0,9265	0,7146
Produção (g/dia)								
gordura	454,2	449,2	505,7	570,2	28,8578	0,0549	0,9500	0,9052
proteína	366,6	362,9	405,0	378,9	21,2276	0,1281	0,6273	0,5124
lactose	575,6	543,0	618,2	622,2	36,6579	0,0584	0,8445	0,6582
EST	1.396	1.355	1.528	1.508	77,9703	0,0635	0,6793	0,8888
Score linear de CCS <sup>4</sup>	4,03	4,45	4,52	3,68	0,4647	0,7565	0,6369	0,1666

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup>Eficiência Produtiva = produção de leite (kg) / consumo de MS (kg); <sup>3</sup>EST: extrato seco total; <sup>4</sup>EL = (  $\log_2$  ( CCS / 100.000 ) ) + 3.

A eficiência produtiva, parâmetro que permite verificar a eficiência de conversão do alimento ingerido em leite, foi mais baixa nos tratamentos fornecidos na forma de TMR do que na forma fracionada (0,94 e 1,18, respectivamente). Essa diferença se explica porque o consumo de MS e, por consequência, o consumo dos demais nutrientes da dieta, nos tratamentos TMR foi mais elevado ( $P < 0,0001$ ) do que nos tratamentos fracionados, apesar da produção de leite não ter sofrido variação ( $P = 0,1496$ ).

A menor eficiência produtiva das vacas que receberam as dietas sob a forma de TMR não era esperada, pois vai de encontro aos preceitos e objetivos desse modo de fornecimento de dieta que consistem, basicamente, em assegurar o consumo balanceado de nutrientes; impedir eventuais desbalanceamentos de dieta e permitir maior estabilidade do ambiente ruminal, principalmente relacionado à menor variação do pH, já que o consumo de concentrados é sempre acompanhado da ingestão de alimentos volumosos (Coppock *et al.*, 1981; Assis, 1997). Assim, na teoria, o sistema TMR permitiria utilização mais eficiente dos alimentos.

Assim como a eficiência produtiva, a variação dos teores de lactose entre os modos TMR e fracionado de fornecimento do concentrado também não era esperada, visto que o consumo de MS foi mais alto nos tratamentos TMR (Tabela 1) e, por consequência, a síntese de AGV, entre eles, o propionato, precursor da lactose; não houve variação da glicemia entre os tratamentos (Tabela 2); e não houve comprometimento da microbiota ruminal comprovada pelas altas concentrações plasmáticas (Tabela 6) e lácteas (Tabela 7) de AGCIR.

Houve interação ( $P < 0,05$ ) dos fatores modo de fornecimento de concentrado e de tipo de OG somente sobre o teor de lactose do leite. Entre os animais submetidos aos tratamentos com OGMO, os que receberam o concentrado na forma de TMR produziram leite com menor teor de lactose do que aqueles que receberam o concentrado fracionado (Tabela 4a).

**Tabela 4a.** Desdobramento das médias dos teores (%) de lactose no leite

		Modo	
		TMR	Fracionado
Óleo	AO	4,35 <sup>Aa</sup>	4,36 <sup>Aa</sup>
	MO	4,24 <sup>Ab</sup>	4,48 <sup>Aa</sup>

Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 0,0453.

Deve-se chamar a atenção para o fato de que os teores médios de lactose dos tratamentos TMR AO, TMR MO e Fracionado AO ficaram muito próximos do valor mínimo estabelecido pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) via Instrução Normativa nº 62 (Brasil, 2002). A IN62 determina, dentre outras coisas, que os teores de lactose, gordura e proteína devam ser superiores a 4,3; 3,0 e 2,9%, respectivamente, para que o leite cru refrigerado seja considerado normal e, por isso, aceito pela indústria de laticínios sem penalização à remuneração paga ao produtor.

Teores de lactose inferiores ou próximos a 4,3%, como os observados na Tabela 4, sugerem baixa síntese de propionato no rúmen e, conseqüentemente, aporte reduzido de glicose à glândula mamária. Entretanto, esses baixos teores contrariam a normoglicemia apresentada na Tabela 3.

Outro fator causador da redução dos teores lácteos de lactose é o comprometimento da sanidade da glândula mamária caracterizado pelo aumento da CCS e, conseqüentemente, do seu escore linear. A redução dos teores de lactose em animais com altas CCS é resultado da menor capacidade de síntese de lactose pelo epitélio mamário infectado, da utilização da lactose pelos patógenos intramamários e da perda de lactose para os interstícios celulares, decorrente do aumento de permeabilidade das membranas (Machado *et al.*, 2000).

Foi utilizada a fórmula de conversão de CCS em escore linear proposta por Dabdoub e Shook (1984) que afirmaram que a glândula mamária sadia deve apresentar escore linear inferior a 4,0 ou  $3,2 \times 10^5$  células/mL. Segundo Leite (2006), mudanças significativas nas concentrações dos componentes lácteos ocorrem somente a partir de CCS superiores a  $5,0 \times 10^5$  células/mL (equivalente ao escore linear 4,5) para proteína e lactose (elevação e redução, respectivamente), e  $10^6$  células/mL (equivalente ao escore linear 6,0) para gordura (redução).

Os escores lineares observados (valores próximos ou superiores a 4,0) foram considerados elevados com relação aos valores estipulados pela literatura (Dabdoub e Shook, 1984) e não sofreram influência ( $P > 0,05$ ) do modo de fornecimento de concentrado nem do tipo de OG suplementado (Tabela 4).

Apesar dos menores ( $P < 0,05$ ) consumos de PB ( $P = 0,0248$ ; 1,91 para 1,80 kg/dia) e de CHO não fibrosos ( $P = 0,0021$ ; 3,16 para 2,91 kg/dia) observados nos tratamentos com adição de OGMO (Tabela 1), isto não se refletiu nas variáveis de produção e composição do leite. Essa estabilidade corrobora com o

comportamento observado de consumo, digestibilidade aparente e componentes plasmáticos (Tabelas 1, 2 e 3, respectivamente). No presente experimento, nem o teor nem a produção diária de proteína láctea sofreram influência do modo de fornecimento do concentrado ( $P = 0,9848$  e  $0,9630$ , respectivamente) ou pelo tipo de OG fornecido ( $P = 0,1281$  e  $0,6273$ , respectivamente). Entretanto, os valores absolutos observados (próximos a 2,8%) ficaram aquém do valor mínimo estabelecido pela IN62 (2,9%). Tais resultados sugerem que tenha havido ação inibitória sobre a microbiota ruminal a ponto de comprometer o desenvolvimento populacional e reduzir o aporte de aminoácidos (AA) à glândula mamária ou que, somado aos altos teores plasmáticos de uréia, pode ter havido desbalanço entre a energia e a proteínas da dieta.

Diferentemente dos teores de proteína e lactose, os teores de gordura no leite apresentaram valores satisfatórios, acima dos 3,0% mínimos exigidos pela IN62 (Tabela 4). Esse comportamento pode ser explicado pela ação simultânea de diversos fatores. O alto consumo de AG (Tabela 1) permite que grande quantidade de AG seja absorvida e aporte à glândula mamária aumentando, assim, a secreção de gordura no leite. O relativamente baixo consumo dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico (Tabela 1), a alta relação V:C (60:40) utilizada no presente experimento e a alta efetividade da fibra do capim-elefante (Tabela 3 do Material e Métodos) aparentemente inibiram a queda de pH ruminal e a consequente formação do isômero de CLA *trans*-10 *cis*-12, principal responsável pela inibição da lipogênese mamária (Baumgard *et al.*, 2002; Moon *et al.*, 2002). Apesar do CLA *trans*-10 *cis*-12 e dos demais inibidores da lipogênese mamária estarem presentes na gordura das amostras avaliadas, eles apresentaram concentrações baixas ( $<0,029$  e  $<0,112$  g/100 g de AG totais, respectivamente; Tabela 9). Concentrações estas aparentemente incapazes de agir de forma deletéria sobre a síntese *de novo* de AG.

He *et al.* (2012) forneceram duas dietas (isoproteicas e isofibrosas; 4,0% de óleo e 7,0% de EE; V:C = 50:50) à base de silagem de alfafa e silagem de milho na forma de TMR e suplementadas com concentrados adicionados de óleos contendo: - alto teor de ácido oleico e baixo de linoleico (AOBL - 3,32 e 1,52% da MS, respectivamente); - médio teor de ácido oleico e baixo de linoleico (MOBL - 2,14 e 1,52% da MS, respectivamente) e, assim como no presente experimento, os autores não observaram influência da composição dos óleos vegetais sobre nenhum dos componentes lácteos, tanto em % quanto em produção diária (kg/dia). Os teores de lactose (4,82 e 4,80% para os tratamentos AOBL e MOBL, respectivamente) e proteína (3,21 e 3,27% para os tratamentos AOBL e MOBL, respectivamente) apresentaram-se numericamente superiores aos do presente experimento, mas não apresentaram variação ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos. Já os teores de gordura foram iguais a 2,88 e 2,76% para os tratamentos AOBL e MOBL, respectivamente, valores estes abaixo do exigido pela IN62 e justificados pelos autores devido à relação V:C igual a 50:50 e aos baixos teores de fibra ( $<29,0\%$  de FDN e  $< 21,5\%$  de FDA), resultando, assim, na produção de quantidades significativas do CLA *trans*-10 *cis*-12 (0,044 e 0,055 g/100 g de AG totais para os tratamentos AOBL e MOBL, respectivamente).

Casper *et al.* (1988) estudaram o fornecimento de duas dietas contendo 20% (base MS) de semente de girassol com altos teores de ácido oleico (80%) – aproximadamente 4,9% de EE e 3,8% de óleo – ou a mesma quantidade de semente de girassol com altos teores de ácido linoleico ( $>65\%$ ) – aproximadamente 5,8% de EE e 4,7% de óleo – em dietas à base de silagem de milho e feno de alfafa (V:C = 55:45) para vacas Holandês em lactação. Assim como no presente experimento, os autores não observaram influência ( $P>0,05$ ) dos teores de ácido oleico sobre a composição do leite.

Esses resultados sugerem que a variação dos teores de ácido oleico entre os óleos vegetais exerce pouca ou nenhuma influência sobre a composição do leite quando fornecidos em quantidades de 4,5% da MS.

## 5. Perfil de ácidos graxos dos alimentos

### 5.1. Capim-elefante

Apesar da sua baixa concentração de lipídeos, os tecidos vegetais agem como importantes fontes de AG na dieta dos ruminantes, influenciando, dessa forma, o perfil dos AG secretados no leite (Dewhurst *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2012). Entretanto, o perfil de AG das forrageiras é extremamente variável e dependente de diversos fatores como espécie vegetal, cultivar, estágio de maturidade, relação folha/haste, nível de adubação nitrogenada, intensidade luminosa, temperatura ambiente e métodos de conservação (Elgersma *et al.*, 2003; Sbrissia *et al.*, 2012). Esses fatores fazem com que a composição lipídica dos vegetais se apresente sob contínua modificação.

No período pré-experimental, foram realizadas correções e adubações do solo da capineira conforme recomendações agrônomicas, assim como cortes de uniformização escalonados a fim de se obter

uniformização da qualidade da forragem no momento da colheita. Entretanto, devido às intempéries climáticas, a idade média do capim-elefante utilizado durante o experimento foi de, aproximadamente, 80 dias, comprometendo, assim, a qualidade nutricional e reduzindo a participação dos AG provenientes do capim-elefante no montante consumido.

O perfil de AG no capim-elefante de cada semana (Tabela 3 dos Anexos) foi gerado a partir de *pool* de três amostras coletadas a cada dois dias. 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-elefante fornecido às vacas.

Os AG predominantes nas amostras analisadas foram o palmítico (C16:0), o esteárico (C18:0); o oleico (C18:1 *cis*-9), o linoleico (C18:2 *cis*-9 *cis*-12) e o  $\alpha$ -linolênico (C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15) (Tabela 3 dos Anexos). Esses resultados corroboram a afirmação feita por Harwood (1980) e Van Soest (1994) de que esses são os AG mais abundantes (~90% do total) nos lípidos de origem vegetal.

Segundo Fernandes *et al.* (2007), gramíneas de clima tropical como o capim-elefante possuem teores de ácido  $\alpha$ -linolênico superiores a 30% (g/100 g de AG totais) no período pré-maturidade. Os teores desse AG presente nas amostras analisadas sugerem que o capim-elefante utilizado no experimento estivesse maduro. Teoria essa, reforçada pela baixa qualidade nutricional apresentada pelas análises bromatológicas (Tabela 3 do Material e Métodos). Além disso, os teores de AG mostraram que a composição dos AG do capim-elefante não variou muito ao longo do experimento, afirmação esta reforçada pela também baixa variação da composição bromatológica (Tabela 3 do Material e Métodos).

Os AG saturados, monoinsaturados e poli-insaturados participaram com 25,8 a 29,9%; 6,0 a 7,8%; e 40,5 a 42,5% do montante total, respectivamente. No presente experimento, esses AG somaram apenas 76 g/100 g do total de AG identificados, significando que outros compostos químicos pouco polares como os pigmentos, por exemplo, foram lidos e geraram picos no cromatograma alterando-se, assim, as reais proporções dos AG. A título de comparação, o perfil de AG observado nas amostras de capim-elefante do primeiro experimento (Tabela 1 dos Anexos) apresentou teores de saturados, monoinsaturados e poli-insaturados iguais a 43,0; 7,6 e 49,4 g/100 g de AG totais, respectivamente.

Um estudo mais cuidadoso sugere que somente o somatório dos AG saturados foi quem sofreu alterações, apresentando-se abaixo do intervalo proposto por Harwood (1980) e Van Soest (1994) e dos valores obtidos por amostras semelhantes analisadas em experimentos anteriores (Perez *et al.*, 2008; Ribeiro 2009a). Essa redução sugere que a metodologia proposta por Sukhija e Palmquist (1988) utilizada no preparo, em especial, na metilação dos AG das amostras de capim coletadas selecionou os AG de forma que os saturados fossem menos susceptíveis ao processo de metilação ácida – talvez por uma questão de polaridade –, além de gerar amostras contendo altos níveis de impurezas.

## 5.2. Óleo de Girassol

Segundo Hazebroek (2000), os híbridos de girassol capazes de produzir óleo com altos ou médios teores de ácido oleico foram desenvolvidos com o objetivo de criar novas opções de óleo comestível que unissem características interessantes do ponto de vista nutricional, ou seja, serem ricos em AG insaturados e pobres em AG saturados e monoinsaturados *trans*, e características interessantes do ponto de vista industrial, tornando-os mais estáveis à oxidação lipídica.

Na nutrição de ruminantes, a utilização do OGAO permite o aumento dos teores de ácido oleico no leite, tornando sua gordura fonte significativa desse AG na dieta humana; permite aumento dos teores lácteos de AG monoinsaturados *cis* (Tabela 5) e, com isso, o aumento da vida de prateleira de produtos ricos em sua gordura sem que haja comprometimento significativo da qualidade nutracêutica; além de potencialmente possibilitar maior intervalo entre os preparos dos concentrados formulados com OG. Sendo essas características inviáveis a partir da utilização de óleos ricos em AGPI.

Assim como ocorreu com o OG comum (altos teores de ácido linoleico), a comercialização dos OG com alto e médio teores de ácido oleico exigiu que se definissem padrões de composição a fim de impedir a venda de produtos adulterados ou fora das especificações. Com esse objetivo, o MAPA publicou a Instrução Normativa Nº 49 (IN49) no ano de 2006 (MAPA, 2006) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Composição média do perfil de ácidos graxos – AG (g/100 g de AG totais) dos óleos de girassol utilizados no experimento e os intervalos composicionais exigidos pela Instrução Normativa Nº 49 (MAPA, 2006)

Ácidos graxos (g/100 g de AG totais)	Experimento		Instrução Normativa nº49	
	Médio Oleico	Alto Oleico	Médio Oleico	Alto Oleico
<C12:0	0,2	0,2	nq	nq
C12:0	0,1	0,6	nq	nq
C14:0	0,4	0,5	≤1,0	≤0,1
C16:0	10,5	5,9	4,0 a 5,5	2,6 a 5,0
C16:1	0,2	0,1	≤0,05	≤0,1
C18:0	3,4	3,1	2,1 a 5,0	2,9 a 6,2
C18:1 <sup>1</sup>	45,7	76,3	43,1 a 71,8	75,0 a 90,7
C18:1 <i>cis</i> -9	42,7	72,7	-	-
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	33,6	10,4	18,7 a 45,3	2,1 a 17,0
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	2,6	0,4	≤0,5	≤0,3
C20:0	0,3	0,3	0,2 a 0,4	0,2 a 0,5
C20:1	0,3	0,3	0,2 a 0,3	0,1 a 0,5
C22:0	0,5	0,7	0,6 a 1,1	0,5 a 1,6
C22:1	nq	nq	nq	≤0,3
C24:0	0,2	0,3	0,3 a 0,4	≤0,5
C24:1	nq	nq	nq	nq
ΣSaturados	15,6	11,6	7,2 a 13,4	6,2 a 13,9
ΣMonoinsaturados	46,2	76,7	43,3 a 72,2	75,1 a 91,6
ΣPoli-insaturados	36,2	10,8	18,7 a 45,8	2,1 a 17,3

<sup>1</sup> Somatório de todos os isômeros C18:1;

- : não citado;

nq: detectado, mas não quantificado.

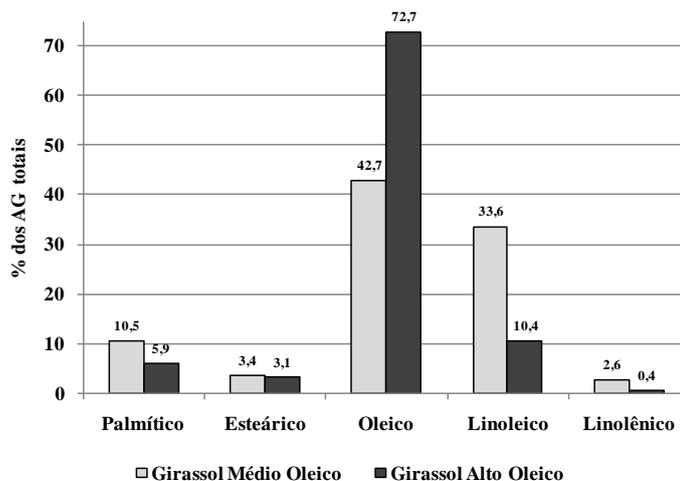
A comparação entre a composição dos OG utilizados no experimento e os intervalos estabelecidos pela IN49 (MAPA, 2006) permite verificar que o somatório dos AG saturados do OGMO apresentou-se cerca de 14% acima do limite superior estabelecido. Esse comportamento foi reflexo do elevado teor de ácido palmítico (10,5 g/100 g de AG totais; 45% acima do limite de 5,5 g/100 g de AG totais estabelecido pela IN49) e pode ser explicado pelas adaptações feitas durante o desenvolvimento dos híbridos que tiveram como objetivo melhorar a adaptação das plantas aos países de clima tropical (Dow Agrosience, 2012).

Outras variações que chamaram a atenção na composição do OGMO foram os baixos teores dos AG octadecenoicos monoinsaturados (C18:1; 45,7 g/100 g de AG totais; apenas 5% acima do valor mínimo estabelecido pela IN49) e os altos teores do ácido  $\alpha$ -linolênico (2,6 g/100 g de AG totais; 420% acima do valor mínimo estabelecido pela IN49). Em termos práticos, esta alteração é bem vinda, tanto se considerarmos sua utilização pelo consumidor comum, como para o fornecimento para ruminantes, por ser um AG  $\omega$ -3 passível de ser convertido ao ácido vacênico e a CLA na glândula mamária.

Ressalte-se que para o OGMO, o somatório dos AG monoinsaturados apresentou concentração (76,7 g/100 g de AG totais) apenas 2% superior ao mínimo estabelecido pela IN49 (75,1 g/100 g de AG totais). Pode-se inferir que esse comportamento se deve à baixa concentração de ácido oleico, apesar da legislação não especificar o intervalo para o seu teor.

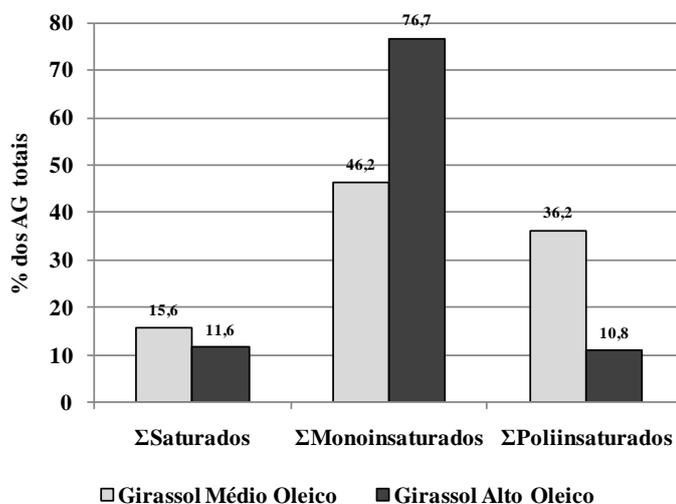
Na comparação entre o OGMO e OGMO deve-se destacar as grandes variações (em torno de 70%) observadas nos teores dos ácidos oleico e linoleico, (Figura 1). Tomando-se por base a composição do OG comum (alto teor de linoleico) utilizado no experimento do Capítulo I (Tabela 1), os OGMO e OGMO

apresentaram teores de ácido oleico 120% e 280% superiores, respectivamente; e os de linoleico apresentaram-se 49% e 85% mais baixos.



**Figura 1.** Teores médios dos principais ácidos graxos presentes nos óleos de girassol utilizados.

Com relação aos somatórios dos AG, os monoinsaturados apresentaram variação de 66% (46,2 e 76,7 g/100 g de AG totais), e os poli-insaturados, de 70% (36,2 e 10,8 g/100 g de AG totais), respectivamente (Figura 2). Percebe-se que tanto os teores de ácido oleico quanto de linoleico do OGMO apresentam valores quase que perfeitamente intermediários aos do OGMO e OG comum.



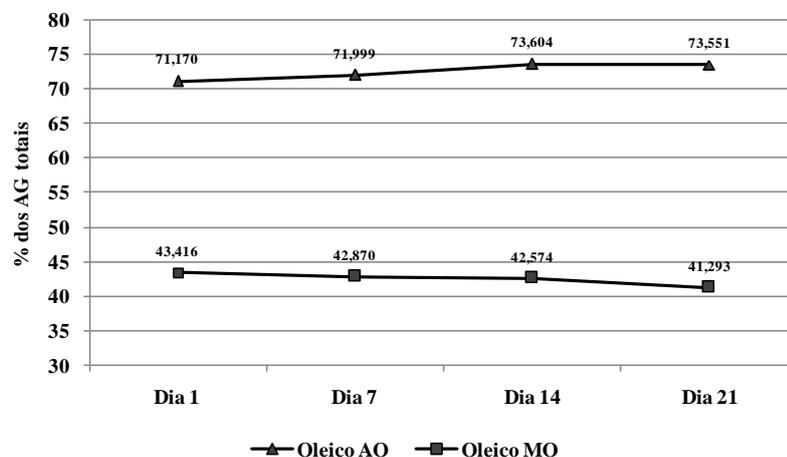
**Figura 2.** Somatório dos teores médios dos ácidos graxos saturados, mono e poli-insaturados presentes nos óleos de girassol utilizados.

Por apresentar baixos teores de AG poli e altos teores de monoinsaturados (Tabela 5), o OGMO torna-se mais estável e resistente à oxidação que os demais óleos vegetais comestíveis, permitindo, assim, possuir prazos de validade mais longos e exigir menos zelo com o armazenamento (Hazebroek, 2000).

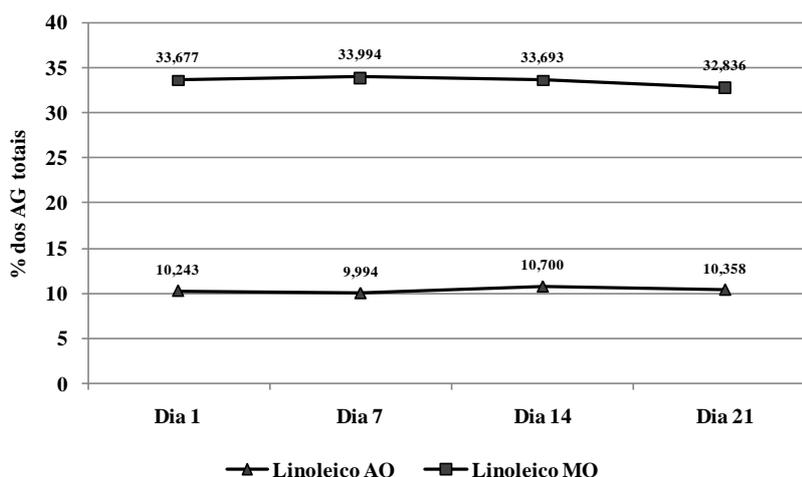
Smith *et al.* (2007) publicaram estudo que comparou a estabilidade oxidativa do OGMO (87,4 e 5,45% de C18:1 e C18:2, respectivamente) com outros óleos vegetais, entre eles o OG comum (17,2 e 71,6% de C18:1 e C18:2, respectivamente), durante período de armazenamento de cinco dias e sob temperatura de 55°C. Os autores observaram que o OGMO apresentou estabilidade oxidativa – testada por meio do consumo de oxigênio (*headspace oxygen determination*) e pelo índice de peróxido – significativamente superior ( $P < 0,05$ ) ao do OG comum, sendo que a estabilidade se mostrou direta e inversamente relacionada ao conteúdo de ácidos oleico e linoleico, respectivamente.

No presente experimento, amostras dos dois tipos de OG foram coletadas a cada sete dias do período experimental (dias 1, 7, 14 e 21) com o objetivo de se verificar eventuais alterações composicionais no

perfil de AG causadas por oxidação lipídica, especialmente sobre os ácidos oleico e linoleico que são o foco principal desse experimento. Essa avaliação consistiu em se observar de modo indireto a velocidade de desaparecimento dos AG insaturados resultado da conversão a novos compostos (ésteres, aldeídos, cetonas, alcoóis, lactonas e hidrocarbonos), permitindo-se, assim, verificar o grau de oxidação (peroxidação) lipídica porque passou o material em consequência de possíveis falhas durante o período de armazenamento (Figuras 3 e 4).



**Figura 3.** Evolução temporal do teor (g/100 g de AG totais) de ácido oleico nos óleos de girassol com alto (▲) e médio (■) teores de ácido oleico.



**Figura 4.** Evolução temporal do teor (g/100 g de AG totais) de ácido linoleico nos óleos de girassol com alto (▲) e médio (■) teores de ácido oleico.

O teor de ácido oleico presente nos dois OG apresentou pequena variação após 21 dias de armazenamento (Figura 3). No OGMO, os teores foram reduzidos em, aproximadamente, 5%, passando de 43,4 para 41,3 g/100 g de AG totais, e no OGAO, os teores se elevaram de 71,2 para 73,6 g/100 g de AG totais. As variações no teor de ácido linoleico – mais propenso à oxidação – foram ainda menores, passando de 33,7 para 32,8 g/100 g de AG totais no OGMO, e no OGAO os teores permaneceram praticamente estáveis (Figura 4).

Apesar de não ter sido possível fazer o estudo estatístico desses dados, pode-se inferir que, devido às baixas variações de concentração observadas para os ácidos oleico e linoleico, nenhum dos OG sofreu oxidação lipídica significativa durante os 21 dias do período experimental.

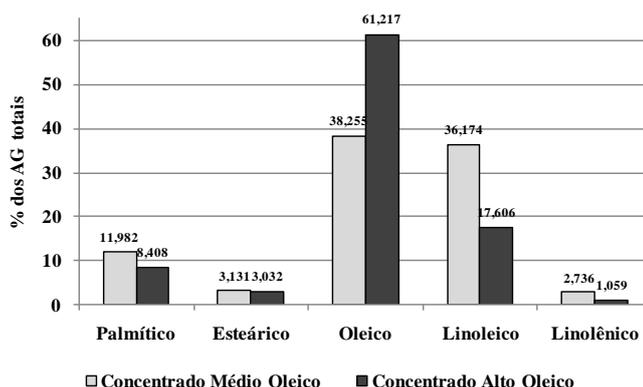
### 5.3. Concentrado

Na Tabela 4 dos Anexos são apresentados os teores dos principais AG presentes nos ingredientes (farelo de soja, fubá de milho e polpa cítrica) e nos dois suplementos concentrados utilizados no experimento.

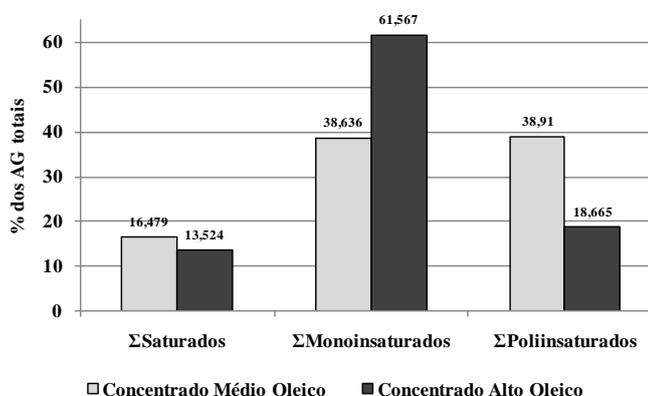
Amostras dos concentrados contendo os dois tipos de óleo foram coletadas logo após o seu preparo, ou seja, nos dias 0 (dia anterior ao início do experimento), 6 e 13 do período experimental. Os teores apresentados no “Dia 1” dizem respeito à média dos perfis de AG obtidos a partir dessas três batidas.

Os teores de AG dos ingredientes (fubá de milho, polpa cítrica e farelo de soja) foram obtidos a partir de *pool* de amostras coletadas em cada um dos três dias de preparo dos concentrados.

Devido aos altos teores de OG (10,0%) adicionados aos concentrados e aos baixos teores de EE presentes nos demais ingredientes (1,9; 5,5 e 3,1% de EE no farelo de soja, milho moído e polpa cítrica, respectivamente), era de se esperar que o perfil de AG dos concentrados mantivesse as mesmas proporções de AG observadas nos OG (Figuras 5 e 6).



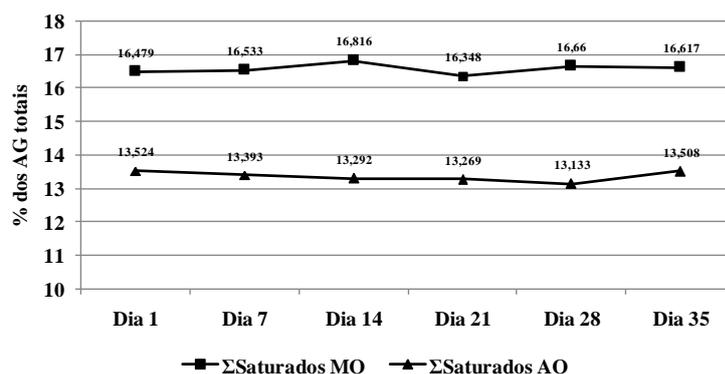
**Figura 5.** Teores médios dos principais ácidos graxos presentes nos suplementos concentrados formulados com óleo de girassol alto (AO) e médio (MO) oleico.



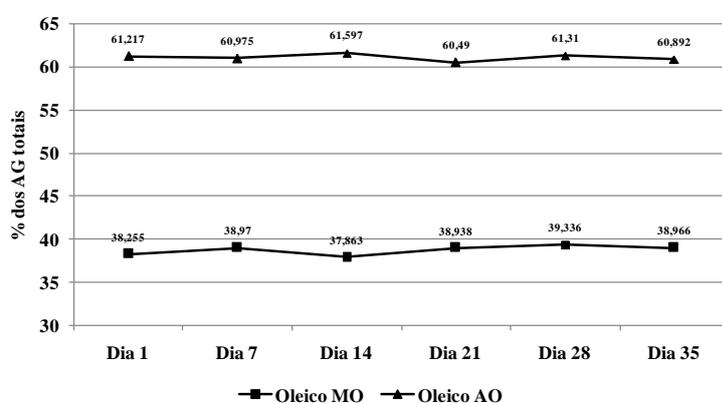
**Figura 6.** Somatório dos teores médios dos ácidos graxos saturados, mono e poli-insaturados nos suplementos concentrados formulados com óleo de girassol alto (AO) e médio (MO) oleico.

Segundo Ribeiro (2009a), é possível que se observe algum grau de saturação ou de  $\beta$ -oxidação (quebra da cadeia carbônica e formação de grupos acetil) dos AG durante o período de armazenamento dos concentrados enriquecidos com óleo devido à sua exposição ao ar ( $O_2$ ), aos microrganismos, e às variações de temperatura. Tais transformações químicas poderiam influenciar negativamente a composição, a palatabilidade e a aceitabilidade do alimento pelos animais comprometendo, assim, a ingestão de matéria seca e causar alterações no perfil de AG secretados no leite. Destaque-se ainda que quanto maior a estabilidade oxidativa do óleo e, conseqüentemente, a vida útil do concentrado formulado com ele, maior é o intervalo entre os preparos na fábrica de ração.

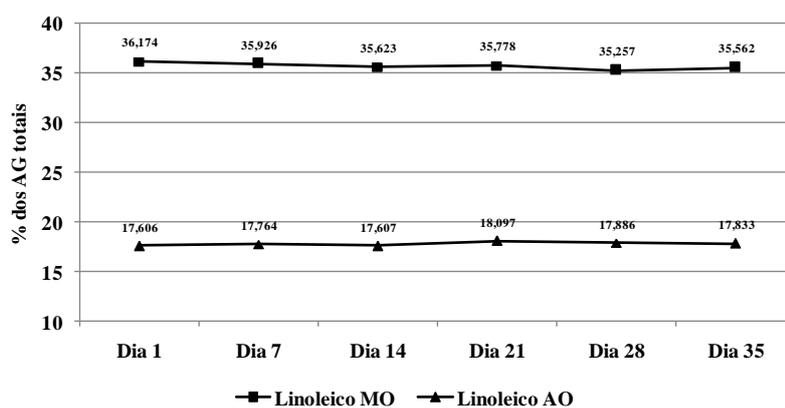
A análise das Figuras 7, 8 e 9 permite verificar que os AG saturados, oleico e linoleico presentes em ambos os OG apresentaram comportamento relativamente estável durante os 35 dias de avaliação. Apesar de não ter sido possível fazer o estudo estatístico desses dados, pode-se inferir que os dois suplementos concentrados não sofreram oxidação lipídica significativa durante o período de avaliação.



**Figura 7.** Evolução temporal do somatório das concentrações (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos saturados nos suplementos concentrados formulados com óleo de girassol com alto (AO) (▲) e médio (MO) (■) teores de ácido oleico



**Figura 8.** Evolução temporal dos teores (g/100 g de AG totais) de ácido oleico nos suplementos concentrados formulados com óleo de girassol alto (AO) (▲) e médio (MO) (■) teores de ácido oleico



**Figura 9.** Evolução temporal dos teores (g/100 g de AG totais) de ácido linoleico nos suplementos concentrados formulados com óleo de girassol com alto (AO) (▲) e médio (MO) (■) teores de ácido oleico

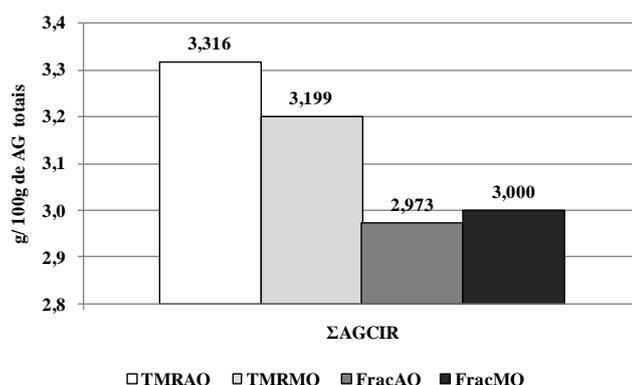
## 6. Perfil de ácidos graxos do plasma sanguíneo

Segundo Abughazaleh *et al.* (2003), há diferenças na incorporação dos diferentes AG entre as moléculas lipídicas do plasma. A maior parte dos AG poli-insaturados se apresenta na forma de fosfolípidos e ésteres de colesterol, enquanto que os saturados, os isômeros de CLA (à exceção do CLA *trans*-10 *cis*-12) e monoinsaturados (tanto *trans* como *cis*) se apresentam na forma de AG livres e triglicérides. Confirmando essa observação, LaCount *et al.* (1994) observaram aumento linear ( $P < 0,05$ ) tanto no teor de triglicérides

totais como no de ácido oleico intra-triglicerídeo à medida que se elevou o aporte de OGAO (86% de oleico) no duodeno de vacas em lactação. Loor *et al.* (2002c) observaram que não só o teor de triglicerídeos, mas também a concentração plasmática total de ácido oleico é proporcional ao seu consumo. Estes autores sugeriram que a taxa de BH ruminal desse AG seja baixa, permitindo, assim, que quantidades significativas desse AG cheguem intactas para absorção intestinal.

As rotas de BH do ácido oleico podem gerar uma vasta gama de intermediários *trans* ou formar o ácido esteárico (Shingfield *et al.*, 2010), sendo esta a principal rota (Shingfield *et al.*, 2010). Vários autores (Selner e Schultz, 1980; Echelmeier *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 2000; Loor *et al.*, 2002c) observaram que, além do próprio ácido oleico, as concentrações plasmáticas do ácido esteárico também se elevam quando ocorre a suplementação dietética de ruminantes com óleos vegetais ricos em ácido oleico.

O perfil de AG do plasma pode ser utilizado como indicador indireto da BH ruminal (Kay *et al.*, 2005). Dessa forma, ao analisar os teores plasmáticos de AGCIR, percebe-se que somente o modo de fornecimento do concentrado influenciou ( $P = 0,0023$ ) o desenvolvimento da população microbiana, de forma que o TMR e o Fracionado geraram concentrações plasmáticas de AGCIR de 3,257 e 2,987 g/100 g de AG totais, respectivamente (Tabela 6 e Figura 10). O fornecimento da dieta na forma de mistura completa assegura o consumo balanceado de nutrientes e permite maior estabilidade do ambiente ruminal, já que o consumo de concentrados é sempre acompanhado da ingestão de alimentos volumosos (Coppock *et al.*, 1981; Assis, 1997). Esse comportamento ajuda a explicar os maiores ( $P < 0,0001$ ) consumos de MS e FDNcp desses tratamentos (Tabela 1). Entretanto, esse aparente aumento da atividade da população microbiana parece não ter sido suficiente para influenciar ( $P > 0,05$ ) a produção de leite ou o teor de proteína do leite (Tabela 4).



**Figura 10.** Teores do somatório dos ácidos graxos de cadeia carbônica ímpar ou ramificada no plasma de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

Apesar do maior consumo de AGPI nas dietas com OGAO (Tabela 1) que, segundo Jenkins (1993), possuem ação inibitória sobre parte da microbiota ruminal, não se observou ( $P = 0,5834$ ) influência do tipo de OG sobre a concentração de AGCIR do plasma (Tabela 6). Esse comportamento sugere que as quantidades de ácido linoleico e demais AGPI consumidos não tenham sido suficientes para causarem efeito deletério sobre a microbiota ruminal.

As concentrações plasmáticas dos AG de cadeia curta (C4:0 a C10:0) foram muito baixas (Tabela 6). Esse comportamento corrobora com os resultados observados em experimentos semelhantes (Loor *et al.*, 2002b, 2002c; Abughazaleh *et al.*, 2003; Petit, 2003; Ward *et al.*, 2003; Kay *et al.*, 2005; Loor *et al.*, 2005; Contreras *et al.*, 2010).

Nenhum dos AG saturados de cadeia média (C12:0 a C16:0) sofreu influência ( $P > 0,05$ ) dos tratamentos. Entretanto, o consumo de ácido palmítico havia sofrido influência tanto do modo ( $P = 0,0001$ ) como do tipo de óleo fornecido ( $P < 0,0001$ ), sendo de 57,4 e 71,9 g/dia para os tratamentos com OGAO e OGAO, respectivamente (Tabela 1). Esse comportamento se explica porque, apesar do aumento da ingestão em valores absolutos, proporcionalmente, a participação do ácido palmítico na dieta se manteve praticamente estável (Tabela 6). Além disso, a síntese desse AG no rúmen é considerada baixa, fazendo com que o processo de BH e a atividade microbiana no rúmen não sejam fatores determinantes na sua concentração plasmática (Bauman *et al.*, 2003; Lock e Bauman, 2011).

**Tabela 6.** Teores dos principais ácidos graxos - AG (g/100 g de AG totais) no plasma de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado

Variável	TMR		Fracionado		EPM <sup>1</sup>	Efeitos		
	AO	MO	AO	MO		Modo	Óleo	M x O
C14:0	0,674	0,645	0,667	0,610	0,0324	0,5264	0,1938	0,6741
C15:0 <i>isso</i>	0,313	0,311	0,271	0,314	0,0279	0,3130	0,3011	0,2466
C15:0 <i>anteiso</i>	0,516	0,511	0,396	0,459	0,0279	0,0045	0,3050	0,2307
C15:0	0,483	0,461	0,442	0,451	0,0119	0,0369	0,5713	0,2226
C16:0	11,158	11,455	11,658	11,252	0,3022	0,6273	0,8583	0,2530
C17:0 <i>iso</i>	0,281	0,260	0,251	0,242	0,0153	0,1297	0,3247	0,7067
C17:0 <i>anteiso</i>	0,390	0,360	0,356	0,321	0,0341	0,2967	0,3398	0,9506
C17:0	0,526	0,521	0,498	0,485	0,0111	0,0067	0,4122	0,7325
C18:0	25,444	25,248	26,372	22,807	1,0646	0,4823	0,0869	0,1235
C18:1 <i>trans</i> -10	0,269	0,321	0,204	0,328	0,0269	0,2886	0,0026	0,1928
C18:1 <i>trans</i> -11	1,066	1,858	1,274	2,750	0,0898	<0,0001	<0,0001	0,0006
C18:1 <i>cis</i> -9 + <i>trans</i> -15	16,009	11,888	15,721	11,938	0,6207	0,8490	<0,0001	0,7870
C18:2 <i>trans</i> -9 <i>trans</i> -12	0,041	0,031	0,037	0,022	0,0054	0,2295	0,0268	0,7200
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -12	0,103	0,141	0,061	0,138	0,0136	0,1068	0,0002	0,1679
C18:2 <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -12 + <i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15	0,116	0,190	0,079	0,194	0,0125	0,1988	<0,0001	0,1061
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	18,090	20,933	18,206	23,649	0,6271	0,0310	<0,0001	0,0463
C18:3 <i>cis</i> -6 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	0,379	0,414	0,346	0,429	0,0366	0,8060	0,1179	0,5048
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	1,539	1,504	1,415	1,539	0,0686	0,1335	0,1335	0,3128
C20:2 ω-6	0,065	0,058	0,059	0,062	0,0052	0,9050	0,7565	0,3431
C20:3 ω-6	0,798	0,903	0,708	0,781	0,0571	0,0721	0,1281	0,7819
C20:4 ω-6	1,318	1,334	1,367	1,242	0,0648	0,7401	0,4104	0,2861
C20:5 ω-3	0,451	0,448	0,377	0,436	0,0353	0,2325	0,4424	0,3908
C21:0	0,104	0,121	0,097	0,116	0,0054	0,2805	0,0026	0,8635
C22:0	0,385	0,340	0,297	0,297	0,0319	0,0485	0,4820	0,4820
C23:0	0,106	0,108	0,140	0,086	0,0148	0,6992	0,0874	0,0622
C24:0	0,087	0,100	0,077	0,124	0,0173	0,6904	0,0964	0,3373
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 + <i>trans</i> -7 <i>cis</i> -9	0,142	0,169	0,147	0,185	0,0087	0,2181	0,0008	0,5183
CLA <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11	0,013	0,015	0,015	0,012	0,0034	0,8823	0,9705	0,4610
CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0,030	0,029	0,038	0,019	0,0047	0,8957	0,0356	0,0735
Σ CLA <sup>2</sup>	0,185	0,212	0,200	0,216	0,0126	0,4460	0,1004	0,6592
Σ Inibidores	0,043	0,044	0,053	0,031	0,0065	0,8415	0,1144	0,0918

*continua*

Ácido graxo	TMR		Fracionado		EPM <sup>1</sup>	Efeitos		
	AO	MO	AO	MO		Modo	Óleo	M x O
Σ Saturados Pares								
Curta	0,573	0,636	0,945	0,533	0,1184	0,2645	0,1496	0,0534
Média	11,902	12,162	12,395	11,923	0,3186	0,6929	0,7414	0,2589
Longa	26,088	25,863	26,929	23,387	1,0468	0,4390	0,0819	0,1237
Total	38,563	38,660	40,262	35,842	1,3113	0,6727	0,1091	0,0946
Σ AGCIR	3,316	3,199	2,973	3,000	0,0817	0,0023	0,5834	0,3821
Σ Monoinsaturados Pares								
<i>cis</i>	20,215	16,029	20,270	15,761	0,6284	0,8670	<0,0001	0,7986
<i>trans</i>	3,327	4,253	3,133	4,947	0,1736	0,1597	<0,0001	0,0155
Total	23,542	20,282	23,403	20,708	0,7062	0,8397	0,0002	0,6918
Σ Poli-insaturados								
ω-3 <i>cis cis</i>	2,015	1,976	2,130	1,996	0,0913	0,4658	0,3490	0,6101
ω-6 <i>cis cis</i>	20,650	23,642	20,684	26,163	0,6784	0,0687	<0,0001	0,0762

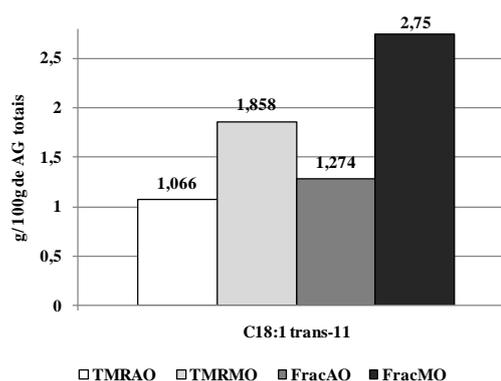
<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup>As fórmulas utilizadas no cálculo das relações estão detalhadamente apresentadas no Tópico 6 do Material e Métodos.

Dentre os AG de cadeia carbônica longa ( $\geq C18$ ), todos os AG C18:1 e C18:2 sofreram influência ( $P < 0,05$ ) do tipo de OG fornecido, sendo que no caso do ácido vacênico e do linoleico, houve interação entre os fatores estudados (Tabelas 6a e 6b, respectivamente). Os tratamentos com OGMO apresentaram concentrações de vacênico sempre superiores aos dos tratamentos com OGAO (Tabela 6a; Figura 11). Esse comportamento já era esperado visto que as dietas contendo OGMO possuíam mais ácido linoleico (Tabela 1), cujo principal intermediário da BH é o ácido vacênico (Shingfield *et al.*, 2010). O modo de fornecimento fracionado do concentrado contendo OGMO promoveu incremento ( $P < 0,05$ ) na concentração plasmática de ácido vacênico (Tabela 6a). Característica esta interessante quando se objetiva maximizar a secreção do ácido rumênico no leite (Kay *et al.*, 2004).

**Tabela 6a.** Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) do ácido graxo C18:1 *trans*-11 no plasma sanguíneo

		Modo	
		TMR	Fracionado
Óleo	AO	1,066 <sup>Ba</sup>	1,274 <sup>Ba</sup>
	MO	1,858 <sup>Ab</sup>	2,750 <sup>Aa</sup>

Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 0,0898.



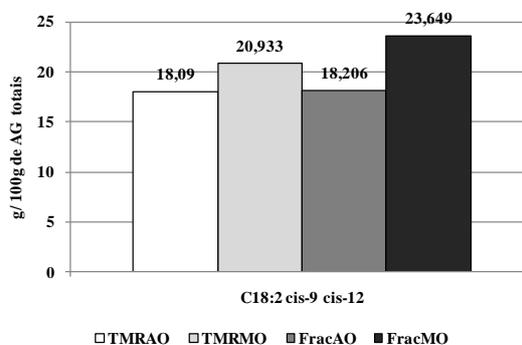
**Figura 11.** Teores de ácido vacênico (C18:1 *trans*-11) no plasma de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

O comportamento da concentração plasmática de ácido linoleico foi semelhante à do ácido vacênico, ou seja, os tratamentos contendo OGMO promoveram incrementos ( $P < 0,05$ ) nas concentrações de ácido linoleico em relação às dos tratamentos com OGAO (Figura 12). Tal comportamento era esperado visto que as dietas contendo OGMO possuíam concentração de ácido linoleico mais elevada que as com OGAO. O modo de fornecimento fracionado de concentrado apresentou concentração de ácido linoleico superior ( $P < 0,05$ ) quando se forneceu OGMO, sugerindo que o modo Fracionado tenha reduzido a atividade enzimática da microbiota, resultado de possível redução populacional. Entretanto, o comportamento dos dados de concentração plasmática de AGCIL, não confirma essa teoria.

**Tabela 6b.** Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) do ácido graxo C18:2 *cis*-9 *cis*-12 no plasma sanguíneo

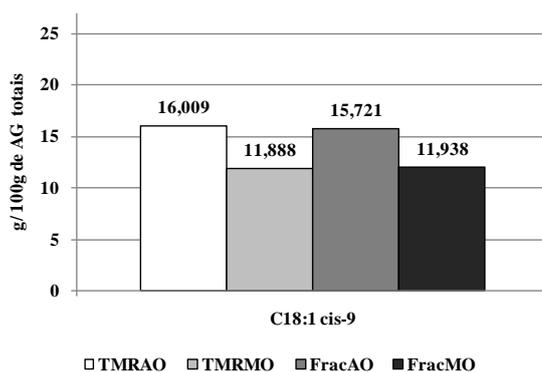
		Modo	
		TMR	Fracionado
Óleo	AO	18,090 <sup>Ba</sup>	18,206 <sup>Ba</sup>
	MO	20,933 <sup>Ab</sup>	23,649 <sup>Aa</sup>

Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 0,6271.



**Figura 12.** Teores de ácido linoleico no plasma de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR versus fracionado) em dietas à base de capim-efefante picado

Como esperado, as concentrações plasmáticas do ácido oleico se elevaram passando de 11,91 para 15,86 g/100 g de AG totais entre os tratamentos contendo OGMO e OGAO, respectivamente (Figura 13; Tabela 6). Assim como no presente experimento, Loo *et al.* (2002d), fornecendo óleo de canola rico em ácido oleico para vacas em lactação, observaram que o consumo de ácido oleico apresentou comportamento semelhante ( $P < 0,001$ ) à concentração plasmática desse AG. Abughazaleh *et al.* (2003) também forneceram dietas contendo diferentes teores de ácido oleico e linoleico para vacas em lactação e observaram que as concentrações plasmáticas desse AG foram proporcionais ao seu consumo ( $P < 0,10$ ).



**Figura 13.** Teores de ácido oleico no plasma sanguíneo de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR versus fracionado) em dietas à base de capim-efefante picado.

As concentrações dos AG C18:2 *trans*-9 *cis*-12 e C18:2 *trans*-11 *cis*-15 – que co-eluem, ou seja, produzem picos cromatográficos em tempos de retenção muito próximos – apresentaram claro comportamento de elevação ( $P < 0,0001$ ) quando houve fornecimento de OGMO (Tabela 6). Segundo Wasowska *et al.* (2006), o C18:2 *trans*-11 *cis*-15 é importante intermediário da BH ruminal do ácido  $\alpha$ -linolênico, assim, sua presença é esperada tanto no plasma como na gordura do leite dos animais submetidos a dietas que contenham concentrações significativas de  $\alpha$ -linolênico. Segundo os dados apresentados na Tabela 5, o teor de ácido  $\alpha$ -linolênico do OGMO é, aproximadamente, 550% mais elevado que no OGAO, explicando, assim, a diferença de concentração.

Dentre os isômeros de CLA, o ácido rumênico e o CLA *trans*-10 *cis*-12 sofreram influência ( $P < 0,05$ ) do tipo de OG fornecido (Tabela 6). As concentrações do ácido rumênico foram mais elevadas ( $P < 0,05$ ; Tabela 6) quando houve fornecimento do OGMO em relação ao OGAO (0,177 *versus* 0,145 g/100 g de AG totais, respectivamente), comportamento esperado já que o consumo de ácido linoleico, seu principal precursor (Shingfield *et al.*, 2010) foi mais alto ( $P < 0,0001$ ) nas dietas contendo este OG (Tabela 1). Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) do modo de fornecimento do concentrado sobre a concentração plasmática de CLA *trans*-10 *cis*-12 (Tabela 6). Além disso, o CLA *trans*-10 *cis*-12 apresentou concentrações plasmáticas mais elevadas ( $P = 0,0356$ ) quando se forneceu OGAO, apesar de seu principal precursor (ácido linoleico) ter sido mais consumido (Tabela 1) nos tratamentos com inclusão de OGMO. Esse comportamento do CLA *trans*-10 *cis*-12 pode ser parcialmente justificado devido às suas baixas concentrações plasmáticas, permitindo que, eventualmente, pequenas variações inerentes à metodologia de análise gerem reflexos nos resultados finais.

Dentre os parâmetros calculados a partir da soma dos diversos grupos de AG, apenas os somatórios das concentrações dos AG poli-insaturados  $\omega$ -6 ( $P < 0,0001$ ) e dos monoinsaturados *cis* e totais sofreram efeito ( $P < 0,05$ ) do tipo de OG (Tabela 6). O fornecimento dos OG com diferentes teores de ácido oleico na dieta refletiu nas concentrações plasmáticas desse AG e, conseqüentemente, nas dos AG monoinsaturados *cis* e total. Da mesma maneira, os diferentes teores de AG  $\omega$ -6 nas dietas – devido, principalmente, à variação do ácido linoleico entre os OG (Tabela 5) – refletiram diretamente sobre seus teores plasmáticos.

O somatório dos AG monoinsaturados *trans*, por sua vez, apresentou interação ( $P < 0,05$ ) entre o modo de fornecimento e o tipo de OG (Tabela 6). Os tratamentos com inclusão de OGMO apresentaram concentrações de AG monoinsaturados *trans* sempre superiores ( $P < 0,05$ ) às observadas no plasma das vacas que receberam os tratamentos com OGAO (Tabela 6c). Este comportamento era esperado, visto que as dietas contendo OGMO possuíam mais ácido linoleico (Tabela 5), cuja taxa de BH ruminal é cerca de 70% superior à do ácido oleico (Beam *et al.*, 2000), além de produzir uma vasta gama de AG *trans* como intermediários de BH (Shingfield *et al.*, 2010). O modo de fornecimento fracionado do concentrado formulado com OGMO promoveu incremento ( $P < 0,05$ ) na concentração plasmática de AG monoinsaturados *trans* quando comparado com o OGAO (Tabela 6c). Tal comportamento pode ser parcialmente atribuído aos elevados teores de ácido vacênico no plasma das vacas que receberam as dietas suplementadas com concentrados formulados com o OGMO.

**Tabela 6c.** Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) do somatório dos ácidos graxos monoinsaturados *trans* de cadeia carbônica par no plasma sanguíneo

		Modo	
		TMR	Fracionado
Óleo	AO	3,327 <sup>Ba</sup>	3,133 <sup>Ba</sup>
	MO	4,253 <sup>Ab</sup>	4,947 <sup>Aa</sup>

Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 0,1736.

Jacobs *et al.* (2011), a fim de estudar os efeitos dos ácidos oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico sobre a expressão gênica da enzima  $\Delta^9$ -desaturase na glândula mamária de vacas em lactação, forneceram três dietas contendo 7,5% (base de MS) de óleo de colza, soja e linhaça, respectivamente. Os autores observaram que as suplementações com ácido oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico promoveram incrementos nas concentrações plasmáticas de cada um dos respectivos AG.

Dentre os AG com 20 ou mais C na cadeia, saturados ou insaturados, somente as concentrações plasmáticas de C21:0 e C22:0 sofreram influência ( $P < 0,05$ ) dos tratamentos (Tabela 6). O primeiro apresentou concentrações mais elevadas ( $P = 0,0026$ ) quando se utilizou OGMO, enquanto que para o C22:0 o fornecimento da dieta no modo TMR promoveu incremento ( $P = 0,0485$ ) nas suas concentrações plasmáticas (Tabela 6). Isto pode ser parcialmente justificado, haja vista que a principal fonte desses AG na dieta (capim-elefante) foi fornecida em proporções fixas durante todo o experimento, além do fato de que esses AG não são substratos importantes para a ação das enzimas microbianas (Bauman *et al.*, 2003; Lock e Bauman, 2011).

## 7. Perfil de ácidos graxos do leite

### 7.1. Ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada

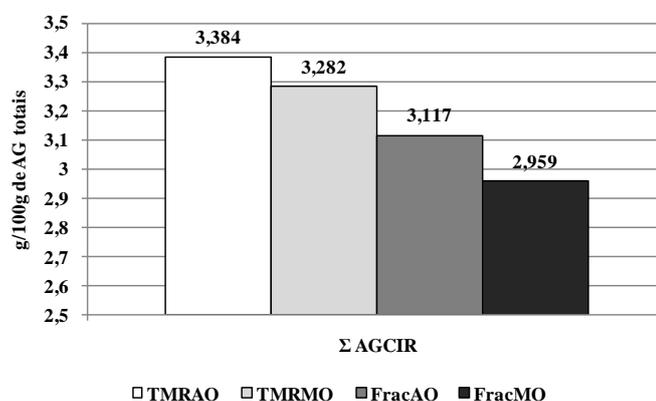
Não foi observada ( $P>0,05$ ) interação dos efeitos de modo de fornecimento do concentrado e de tipo de OG sobre as concentrações de AGCIR no leite (Tabela 7). De modo geral, os modos de fornecimento do concentrado apresentaram influência maior sobre as concentrações dos AGCIR no leite se comparado aos tipos de OG adicionados à dieta (Tabela 7; Figura 14). Em relação ao modo fracionado de fornecimento do concentrado, as dietas consumidas sob a forma de TMR promoveram incrementos ( $P<0,05$ ) nas concentrações lácteas (Tabela 7) dos AG C15:0 *anteiso* em 13% (de 0,370 para 0,419 g/100 g de AG totais); do C15:0 em 15% (de 0,792 para 0,912 g/100 g de AG totais); do C16:0 *iso* em 10% (de 0,166 para 0,183 g/100 g de AG totais); do C17:0 *iso* em 13% (de 0,379 para 0,429 g/100 g de AG totais); e do C17:0 *anteiso* em 15% (de 0,380 para 0,434 g/100 g de AG totais). Esses incrementos refletiram diretamente nos somatórios dos teores dos AG *iso*, *anteiso* e dos AGCIR totais, que no leite das vacas que consumiram as dietas sob a forma de TMR apresentaram aumentos ( $P<0,001$ ) de 14%, 6% e 10%, respectivamente (Tabela 7) em relação ao daquelas que receberam o concentrado fracionado.

**Tabela 7.** Teores (g/100 g de AG totais) e secreção diária (g/dia) dos ácidos graxos (AG) de cadeia ímpar e ramificada na gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado

Ácido graxo (g/100 g de AG totais)	TMR		Fracionado		EPM <sup>1</sup>	Efeitos		
	AO	MO	AO	MO		Modo	Óleo	Modo x Óleo
	g/100 g de AG totais							
C5:0	0,011	0,009	0,010	0,011	0,0008	1,0000	0,8852	0,0675
C7:0	0,002	0,002	0,001	0,002	0,0008	0,8211	0,8211	0,3306
C9:0	0,014	0,012	0,014	0,012	0,0008	0,7573	0,0124	0,8772
C11:0 + C10 <i>cis</i> -9	0,114	0,116	0,135	0,132	0,0082	0,0268	0,9574	0,7441
C13:0	0,035	0,036	0,037	0,035	0,0027	0,8532	0,8912	0,5244
C14:0 <i>iso</i>	0,086	0,083	0,084	0,082	0,0028	0,5754	0,3002	0,9115
C15:0 <i>iso</i>	0,226	0,208	0,221	0,196	0,0082	0,3049	0,0133	0,6270
C15:0 <i>anteiso</i>	0,426	0,413	0,368	0,372	0,0107	<0,0001	0,6726	0,4227
C15:0	0,911	0,912	0,798	0,786	0,0162	<0,0001	0,7481	0,6743
C16:0 <i>iso</i>	0,185	0,180	0,171	0,160	0,0058	0,0062	0,1891	0,6025
C17:0 <i>iso</i>	0,442	0,415	0,417	0,341	0,0110	<0,0001	<0,0001	0,0343
C17:0 <i>anteiso</i>	0,446	0,422	0,398	0,363	0,0118	<0,0001	0,0166	0,6508
C17:0	0,285	0,262	0,260	0,260	0,0124	0,2922	0,3443	0,3494
C17:1 <i>cis</i> -9	0,139	0,141	0,130	0,132	0,0062	0,1427	0,7566	0,9282
C21:0	0,043	0,050	0,046	0,055	0,0016	0,0205	<0,0001	0,6506
C23:0	0,021	0,024	0,028	0,022	0,0015	0,1000	0,3585	0,0057
Σ <i>Anteiso</i>	0,871	0,834	0,766	0,735	0,0192	<0,0001	0,0831	0,8589
Σ <i>Iso</i>	0,939	0,886	0,894	0,779	0,0211	0,0010	0,0004	0,1488
Σ Impares Lineares	1,574	1,563	1,458	1,446	0,0253	<0,0001	0,6476	0,9785
Σ AGCIR	3,384	3,282	3,117	2,959	0,0506	<0,0001	0,0151	0,5805
	g/dia							
Σ AGCIR <sup>2</sup>	13,322	12,614	14,366	12,899	0,8975	0,4721	0,2427	0,6807

<sup>1</sup> Erro padrão da média; <sup>2</sup> Ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada.

Assim como para o consumo de MS (Tabela 1), o modo de fornecimento de concentrado TMR também promoveu teores mais elevados ( $P < 0,05$ ) de AGCIR do leite (Tabela 7; Figura 14), sugerindo que esse modo de fornecimento proporcionou ambiente ruminal mais favorável para o crescimento da microbiota. Já a secreção diária desses AG, não apresentou variação ( $P = 0,4721$ ) entre os dois modos de fornecimento de concentrado. Esse comportamento ocorreu porque, apesar dos menores ( $P < 0,0001$ ) teores de AGCIR no modo fracionado, a secreção diária de gordura foi maior ( $P = 0,0549$ ) que a da TMR, fazendo com que a secreção diária dos AGCIR fossem semelhantes entre os dois modos.



**Figura 14.** Teores de ácidos graxos de cadeia carbônica ímpar ou ramifica na gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado

A variação não numérica – mas de espécies – da população microbiana ajuda a explicar porque houve variação nos parâmetros de consumo (Tabela 1), tendência de variação em alguns parâmetros de digestibilidade aparente (Tabela 2), mas não houve nos teores ou na secreção diária de proteína no leite (Tabela 4).

O C21:0 apresentou comportamento inverso ao dos demais AG, ou seja, suas concentrações no leite foram mais elevadas nos tratamentos cujo concentrado foi fornecido de forma fracionada (Tabela 7). Isto pode ser parcialmente explicado considerando dois motivos: sua concentração láctea ser de origem majoritariamente vegetal, ou seja, não é de origem microbiana; e pelas suas baixas concentrações, que não permitem avaliação precisa dos seus teores. Este motivo também ajuda a explicar a variação ( $P = 0,0124$ ) observada nos teores de C9:0 (Tabela 7).

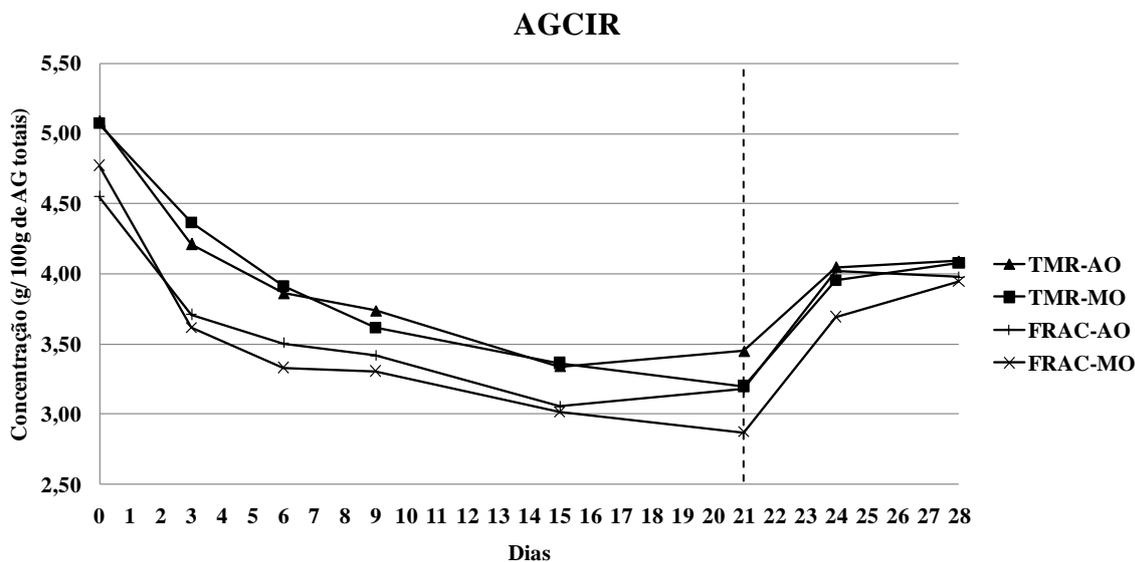
Apesar do perfil de AG no plasma poder ser considerado reflexo dos AG oriundos da BH ruminal e/ou daqueles advindos da dieta (Contreras *et al.*, 2010), o mesmo raciocínio pode não se aplicar quando consideramos o perfil de AG no plasma em relação àquele que é secretado no leite. Segundo Smith (1994), tanto os AG de cadeia linear com número ímpar de C (principalmente, C15:0 e C17:0) quanto os seus isômeros *anteiso* podem ser sintetizados *de novo* na glândula mamária, a partir da incorporação do propionil-CoA ou do metilmalonil-CoA no lugar das moléculas de Acetil-CoA ou de malonil-CoA, respectivamente, durante a lipogênese mamária (Murray *et al.*, 2003).

Outro fator que impede a comparação do perfil de AGCIR no plasma com o do leite é o fato de que parte do C17:0 que aporta na glândula mamária é utilizado pela enzima  $\Delta^9$ -desaturase para a síntese de C17:1 *cis*-9 (Fievez *et al.*, 2003; Kay *et al.*, 2009). Segundo Fievez *et al.* (2003), o índice de desaturase – responsável por quantificar a afinidade da  $\Delta^9$ -desaturase pelos seus substratos – do par C17:0/C17:1 *cis*-9 é equivalente ao do ácido vacênico/rumênico, reconhecidamente um dos mais altos.

O efeito inibitório dos AGPI da dieta sobre as bactérias ruminais já é bem conhecido, sendo função do número de insaturações das cadeias carbônicas destes AGPI (Dehority, 2003; Jenkins, 1993; Vlaeminck *et al.*, 2006b). Por esse motivo, houve efeito do tipo de OG ( $P < 0,05$ ) para vários AG de cadeia ímpar e/ou ramificada do leite (Tabela 7). As concentrações no leite dos AG C17:0 *iso* e C17:0 *anteiso* sofreram reduções de 14% e de 8%, respectivamente, quando comparados os tratamentos com inclusão de OGAO e OGMO (Tabela 7).

Baseado nos potenciais benefícios da elevação dos teores dos AG insaturados, em especial do CLA *cis-9 trans-11*, na saúde humana, tornou-se necessário o desenvolvimento de estratégias que permitissem a elevação das concentrações desses AG na gordura láctea. Já se sabe que os níveis desses AG podem ser maximizados quando do fornecimento de suplementações lipídicas, em especial, com óleo de peixe ou óleos vegetais ricos em AG poli-insaturados. Entretanto, o seu fornecimento apresenta respostas bastante variáveis. Segundo Shingfield *et al.* (2008), parte dessa variação se deve à necessidade tempo-dependente de adaptação ruminal aos altos níveis de lipídeos na dieta.

Objetivando compreender as variações tempo-dependentes das concentrações dos AG no leite, foram coletadas, durante o período experimental, amostras de leite a cada três dias, sendo analisadas as dos dias 0 (anterior ao início do experimento), 3, 6, 9, 15 e 21, e, adicionalmente, mais duas coletas pós-experimento nos dias 24 e 28. Dessa forma, tornou-se possível acompanhar as variações temporais dos diversos AG lácteos em cada tratamento. O fornecimento dos OG causou redução gradativa nas concentrações de AGCIR no leite, consequência do comprometimento da microbiota ruminal causada pela potencial ação deletéria dos AGPI (Dehority, 2003; Jenkins, 1993; Vlaeminck *et al.*, 2006b). Aparentemente, os 21 dias foram insuficientes para verificar o momento de estabilização dos teores de AGCIR. Observa-se também que as vacas que consumiram as dietas sob a forma de TMR apresentaram, durante praticamente todo o período experimental, leite com teores de AGCIR superiores aos daquelas que receberam concentrado no modo fracionado. Após o 21º dia, com a suspensão da suplementação dos OG, percebeu-se rápida elevação dos teores de AGCIR no leite, consequência do fim da ação inibitória dos AGPI sobre a população microbiana do rúmen. No entanto, neste período de sete dias, não foi observado o retorno às concentrações originais (Dia 0) destes AG no leite (Figura 15).



**Figura 15.** Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos de cadeia carbônica ímpar e ramificada (AGCIR) na gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

## 7.2. Ácidos graxos saturados de cadeia curta e média

O modo de fornecimento fracionado dos concentrados na dieta elevou ( $P < 0,05$ ) os teores dos AG C6:0, C8:0 e C10:0 no leite, bem como a secreção diária do somatório das concentrações destes três AG ( $P = 0,0323$ ) (Tabela 8). Esse comportamento sugere ter havido inibição da síntese *de novo* de AG na glândula mamária das vacas que receberam as dietas sob a forma de TMR. Entretanto, os teores dos inibidores da lipogênese mamária (CLA *trans-9 cis-11* e CLA *trans-10 cis-12*) foram maiores ( $P < 0,005$ ) no leite das vacas que receberam concentrado de modo fracionado (Tabela 9). Assim, pode-se hipotetizar que as concentrações dos AG inibidores da lipogênese mamária não tenham sido suficientes para provocar depressão no teor de gordura do leite ou síntese de AG específicos.

Dentre os AG de cadeia carbônica média do leite, somente o ácido palmítico (C16:0) sofreu influência do modo de fornecimento dos concentrados, reduzindo ( $P = 0,0422$ ) de 19,822 para 20,735 g/100 g de AG totais entre os modos TMR e Fracionado, respectivamente. Apesar do ácido palmítico ser o AG de cadeia

média presente em maior concentração no leite, seu aumento não chegou a influenciar nem os teores ( $P = 0,1896$ ) nem o consumo diário ( $P = 0,0984$ ) do somatório dos AG de cadeia média (Tabela 8).

**Tabela 8.** Teores (g/100 g de AG totais) e secreção diária (g/dia) dos ácidos graxos saturados na gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado

Ácido graxo	TMR		Fracionado		EPM <sup>1</sup>	Efeitos		
	AO	MO	AO	MO		Modo	Óleo	Modo x Óleo
g/ 100 g de ácidos graxos totais								
C4:0	2,575	2,372	2,569	2,750	0,2058	0,1481	0,9332	0,1369
C6:0	1,174	1,000	1,262	1,261	0,0516	0,0209	0,4727	0,4841
C8:0	0,570	0,522	0,614	0,605	0,0269	0,0254	0,3061	0,4798
C10:0	1,122	0,989	1,208	1,118	0,0544	0,0560	0,0475	0,6943
C12:0	1,439	1,241	1,497	1,301	0,0605	0,3350	0,0027	0,9853
C14:0	6,912	6,247	7,156	6,273	0,1935	0,4931	0,0004	0,5793
C16:0	19,664	21,805	18,760	20,885	0,4311	0,0422	<0,0001	0,9859
C18:0	16,275	14,251	14,800	13,043	0,6145	0,0365	0,0043	0,8296
C20:0	0,164	0,150	0,146	0,139	0,0061	0,0283	0,0908	0,5697
C22:0	0,061	0,041	0,055	0,042	0,0035	0,5111	<0,0001	0,3307
C24:0	0,010	0,008	0,009	0,010	0,0010	0,6044	0,6044	0,2477
Σ Saturados Pares								
Curta	5,439	4,982	5,653	5,734	0,2160	0,0323	0,3901	0,2210
Média	28,014	29,293	27,410	28,459	0,5365	0,1896	0,0377	0,8317
Longa	16,509	14,450	15,010	13,233	0,6216	0,0364	0,0042	0,8217
Total	49,963	48,724	48,073	47,426	0,5557	0,0073	0,0993	0,5984
g/dia								
C14:0	28,318	23,948	32,505	27,361	1,9455	0,0642	0,0225	0,8463
C16:0	78,057	83,410	85,343	90,687	4,6784	0,1364	0,2699	0,9992
C18:0	65,937	54,988	69,008	56,872	6,1026	0,6727	0,0558	0,9193
Σ Saturados Pares								
Curta	22,374	19,598	25,691	25,136	1,8696	0,0267	0,3881	0,5638
Média	112,28	112,16	124,66	123,75	6,9111	0,0984	0,9420	0,9559
Longa	66,889	55,752	69,987	57,700	5,7840	0,6711	0,0555	0,9229
Total	201,54	187,51	220,33	206,58	15,6357	0,1580	0,3985	0,8898

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup>As fórmulas utilizadas no cálculo das relações estão detalhadamente apresentadas no Tópico 6 do Material e Métodos.

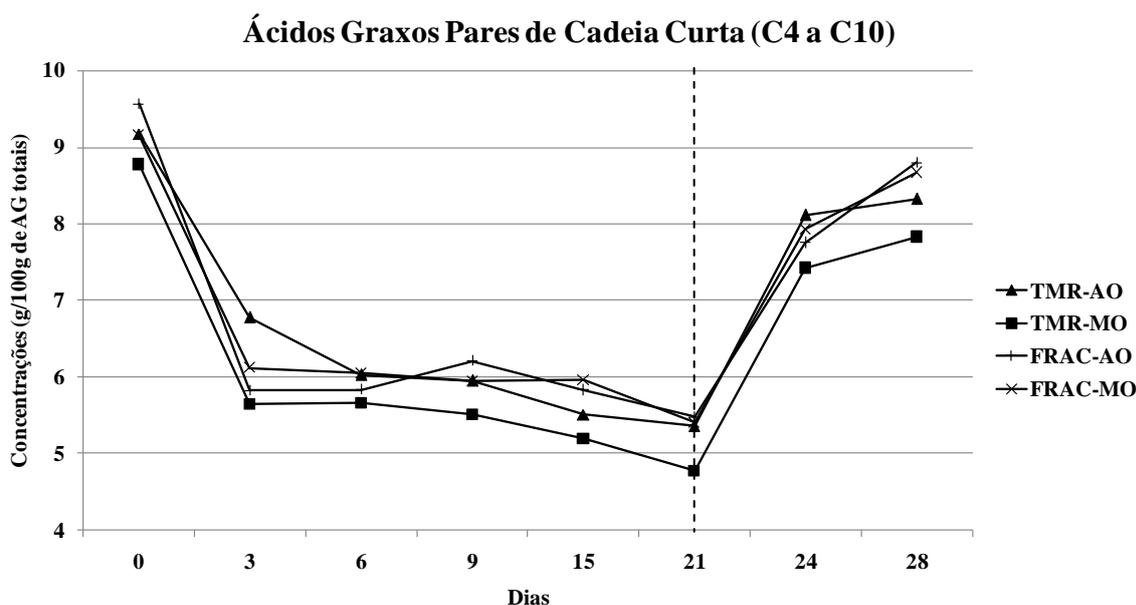
O tipo de OG consumido alterou o somatório dos teores dos AG de cadeia média no leite ( $P = 0,0377$ ), fazendo com que as concentrações médias dos dois modos de fornecimento passassem de 27,712 para 28,876 g/100 g de AG totais entre os tratamentos com OGAO e OGMO, respectivamente. No entanto, não provocou efeito sobre ( $P > 0,05$ ) os teores totais dos AG de cadeia curta no leite nem nas secreções diárias de ambos (Tabela 8).

As concentrações dos AG C12:0 e C14:0 no leite apresentam comportamento oposto ao do C16:0, ou seja, foram incrementadas ( $P < 0,05$ ) com o fornecimento do OGAO (Tabela 8). A explicação para esse comportamento está no fato de que o consumo diário de ácido palmítico foi mais elevado ( $P < 0,0001$ ;

71,859 versus 57,394 g/dia; Tabela 1) quando se forneceu OGMO. Isso sugere que o consumo diário do ácido palmítico foi quem definiu o seu comportamento na gordura do leite e não a ação dos inibidores da lipogênese. Isso ocorre porque, segundo Baldwin e Polounsky (1977), cerca de 50% do ácido palmítico secretado no leite é advindo da dieta e não da síntese *de novo* na glândula mamária. Esse comportamento explica porque o leite das vacas que consumiram as dietas sob a forma de TMR apresentou teores de ácido palmítico mais elevados, apesar dos teores mais altos de inibidores.

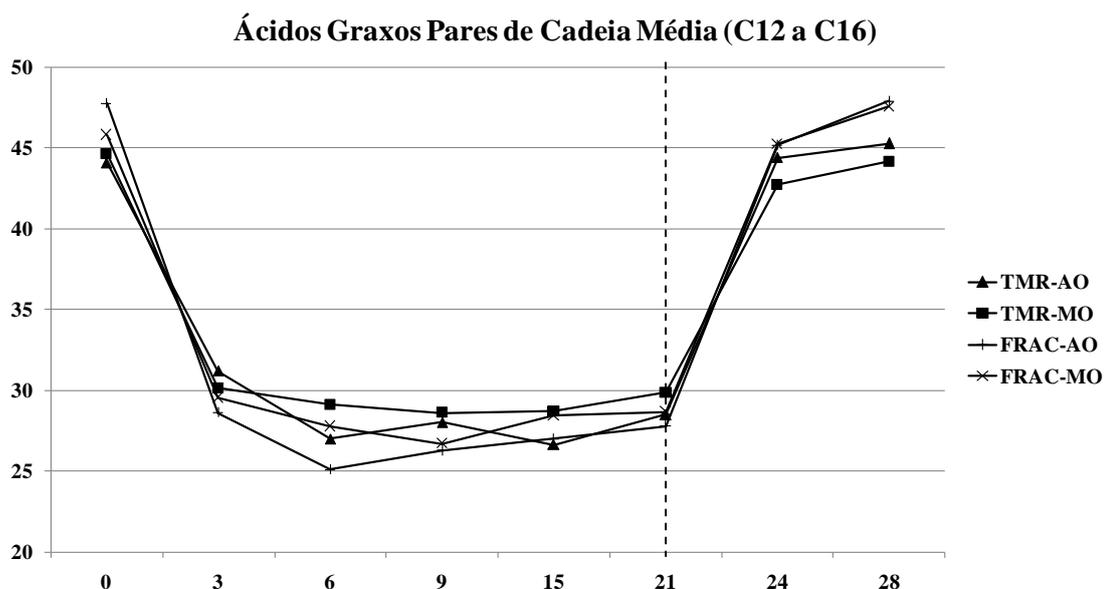
He *et al.* (2012) forneceram duas dietas (isoproteicas e isofibrosas; V:C = 50:50) à base de silagem de alfafa e silagem de milho na forma de TMR suplementadas com concentrados adicionados de 4,0% de óleos contendo: - alto teor de ácido oleico e baixo de linoleico (3,32 e 1,52% da MS, respectivamente); - médio teor de ácido oleico e baixo de linoleico (2,14 e 1,52% da MS, respectivamente). Assim como no presente experimento, os autores observaram redução ( $P < 0,05$ ) tanto dos teores (g/100 g de AG totais) como na produção diária (g/dia) dos AG de cadeia curta e média inferior a 16 C entre os tratamentos com médio e alto oleico, ou seja, à medida que se elevou o consumo de AGPI, especialmente, de C18:2. Essa observação reforça a teoria de que os AG C18:2 são mais eficientes em causar inibição da síntese *de novo* de AG que os C18:1 (Moon *et al.*, 2002; Sampath e Ntambi, 2005). Entretanto, como o consumo de C16:0 não apresentou variação entre os tratamentos (0,64 g de C16:0/100 g de MS consumida), seus teores apresentaram o mesmo comportamento dos demais AG de cadeia média, ou seja, reduziram com o aumento do consumo de AG C18:2.

Os teores dos AG de cadeia curta no leite foram reduzidos, de forma rápida, em cerca de 30%, após o início do fornecimento da suplementação com os OG, sugerindo que houve atuação de AG inibidores da lipogênese mamária. Já a partir do terceiro dia de fornecimento das dietas, foi observada tendência à estabilidade de sua concentração. Após o 21º dia, com a suspensão da suplementação, observou-se rápida elevação dos teores de AG de cadeia curta com número par de C no leite, apesar de, no período de sete dias, as concentrações originais observadas no dia 0 não terem sido alcançadas (Figura 16).



**Figura 16.** Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos de cadeia curta com número par de C (C4:0 a C10:0) no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

Assim como nos AG de cadeia curta, a concentração de AG saturados de cadeia média no leite também apresentaram comportamento de queda acentuada – também em cerca de 30% – até o terceiro dia de fornecimento da suplementação com os OG, seguido de manutenção dos teores até o fim do período experimental, e rápido retorno após o fim da suplementação aos teores originalmente observados no dia 0 (Figura 17). Entre o 15º e 21º dias observou-se que os tratamentos com suplementação com OGMO apresentaram valores mais baixos se comparados com aqueles em que o OGMO foi utilizado.



**Figura 17.** Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos de cadeia média com número par de C (C12:0 a C16:0) no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

### 7.3. Ácidos graxos saturados de cadeia longa

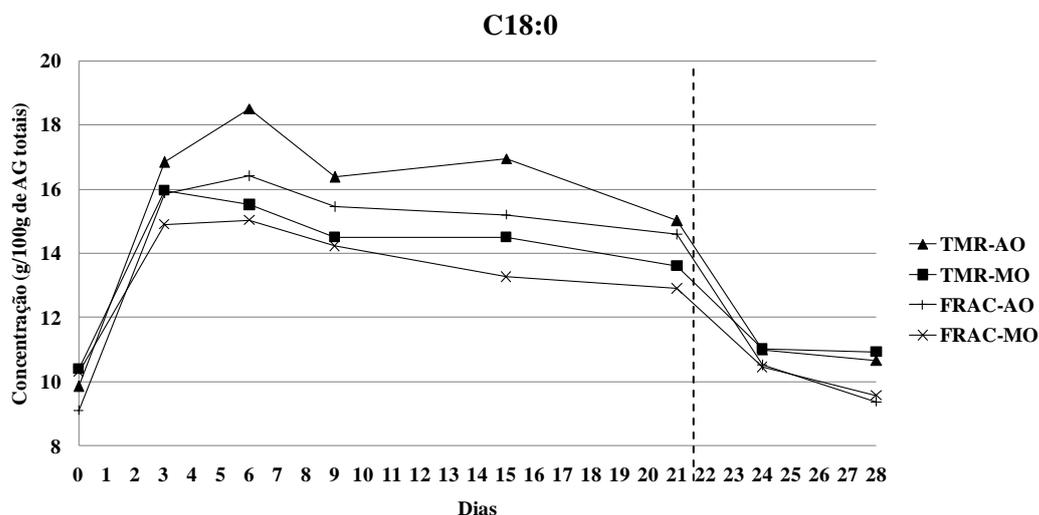
Segundo Baldwin e Polounsky (1977), todos os AG saturados com 18 ou mais C na cadeia que são secretados no leite são originados exclusivamente da dieta. Dentre eles, o ácido esteárico é o que, normalmente, apresenta os teores mais elevados no leite. No presente experimento, seus teores apresentaram-se mais elevados ( $P < 0,05$ ) no leite das vacas alimentadas com dietas sob a forma de TMR, do que no daquelas que receberam o concentrado no modo fracionado (Tabela 8) ( $P = 0,0365$ ; 15,263 *versus* 13,922 g/100 g de AG totais, respectivamente). Mesmo comportamento foi observado para o somatório dos teores dos AG de cadeia longa ( $P = 0,064$ ; 15,474 *versus* 14,122 g/100 g de AG totais), já que os demais AG saturados (C20:0, C22:0 e C24:0) apresentam concentrações muito baixas não influenciando, assim, no cômputo final. Sua secreção diária, entretanto, não apresentou variação ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos.

Os teores lácteos do ácido esteárico estão associados a três fatores: i) ao seu consumo na dieta; ii) ao grau de BH por que passam os AG poli-insaturados no rúmen (Bauman *et al.*, 2003; Loor *et al.*, 2005; Lock e Bauman, 2011) e ; iii) à atividade das enzimas desaturase nas células mamárias, em especial a  $\Delta^9$ -desaturase (Ntambi e Miyazaki, 2004). Soyeurt *et al.* (2008) observaram que, em média, cerca de 40% do ácido esteárico absorvido do plasma pela glândula mamária é convertido em ácido oleico via ação da  $\Delta^9$ -desaturase, fazendo com que mais de 50% deste AG secretado no leite bovino seja oriundo da ação dessa enzima. Assim, não é possível definir com segurança em que intensidade cada um dos fatores anteriormente citados agiram sobre as concentrações de ácido esteárico do leite. Entretanto, segundo os dados apresentados na Tabela 12, não houve variação na atividade da enzima  $\Delta^9$ -desaturase (índice de desaturase) sobre o ácido esteárico entre os dois fatores estudados (modo e OG) e nenhum dado sugere que houve variação do grau de BH ruminal entre os fatores. Isso sugere que a variação na concentração do ácido esteárico no leite ocorreu exclusivamente devido ao seu consumo (Tabela 1), que foi mais elevado nas vacas que receberam as dietas no modo TMR em relação às que consumiram o concentrado de forma fracionada ( $P = 0,0001$ ; 18,305 *versus* 16,402 g/dia, respectivamente).

Assim como no presente experimento, Loor *et al.* (2005) ofereceram diferentes fontes de óleo (girassol, linhaça e peixe) na dieta de vacas em lactação e observaram que os teores de esteárico lácteo foram proporcionais ao seu consumo diário. Entretanto, esse raciocínio não ajuda a explicar o efeito ( $P = 0,0043$ ) do tipo de OG sobre as concentrações de ácido esteárico no leite (Tabela 8). Os dados da Tabela 1 não sugerem efeito do tipo de OG sobre o consumo de ácido esteárico ( $P > 0,05$ ), mas suas concentrações no leite variaram ( $P = 0,0043$ ) em função do tipo de OG (Tabela 8), sendo de 15,538 e 13,647 g/100 g de AG totais para OGAO e OGMO, respectivamente. Isto sugere que houve diferenças nas taxas de BH dos AG consumidos nestes dois tratamentos. Sugestão esta, reforçada pelo maior teor de AGCIR encontrado nos tratamentos com inclusão de OGAO (Tabela 7).

Os demais AG saturados de cadeia com número par de C (C20:0; C22:0 e C24:0) apresentaram concentrações baixas (<0,17 g/100 g de AG totais; Tabela 8). Comportamento este esperado já que não há nenhuma rota metabólica celular conhecida para sua síntese (Yashodhara *et al.*, 2009), além de sua concentração nos alimentos ser naturalmente baixa.

As concentrações do ácido esteárico no leite apresentaram rápida elevação até o 3º dia após o início de fornecimento das dietas com os OG. A partir daí, não se observou padrão de comportamento. Ficou claro, apenas, que aqueles com adição de OGAO apresentaram teores de ácido esteárico mais elevados. Após a suspensão dos tratamentos no 21º dia, observou-se, em período de sete dias, o retorno aos teores originais observados antes do início da suplementação (Figura 18).



**Figura 18.** Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do ácido esteárico no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

## 7.4. Ácidos graxos insaturados

### 7.4.1. Ácidos graxos monoinsaturados *cis*

Os AG monoinsaturados *cis* podem ser originados de três diferentes fontes: i) diretamente da dieta, ao passarem pelo rúmen sem que sejam modificados pelas enzimas microbianas; ii) das rotas intermediárias da BH dos AG poli-insaturados; ou iii) da ação da enzima  $\Delta^9$ -desaturase sobre o ácido esteárico na glândula mamária. Aproximadamente, dois terços de todo ácido esteárico absorvido pela glândula mamária é metabolizado pela enzima  $\Delta^9$ -desaturase, explicando, em parte, a elevada concentração do ácido oleico no leite (Chilliard *et al.*, 2003b ; Haug *et al.*, 2007).

A elevação dos teores de AG *cis*, em especial do ácido oleico, nos produtos lácteos é de grande importância pois: i) é reconhecidamente benéfico à saúde humana, por ser capaz de reduzir os teores plasmáticos de colesterol LDL e de triglicérides (De Lorgeril *et al.*, 1994; Carter *et al.*, 1997; Kris-Etherton *et al.*, 1999; Mensink *et al.*, 2003; Nicolosi *et al.*, 2004); ii) é monoinsaturado, permitindo que esses produtos possuam maior vida de prateleira (Noakes *et al.*, 1996).

Os somatórios das concentrações dos AG *cis* apresentaram concentrações estáveis ( $P > 0,05$ ) no leite das vacas em função dos modos de fornecimento do concentrado (Tabela 1; 30,6 g /100 g de AG totais) e valores mais elevados ( $P = 0,0001$ ) nas dietas contendo OGAO (31,900 e 29,254 g/100 g de AG totais para os tratamentos com OGAO e OGMO, respectivamente). O efeito dos tipos de OG sobre os teores de AG *cis* no leite das vacas pode ser explicado por uma série de fatores, entre os principais: 1) o consumo de AG *cis* nas dietas com OGAO foi superior ao daquelas com inclusão de OGMO (Tabela 1); ii) o ácido oleico é menos propenso à BH ruminal se comparado aos demais AG insaturados (entre 13 e 42% menos reativo que o ácido linoleico) (Loor *et al.*, 2004; Doreau *et al.*, 2009); e iii) a BH dos AG poli-insaturados, em especial o ácido linoleico, produz AG intermediários com monoinsaturações, principalmente, do tipo *trans* (Shingfield *et al.*, 2010). Fato este, confirmado pelos elevados teores destes AG nas dietas em que foi incluído o OGMO (Tabela 9).

**Tabela 9.** Teores (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos mono e poli-insaturados no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado

Variável	TMR		Fracionado		EPM <sup>1</sup>	Efeitos		
	AO	MO	AO	MO		Modo	Óleo	M x Ó
C12:0 <i>cis</i> -9	0,047	0,045	0,038	0,038	0,0017	<0,0001	0,3844	0,6622
C14:1 <i>cis</i> -9	0,421	0,545	0,524	0,525	0,0366	0,2617	0,0996	0,1029
C16:1 <i>trans</i> -9	0,182	0,293	0,228	0,463	0,0120	<0,0001	<0,0001	<0,0001
C16:1 <i>cis</i> -9	0,813	0,968	0,777	0,924	0,0456	0,3849	0,0023	0,9426
C18:1 <i>trans</i> -4	0,129	0,082	0,142	0,083	0,0052	0,2188	<0,0001	0,2460
C18:1 <i>trans</i> -5	0,117	0,069	0,128	0,072	0,0041	0,0963	<0,0001	0,3202
C18:1 <i>trans</i> -6 a 8	1,134	0,838	1,237	0,729	0,0295	0,9229	<0,0001	0,0010
C18:1 <i>trans</i> -9	0,998	0,787	0,986	0,722	0,0271	0,1628	<0,0001	0,3385
C18:1 <i>trans</i> -10	0,817	0,744	0,727	0,661	0,0204	0,0002	0,0017	0,8484
C18:1 <i>trans</i> -11	3,383	5,454	4,482	7,969	0,1811	<0,0001	<0,0001	0,0005
C18:1 <i>trans</i> -12	0,764	0,859	0,730	0,844	0,0190	0,2030	<0,0001	0,6149
C18:1 <i>trans</i> -13 + <i>trans</i> -14	0,741	0,794	0,736	0,724	0,0243	0,1295	0,3974	0,1862
C18:1 <i>trans</i> -16	0,444	0,504	0,428	0,405	0,0148	0,0004	0,2206	0,0086
C18:1 <i>cis</i> -9 + <i>trans</i> -15	28,654	26,833	29,099	25,213	0,5292	0,2751	<0,0001	0,0600
C18:1 <i>cis</i> -11	1,132	1,078	1,153	1,075	0,0442	0,8379	0,1448	0,7879
C18:1 <i>cis</i> -12	0,258	0,404	0,224	0,258	0,0149	<0,0001	<0,0001	0,0006
C18:1 <i>cis</i> -13	0,143	0,120	0,144	0,105	0,0065	0,2837	<0,0001	0,2020
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -12	0,100	0,112	0,080	0,097	0,0043	0,0002	0,0016	0,6304
C18:2 <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -12 + <i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15	0,035	0,060	0,038	0,085	0,0041	0,0019	<0,0001	0,0096
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	0,994	1,154	0,991	1,277	0,0405	0,1497	<0,0001	0,1309
C18:3 <i>cis</i> -6 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	0,023	0,023	0,026	0,031	0,0023	0,0185	0,3308	0,3308
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	0,093	0,092	0,094	0,104	0,0060	0,2724	0,5155	0,3493
C20:1 <i>cis</i> -9	0,125	0,129	0,118	0,125	0,0033	0,0942	0,1013	0,7661
C20:1 <i>cis</i> -11	0,061	0,061	0,072	0,065	0,0021	0,0012	0,1035	0,1035
C20:2 ω-6	0,013	0,013	0,013	0,015	0,0008	0,2528	0,0611	0,1599
C20:3 ω-6	0,033	0,036	0,033	0,032	0,0020	0,4493	0,7042	0,3147
C20:4 ω-6	0,061	0,058	0,061	0,067	0,0041	0,3389	0,6579	0,2441
C20:5 ω-3 (EPA)	0,047	0,036	0,046	0,034	0,0039	0,7390	0,0079	0,8864
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 + <i>trans</i> -7 <i>cis</i> -9	1,297	2,149	1,807	3,241	0,0885	<0,0001	<0,0001	0,0025
CLA <i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11	0,043	0,062	0,055	0,083	0,0041	0,0003	<0,0001	0,2272
CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0,019	0,026	0,019	0,029	0,0021	0,6012	0,0005	0,5233
Σ CLA	1,359	2,237	1,880	3,353	0,0900	<0,0001	<0,0001	0,0024
Σ Inibidores <sup>2</sup>	0,062	0,088	0,074	0,112	0,0043	0,0003	<0,0001	0,1630

*continua*

Variável	TMR		Fracionado		EPM <sup>1</sup>	Efeitos		
	AO	MO	AO	MO		Modo	Óleo	M x O
Σ Monoin saturados Pares								
<i>cis</i>	31,653	30,181	32,148	28,326	0,6058	0,2701	0,0001	0,0614
<i>trans</i>	8,701	10,421	9,819	12,667	0,2249	<0,0001	<0,0001	0,0169
Total	40,359	40,601	41,966	40,993	0,5329	0,0698	0,4979	0,2627
Σ C18:1	38,711	38,562	40,210	38,855	0,8464	0,0749	0,1319	0,2239
Σ Poli-insaturados								
ω-3 <i>cis cis</i>	0,140	0,128	0,142	0,139	0,0069	0,3710	0,2689	0,5182
ω-6 <i>cis cis</i>	1,122	1,283	1,122	1,421	0,0426	0,1147	<0,0001	0,1147
Σ C18 ω-6 <i>trans</i>	0,135	0,173	0,118	0,182	0,0066	0,5293	<0,0001	0,0559
Hipo:hiper	1,0334	0,925	1,074	0,894	0,0279	0,8728	<0,0001	0,2058
ω-6:ω-3	8,179	10,136	8,094	10,427	0,3368	0,7617	<0,0001	0,5793

<sup>1</sup>Erro padrão da média; <sup>2</sup>As fórmulas utilizadas no cálculo das relações estão detalhadamente apresentadas no Tópico 6 do Material e Métodos.

Segundo o USDA (2005), os AG monoin saturados *cis* estão presentes em concentrações entre 23 e 32% do total de AG da gordura láctea bovina, sendo que o ácido oleico, seu principal representante, participa com, aproximadamente, 93% desse montante. No presente experimento, ele participou com 89 a 91% dos AG *cis* (Tabela 9). Os modos de fornecimento do concentrado não influenciou ( $P>0,05$ ) os teores de ácido oleico no leite, e a suplementação com OGAO elevou ( $P<0,0001$ ) suas concentrações em 11% (26,023 *versus* 28,876 g/100 g de AG totais) em relação às dietas com inclusão de OGMO, refletindo, assim, em sua secreção diária ( $P = 0,0186$ ; 124,0 *versus* 106,0 g/dia) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Secreção diária (g/dia) dos ácidos graxos mono e poli-insaturados do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado

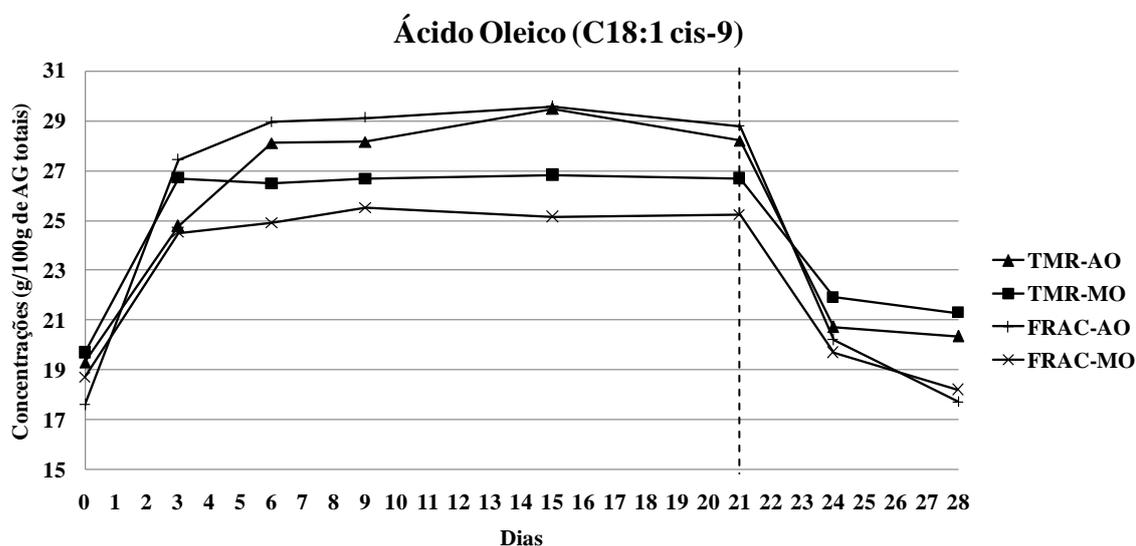
Variável	TMR		Fracionado		EPM <sup>1</sup>	Efeitos		
	AO	MO	AO	MO		Modo	Óleo	M x O
C16:1 <i>trans-9</i>	0,720	1,114	1,054	2,005	0,0824	<0,0001	<0,0001	0,0023
C18:1 <i>trans-11</i>	13,705	20,819	20,828	34,719	1,7564	<0,0001	<0,0001	0,0514
C18:1 <i>cis-9 + trans-15</i>	114,75	102,57	133,26	109,47	7,1178	0,0893	0,0186	0,4290
C18:2 <i>cis-9 cis-12</i>	3,860	4,451	4,588	5,560	0,3508	0,0151	0,0363	0,5977
C18:3 <i>cis-9 cis-12 cis-15</i>	0,338	0,351	0,439	0,454	0,0355	0,0082	0,7053	0,9761
CLA <i>cis-9 trans-11 + CLA trans-7 cis-9</i>	5,244	8,136	8,255	14,113	0,5936	<0,0001	<0,0001	0,0199
CLA <i>trans-9 cis-11</i>	0,175	0,234	0,249	0,358	0,0195	<0,0001	0,0002	0,2129
CLA <i>trans-10 cis-12</i>	0,074	0,098	0,087	0,121	0,0094	0,0707	0,0051	0,5945
Σ Monoin saturados <i>trans</i>	35,335	39,853	45,189	55,135	2,9093	0,0002	0,0205	0,3665
Σ Poli-insaturados								
ω-3 <i>cis cis</i>	0,543	0,488	0,663	0,607	0,0534	0,0354	0,3156	0,9869
ω-6 <i>cis cis</i>	4,356	4,956	5,202	6,194	0,3958	0,0145	0,0575	0,6282

<sup>1</sup>Erro padrão da média.

He *et al.* (2012) forneceram duas dietas (isoproteicas e isofibras; 4,0% de óleo e 7,0% de EE; V:C = 50:50) à base de silagem de alfafa e silagem de milho na forma de TMR e suplementadas com concentrados adicionados de óleos contendo: - alto teor de ácido oleico e baixo de linoleico (3,32 e 1,52% da MS, respectivamente); - médio teor de ácido oleico e baixo de linoleico (2,14 e 1,52% da MS, respectivamente) para vacas em lactação e, assim como no presente experimento, também observaram elevação ( $P < 0,05$ ) nos teores e na secreção diária do ácido oleico no tratamento com maior teor desse AG.

Resultados semelhantes observaram Abughazaleh *et al.* (2003) ao fornecerem dietas baseadas em feno de alfafa e silagem de milho (isoproteicas, isofibras e isoenergéticas; 4,5% de óleo; V:C = 50:50) suplementadas com dois tipos de OG com teores contrastantes dos ácidos oleico e linoleico para vacas primíparas Holandês. Os autores observaram teores de ácido oleico ligeiramente mais elevados ( $P < 0,01$ ; 20,0 *versus* 21,5 g/100 g de AG totais) nos tratamentos suplementados com OGAO.

As concentrações de ácido oleico no leite foram elevadas em, aproximadamente, 31%, de forma rápida após o início do fornecimento da suplementação com os OG e, a partir do sexto dia de fornecimento das dietas, foi observada relativa estabilidade nos tratamentos até o 21º. A partir daí, com a suspensão da suplementação dos OG, no período de sete dias, observou-se rápida queda dos teores de ácido oleico no leite, cujas concentrações ficaram próximas daquelas observadas antes do início da suplementação lipídica.



**Figura 19.** Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do ácido oleico no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

#### 7.4.2. Ácidos graxos monoinsaturados *trans*

O ácido palmitelaídico (C16:1 *trans*-9) tem-se destacado como importante regulador glicêmico, apesar da necessidade de pesquisas sobre sua origem, seus mecanismos de ação e seu consumo diário capaz de gerar função terapêutica. Já se sabe, porém, que suas principais fontes são os óleos de peixe e, principalmente, as gorduras dos ruminantes (Destailats *et al.*, 2000). Assim, faz-se necessária a busca da maximização de sua concentração na gordura do leite.

Tanto os teores quanto a secreção diária do ácido palmitelaídico apresentaram interação ( $P < 0,0001$ ) de efeitos de modo de fornecimento do concentrado e de tipo de OG (Tabela 10). As vacas que consumiram as dietas fornecidas como TMR, produziram leite com concentrações deste AG mais baixas que o daquelas que receberam concentrado fornecido de modo fracionado (Tabela 10a), sugerindo que o ambiente ruminal possui papel relevante sobre sua síntese. Comparando os tipos de OG, foi observado que o leite das vacas que consumiram dietas com OGMO apresentou concentrações de ácido palmitelaídico superiores às obtidas no leite daquelas que receberam suplemento contendo o OGAO (Tabela 10a). Esse comportamento sugere que esse AG seja sintetizado, provavelmente, no rúmen, tendo como substrato o ácido palmítico,

considerando-se que o consumo deste foi superior ( $P = 0,0001$ ) quando do fornecimento do OGMO (Tabela 1). A secreção diária do ácido palmítico apresentou comportamento semelhante ao observado pelos seus teores ( $P < 0,0001$ ), com valores mais elevados no leite das vacas que receberam concentrado de modo fracionado e com o fornecimento do OGMO (Tabela 10a).

**Tabela 9a.** Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) do ácido C16:1 *trans*-9 no leite

Óleo	Modo	
	TMR	Fracionado
	AO	0,182 <sup>Bb</sup>
MO	0,293 <sup>Ab</sup>	0,463 <sup>Aa</sup>

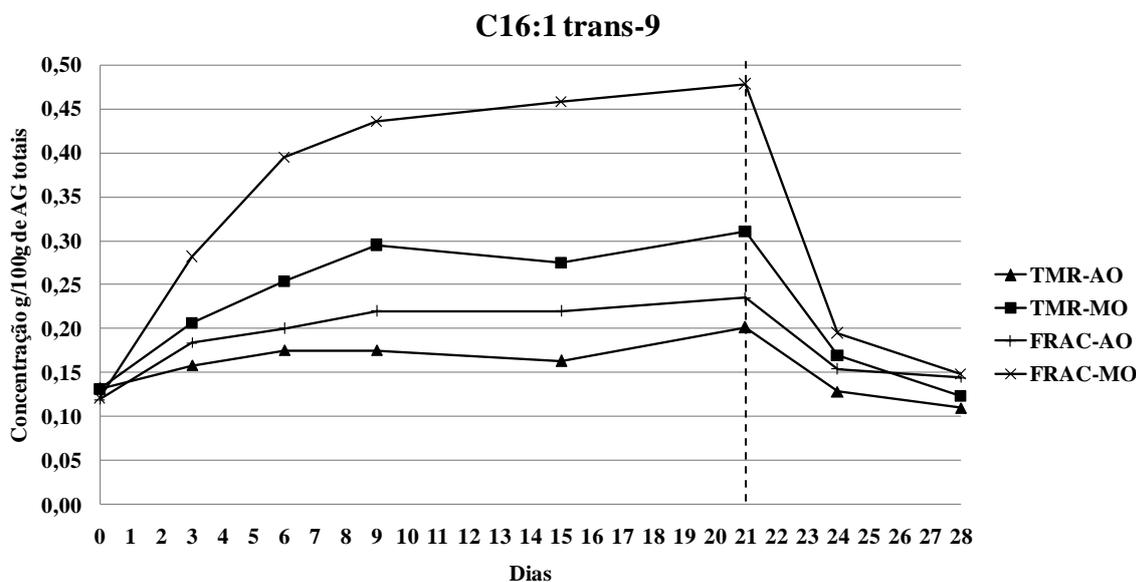
Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 0,0120.

**Tabela 10a.** Desdobramento das médias das secreções diárias (g/dia) do ácido C16:1 *trans*-9 no leite

Óleo	Modo	
	TMR	Fracionado
	AO	0,720 <sup>Bb</sup>
MO	1,114 <sup>Ab</sup>	2,006 <sup>Aa</sup>

Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 0,8803.

A evolução temporal dos teores do ácido palmítico no leite evidencia a variação de comportamento entre os diversos tratamentos (Figura 20), onde se destacam os elevados teores observados no leite das vacas que receberam concentrado contendo OGMO fornecido de modo fracionado. A elevação dos teores do ácido palmítico no leite foi gradativa, sendo que para os tratamentos cujos concentrados foram fornecidos no modo fracionado, os valores parecem não ter estabilizado até o final do experimento (21º dia). Entretanto, já no terceiro dia após a suspensão dos tratamentos (24º dia), os teores retornaram para valores próximos aos iniciais.



**Figura 20.** Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do C16:1 *trans*-9 (ácido palmítico) no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

Poucos foram os experimentos que avaliaram o comportamento do ácido oleico no rúmen, mas já se sabe que, assim como para a BH do ácido linoleico, a sua BH pode dar origem ao ácido esteárico (Harfoot e Hazlewood, 1988) e a grande variedade de intermediários C18:1 *trans* (Shingfield *et al.*, 2010). Então, apesar dos teores totais de AG C18:1 *trans* terem sido inferiores ( $P < 0,0001$ ) se comparados aos dos tratamentos com OGMO, observaram-se concentrações ( $P < 0,0017$ ) mais altas de C18:1 *trans* com insaturações abaixo dos carbonos 9 – 10 nos tratamentos com OGMO (Tabela 9). Deve-se destacar também a diferença apresentada entre os teores do ácido vacênico dos tratamentos com OGMO e OGMO, cuja origem se dá, principalmente, a partir da BH do ácido linoleico (Shingfield *et al.*, 2010), presente em maiores concentrações nas dietas suplementadas com OGMO.

Segundo Collomb *et al.* (2004), tanto os teores do AG C18:1 *trans-7* como os do CLA *trans-7 cis-9* são significativamente mais elevados na gordura do leite de vacas alimentadas com dietas ricas em ácido oleico. Confirmando essa afirmação, os teores observados dos AG C18:1 *trans-6* a C18:1 *trans-8* foram mais elevados ( $P < 0,0001$ ) nas dietas suplementadas com OGAO em detrimento ao OGMO (1,186 *versus* 0,784 g/100 g de AG totais), sugerindo que grande parte desse montante seja formado pelo AG C18:1 *trans-7*.

Os modos de fornecimento dos concentrados influenciaram os teores dos AG C18:1 *trans-10*, C18:1 *trans-16* e vacênico. Inversamente ao esperado, os teores do C18:1 *trans-10* foram mais elevados ( $P = 0,0002$ ) no leite das vacas que consumiram as dietas sob a forma de TMR do que no daquelas que receberam concentrado de modo fracionado (0,781 *versus* 0,694 g/100 g de AG totais). Esse comportamento sugere que o modo TMR permitiu maior queda de pH se comparado ao fracionado.

Os tratamentos com OGAO apresentaram teores mais elevados ( $P = 0,0017$ ) de C18:1 *trans-10* no leite que os com OGMO (Tabela 9; 0,772 *versus* 0,702 g/100 g de AG totais). Isto ocorreu, provavelmente, porque o AG C18:1 *trans-10*, por ser intermediário comum da BH dos ácidos oleico e linoleico, foi sintetizado em maior quantidade no leite das vacas que consumiram OGAO, onde foi verificado maior consumo dos ácidos oleico e linoleico (Tabela 1).

O ácido vacênico é o principal produto intermediário da BH ruminal do ácido linoleico. Secundariamente, há a formação de outros AG monoinsaturados como o C18:1 *trans-10*, C18:1 *trans-12*, C18:1 *trans-13* e C18:1 *trans-16* (Shingfield *et al.*, 2010). Observou-se interação entre o modo de fornecimento do concentrado e o tipo de OG ( $P = 0,0005$ ) para a concentração de ácido vacênico no leite (Tabela 9). As vacas que receberam dietas sob a forma de TMR apresentaram leite com concentrações mais baixas ( $P < 0,05$ ) de ácido vacênico do que no daquelas que consumiram concentrado fornecido de modo fracionado (Tabela 9b). Com relação aos tipos de OG, o leite das vacas que consumiram OGMO apresentou concentrações de ácido vacênico superiores às do leite daquelas que receberam dietas com OGAO (Tabela 9b). Houve efeito ( $P < 0,0001$ ) do modo de fornecimento do concentrado e do tipo de OG sobre a secreção diária de ácido vacênico, com as maiores produções deste AG sendo observadas nas vacas que receberam o modo fracionado de fornecimento de concentrado e consumiram dietas com OGMO (Tabela 10).

**Tabela 9b.** Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) do ácido C18:1 *trans-11* no leite

		Modo	
		TMR	Fracionado
Óleo	AO	3,383 <sup>Bb</sup>	4,482 <sup>Ba</sup>
	MO	5,456 <sup>Ab</sup>	7,969 <sup>Aa</sup>

Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 0,1811

**Tabela 9c.** Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) do somatório dos ácidos monoinsaturados *trans* no leite

		Modo	
		TMR	Fracionado
Óleo	AO	8,707 <sup>Bb</sup>	9,819 <sup>Ba</sup>
	MO	10,421 <sup>Ab</sup>	12,667 <sup>Aa</sup>

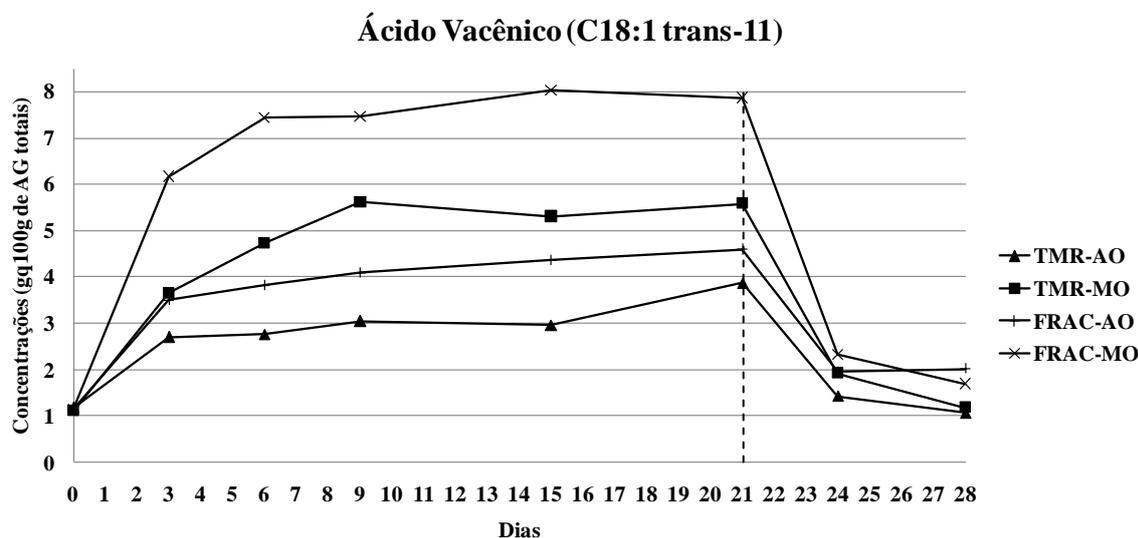
Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 0,2249

He *et al.* (2012), forneceram dietas com níveis constantes de ácido linoleico e crescentes de ácido oleico e não observaram efeito ( $P > 0,05$ ) nos teores nem na produção diária de ácido vacênico ou de rumênico da gordura do leite. Rego *et al.* (2009) também não encontraram elevação nos teores de vacênico ou de rumênico quando vacas em lactação sob pastejo receberam suplemento com óleo de colza (rico em ácido oleico). Esses resultados reforçam a idéia de que o ácido linoleico, mas não o ácido oleico, é um importante precursor do vacênico e, conseqüentemente, do rumênico.

O somatório das concentrações dos AG monoinsaturados *trans* apresentou interação ( $P = 0,0169$ ) entre o modo de fornecimento do concentrado e o tipo de OG (Tabela 9), à semelhança do que foi observado para os teores de ácido vacênico no leite. Foram observados teores dos AG monoinsaturados *trans* mais elevados ( $P < 0,05$ ) no leite das vacas que receberam concentrado de modo fracionado e quando consumiram as dietas com OGMO (Tabela 9). A justificativa para os comportamentos equivalentes está no fato de que o vacênico compõe mais de 50% do somatório.

Os elevados teores de AG monoinsaturados *trans* no leite das vacas que receberam o concentrado de modo fracionado estão coerentes com suas menores concentrações de ácido esteárico no leite obtidos nesses tratamentos.

A elevação dos seus teores foi crescente e gradativa até, aproximadamente, o 6º dia de fornecimento das dietas suplementadas com OG, quando os valores se apresentaram relativamente estáveis até o final do fornecimento da suplementação (21º dia). Entretanto, já no terceiro dia após a suspensão dos tratamentos (24º dia), os teores retornaram a valores próximos dos iniciais (Figura 21).



**Figura 21.** Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do ácido vacênico no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

#### 7.4.3. Ácidos graxos poli-insaturados

O ácido linoleico  $\omega$ -6, o  $\alpha$ -linolênico  $\omega$ -3 e os isômeros de CLA são os principais AGPI presentes na gordura láctea (Parodi, 1997; Jensen, 2002; O'Donnell-Mengaro *et al.*, 2011). Suas concentrações são dependentes do seu nível de ingestão – no caso dos  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 – e do grau de BH ruminal dos AG. Assim, as estratégias para aumentar seus teores no leite normalmente envolvem a utilização de alimentos ricos nesses AG (*e.g.* soja, girassol, linhaça, óleo de peixe, forrageiras C3) e/ou processos que reduzam a BH ruminal (*e.g.* aumento do fluxo ruminal, utilização de gordura protegida) (Lock e Bauman, 2004; Palmquist, 2009). No caso do CLA, o único isômero que se apresenta em concentrações significativas no leite e, por consequência, passível de causar efeitos fisiológicos benéficos à saúde humana, é o ácido rumênico (CLA *cis*-9 *trans*-11) (Pariza *et al.*, 2000).

Os teores do ácido linoleico  $\omega$ -6 no leite sofreram influência ( $P < 0,0001$ ) apenas do tipo de OG (Tabela 9; 0,992 *versus* 1,216 g/100 g de AG totais para os tratamentos com OGAO e OGMO, respectivamente). Esse comportamento pode ser explicado pelo elevado consumo deste AG nos tratamentos com OGMO (72% maior que no OGAO; Tabela 1) que impediram que todo o ácido linoleico  $\omega$ -6 sofresse BH, e pela possível redução da atividade microbiana evidenciada pela redução dos AGCIR (Tabela 7). Os teores dos somatórios dos AG poli-insaturados  $\omega$ -6 seguiram o mesmo comportamento do ácido linoleico  $\omega$ -6 (Tabela 9), reflexo da sua alta participação no cálculo deste somatório (89%). Diferentemente do ácido linoleico, os teores dos demais AG  $\omega$ -6, quais sejam, C20:2; C20:3 e C20:4 não sofreram influência ( $P > 0,05$ ) dos fatores estudados (Tabela 9).

Apesar de se apresentar em concentrações significativas na composição do OGMO (2,6%; Tabela 5), o ácido  $\alpha$ -linolênico  $\omega$ -3 não sofreu influência ( $P > 0,05$ ) dos fatores estudados (Tabela 9). Esse comportamento pode ser parcialmente justificado haja vista ser este AG altamente propenso à BH ruminal (Lor *et al.*, 2004; Doreau *et al.*, 2009). Tal suposição é reforçada pelos elevados ( $P < 0,0001$ ) teores do AG C:18:2 *trans*-11 *cis*-15 observados no leite das vacas que consumiram dietas com OGMO (Tabela 9); 0,037 e 0,073 g/100 g de AG totais para os tratamentos com OGAO e OGMO, respectivamente). O AG C18:2

*trans*-11 *cis*-15 é um dos mais importantes intermediários da BH ruminal do ácido  $\alpha$ -linolênico  $\omega$ -3 (Destailats *et al.*, 2005; Wasowska *et al.*, 2006). Ressalte-se que nas condições de injeção cromatográficas utilizadas ele co-eluiu, ou seja, gerou um pico no cromatograma no mesmo tempo de retenção que o isômero de linoleico C18:2 *trans*-9 *cis*-12 (normalmente presente na gordura láctea em concentrações muito baixas). O AG C18:2 *trans*-11 *cis*-15, de modo geral, pode ser encontrado em concentrações significativas na gordura do leite de vacas consumindo dietas ricas em espécies forrageiras C3 pastejadas ou quando há suplementação com óleos ricos em ácido  $\alpha$ -linolênico  $\omega$ -3 (Bargo *et al.*, 2006; Palladino *et al.*, 2009).

Os teores dos AG C18:2 *trans*-9 *cis*-12 + C18:2 *trans*-11 *cis*-15 apresentaram interação ( $P < 0,05$ ) de efeitos de modo de fornecimento do concentrado e de tipo de OG (Tabela 9), mostrando que quando foi utilizado o OGMO, o modo fracionado de fornecimento do concentrado promoveu incremento ( $P < 0,05$ ) nas suas concentrações no leite das vacas (Tabela 9d).

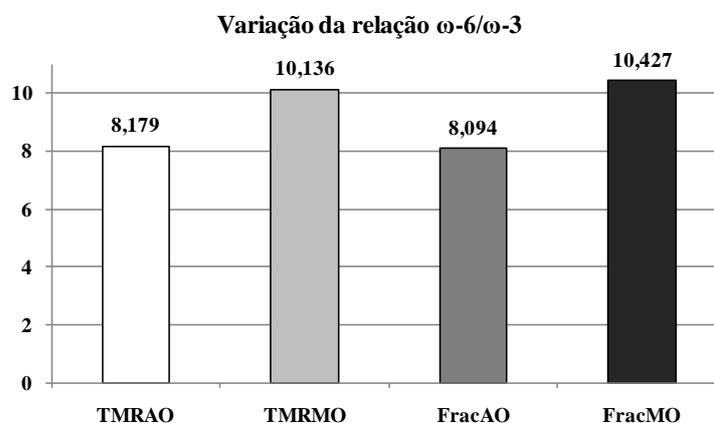
**Tabela 9d.** Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos C18:2 *trans*-9 *cis*-12 + C18:2 *trans*-11 *cis*-15 no leite

		Modo	
		TMR	Fracionado
Óleo	AO	0,035 <sup>Ba</sup>	0,038 <sup>Ba</sup>
	MO	0,060 <sup>Ab</sup>	0,085 <sup>Aa</sup>

Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 0,0041

A relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3 é um importante parâmetro utilizado para classificar a qualidade nutricional das gorduras, óleos, alimentos e dietas. Dietas com relações entre 2:1 e 3:1 têm sido as mais recomendadas, por possibilitar maior conversão do ácido  $\alpha$ -linolênico a ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 *cis*-4 *cis*-7 *cis*-10 *cis*-13 *cis*-16 *cis*-19), alcançando valores máximos em torno de 2,3:1. Na gordura do leite, essa relação tende a ser mais alta, sendo influenciada pelo regime alimentar, permitindo que alguns produtos de ruminantes se tornem importantes fontes de AG  $\omega$ -3 na dieta humana (Haug *et al.*, 2007).

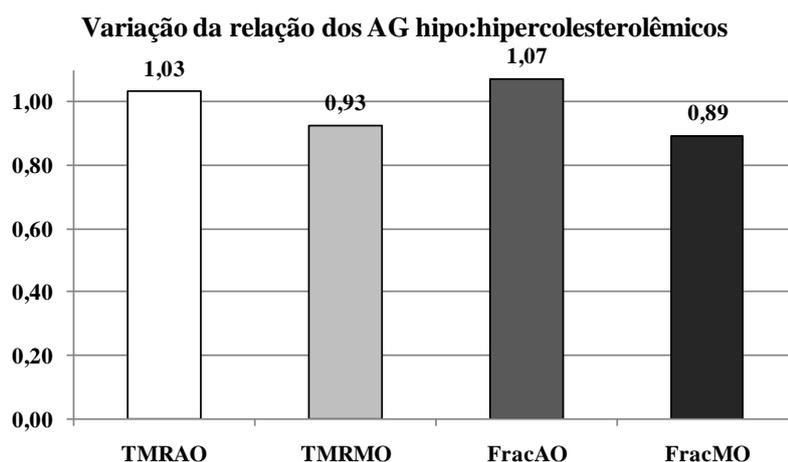
A relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3 sofreu influência ( $P < 0,0001$ ) apenas do tipo de OG fornecido (Tabela 9), com valores de 8,1 e 10,3 para os tratamentos com OG AO e OGMO, respectivamente (Figura 22). Tal comportamento se explica devido à estabilidade e baixos teores absolutos de AG  $\omega$ -3 no leite obtido de todos os tratamentos e ao aumento dos teores de AG  $\omega$ -6 no leite das vacas que receberam dietas com OGMO em relação a daquelas que consumiram OG AO. O aumento da relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3 é indesejável do ponto de vista de saúde humana já que, apesar do AG  $\omega$ -6 ser considerado essencial, níveis elevados do mesmo podem ser responsáveis por desencadear uma série de disfunções fisiológicas, como a formação de trombos, de ateromas e de desordens imunológicas (Martin *et al.*, 2006; Simopoulos, 2008). Além disso, os valores ficaram acima dos 2,3:1 recomendados por Martin *et al.* (2006).



**Figura 22.** Relação entre as concentrações dos ácidos graxos  $\omega$ -6: $\omega$ -3 do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

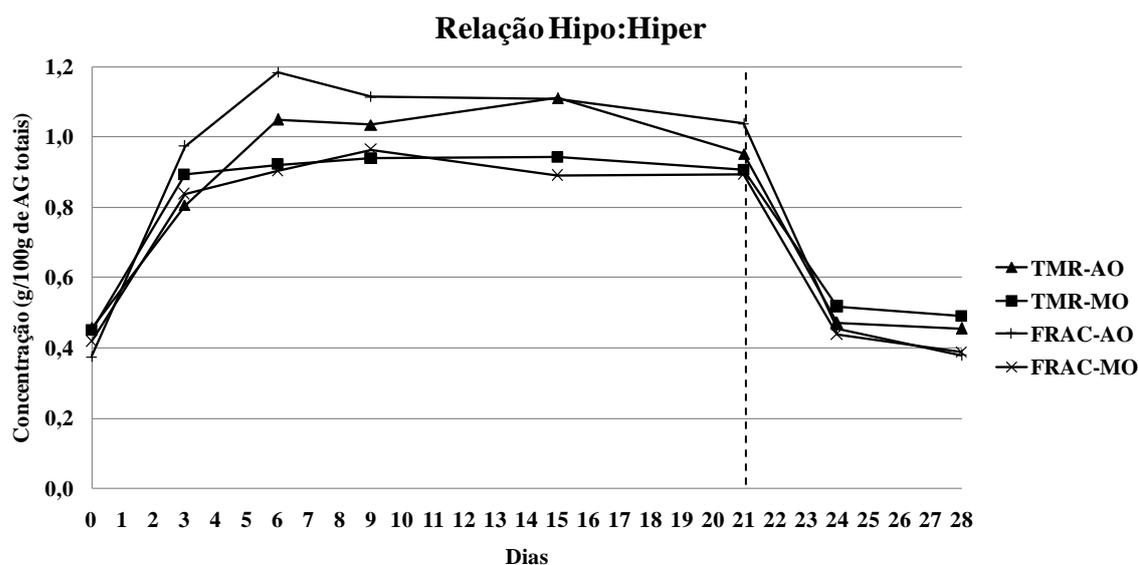
Essa relação é, de modo geral, pouco explorada nos trabalhos que apresentam resultados de perfis de AG da gordura do leite. Uma exceção foi o artigo de Petit (2003), que testaram os efeitos do tratamento de sementes de linhaça e girassol com formaldeído sobre o perfil de AG do plasma e do leite de vacas Holandês. Os autores observaram relações  $\omega$ -6: $\omega$ -3 de 2,3; 8,4; 1,7 e 8,2 para os tratamentos com sementes de linhaça e de girassol tratados, e sementes de linhaça e de girassol não tratadas com formaldeído, respectivamente. Como era de se esperar, os tratamentos à base de linhaça apresentaram relações  $\omega$ -6: $\omega$ -3 baixas já que o óleo dessa semente é rico em ácido  $\alpha$ -linolênico (57%). Entretanto, os tratamentos com a adição de girassol, fonte de ácido linoleico, apresentaram valores semelhantes aos obtidos nos tratamentos com a adição de OGAO do presente experimento. No primeiro experimento da presente Tese, as relações  $\omega$ -6: $\omega$ -3 apresentaram valores variando entre 6,23 e 8,86 para os tratamentos com a adição de 0 e 3,7% do OG na MS das dietas.

Outra relação utilizada para avaliar a qualidade nutricional das gorduras, dos óleos, alimentos e dietas, é a proporção entre os AG hipo (C18:1 *cis*-9; C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15 e C20:5  $\omega$ -3) e hipercolesterolêmicos (C12:0; C14:0 e C16:0). Ressalte-se que quanto mais alto o valor desta relação, mais interessante é do ponto de vista de saúde humana. No presente experimento, a relação hipo:hiper sofreu influência ( $P < 0,0001$ ) apenas do tipo de OG (Tabela 9), cujos valores foram 1,05 e 0,90 para os tratamentos com OGAO e OGMO, respectivamente (Figura 23). Esse comportamento foi resultado de dois fatores agindo simultaneamente: a redução dos teores de AG saturados de cadeia carbônica média (Tabela 8) e a concomitante elevação dos teores de AG monoinsaturados, em especial, do ácido oleico no leite das vacas que receberam os tratamentos com OGAO (Tabela 9).



**Figura 23.** Relação entre os ácidos graxos hipo e hipercolesterolêmicos no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

As relações entre as concentrações dos AG hipo e hipercolesterolêmicos (Hipo:Hiper) se elevaram rápida e uniformemente até o 3º dia, resultado da redução da síntese *de novo* de AG (Figura 17) e da elevação dos teores de AG insaturados em resposta à suplementação com OG (Tabela 9). A partir do 6º dia, percebe-se que os tratamentos suplementados com OGAO apresentaram valores mais elevados para a relação Hipo:Hiper se comparados aos obtidos das dietas com OGMO. No período avaliado não observou-se estabilidade na relação. Assim como ocorreu com os teores de AG saturados e do ácido oleico, observou-se rápida queda nos valores da relação após a suspensão dos tratamentos (Figura 24).



**Figura 24.** Evolução temporal da relação das concentrações dos ácidos graxos hipo:hipercolesterolêmicos da gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

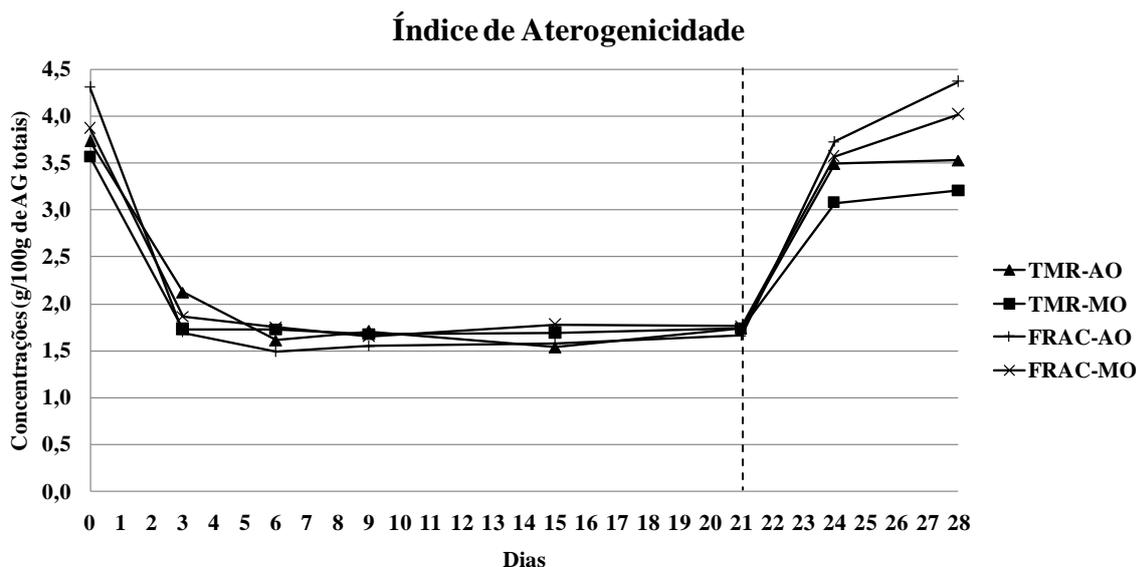
Os índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT) propostos por Ulbright e Southgate (1991) sofreram influência ( $P < 0,05$ ) apenas do tipo de OG oferecido (Tabela 11). O IA reduziu ( $P = 0,04$ ) seus valores de 1,742 para 1,628 com a adição de OGAO à dieta. Mesmo comportamento foi observado para o IT, reduzindo ( $P = 0,0062$ ) de 2,922 para 2,700 com a adição do OGAO à dieta. O incremento na qualidade nutricional da gordura do leite se deveu, basicamente, à redução dos teores de AG saturados de cadeia curta e média e à elevação dos teores do ácido oleico, já que os demais AGPI não apresentaram variações relevantes (Tabela 11).

**Tabela 11.** Índices de aterogenicidade (IA) e de trombogenicidade (IT) da gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado

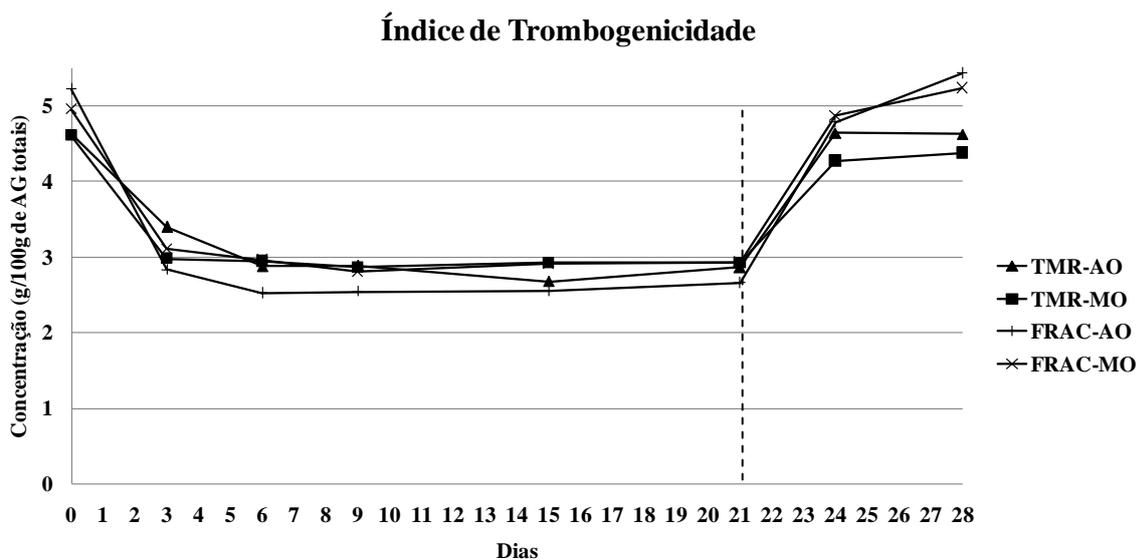
Índice	TMR		Fracionado		EPM <sup>1</sup>	Efeitos		
	AO	MO	AO	MO		Modo	Óleo	Modo x Óleo
IA	1,640	1,712	1,615	1,772	0,0534	0,7447	0,0406	0,4326
IT	2,791	2,926	2,608	2,918	0,0758	0,2154	0,0062	0,2566

<sup>1</sup>Erro padrão da média.

O comportamento dos IA e IT (Figuras 25 e 26, respectivamente) durante o período de fornecimento da dieta foi semelhante, ou seja, ambos apresentaram redução abrupta e intensa dos seus valores já nos primeiros três dias de fornecimento das dietas com os OG (cerca de 52% para o IA e 37% para o IT). A partir do 6º dia, seus valores se estabilizaram sendo que, devido à escala apresentada, não é possível verificar os valores mais baixos dos tratamentos com OGAO. No terceiro dia após a suspensão dos tratamentos (24º dia) os índices retornaram a valores próximos dos iniciais.



**Figura 25.** Evolução temporal do índice de aterogenicidade da gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.



**Figura 26.** Evolução temporal do índice de trombogenicidade da gordura do leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

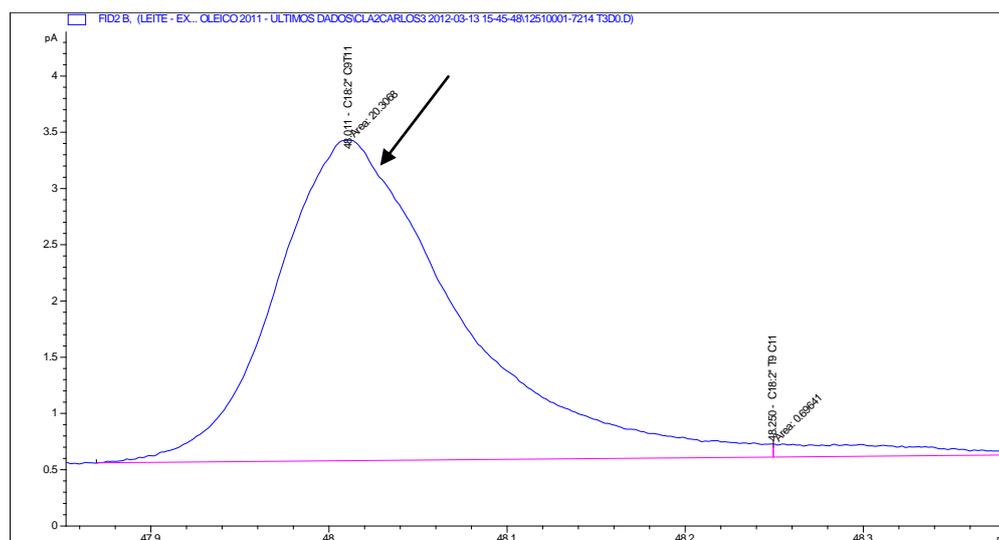
#### 7.4.4. Ácidos linoleicos conjugados

Segundo Corl *et al.* (2002), o isômero CLA *trans*-7 *cis*-9 é sintetizado exclusivamente a partir da ação da enzima  $\Delta^9$ -desaturase do tecido mamário, utilizando como substrato o AG *trans*-7 advindo da BH incompleta do ácido oleico (Collomb *et al.*, 2004). Então, visto que os teores dos AG C18:1 *trans*-6 a C18:1 *trans*-8 se elevaram ( $P < 0,05$ ) nos tratamentos suplementados com OGAO (Tabela 9), supõe-se que a maior parte do seu montante seja formada pelo isômero C18:1 *trans*-7.

Apesar de ainda não terem sido descobertas funções fisiológicas para esse isômero de CLA, no presente trabalho ele se torna importante porque, nas condições de injeção de amostras no cromatógrafo, ele co-eluiu com o ácido rumênico. Segundo Yurawecz *et al.* (1998), o CLA *trans*-7 *cis*-9 co-elui com o rumênico na maioria das condições de corrida da cromatografia gás-líquida.

A co-eluição entre os dois isômeros de CLA faz com que a interpretação das concentrações do ácido rumênico na gordura do leite seja realizada com cautela já que este está sendo superestimado em magnitude desconhecida. A Figura 27 apresenta um fragmento do cromatograma de uma das amostras de gordura de leite gerada a partir de uma vaca alimentada com dieta contendo OGAO e percebe-se (seta) que o pico cujo tempo de retenção sugere ser o ácido rumênico não está puro, ou seja, algum outro AG – muito provavelmente o CLA *trans-7 cis-9* – está co-eluindo (formando pico) no mesmo tempo de retenção, superestimando, assim, a sua área e, conseqüentemente, o seu teor no leite. Como os teores do C18:1 *trans-7* – precursor do CLA *trans-7 cis-9* – se elevaram com a suplementação com OGAO, supõe-se que a superestimação seja maior nesses tratamentos.

Com o objetivo de facilitar a discussão e a leitura do texto, a designação dos teores desses AG será padronizada em “ácido rumênico” apenas.



**Figura 27.** Fragmento de cromatograma contendo detalhe do pico referente ao ácido rumênico com isômero de CLA co-eluindo.

Os teores (Tabela 9) e a secreção (Tabela 10) láctea do ácido rumênico apresentaram interação ( $P < 0,05$ ) entre o modo de fornecimento do concentrado e o tipo de OG. O desdobramento das interações mostrou que os tratamentos com suplementação de OGMO apresentaram teores de ácido rumênico mais elevados no leite ( $P < 0,05$ ) quando comparados aos com OGAO (Tabela 9e). A elevação dos teores refletiu na sua secreção (Tabela 10b), sendo que os tratamentos com OGMO e OGAO apresentaram valores iguais a 11,1 e 6,7 g/dia, respectivamente. Este comportamento é esperado visto que o ácido vacênico, precursor do ácido rumênico, é o principal produto da BH parcial do ácido linoleico (Grinari *et al.*, 2000; Bauman e Lock, 2006), e foi consumido em maiores quantidades nos tratamentos OGMO (Tabela 1). Esse comportamento é coerente com o que foi observado para o vacênico, ou seja, valores elevados para os tratamentos com OGMO.

O modo de fornecimento fracionado dos concentrados permitiu a obtenção de concentrações mais elevadas ( $P < 0,05$ ) de ácido rumênico no leite quando comparado ao TMR (Tabela 9e). A elevação dos teores refletiu na sua secreção no leite, sendo maiores ( $P < 0,05$ ) nos tratamentos cujo concentrado foi fornecido de modo fracionado do que sob a forma de TMR (Tabela 10b).

**Tabela 9e.** Desdobramento das médias dos teores (g/100 g de AG totais) dos isômeros de CLA *cis-9 trans-11* e *trans-7 cis-9* no leite

		Modo	
		TMR	Fracionado
Óleo	AO	1,297 <sup>Bb</sup>	1,807 <sup>Ba</sup>
	MO	2,149 <sup>Ab</sup>	3,241 <sup>Aa</sup>

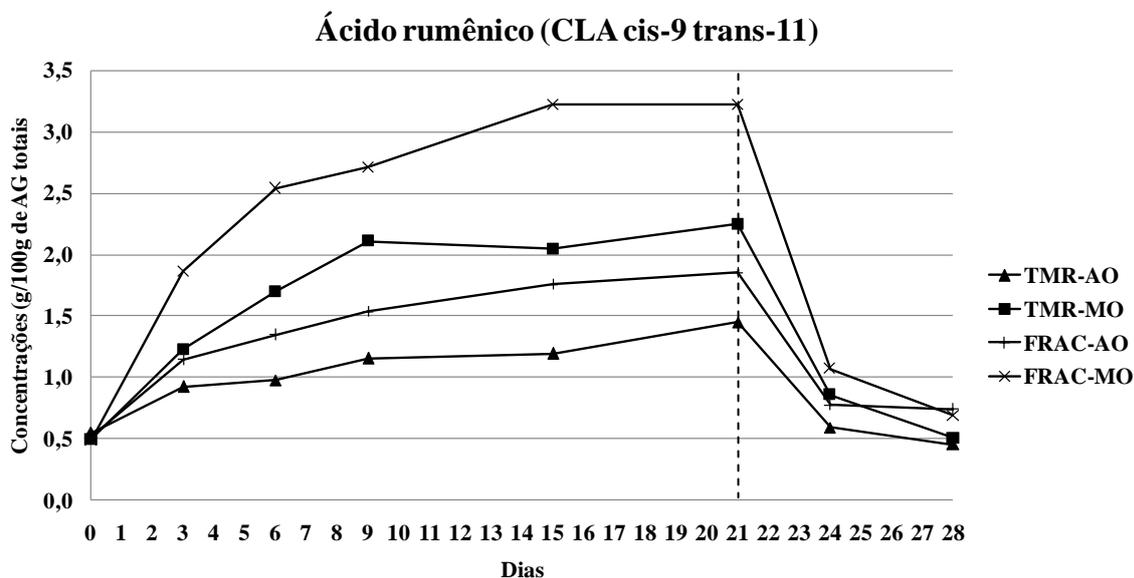
Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 0,0885

**Tabela 10b.** Desdobramento das médias das secreções diárias (g/dia) do ácido rumênico no leite

		Modo	
		TMR	Fracionado
Óleo	AO	5,247 <sup>Bb</sup>	8,255 <sup>Ba</sup>
	MO	8,136 <sup>Ab</sup>	14,113 <sup>Aa</sup>

Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 0,6346

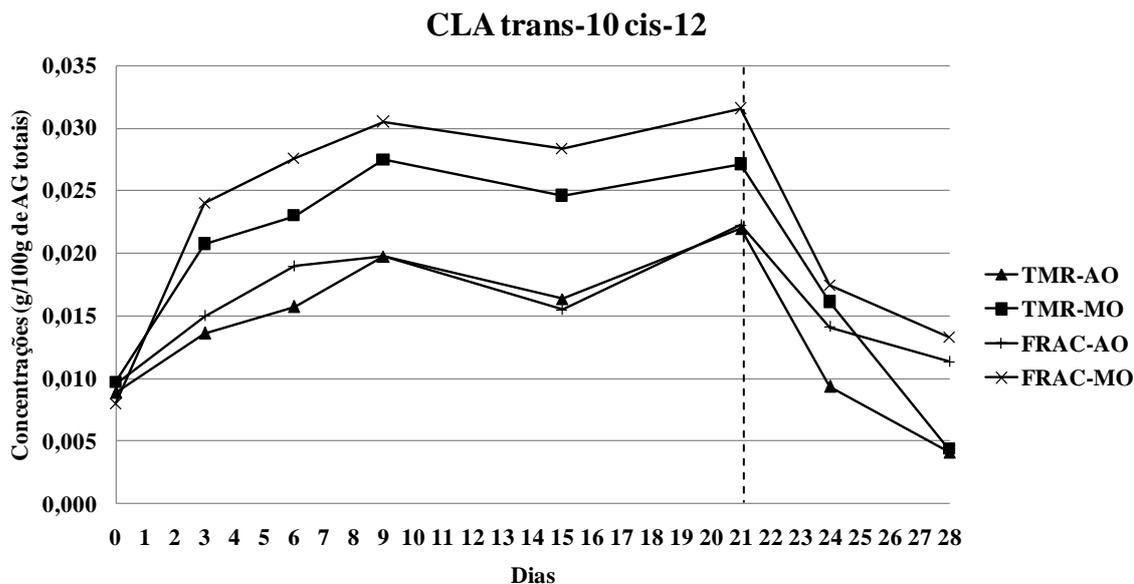
Diferentemente do ácido vacênico, que estabilizou seus teores a partir do sexto dia, as curvas do ácido rumênico lácteo apresentaram comportamento crescente sugerindo que, apesar do período de suplementação de 21 dias, os teores pareciam não ter alcançado seus valores máximos, merecendo destaque as elevadas concentrações observadas para o leite obtido da dieta com OGMO, consumida sob a forma fracionada (Figura 28). Assim, tornam-se necessários experimentos mais longos a fim de se certificar o comportamento (valores máximos e persistência) de síntese do ácido rumênico em vacas consumindo dietas à base de gramínea tropical suplementada com óleo vegetal. Após o fim da suplementação, os teores de ácido rumênico no leite decresceram rapidamente aos valores iniciais.



**Figura 28.** Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do ácido rumênico no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

As concentrações do isômero CLA *trans-10 cis-12* no leite foram influenciadas ( $P = 0,0356$ ) somente pelo tipo de OG suplementado (Tabela 9), cujos valores foram 0,019 e 0,027 g/100 g de AG totais para os tratamentos com OGMO e OGMO, respectivamente.

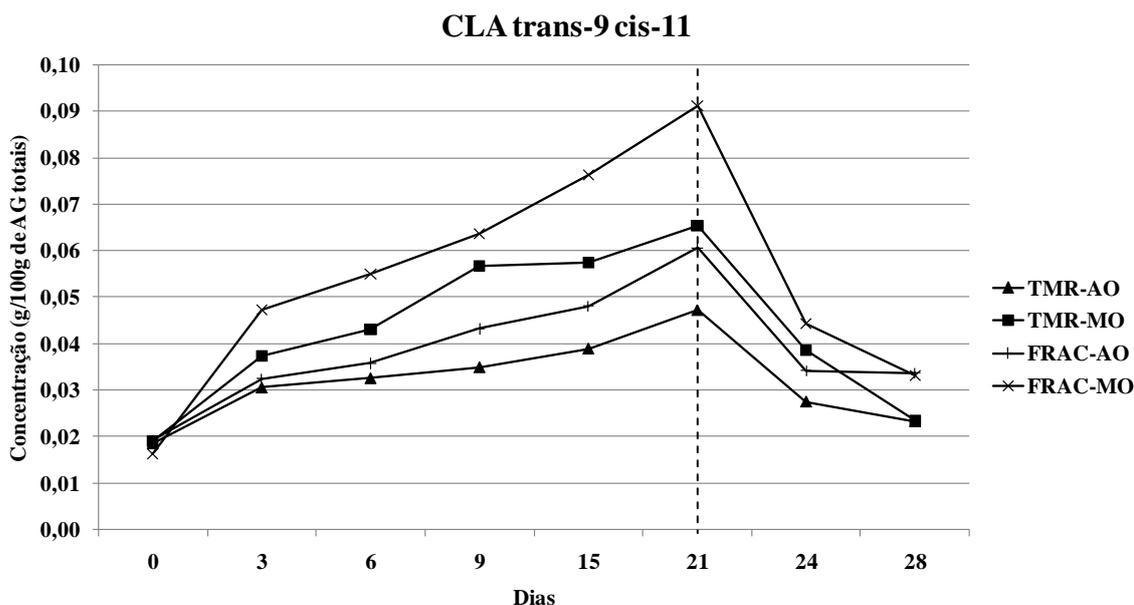
Na Figura 29 destacam-se os teores mais elevados do CLA *trans-10 cis-12* no leite obtido dos tratamentos suplementados com OGMO. Este comportamento é esperado visto que o ácido linoleico, principal precursor do CLA *trans-10 cis-12*, foi consumido em quantidades superiores nestas dietas (Tabela 1). Somente no 9º dia de fornecimento das dietas com os OG é que foi observada relativa estabilidade na concentração do CLA *trans-10 cis-12* no leite. Após a suspensão do fornecimento das dietas, os teores lácteos do CLA *trans-10 cis-12* reduziram-se rapidamente.



**Figura 29.** Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do CLA *trans*-10 *cis*-12 no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

O isômero de CLA *trans*-9 *cis*-11, assim como o CLA *trans*-10 *cis*-12, é reconhecidamente capaz de inibir a lipogênese mamária (Perfield *et al.*, 2007). Em dietas com elevadas relações V:C, sua concentração no leite e, conseqüentemente, seus efeitos antilipogênicos tendem a ser, de modo geral, mais baixos que os do CLA *trans*-10 *cis*-12 (Perfield *et al.*, 2007). Os teores (Tabela 9) e a secreção diária (Tabela 10) do CLA *trans*-9 *cis*-11 no leite foram influenciados ( $P < 0,05$ ) pelo modo de fornecimento do concentrado e pelo tipo de OG.

O comportamento das concentrações do CLA *trans*-9 *cis*-11 no leite (Figura 30) sugere que, assim como observado para o CLA *trans*-10 *cis*-12, houve variação entre os diversos tratamentos, onde se destacaram os teores mais elevados dos tratamentos suplementados com OGMO, principalmente, quando o concentrado foi fornecido de modo fracionado. Todos os tratamentos apresentaram teores crescentes de CLA *trans*-9 *cis*-11 no leite durante o período de suplementação lipídica, sugerindo que sob condições mais prolongadas de fornecimento dessas dietas possa haver comprometimento dos teores lácteos de gordura.



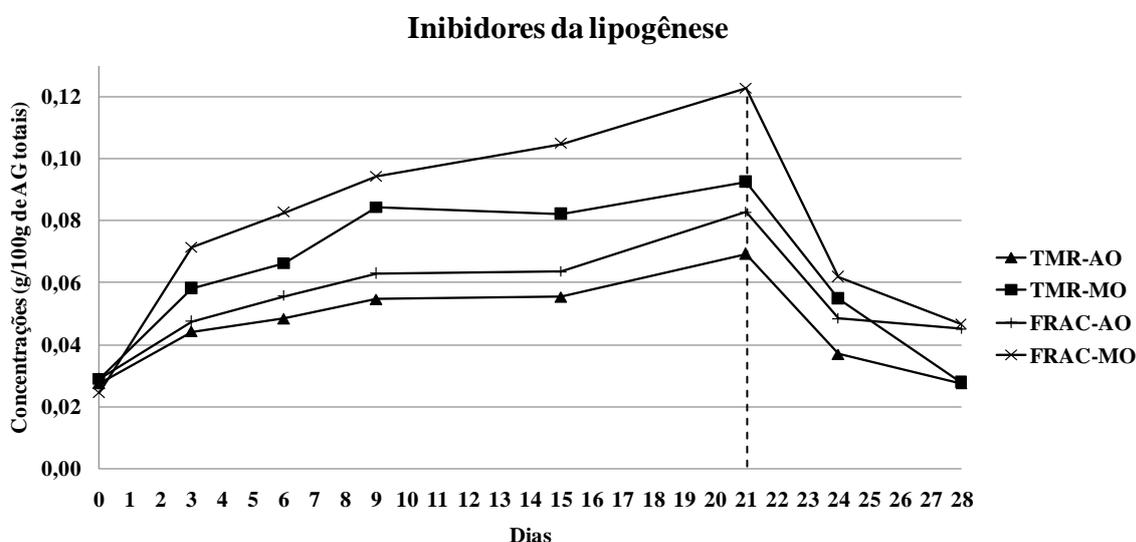
**Figura 30.** Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) do CLA *trans*-9 *cis*-11 no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

Shingfield *et al.* (2003) e Whitlock *et al.* (2002) apresentaram evidências da existência de relação entre os teores lácteos do AG C18:1 *cis*-11 e a redução da síntese *de novo* de AG na glândula mamária. Para Looor *et al.* (2005) essa relação ocorre porque, possivelmente, o CLA *trans*-9 *cis*-11 seja precursor do C18:1 *cis*-11. No presente experimento, aparentemente, não houve relação entre esses AG já que os teores de C18:1 *cis*-11 não foram influenciados ( $P>0,05$ ) pelos fatores estudados (Tabela 9).

Por apresentar concentrações mais elevadas que o CLA *trans*-10 *cis*-12, o CLA *trans*-9 *cis*-11 definiu o comportamento dos AG inibidores da lipogênese (Tabela 9 e Figura 31) apresentando, assim, influência tanto no modo ( $P = 0,0003$ ) quanto no tipo de OG ( $P<0,0001$ ).

É provável que os inibidores da lipogênese mamária apresentaram-se em concentrações intermediárias, já que foram capazes de reduzir ( $P<0,05$ ) a síntese de AG saturados de cadeia curta e média (Tabela 8 e Figuras 16 e 17), mas incapazes de influir ( $P>0,05$ ) sobre os teores de gordura no leite (Tabela 4).

Com relação à evolução temporal (Figura 31), os inibidores da lipogênese apresentaram comportamento similar ao do CLA *trans*-9 *cis*-11, com elevação contínua dos seus teores.



**Figura 31.** Evolução temporal das concentrações (g/100 g de AG totais) dos ácidos graxos inibidores da lipogênese (CLA *trans*-10 *cis*-12 e CLA *trans*-9 *cis*-11) no leite de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado.

Para avaliar a variação temporal da secreção dos intermediários da BH ruminal no leite, Shingfield *et al.* (2008) forneceram dietas à base de silagem de milho contendo 45 g de suplemento lipídico constituído por óleo de peixe e OG para vacas Holandês. Os autores observaram que durante 28 dias (com coletas a cada dois dias) os AG de cadeia saturada com número par de C (C4:0 a C:14) apresentaram redução contínua sem que se observasse tendência à estabilização. Comportamento condizente com os teores dos AG inibidores da lipogênese (CLA *trans*-10 *cis*-12 e CLA *trans*-9 *cis*-11), mas diferente do observado no presente experimento. Devido ao fornecimento de quantidades significativas de ácido oleico (13,6% dos AG totais) os teores dos AG C18:1 *trans*-6 a C18:1 *trans*-8 também apresentaram comportamento crescente. Os teores dos ácidos vacênico e rumênico apresentaram comportamentos semelhantes com elevação abrupta nas suas concentrações até o 5º dia de fornecimento da dieta e, a partir de então, apresentaram queda até o 15º dia, quando estabilizaram seus teores em valores levemente superiores aos do início do experimento. Segundo os autores, a redução dos teores de vacênico e, conseqüentemente, do rumênico, foi associada à elevação dos teores do AG C18:1 *trans*-10, indicando a ocorrência de alterações tempo-dependentes sobre a microbiota ruminal.

Já Felton *et al.* (2008), avaliaram os efeitos de diferentes tipos de volumosos (pastejo de alfafa ou silagem de milho e alfafa) em dieta suplementada com 650 g de um suplemento lipídico constituído por óleo de peixe e OG durante período de 18 dias sobre os teores de CLA da gordura láctea. Os autores observaram comportamento dos teores dos ácidos vacênico e rumênico semelhante aos do experimento de Shingfield *et*

al. (2008), ou seja, elevação abrupta nas suas concentrações até o 3º dia e, a partir de então, queda até o 9º dia, quando estabilizaram seus teores em valores levemente superiores aos do início do experimento. Entre tratamentos, o volumoso pastejado permitiu a ocorrência de teores mais altos e estáveis destes AG.

## 8. Índice de atividade da enzima desaturase

Com o objetivo de avaliar a expressão da enzima  $\Delta^9$ -desaturase na glândula mamária de vacas em lactação, Jacobs *et al.* (2011) forneceram quatro dietas à base de triticale suplementadas com 2,7% (base de MS) de óleo de soja (fonte de ácido linoleico) ou a mesma quantidade de óleo de colza (fonte de ácido oleico) ou de linhaça (fonte de ácido  $\alpha$ -linolênico) ou de um composto formado pelos três óleos. Os resultados permitiram aos autores concluir que a expressão mamária dessa enzima foi mais sensível (menos ativa) ao fornecimento dietético de ácido linoleico do que de oleico ou  $\alpha$ -linolênico, sugerindo, então, que a expressão da  $\Delta^9$ -desaturase na glândula mamária bovina responde diferentemente aos diversos AG presentes na dieta.

A variação dos teores dos ácidos oleico e linoleico influenciaram a atividade da desaturase apenas sobre o C14:0 ( $P = 0,0013$ ) e sobre o ácido vacênico ( $P < 0,0001$ ) (Tabela 12), sendo que esta última apresentou interação de efeitos de modo de fornecimento do concentrado e de tipo de OG ( $P < 0,0001$ ), mostrando que além da suplementação com OGMO, o modo fracionado de fornecimento do concentrado também estimulou a atividade da desaturase (de 0,054 para 0,105 para os tratamentos TMR e fracionado, respectivamente) (Tabela 12a).

**Tabela 12.** Atividade da enzima  $\Delta^9$ -desaturase (índice de desaturase) na glândula mamária de vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico e submetidas a dois modos de fornecimento do concentrado (TMR *versus* fracionado) em dietas à base de capim-elefante picado

Índice de desaturase	TMR		Fracionado		EPM <sup>1</sup>	Efeitos		
	AO	MO	AO	MO		Modo	Óleo	Modo x Óleo
C14:1 <i>cis</i> -9 / C14:0	0,062	0,087	0,073	0,084	0,0052	0,4784	0,0013	0,1824
C16:1 <i>cis</i> -9 / C16:0	0,041	0,045	0,041	0,044	0,0019	0,9474	0,0820	0,8950
C18:1 <i>cis</i> -9 / C18:0	1,799	1,904	2,024	1,961	0,1014	0,1756	0,8392	0,4158
rumênico/vacênico	0,046	0,081	0,062	0,129	0,0033	<0,0001	<0,0001	<0,0001

<sup>1</sup>Erro padrão da média.

**Tabela 12a.** Desdobramento das médias de atividade da enzima  $\Delta^9$ -desaturase sobre o ácido vacênico para a síntese do ácido rumênico

		Modo	
		TMR	Fracionado
Óleo	AO	0,046 <sup>Ba</sup>	0,062 <sup>Ba</sup>
	MO	0,081 <sup>Ab</sup>	0,129 <sup>Aa</sup>

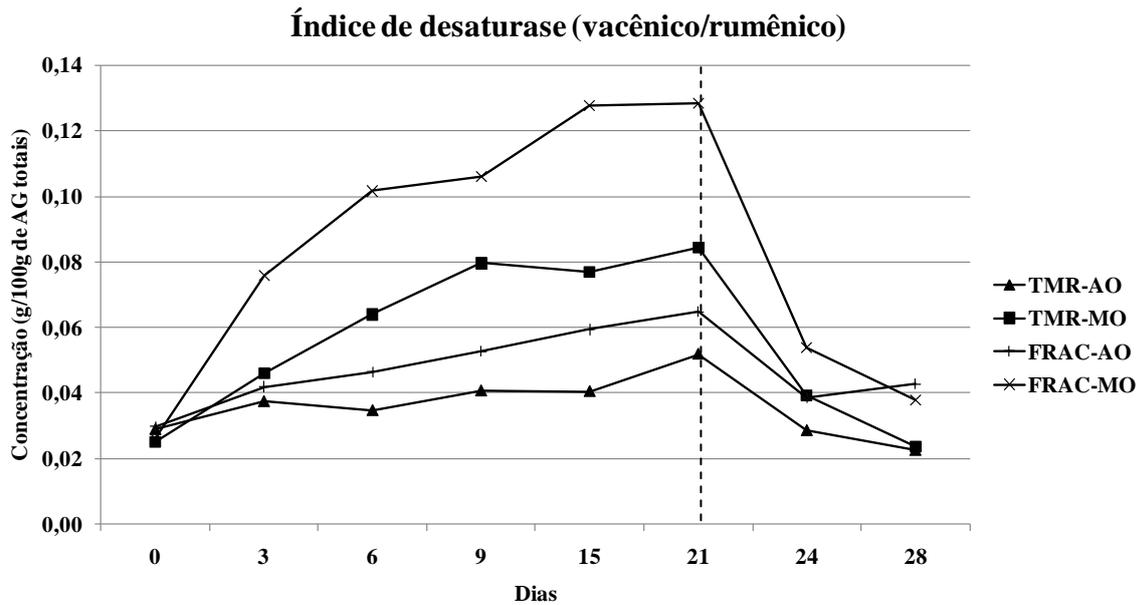
Letras iguais, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, indicam semelhança ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos; Erro-padrão da média = 0,0015.

Além do tipo de óleo, o substrato também influencia na atividade da desaturase. Segundo Ntambi e Miyazaki (2004), a ação da  $\Delta^9$ -desaturase sobre os AG saturados não é uniforme, sendo os AG palmítico e esteárico os mais propensos à reação. No presente experimento, somente o par C18:1 *cis*-9/C18:0 apresentou valores destacadamente superiores (média de 1,925), sugerindo que a conversão do ácido esteárico à oleico é mais intensa que quaisquer outras catalizadas pela enzima  $\Delta^9$ -desaturase. Os demais índices de atividade apresentaram valores dentro do esperado para esse nível de suplementação lipídica, apesar de inferiores.

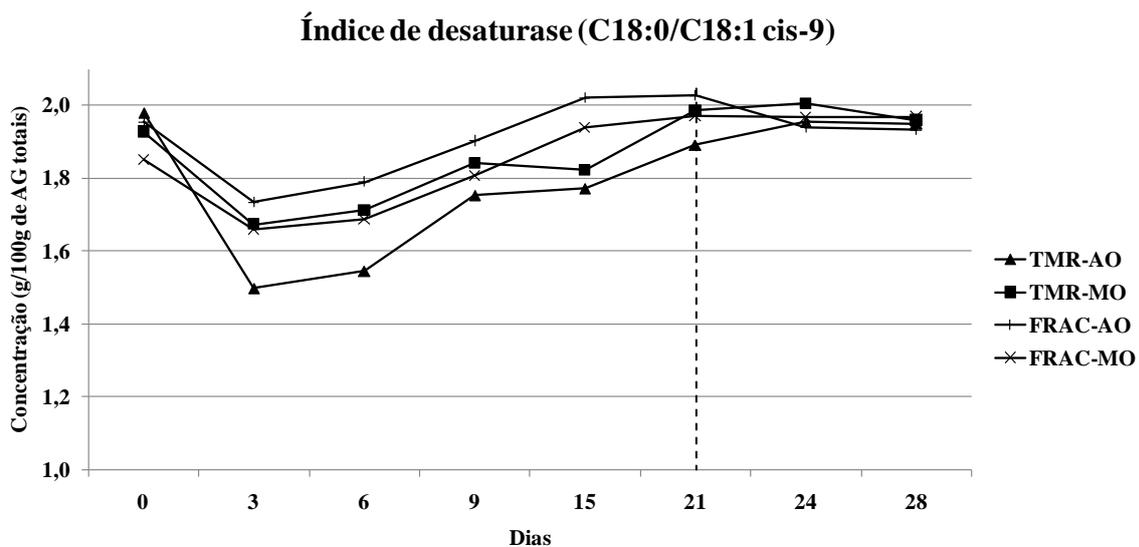
Jacobs *et al.* (2011) observaram índices de atividade da desaturase médios de 0,10; 0,06 e 0,69 para o C14:0, C16:0 e o ácido esteárico, respectivamente. Shingfield *et al.* (2006) suplementaram dietas de vacas

com óleo de peixe e observaram índices de desaturase para o C14:0, C16:0, ácido esteárico e o vacênico de 0,10; 0,075; 2,00 e 0,43, respectivamente. Todos estes valores podem ser considerados semelhantes aos obtidos no presente experimento.

Pela Figura 32, percebe-se que foram obtidos índices elevados de desaturase do par vacênico/rumênico na dieta suplementada com OGMO e fornecimento fracionado de concentrado. Esse comportamento apresenta-se oposto ao observado por Jacobs *et al.* (2011), que sugeriram que dietas adicionadas de ácido linoleico tendem a reduzir a atividade das desaturases. Após o fim da suplementação, os teores retornaram rapidamente aos valores iniciais. Já o efeito da desaturase sobre o ácido esteárico, apresentou comportamento pouco definido com o passar dos dias (Figura 33), com sutil redução da sua atividade nos primeiros seis dias e posterior retorno à atividade inicial.



**Figura 32.** Evolução temporal do índice de desaturase do par ácido vacênico/rumênico.



**Figura 33.** Evolução temporal do índice de desaturase do par ácido esteárico/oleico.

## **CONCLUSÕES**

A utilização do óleo de girassol rico em ácido oleico determinou sensível melhora na qualidade nutricional dos ácidos graxos da gordura do leite se comparado à suplementação com óleo de girassol com médio teor de ácido oleico sem que, contudo, houvesse comprometimento do consumo e digestibilidade da dieta ou da produção/composição do leite. Apesar da melhora da qualidade nutricional da gordura, observou-se redução dos teores do ácido rumênico quando da adição do óleo com altos teores de ácido oleico.

O fornecimento fracionado do concentrado permitiu a síntese e secreção de ácidos graxos não interessantes do ponto de vista nutricional, mas destacou-se na otimização da síntese do ácido rumênico.

A análise da evolução temporal dos AG lácteos permitiu verificar que cerca de seis dias de suplementação dietética são suficientes para estabilizar importantes parâmetros de qualidade nutricional da gordura como os índices de aterogenicidade e trombogenicidade e a relação de ácidos graxos hipo e hipercolesterolêmicos. Entretanto, 21 dias de suplementação não foram suficientes para permitir que os teores lácteos de ácido rumênico se estabilizassem.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A melhora da qualidade nutricional da gordura do leite gerada pelo fornecimento de dietas baseadas em forrageiras frescas suplementadas com óleo vegetal rico em ácidos graxos poli-insaturados tem sido relatada com certa frequência pela literatura. Entretanto, tem-se tornado grande desafio desenvolver sistema de produção leiteira que viabilize os aspectos logísticos, financeiros e comerciais relacionados à venda desses novos produtos.

Assim, torna-se necessário que as pesquisas futuras se dediquem em criar meios que permitam a redução dos custos de produção, o desenvolvimento de estratégias de remuneração do produtor rural e a comercialização pela indústria, entre outros assuntos correlatos.

## ANEXOS

**Tabela 1.** Concentração de ácidos graxos (g/100 g de AG totais) em amostras de capim-elefante, coletadas ao longo do período experimental

Ácidos graxos	Fase 1				Fase 2			Fase 3			Fase 4			Média <sup>1</sup>
	Dia 1	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 5	Dia 10	Dia 15	Dia 5	Dia 10	Dia 15	
C8:0	0,000	0,000	0,000	0,032	0,007	0,014	0,000	0,069	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009
C10:0	0,546	0,160	0,256	0,185	0,118	0,140	0,045	0,032	0,117	0,076	0,516	0,387	0,272	0,289
C12:0	0,811	0,825	1,023	1,071	1,008	1,205	0,886	0,949	0,993	0,777	0,825	0,857	0,843	0,929
C14:0	1,663	1,492	2,082	1,780	1,951	2,347	1,546	1,998	1,949	1,502	1,738	1,606	1,665	1,794
C14:1 <i>cis</i>	0,000	0,000	0,020	0,000	0,020	0,000	0,000	0,000	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007
C16:0	31,098	29,182	27,403	29,178	27,997	30,416	27,240	28,778	27,088	23,064	26,454	24,898	24,742	27,503
C16:1 <i>cis</i>	1,154	0,858	0,934	0,630	0,587	0,525	0,877	0,078	0,598	0,716	0,457	0,462	0,406	0,637
C18:0	2,805	2,828	2,755	3,753	2,908	3,527	3,046	3,201	2,873	2,106	2,825	2,598	2,359	2,891
C18:1 <i>cis</i> -9	4,281	4,164	3,750	4,191	4,378	4,821	5,714	4,059	3,574	3,507	3,546	3,887	2,980	4,066
C18:1 total – <i>cis</i> -9	0,579	0,194	0,553	0,990	0,314	0,000	0,717	0,419	0,332	0,376	0,398	0,533	0,000	0,416
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	16,595	18,212	16,881	16,531	21,332	19,063	18,439	23,967	19,367	17,762	20,548	20,387	19,441	19,117
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	30,377	31,508	32,456	25,250	25,147	22,308	32,226	22,600	30,088	39,929	32,090	32,927	36,472	30,260
C20:0	2,607	2,267	2,487	3,706	3,202	3,358	2,671	4,169	3,170	2,142	2,896	2,845	2,399	2,917
C20:1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,189	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015
C22:0	2,838	2,189	2,365	3,571	3,058	3,278	3,148	3,584	2,691	2,556	2,340	2,423	2,389	2,802
C22:1	0,000	0,212	0,811	1,175	0,840	0,574	0,000	0,000	0,344	0,418	0,000	1,031	0,814	0,478
C24:0	2,568	2,306	2,607	3,183	2,933	3,739	2,394	3,118	2,626	1,989	2,544	2,512	1,995	2,655
C24:1	0,826	0,658	2,164	2,701	2,488	2,394	0,000	0,260	2,235	1,165	0,455	1,030	0,933	1,331
ΣSaturados	46,006	43,086	42,028	47,811	44,440	49,373	41,989	47,720	42,872	35,211	41,498	39,200	37,771	43,001
ΣMonoinsaturados	7,022	7,194	8,634	10,406	9,080	9,256	7,308	5,714	7,673	7,098	5,865	7,486	6,316	7,619
ΣPoli-insaturados	46,972	49,720	49,337	41,781	46,479	41,371	50,665	46,567	49,455	57,691	52,638	53,314	55,913	49,377

<sup>1</sup>Média relativa a todo o período experimental

**Tabela 2.** Conteúdo médio de ácidos graxos (g/100 g de AG totais) no concentrado fornecido no primeiro e no último dia de cada fase do Quadrado Latino

Variável	Controle		1,3% OG		2,5% OG		3,7% OG		Média	
	Dia 1	Dia 14	Dia 1	Dia 14	Dia 1	Dia 14	Dia 1	Dia 14	Dia 1	Dia 14
C10:0	0,14	0,16	0,10	0,03	0,13	0,090	0,13	0,08	0,12	0,09
C12:0	0,08	0,08	0,04	0,05	0,03	0,029	0,03	0,03	0,04	0,05
C14:0	0,17	0,17	0,11	0,13	0,11	0,105	0,10	0,10	0,12	0,13
C15:0	0,03	0,03	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00	0,01	0,01
C16:0	18,17	18,36	11,09	11,99	10,11	10,068	9,26	9,23	12,16	12,41
C16:1 <i>trans</i>	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,00	0,00	0,00	0,00
C16:1 <i>cis</i>	0,19	0,21	0,13	0,15	0,12	0,120	0,11	0,12	0,14	0,15
C17:0	0,17	0,18	0,09	0,10	0,07	0,073	0,07	0,03	0,10	0,10
C18:0	3,27	3,24	2,87	3,00	2,88	2,893	2,84	2,83	2,96	2,99
C18:1 <i>cis</i> -9	22,89	22,66	20,12	21,32	20,63	20,871	20,21	20,38	20,96	21,31
C18:1 total – <i>cis</i> -9	1,60	1,62	1,23	1,30	1,21	1,222	1,18	1,18	1,31	1,33
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	47,42	47,55	56,26	58,31	61,50	61,481	63,18	63,22	57,09	57,62
C20:0	0,40	0,41	0,28	0,30	0,27	0,271	0,25	0,25	0,30	0,31
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	4,30	4,49	2,18	2,35	1,70	1,754	1,47	1,46	2,41	2,51
C20:1	0,09	0,11	0,19	0,20	0,19	0,193	0,19	0,19	0,17	0,17
C22:0	0,34	0,33	0,46	0,47	0,51	0,506	0,53	0,53	0,46	0,46
C24:0	0,45	0,40	0,31	0,30	0,38	0,323	0,34	0,32	0,37	0,34
C24:1	0,30	0,03	0,06	0,00	0,11	0,000	0,13	0,04	0,15	0,02
ΣSaturados	23,20	23,34	15,34	16,38	14,48	14,359	13,54	13,40	16,64	16,87
ΣInsaturados	76,80	76,66	80,16	83,62	85,46	85,641	86,29	86,60	82,18	83,13

**Tabela 3.** Variação do conteúdo de ácidos graxos (g/100 g de AG totais) do capim-elefante durante o período experimental

Ácidos graxos	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Média
C8:0	0,049	0,223	0,183	0,152
C10:0	0,114	0,080	0,056	0,083
C12:0	1,582	1,384	1,233	1,400
C14:0	0,791	0,587	0,565	0,648
C14:1 <i>cis</i>	0,201	0,320	0,298	0,273
C16:0	21,040	18,994	17,649	19,228
C16:1 <i>cis</i>	0,318	0,233	0,204	0,252
C18:0	2,609	1,945	1,953	2,169
C18:1 <i>cis</i> -9	4,049	6,016	4,405	4,823
C18:1 total – <i>cis</i> -9	2,036	1,066	0,927	1,343
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	13,793	15,781	15,310	14,961
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	28,701	24,632	26,411	26,581
C20:0	1,002	0,794	0,926	0,907
C20:1	0,146	0,207	0,180	0,178
C22:0	1,087	1,101	1,341	1,176
C24:0	1,660	1,687	1,988	1,778
C22:6 (DHA)	0,04	0,05	0,04	0,043
ΣSaturados	29,934	26,795	25,894	27,541
ΣMonoinsaturados	6,750	7,842	6,014	6,869
ΣPoli-insaturados	42,534	40,463	41,761	41,586

<sup>1</sup>Média relativa a todo o período experimental

**Tabela 4.** Variação temporal da concentração de ácidos graxos - AG (g/100 g de AG totais) nos ingredientes e nos suplementos concentrados formulados com óleos de girassol contendo alto (AO) e médio (MO) teores de ácido oleico, fornecidos para vacas primíparas Holandês x Gir alimentadas com dieta à base de capim-elefante picado

Variável	Dia 1		Dia 7		Dia 14		Dia 21		Dia 28		Dia 35		FS <sup>1</sup>	Milho Moído	PC <sup>2</sup>
	MO	AO													
C8:0	0,014	0,036	0,013	0,035	0,013	0,035	0,011	0,033	0,015	0,034	0,013	0,036	nq <sup>3</sup>	nq	0,039
C10:0	0,022	0,033	0,028	0,030	0,037	0,037	0,030	0,025	0,027	0,026	0,022	0,026	0,094	0,040	0,113
C12:0	0,121	0,561	0,123	0,556	0,142	0,542	0,112	0,525	0,120	0,515	0,108	0,535	nq	0,016	0,286
C14:0	0,200	0,305	0,199	0,294	0,223	0,291	0,190	0,271	0,198	0,273	0,190	0,315	0,130	0,082	0,485
C14:1 <i>cis</i>	0,020	0,023	0,020	0,022	0,025	0,020	0,019	0,018	0,019	0,019	0,019	0,022	0,061	0,029	0,065
C16:0	11,982	8,408	11,992	8,333	12,115	8,307	11,803	8,329	12,160	8,309	12,114	8,446	19,668	16,499	22,929
C16:1 <i>cis</i> -9	0,143	0,122	0,143	0,118	0,148	0,115	0,142	0,113	0,139	0,114	0,139	0,120	0,088	0,133	0,367
C18:0	3,131	3,032	3,190	3,015	3,290	2,963	3,155	2,876	3,191	2,890	3,167	3,040	4,116	2,560	4,015
C18:1 <i>cis</i> -9	38,255	61,217	38,970	60,975	37,863	61,597	38,938	60,490	39,336	61,310	38,966	60,892	15,208	29,113	19,302
C18:1 total – <i>cis</i> -9	3,315	4,580	3,255	3,892	3,427	3,980	3,316	4,156	3,427	4,094	3,300	4,125	1,612	1,731	3,296
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	36,174	17,606	35,926	17,764	35,623	17,607	35,778	18,097	35,257	17,886	35,562	17,833	46,966	42,871	28,949
C20:0	0,307	0,256	0,303	0,258	0,301	0,251	0,313	0,275	0,308	0,277	0,310	0,277	0,239	0,506	0,393
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	2,736	1,059	2,791	1,105	2,663	1,041	2,546	1,052	2,454	0,997	2,543	1,010	4,079	1,089	4,160
C20:1	0,208	0,205	0,204	0,211	0,198	0,209	0,199	0,207	0,201	0,219	0,204	0,218	0,081	0,229	0,089
C22:0	0,460	0,590	0,452	0,568	0,446	0,579	0,426	0,572	0,422	0,556	0,444	0,552	0,333	0,189	0,349
C22:1	0,010	nq	0,009	0,009	0,013	0,009	0,009	nq	nq	nq	0,014	0,015	nq	nq	nq
C24:0	0,242	0,303	0,233	0,304	0,249	0,287	0,308	0,363	0,219	0,253	0,249	0,281	0,191	0,303	0,600
ΣSaturados	16,479	13,524	16,533	13,393	16,816	13,292	16,348	13,269	16,66	13,133	16,617	13,508	24,771	20,195	29,209
ΣMonoinsaturados	38,636	61,567	39,346	61,335	38,247	61,950	39,307	60,828	39,695	61,662	39,342	61,267	17,050	31,235	23,119
ΣPoli-insaturados	38,91	18,665	38,717	18,869	38,286	18,648	38,324	19,149	37,711	18,883	38,105	18,843	51,045	43,969	33,109

<sup>1</sup>Farelo de soja; <sup>2</sup>polpa cítrica; <sup>3</sup>nq: detectado, mas não quantificado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUGHAZALEH, A.; SCHINGOETHE, D. J.; HIPPEN, A. R.; KALSCHEUR, K. F. Conjugated Linoleic Acid and Vaccenic Acid in Rumen, Plasma, and Milk of Cows Fed Fish Oil and Fats Differing in Saturation of 18 Carbon Fatty Acid. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 3648–3660, 2003.
- ABU-GHAZALEH, A. A.; RILEY, M. B.; THIES, E. E.; JENKINS, T. C. Dillution rate and pH effects on the conversion of oleic acid to *trans* C18:1 positional isomers in continuous culture. *J. Dairy Sci.*, v. 88, p. 4334–4341, 2005.
- ADEWUYI, A. A.; GRUYS, E.; VAN EERDENBURG, F. J. V. M. Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary Quarterly*, v. 27, n. 3, p. 117-126, 2005.
- ADLOF, R. O.; DUVAL, S.; EMKEN, E. A. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in humans. *Lipids*, v. 35, p. 131–135, 2000.
- AHNADI, C. E.; BESWICK, N.; DELBECCHI, L.; KENNELLY, J. J.; LACASSE, P. Addition of fish oil to diets for dairy cows. II: Effects on milk fat and gene expression of mammary lipogenic enzymes. *J. Dairy Res.*, v. 69, p. 521–531, 2002.
- AII, T.; TAKAHASHI, S.; KURIHARA, M.; KUME, S. The effects of Italian ryegrass hay, haylage and fresh Italian ryegrass on the fatty acid composition of cows' milk. *Jap. J. Zootech. Sci.* v. 59, p. 718–724, 1988.
- AKAHOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; ICHINOSE, F.; KANEKO, M.; SHIMODA, A.; NONAKA, K.; IWATA, T.; YAMAUCHI, Y.; TSUTSUMI, K.; SUGANO, M. Dietary protein modulates the effect of CLA on lipid metabolism in rats. *Lipids*, v. 39, p. 25-30, 2004.
- ALBERS, R.; WIELEN, R. P.; BRINK, E. J.; HENDRIKS, H. F.; DOROVSKA-TARAN, V. N.; MOHEDE, I. C. Effects of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 57, p. 595-603, 2003.
- ALEVATO, C. B.; RIBEIRO, C. G. S.; LOPES, F. C. F.; GAMA, M. A. S.; FASSIO, P. O.; PINTO, D. M. Níveis de glicose e ureia no sangue de vacas Holandês x Gir recebendo dois tipos de óleo de girassol e dois modos de fornecimento do concentrado em dietas à base de capim-elefante picado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., Brasília, DF. *Anais...*, Brasília: SBZ, 2012.
- ALONSO, A.; ZOZAYA, C.; VÁZQUEZ, Z.; MARTÍNEZ, J. A.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A. The effect of low-fat versus whole-fat dairy product intake on blood pressure and weight in young normotensive adults. *J. Hum. Nutr. Diet.*, v. 22, p. 336–342, 2009.
- AMOROCHO, A. K.; JENKINS, T. C.; STAPLES, C. R. Evaluation of catfish oil as a feedstuff for lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v. 92, p. 5178–5188, 2009.
- ANDO, A.; OGAWA, J.; KISHINO, S.; SHIMIZU, S. Conjugated linoleic acid production from castor oil by *Lactobacillus plantarum* JCM 1551. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 35, p. 40–45, 2004.
- ANTUNES, C. A.; RODRIGUEZ, N. M.; SALIBA, E. O. S. S. *Metabolismo dos carboidratos não estruturais*. In: Nutrição de ruminantes. BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S. G. 2ª Edição. Prol Editora Gráfica, 616p, 2011.
- AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official Methods of Analysis*, 11 ed. Washington D.C.: AOAC, 1990.
- AROEIRA, L. J. M.; LOPES, F. C. F.; DAYRELL, M. S. Degradabilidade de alguns alimentos no rúmen de vacas Holandês/Zebu. *R. Soc. Bras. Zootec.*, v. 25, p. 1178-1186, 1996.

- ASCHERIO, A.; KATAN, M. B.; ZOCK, P. L.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C. *Trans* fatty acids and coronary heart disease. *N Engl J Med*, v. 340, p. 1994-8, 1999.
- ASSIS, A. G. *Fundamentos das dietas completas*. In: DIAS, J. C.; COSTA, J. L. (Org.) Forragens para o gado leiteiro. São Paulo: Tortuga; Juiz de Fora: Embrapa – CNPGL, 1997. p.70-77.
- AZAIN, M. J. Role of fatty acids in adipocyte growth and development. *J. Anim. Sci.*, v. 82, p. 916-924, 2004.
- BAIRD, G. D.; HEITPNAN, R. J.; REID, I. M.; SYMONDS, H. W.; LOMAX, M. A. Effects of food deprivation on ketonemia, ketogenesis and hepatic intermediary metabolism in the lactating cow. *Biochem. Journal*, v. 178, p. 35, 1979.
- BALDWIN, A., POLOUNSKY, K. W. In: *Reproduction in Domestic Animals*. 3 ed. COLE, H. H. E CUPP, P. T. Acad. Press. 1977, 421p.
- BANNI, S.; CARTA, G.; ANGIONI, E.; MURRU, E.; SCANU, P. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. *Journal of Lipid Research*, v. 42, p. 1052–1061, 2001.
- 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.
- BARLETTA, R. V.; RENNÓ, F. P.; GANDRA, J. R.; FREITAS JÚNIOR, J. É.; VERDURICO, L. C.; MINGOTI, R. D.; VILELA, F. G. Desempenho e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com grãos de soja. *Arch. Zootec.*, v. 61, p. 236, 2012.
- BATICZ, O.; TÖMÖSKÖZI, S.; VIDA, L. Concentrations of citrate and ketone bodies in cow's rawmilk. *Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng.* v. 46, n. 1–2, p. 93–104, 2002.
- BAUMAN, D. E.; DAVIS, C. L. Lactation: A comprehensive treatise. In: LARSON, B.B.L.; SMITH, V. R. (ed.). *Biosynthesis of milk fat*. New York: Academic Press, 1974.
- 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.; 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.; 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., LOCK, A. L.; PERFIELD, J. W. The role of trans fatty acids in the regulation of milk fat synthesis. *Proc. Intermountain Nutr. Conf.* , Salt Lake City, UT. p. 85-96, 2005.
- BAUMAN, D. E.; LOCK, A. L. Conjugated linoleic acid: Biosynthesis and nutritional significant. In: FOX, P. F.; SWEENEY, P. L. H. (eds). *Advanced Dairy Chemistry*, v. 2: *Lipids*. NY: Springer,, p. 93-136, 2006.
- BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; DWYER, D. A.; BAUMAN, D. E. Identification of the Conjugated Linoleic Acid Isomer That Inhibits Milk Fat Synthesis. *Am. J. Physiol.*, v. 278, p. 179–184, 2000.
- 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. Conjugated dienoic linoleate: A polyunsaturated fatty acid with unique chemoprotective properties. *Nutrition Review*, v. 1, p. 83–89, 1995.
- 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. *J. Nutr.*, v. 133, p. 257S–260S, 2003.
- BENJAMIN, S.; SPENER, F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutrition & Metabolism*, v. 6, 2009.
- BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, v. 47, p. 233-261, 1996.
- 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. 2ª Edição. *Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal: Editora Fundep, p. 415-438, 2011.
- BERGAMO, P.; FEDELE, E.; IANNIBELLI, L.; MARZILLO, G. Fat-soluble vitamin contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian dairy products. *Food Chemistry*, v. 82, p. 625–631, 2003.
- BERNARD, L.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 606, p. 67–108, 2008.
- BOBIO, A. P.; BOBIO, F. O. Química do processamento de alimentos. Editora Varela, 3ª Edição, 2001, 143p.
- BOUFAÏED, H.; CHOUINARD, P. Y.; TREMBLAY, G. F.; PETIT, H. V.; MICHAUD, R.; BÉLANGER, G. Fatty acids in forages. I. Factors affecting concentrations. *Can. J. Anim. Sci.*, v. 83, p. 501–511, 2003.
- BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA. *Instrução Normativa n. 51*, de 18 de setembro de 2002.
- BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA. *Instrução Normativa n. 49*, de 22 de dezembro de 2006.
- BRASIL – IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=1823&id\\_pagina=1](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1823&id_pagina=1) Acessado em: 26/10/2012.
- BRASIL - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA. *Instrução normativa n.62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamentos técnicos de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte de leite*. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Inspeção de Produto Animal, 2011, 24p.
- BROWN, J. M.; MCINTOSH, M. K. Conjugated Linoleic Acid in Humans: Regulation of Adiposity and Insulin Sensitivity. *J. Nutr.*, v. 133, p. 3041–3046, 2003.
- BROWN, J. M.; BOYSEN, M. S.; CHUNG, S.; FABIYI, O.; MORRISON, R. F.; MANDRUP, S.; MCINTOSH, M. K. Conjugated Linoleic Acid Induces Human Adipocyte Delipidation. *J. Biol. Chem.*, v. 27, p.26735-26747, 2004.
- BUCCIONI, A.; DECANDIA, M.; MINIERI, S.; MOLLE, G.; CABIDDU, A. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Animal Feed Science and Technology*, v. 174, p. 1–25, 2012.

- BUTLER, G.; NIELSEN, J. H.; SLOTS, T.; SEAL, C.; EYRE, M. D.; SANDERSON R.; LEIFERT, C. Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high and low-input conventional and organic systems: seasonal variation. *J Sci Food Agric*, v. 88, p. 1431–1441, 2008.
- CABIDDU, A.; SALIS, L.; TWEED, J. K. S.; MOLLE, G.; DECANDIA, M.; LEEB, M. R. F. The influence of plant polyphenols on lipolysis and biohydrogenation in dried forages at different phenological stages: in vitro study. *J Sci Food Agric*, v. 90, p. 829–835, 2010.
- CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; MALAFAIA, P. A. M.; ZERVOUDAKIS, J. T.; SOUZA, A. L.; VELOSO, R. G.; NUNES, P. M. M. Consumo e digestibilidade dos nutrientes em bovinos alimentados com dietas à base de volumosos tropicais. *R. Bras. Zootec.*, v. 35, n. 6, p. 2406-2412, 2006.
- 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.
- CARRIQUIRY, M.; WEBER, W. J.; DAHLEN, C. R.; LAMB, G. C.; BAUMGARD, L. H.; CROOKER, B. A. Production response of multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed diets enriched with n-3 or n-6 fatty acids. *J. Dairy Sci.*, v. 92, p. 4852–4864, 2009.
- CARRUTHERS, V. R.; BRYANT, A. M.; COCKREM, F. R. M.; MCLEAY, L. M. Food intake, milk production, and digestive efficiency of cows differing in susceptibility to bloat. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 31, p. 105–110, 1988.
- CASPER, D. P.; SCHINGOETHE, D. J.; MIDDAUGH, R. P.; BAER, R. J. Lactational responses of dairy cows to diets containing regular and high oleic acid sunflower seeds. *J. Dairy Sci.*, v. 71, p. 1267-1274, 1988.
- CATER, N. B.; HELLER, H. J.; DENKE, M. A. Comparison of the effects of medium-chain triacylglycerols, palm oil, and high oleic acid sunflower oil on plasma triacylglycerol fatty acids and lipid and lipoprotein concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 65, p. 41-5, 1997.
- CHAJES, V.; LAVILLONNIERE, F.; MAILLARD, V.; GIRAUDEAU, B.; JOURDAN, M. L.; SEBEDIO, J. L.; BOUGNOUX, P. Conjugated linoleic acid content in breast adipose tissue of breast cancer patients and the risk of metastasis. *Nutr. Cancer*, v. 45, p. 17-23, 2003.
- CHENG, Z.; ELMES, M.; ABAYASEKARA, D. R.; WATHES, D. C. Effects of conjugated linoleic acid on prostaglandins produced by cells isolated from maternal intercotyledonary endometrium, fetal allantochorion and amnion in late pregnant ewes. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1633, p. 170-178, 2003.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, R. M.; DOREAU, M. Ruminant Milk Fat Plasticity: Nutritional Control of Saturated, Polyunsaturated, *trans* and Conjugated Linoleic Acid. *Annales de Zootechnie*, v. 49, p. 181-205, 2000.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G. A Review of Nutritional and Physiological Factors Affecting Goat Milk Lipid Synthesis and Lipolysis. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p. 1751-1770, 2003a.
- CHILLIARD, Y.; ROUEL, J.; CAPITAN, P.; CHABOSSEAU, J. M.; RAYNAL- LJUTOVAC, K.; FERLAY, A. *Correlations between milk fat content and fatty acid composition in goats receiving different combinations of forages and lipid supplements*. p. 343, 54th Annu. Meeting EAAP, Roma, Itália. Y. VAN DER HONING, ed. Wageningen Acad. Publ., Wageningen, Holanda, 2003b.
- 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. The composition, structure and function of lipids in the tissues of ruminant animals. *In: Lipid Metabolism in Ruminant Animals*. Oxford: Pergamon Press, p. 95-191, 1981.

- 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
- CLIFTON, P. M.; KEOGH, J. B.; NOAKES, M. *Trans* fatty acids in adipose tissue and the food supply are associated with myocardial infarction. *J. Nutr.*, v. 134, p. 874-9, 2004.
- COLLOMB, M.; SIEBER, R.; BÜTIKOFER, U. CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids*, v. 39, p. 355–364, 2004.
- COLLOMB, M.; SCHMIDA, A.; SIEBER, R.; WECHSLER, D.; RYHÄNEN, E. L. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1347–1361, 2006.
- CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. *Série histórica: área, produção e produtividade*. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/>. Acessado em: 18 de novembro de 2012.
- CONTRERAS, G. A.; O'BOYLE, N. J.; HERDT, T. H.; SORDILLO, L. M. Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *J. Dairy Sci.*, v. 93, p. 2508–2516, 2010.
- COPPOCK, C. E.; BATH, D. L.; HARRIS JR., B. From feeding to feeding-systems. *J. Dairy Sci.*, v. 64, N. 6, p. 1230-1249, 1981.
- CORL, B. A.; BAUMGARD, L. H.; DWYER, D. A.; GRINARI, J. M.; PHILIPPS, B. S.; BAUMAN, D. E. The role of  $\Delta 9$ -desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA. *J. Nutr. Biochem.*, v. 12, p. 622–630, 2001.
- CORL, B. A.; BAUMGARD, L. H.; GRINARI, J. M.; DELMONTE, P.; MOREHOUSE, K. M.; YURAWECZ, M. P.; BAUMAN, D. E. *Trans*-7,*cis*-9 CLA Is Synthesized Endogenously by  $\Delta 9$ -Desaturase in Dairy Cows. *Lipids*, v. 37, p. 681–688, 2002.
- CORL, B. A.; BAUMGARD, L. H.; GRINARI, J. M.; DELMONTE, P.; MOREHOUSE, K. M.; YURAWECZ, M. P.; BAUMAN, D. E. *Trans*-7, *cis*-9 CLA is synthesized endogenously by  $\delta 9$ -CORL, B. A.; BARBANO, D. M.; BAUMAN, D. E.; IP, C. *cis*-9, *trans*-11 CLA Derived Endogenously from *trans*-11 18:1 Reduces Cancer Risk in Rats. *J. Nutr.*, v. 133, p. 2893–2900, 2003.
- 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, 2001.
- COSTA, J. L.; NOVAES, L. P.; SA, W. F. *et al.* Sistema de produção de leite a pasto com rebanho mestiço: 25 anos de informações. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. 51p.
- CRUZ-HERNANDEZ, C.; KRAMER, J. K. G.; KENNELLY, J. J.; GLIMM, D. R.; SORENSEN, B. M.; OKINE, E. K.; GOONEWARDENE, L. A.; WESELAKE, R. J. Evaluating the Conjugated Linoleic Acid and *Trans* 18:1 Isomers in Milk Fat of Dairy Cows Fed Increasing Amounts of Sunflower Oil and a Constant Level of Fish Oil. *J. Dairy Sci.* V. 90, p. 3786–3801, 2007.
- DABDOUBT, S. A. M.; SHOOK, G. E. Phenotypic relations among milk yield, somatic cell count, and clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v. 67, p. 163-4, Supplement 1, 1984.
- DANONE – Danone do Brasil. Disponível em: <http://exame.abril.com.br/negocios/empresas/industria/noticias/danone-entra-na-disputa-com-nestle-pelo-segmento-de-leite-premium> Acessado em: 26/10/2012.
- DEHORITY, B. A. Rumen Microbiology. Nottingham: Nottingham University Press, 372 p., 2003.

- DELMONTE P; KATAOK, A.; CORL, B. A.; BAUMAN, D. E.; YURAWECZ, M. P. Relative retention order of all isomers of *cis/trans* conjugated linoleic acid FAME from the 6,8- to 13,15-positions using silver ion HPLC with two elution systems. *Lipids*, v. 40, p. 509-14, 2005.
- DE LORGERIL, M.; RENAUD, S.; MAMELLE, N.; SALEN, P. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet*, v. 343, p.1454-59, 1994.
- 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.; WOLFF, R. L.; PRECHT, D.; MOLKENTIN, J. Study of Individual *trans*- and *cis*-16:1 Isomers in Cow, Goat, and Ewe Cheese Fats by Gas-Liquid Chromatography with Emphasis on the *trans*- $\Delta^3$  Isomer. *Lipids*, V. 35, n. 9, 2000.
- DESTAILLATS, F.; TROTTLER, J. P.; GALVEZ, J. M. G.; ANGERS, P. Analysis of  $\alpha$ -Linolenic Acid Biohydrogenation Intermediates in Milk Fat with Emphasis on Conjugated Linolenic Acids. *Journal of Dairy Science.*, v. 88, p. 3231-3239, 2005.
- 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.
- DESVERGNE. B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr. Rev.*, v. 20, p. 649-688, 1999.
- DE VETH, M. J.; GRINARI, J. M.; PFEIFFER, A. M.; BAUMAN, D. E. Effect of CLA on milk fat synthesis in dairy cows: comparison of inhibition by methyl esters and free fatty acids, and relationships among studies. *Lipids*. v. 39, p. 365-72, 2004.
- DEVILLARD, E., MCINTOSH, F. M.; NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J. Rumen ciliate protozoa contain high concentrations of conjugated linoleic acids and vaccenic acid, yet do not hydrogenate linoleic acid or desaturate stearic acid. *Br. J. Nutr.*, v. 96, p. 697-704, 2006.
- DEWHURST, R. J.; SCOLLAN, N. D.; YOUELL, S. J.; TWEED, J. K. S.; HUMPHREYS, M. O. Influence of species, cutting date and cutting interval on the fatty acid composition of grasses. *Grass and Forage Science*, Oxford, v. 56, n. 1, p. 68-74, 2001.
- DEWHURST, R. J.; MOORBY, J. M.; SCOLLAN, N. D.; TWEED, J. K. S.; HUMPHREYS, M. O. Effects of a stay-green trait on the concentration and stability of fatty acid in perennial ryegrass. *Grass and Forage Science*, Oxford, v. 57, n. 4, p. 360-366, 2002.
- 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., ANAND, G. R.; SATTER, L. D.; PARIZA, M. W. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci.*, v. 82, p. 2146-2156, 1999.
- DIAS, K. M. *Perfil de ácidos graxos em pastos de capim-elefante cv. Pioneiro submetidos a alturas de pastejo e severidades de desfolha*. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Florianópolis – SC, 2012.
- DIEDRICH, M.; HENSCHHEL, K. P. The natural occurrence of unusual fatty acids. 1. Odd numbered fatty acids. *Nahrung*, v. 34, p. 935-943, 1990.
- DIMOPOULOS, N.; WATSON, M.; SAKAMOTO, K.; HUNDAL, H. S. Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem. J.*, v. 1, p. 473-481, 2006.

- DIONISI, F.; GOLAY, P. A.; FAY, L. B. Influence of Milk fat presence on the determination of *trans* fatty acids in fats for infant formulae. *Analytica Chimica Acta*. V. 465, p. 395-407, 2002.
- DOREAU, M.; FERLAY, A. Digestion and utilization of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, v. 45, p. 379-396, 1994.
- DOREAU, M.; LAVERROUX, S.; NORMAND, J.; CHESNEAU, G.; GLASSER, F. Effect of linseed fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on fatty acid rumen metabolism and intestinal digestibility in cows. *Lipids*. V. 44, p. 53-62, 2009.
- DOW AGROSCIENCE. O óleo de girassol alto oleico. Disponível em: <<http://www.dowagro.com/Omega-9Oils/index.htm>>. Acessado em: 20/08/2012.
- DRACKLEY, J.K. Lipid Metabolism. In: D'MELLO, J. P. F. (Ed.) *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. 1. Ed. Cidade: CABI. p. 97-119, 2000.
- DUCKETT, S. K., ANDRAE, J. G.; OWENS, F. N. Effect of highoil corn or added corn oil on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *J. Anim. Sci.*, v. 80, p. 3353-3360, 2002.
- EATON, S.; KIM, B.; MORTEZA, P. Mammalian mitochondrial  $\beta$ -oxidation. *Biochemical Journal*, v. 320, p. 345-357, 1996.
- ECHELMEIER, S.; DEPETERS, E.; PEREZ-MONTI, H.; TAYLOR, S. Effects of continuous infusions of canola oil into either the rumen or the abomasum of lactating dairy cows on milk composition and nutrient digestion. *J. Anim. Sci.*, v. 76, p. 301, 1998.
- EICHHOLZER, M.; STAHELIN, H. Is there a hypocholesterolemic factor in milk and milk products? *Int J Vitam Nutr Res*, v. 63, p. 158-167, 1993.
- 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.; ELLEN, G.; VAN DER HORST, H.; MUUSE, B. G.; BOER, H.; TAMMINGA, S. 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, , p. 191-205, 2003.
- ELGERSMA, A.; TAMMINGA, S.; ELLEN, G. Review: Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*, v. 131, p. 207-225, 2006.
- ELWOOD, P. C.; PICKERING, J. E.; HUGHES, J.; FEHILY, A. M.; NESS, A. R. Milk drinking, ischaemic heart disease and ischaemic stroke. Evidence from cohort studies. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v. 58, p. 718-24, 2004.
- ELWOOD, P. C.; GIVENS, D. I.; BESWICK, A. D.; FEHILY, A. M.; PICKERING, J. E.; GALLACHER, J. The Survival Advantage of Milk and Dairy Consumption: an Overview of Evidence from Cohort Studies of Vascular Diseases, Diabetes and Cancer. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 27, p. 723S-734S, 2008.
- ELWOOD, P. C.; PICKERING, J. E.; GIVENS, D. I.; GALLACHER, J. E. The consumption of milk and dairy foods and the incidence of vascular disease and diabetes: An overview of the evidence. *Lipids*, v. 45, p.925-939 2010.

- FALL, R.; KARL, T.; HANSEL, A.; JORDAN, A.; LINDINGER, W. Volatile organic compounds emitted after leaf wounding: on-line analysis by proton-transfer-reaction mass spectrometry. *J. Geophys. Res.*, v. 104, p. 15963–15974, 1999.
- FARMAKI, T.; SANMARTIN, M.; JIMENEZ, P.; PANEQUE, M.; SANZ, C.; VANCANNEYT, G.; LEON, J.; SANCHEZ-SERRANO, J. J. Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, p. 555–568, 2007.
- FEHILY, A. M.; YARNELL, J. W.; SWEETNAM, P. M.; ELWOOD, P. C. Diet and incident ischaemic heart disease: The Caerphilly study. *British Journal of Nutrition*, v. 69, p. 303-14, 1993.
- 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.
- FELTON, D. O.; IBRAHIM, S. A.; ABUGHAZALEH, A. A. Temporal changes in milk conjugated linoleic acid for cows fed a pasture- or conserved-forages-based diet and supplemented with fish oil and sunflower oil. *Can. J. Anim. Sci.*, v. 88, p. 123-127, 2008.
- FERNANDES, S. A. A.; MATTOS, W. R. S.; MATARAZZO, S. V.; BAMA, M. A. S.; ROSSETO, C. V. Perfil de Ácidos graxos em alimentos de clima tropical utilizados nas dietas para ruminantes. *B. Indústria. anim.*, Nova Odessa, v. 64, n. 1, p. 19-27, 2007.
- FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C. The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 53, p.275–97, 2002.
- FIEVEZ, V.; VLAEMINCK, B.; DHANOA, M. S.; DEWHURST, R. J. Use of principal component analysis to investigate the origin of heptadecenoic and conjugated linoleic acids in milk. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 4047–4053, 2003.
- FONOLLÁ, J.; LÓPEZ-HUERTAS, E.; MACHADO, F. J.; MOLINA, D.; ÁLVAREZ, I.; MÁRMOL, E.; NAVAS, M.; PALACÍN, E.; GARCÍA-VALLS, M. J.; REMÓN, B.; BOZA, J. J.; MARTIN, J. L. Milk enriched with “healthy fatty acids” improves cardiovascular risk markers and nutritional status in human volunteers. *Nutrition*, v. 25, 408–414, 2009.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. *Qualidade do leite e controle de mastite*, 1. ed. São Paulo: Lemos Editorial. 2000. 175p.
- FONSECA, L. F. L. Pagamento por qualidade: situação atual e perspectivas para o Brasil. In: Simpósio Internacional sobre Produção Intensiva de Leite – INTERLEITE, 5, 2001, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Instituto Fernando Costa – SP, 2001. 193p.
- FUENTES, M. C.; CALSAMIGLIA, S.; CARDOZO, P. W.; VLAEMINCK, B. Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *J. Dairy Sci.*, v. 92, p. 4456–4466, 2009.
- FULCO, A. J. Fatty acid metabolism in bacteria. *Prog. Lipid Res.*, v. 22, p. 133–160, 1983.
- 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.
- GAMA, M. A. S.; LOPES, F. C. F.; RIGUEIRA, J. C. S. *et al.* Perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa de manteigas oriundas de vacas recebendo dietas com óleo de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 21., 2008, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: sBCTA/UFMG, 2008.
- GARNSWORTHY, P. C. *Fat in dairy cow diets*. In: GARNSWORTHY, P. C.; WISEMAN, J. (Eds.) *Recent developments in ruminant nutrition* 4.ed. Nottingham, p.399-444, 2002.

- GARNSWORTHY, P. C.; MASSON, L. L.; LOCK, A. L.; MOTTRAM, T. T. Variation of Milk Citrate with Stage of Lactation and *De Novo* Fatty Acid Synthesis in Dairy Cows. *J. Dairy Science*. v. 89, p. 1604-1612, 2006.
- GAVINO, V. C.; GAVINO, G.; LEBLANC, M. J.; TUCHWEBER, B. An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure *cis*-9, *trans*-11- octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters. *J Nutr.*, v. 130, p. 27-29, 2000.
- GERMAN, J. B. Butyric acid: a role in cancer prevention. *Nutr Bull.*, v. 24, p. 293-299, 1999.
- GERMAN, J. B.; GIBSON, R. A.; KRAUSS, R. M.; NESTEL, P.; LAMARCHE, B.; VAN STAVEREN, W. A.; STEIJNS, J. M.; DE GROOT, L. C. P. G. M.; LOCK, A. L.; DESTAILLATS, F. A reappraisal of the impact of dairy foods and Milk fat on cardiovascular disease risk. *Eur. J. Nutr.*, v. 48, p. 191-203, 2009.
- GIDDING, S. S.; LICHTENSTEIN, A. H.; FAITH, M. S.; KARPYN, A.; MENNELLA, J. A.; POPKIN, B.; ROWE, J.; VAN HORN, L.; WHITSEL, L. Implementing American Heart Association Pediatric and Adult Nutrition Guidelines: A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism, Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Epidemiology and Prevention, and Council for High Blood Pressure Research. *Circulation*. v. 119, p.1161-1175, 2009.
- GLASSER, F.; SCHMIDEL, Y. P.; SAUVANT, D.; DOREAU, M. Digestion of fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. *Animal*, v. 2, p. 691-704, 2008.
- GOFF, J. P.; HORST, R. L. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science*, v. 80, p. 1260-1268, 1997.
- GOFF, D. C.; D'AGOSTINO, J. R.; HAFFNER, S. M.; OTVOS, J. D. Insulin resistance and adiposity influence lipoprotein size and subclass concentrations. Results from the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Metabolism*, v. 54, p. 264-70, 2005.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H. O.; RIBEIRO, L. A. *Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais*. Porto Alegre: Ed Félix H. D. Gonzalez, 2000. 108p.
- GRIINARI, J. M., DWYER, D. A., MCGUIRE, M. A., BAUMAN, D. E., PALMQUIST, D. L., NURMELA, K. V. V. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. v. 81, p. 1251-1261, 1998.
- GRIINARI, J. M.; BAUMAN, D. E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol.1, pp.180-200, 1999.
- GRIINARI, J. M.; CORL, B. A.; LACY, S. H.; CHOUINARD, P. Y.; NURMELA, K. V. V.; BAUMAN, D. E. Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized Endogenously in Lactating Dairy Cows by  $\Delta^9$ -Desaturase. *J. Nutr.*, v. 130, p. 2285-2291, 2000.
- GRUMMER, R. R.; ANUENTANO, L. E.; BERTH, S. J.; SKAAR, T. C. Effects of negative energy balance on circulating metabolites and hepatic lipid metabolism in lactating goats. *J. Dairy Sci.*, v. 71, Suppl. 1, p. 246 (Abstr.), 1988.
- GRUNDY, S. M. Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 60, p. 986S-990S, 1994.
- GUDLA, P.; ABUGHAZALEH, A. A.; ISHLAH, A.; JONES, K. The effect of level of forage and oil supplement on biohydrogenation intermediates and bacteria in continuous cultures. *Animal feed Science and Technology*. v. 171, p. 108-116, 2012.
- HA, Y. L.; GRIMM, N. K.; PARIZA, M. W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*, v. 8, p.1881-1887, 1987.

- 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.
- HAMMARSTEDT, P. A.; JANSSON, P. A.; WESSLAU, C.; YANG, X.; SMITH, U. Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 301, p. 578-582, 2003.
- HANSON, R. W.; BALLARD, F. J. The Relative Significance of Acetate and Glucose as Precursors for Lipid Synthesis in Liver and Adipose Tissue from Ruminants. *Biochem. J.*, v.105, p. 529, 1967.
- HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: HOBSON, P.N. (Ed.) *The rumen microbial ecosystem*. London: Elsevier Applied Science, p.285-322, 1988.
- HARMEYER, J., MARTENS, H. Aspects of urea metabolism with reference to the goat. *J. Dairy Sci.*, v. 63, p. 1707-1728, 1980.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract.*, v. 22(6), p. 475-476, 1973.
- HARVATINE, K. J.; BAUMAN, D. E. SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. *Journal of Nutrition*, v. 136, p. 2468–2474, 2006.
- HARWOOD, J. L. *Plant acyl lipids: structure, distribution and analyses*. In: Stumpf, P. K.; Conn, E. E. The biochemistry of plants. New York: Academic Press, v. 4, p. 1-55, 1980.
- HASSIM, H. A.; LOURENÇO, M.; GOEL, G.; VLAEMINCK, B.; GOH, Y. M.; FIEVEZ, V. Effect of different inclusion levels of oil palm fronds on in vitro rumen fermentation pattern, fatty acid metabolism and apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid. *Animal Feed Science and Technology*, v. 162, p. 155–158, 2010.
- HAUG, A.; HALLAQ, H.; LEAF, A. Potential antiatherogenic effects of omega-3 fatty acids. In: NERISERNERI, G. G.; GENSINI, G. F.; ABBATE, R.; PRISCO, D. *Thrombosis, an update* Florence: Scientific Press, p. 361-372, 1992.
- HAUG, A.; HØSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, v. 6, p. 25, 2007.
- HAZEBROEK, J. P. Analysis of genetically modified oils. *Progress in Lipid Research*, v. 39, p. 477-506, 2000.
- HE, X.; ZHANG, H.; YANG, X.; ZHANG, S.; DAI, Q.; XIAO, W.; REN, G. Modulation of immune function by conjugated linoleic acid in chickens. *Food Agri. Immunol.*, v. 18, p. 169-178, 2007.
- HE, M.; ARMENTANO, L. E. Effect of fatty acid profile in vegetable oils and antioxidant supplementation on dairy cattle performance and milk fat depression. *J. Dairy Sci.*, v. 94, p. 2481–2491, 2011.
- HE, M.; PERFIELD, K. L.; GREEN, H. B.; ARMENTANO, L. E. Effect of dietary fat blend enriched in oleic or linoleic acid and monensin supplementation on dairy cattle performance, milk fatty acid profiles, and milk fat depression. *J. Dairy Sci.*, v. 95, p. 1447–1461, 2012.
- HODGSON, J. M.; WAHLQVIST, M. L.; BOXALL, J. A.; BALAZS, N. D. Platelet trans fatty acids in relation to angiographically assessed coronary artery disease. *Atherosclerosis*, v. 120, p. 147-154, 1996.
- HOPPE, C.; MØLGAARD, C.; MICHAELSEN, K.F. Cow's milk and linear growth in industrialized and developing countries. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 26, p. 131–73, 2006.

- HOWARD, B. V.; VAN HORN, L.; HSIA, J.; MANSON, J. E.; STEFANICK, M. L. Low-fat dietary pattern and risk of cardiovascular disease: The Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *J. Am. Med. Assoc.*, v. 295, p. 655-666, 2006.
- HRISTOV, A. N.; KENNINGTON, L. R.; MCGUIRE, M. A.; HUNT, C. W. Effect of diets containing linoleic acid or oleic acid-rich oils on ruminal fermentation and nutrient digestibility, and performance and fatty acid composition of adipose and muscle tissues of finishing cattle. *Journal of Animal Science*, v. 83, p. 1312-1321, 2005.
- HUR, S. J.; PARK, Y. Effect of conjugated linoleic acid on bone formation and rheumatoid arthritis. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 568, p. 16-24, 2007.
- HUTH, P. J.; PARK, K. M. Influence of Dairy Product and Milk Fat Consumption on Cardiovascular Disease Risk: A Review of the Evidence. *Advances in Nutrition*, v. 3, p. 266-285, 2012.
- INSEL, P.; TURNER, R. E.; ROSS, D. *Nutrition*. 2. Ed.. Cidade: American dietetic association, 2004, 782p.
- IP, C.; CHIN, S. F.; SCIMECA, J. A.; PARIZA, M. W. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Research*, v. 51, p. 6118-6124, 1991.
- IP, C.; BRIGGS, S. P.; HAEGELE, A. D.; THOMPSON, H. J.; STORKSON, J.; SCIMECA, J. A. The efficacy of conjugated linoleic acid in mammary cancer prevention is independent of the level or type of fat in the diet. *Carcinogenesis*, v. 17, p. 1045-1050, 1996.
- IP, C.; DONG, Y.; IP, M. M.; BANNI, S.; CARTA, G.; ANGIONI, E.; MURRU, E.; SPADA, S.; MELIS, M. P.; SAEBO, A. Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention. *Nutr. Cancer.*, v. 43, p. 52-58, 2002.
- JACOBS, A. A. A.; VAN BAAL, J.; SMITS, M. A.; TAWHEEL, H. Z. H.; HENDRIKS, W. H.; VAN VUUREN, A. M.; DIJKSTRA, J. Effects of feeding rapeseed oil, soybean oil, or linseed oil on stearoyl-CoA desaturase expression in the mammary gland of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 94, p. 874-887, 2011.
- JAHREIS, G.; FRITSCH, J.; STEINHART, H. Conjugated linoleic acid in milk fat: variation high depending on production system. *Nutrition Research*, v. 17, p. 1479-1484, 1997.
- JENKINS, T. C. Lipid Metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science*, v. 76, p. 3851-3863, 1993.
- JENKINS, T. C. Butylsoyamide protects soybean oil from ruminal biohydrogenation: effects of butylsoyamide on plasma fatty acids and nutrient digestion in sheep. *J. Anim. Sci.*, v. 73, p. 2376-2381, 1995.
- JENKINS, T. C., ABUGHAZALEH, A. A.; FREEMAN, S.; THIES, E. J. The production of 10-hydroxystearic acid and 10-ketostearic acids is an alternate route of oleic acid transformation by the ruminal microbiota in cattle. *J. Nutr.*, v. 136, p. 926-931, 2006.
- JENKINS, T. C.; WALLACE, R. J.; MOATE, P. J.; MOSLEY, E. E. BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, v. 86, p. 397-412, 2008.
- JENSEN, R. G. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 295-350, 2002.
- KANEDA, T. *Iso-* and *anteiso-*fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.*, v. 55, p. 288-302, 1991.
- KATZ, I.; KEENEY, M. Characterization of the Octadecenoic Acids in Rumen Digesta and Rumen Bacteria. *J. Dairy Sci.*, v. 49, p. 962-966, 1966.

- KAY, J. K.; MACKLE, T. R.; AULDIST, M. J.; THOMSON, N. A.; BAUMAN, D. E.; Endogenous synthesis of *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. *J Dairy Sci*, v. 87, p. 369-78, 2004.
- KAY, J. K.; ROCHE, J. R.; KOLVER, E. S.; THOMSON, N. A.; BAUMGARD, L. H. A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, v. 72, p. 322-332, 2005.
- KELLEY, D. S.; TAYLOR, P. C.; RUDOLPH, I. L.; BENITO, P.; NELSON, G. J.; MACKEY, B. E.; ERICKSON, K. L. Dietary conjugated linoleic acid did not alter immune status in young healthy women. *Lipids*, v. 35, p. 1065-1071, 2000.
- KELLY, M. L.; KOLVER, E. S.; BAUMAN, D. E.; VAN AMBURGH, M. E.; MULLER, L. D. Effect of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *J. Dairy Sci.* v. 81, p. 1626-1630, 1998a.
- KELLY, M. L., BERRY, J. R.; DWYER, A. D.; GRIINARI, J. M.; CHOUINARD, P. Y.; VAN AMBURGH, M. E.; BAUMAN, D. E. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr.*, v. 128, p. 881-885, 1998b.
- KEMP, P.; WHITE, R. W.; LANDER, D. J. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. *J. Gen. Microbiol.*, v. 90, p. 100-114, 1975.
- KEMP, P.; LANDER, D. J. Hydrogenation in vitro of  $\alpha$ -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *Journal of Gen. Microbiol.* v. 130, p. 527-533, 1984.
- KHAN, N. A.; CONE, J. W.; HENDRIKS, W. H. Stability of fatty acids in grass and maize silages after exposure to air during the feed out period. *Animal Feed Science and Technology*, v. 154, p. 183-192, 2009.
- KHAN, N. A.; CONEA, J. W.; FIEVEZ, V.; HENDRIKS, W. H. Causes of variation in fatty acid content and composition in grass and maize silages. *Animal Feed Science and Technology*, v. 174, p. 36- 45, 2012.
- KHANAL, R. C.; DHIMAN, T. R. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid (CLA): A Review. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 3, p. 72-81, 2004.
- KHIAOSA-ARD, R.; KLEVENHUSEN, F.; SOLIVA, C. R.; KREUZER, M.; LEIBER, F. Transfer of linoleic and linolenic acid from feed to milk in cows fed isoenergetic diets differing in proportion and origin of concentrates and roughages. *Journal of Dairy Research*, v. 77, p. 331-336, 2010.
- 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.
- KOZLOSKI, G. V. *Bioquímica dos ruminantes*, 2 ed. Santa Maria: UFSM. 2009, 214p.
- KRAMER, J. K. G.; FELLNER, V.; DUGAN, M. E. R. *et al.* Evaluating Acid and Base Catalysts in the Methylation of Milk and Rumen Fatty Acids with Special Emphasis on Conjugated Dienes and Total trans Fatty Acids. *Lipids*, v. 32, n. 11, p. 1219- 1228, 1997.
- KRAMER, J. K. G.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; ZHOU, J. Conjugated linoleic acids and octadecenoic acids: Analysis by GC. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Vol. 103, Issue 9, p. 600-609, 2001.
- KRAMER, J. K. G.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; DENG, Z.; ZHOU, J.; JAHREIS, G.; DUGAN, M. E. R. Analysis of conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 79(suppl), p. 1137S-45S, 2004.
- KRATZ, M.; BAARS, T.; GUYENET, S. The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular, and metabolic disease. *European Journal of Nutrition*, on-line version, 2012.

- KRIS-ETHERTON, P. M.; PEARSON, T. A.; WAN, Y.; HARGROVE, R. L.; MORIARTY, K.; FISHELL, V.; ETHERTON, T. D. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 70, p. 1009-1015, 1999.
- KRISTENSEN, D.; HEDEGAARD, R. V.; NIELSEN, J. H.; SKIBSTED, L. H. Oxidative stability of buttermilk as influenced by the fatty acid composition of cows' milk manipulated by diet. *Journal of Dairy Research*, v. 71, p. 46-50, 2004.
- KRITCHEVSKY, D. Diet and cancer: what's next?. *J Nutr.*, v. 133(11 Suppl 1), p. 3827S-3829S, 2003.
- KUHNT, K.; KRAFT, J.; MOCKEL, P.; JAHREIS, G. *Trans*-11-18:1 is effectively delta-9-desaturated compared with *trans*-12-18:1 in humans. *British Journal of Nutrition*, v. 95, p. 752-761, 2006.
- LACOUNT, D.; DRACKLEY, J.; LAESCH, S.; CLARK, J. Secretion of oleic acid in milk fat in response to abomasal infusions of canola or high oleic sunflower fatty acids. *J. Dairy Sci.*, v. 77, p. 11372-1385, 1994.
- LAMARCHE, B.; LEMIEUX, I.; DESPRES, J. P. The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects. *Diabetes Metab.*, v. 25, p. 199-211, 1999.
- LARSSON, S. C.; BERGKVIST, L.; WOLK, A. High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 82, p. 894-900, 2005.
- LAVERROUX, S.; GLASSER, F.; GILLET, M.; JOLY, C.; DOREAU, M. Isomerization of Vaccenic Acid to *cis* and *trans* C18:1 Isomers During Biohydrogenation by Rumen Microbes. *Lipids*, v. 46, p. 843-850, 2011.
- LAWLESS, F.; MURPHY, J. J.; HARRINGTON, D. *et al.* Elevation of conjugated *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 3259-3267, 1998.
- LE DU, Y. L. P.; PENNING, P. D. *Animal based techniques for estimating herbage intake*. In: LEAVER, J.D. Herbage intake handbook. Hurley: British Grassland Society, p.37-76, 1982.
- LEE, T. I.; YOUNG, R. A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.*, v. 34, p. 77-137, 2000.
- LEE, Y.; JENKINS, T. C. Biohydrogenation of Linolenic Acid to Stearic Acid by the Rumen Microbial Population Yields Multiple Intermediate Conjugated Diene Isomers. *Journal of Nutrition*, v. 141, p. 1445-1450, 2011.
- LEITE, M. O. *Fatores interferentes na análise eletrônica da qualidade do leite cru conservado com azidiol liquid, azidiol comprimido e bronopol*. 2006. 63 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG.
- LEITE, R. M. V. B. C. *Avaliação de danos e efeito de variáveis ambientais na mancha de alternaria (Alternaria helianthi) em girassol*. 107 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- 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.
- LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n. 3, 2001.

- LOBLEY, G. E.; CONNELL, A.; LOMAX, M. A. et al. The effect of nitrogen and protein supplementation on feed intake, growth and digestive function of steers with different *Bos taurus* genotypes when fed a low quality grass hay. *British Journal of Nutrition*, v. 73, p. 667-685, 1995.
- LOCK, A. L.; BAUMAN, D. E. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*, v. 39, p. 1197-1206, 2004.
- LOCK, A. L.; PARODI, P. W.; BAUMAN, D. E. The biology of *trans* fatty acids: Implications for human health and the dairy industry. *Aust. J. Dairy. Technol.*, v. 60, p. 134-142, 2005.
- LOCK, A. L.; BAUMAN, D. E. Separating Milk Fats from Fiction. *WCDS Advances in Dairy Technology*, v. 23, p. 19-36, 2011.
- LOOR, J. J.; BANDARA, A. B. P. A.; HERBEIN, J. H. Characterization of 18:1 and 18:2 isomers produced during microbial biohydrogenation of unsaturated fatty acids from canola and soya bean oil in the rumen of lactating cows. *J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr.*, v. 86, p. 422-432, 2002a.
- LOOR, J. J.; HERBEIN, J. H.; POLAN, C. E. *Trans*18:1 and 18:2 Isomers in Blood Plasma and Milk Fat of Grazing Cows Fed a Grain Supplement Containing Solvent-Extracted or Mechanically Extracted Soybean Meal. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 1197-1207, 2002b.
- LOOR, J. J.; QUINLAN, L. E.; BANDARA, A. B. P. A.; HERBEIN, J. H. Distribution of *trans*-vaccenic acid and *cis*9,*trans*11-conjugated linoleic acid (rumenic acid) in blood plasma lipid fractions and secretion in milk fat of Jersey cows fed canola or soybean oil. *Anim. Res.*, v. 51, p. 119-134, 2002c.
- LOOR, J. J.; HERBEIN, J. H.; JENKINS, T. C. Nutrient digestion, biohydrogenation, and fatty acid profiles in blood plasma and milk fat from lactating Holstein cows fed canola oil or canolamide. *Animal Feed Science and Technology*, v. 97, p. 65-82, 2002d.
- LOOR, J. J.; UEDA, K.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y.; DOREAU, M. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of *trans* fatty acid and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.87, p. 2472-2485, 2004.
- LOOR, J. J.; FERLAY, A.; OLLIER, A.; UEDA, K.; DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. High-Concentrate Diets and Polyunsaturated Oils Alter *Trans* and Conjugated Isomers in Bovine Rumen, Blood, and Milk. *J. Dairy Sci.*, v. 88, p. 3986-3999, 2005.
- 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, 2002.
- LOPES, F. C. F. Determinação do consumo de forrageiras tropicais por vacas em lactação em condição de pastejo. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, v. 52, p. 1-116, 2007.
- LOPES, F. C. F.; GAMA, M. A. S.; ANTONIASSI, R.; BIZZO, H. R.; RIBEIRO, C. G. S.; BARROS, P. A. V.; CASTRO, R. J. C.; MESQUITA, R. A.; RODRIGUEZ, N. M. Índices de aterogenicidade e trombogenicidade de manteigas Oriundas do leite de vacas consumindo dietas com óleo de soja. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 21, 2008, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: SBCTA, 2008.
- LOPES, F. C. F.; GAMA, M. A. S.; RIBEIRO, C. G. S.; MOURTHÉ, M. H. F.; BARROS, P. A. V.; SOUZA, S. M. Produção de leite com alto teor de CLA – Experiência brasileira. In: PEREIRA, L. G. R., et al. *Pesquisa, desenvolvimento e inovação para a sustentabilidade da bovinocultura leiteira*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2011.
- LOPES, F. C. F.; SOUZA, S. M.; GAMA, M. A. S.; ALEVATO, C. B.; ALMEIDA, M. M.; BARROS, P. A. V. Índices de qualidade nutricional da gordura do leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com dietas à base de cana de açúcar suplementadas com níveis crescentes de óleo de girassol. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., Brasília, DF. *Anais...*, Brasília: SBZ, 2012a.

- LOPES, F. C. F.; MOURTHÉ, M. H. F.; REIS, R. B.; GAMA, M. A. S.; BARROS, P. A. V.; ALEVATO, C. B.; MOREIRA, E. A.; ALMEIDA, M. M. Índices de qualidade nutricional da gordura do leite de vacas Holandês x Gir em pastagem de capim-Marandu suplementado com quantidades crescentes de grão de soja tostado. In: Congresso Internacional do Leite, 11., 2012, Goiânia, Goiás. *Anais...* Goiânia, Goiás: Embrapa, 2012b.
- LOPES, M. A.; LAGE, L. A.; LOPES, F. C. F.; RIBEIRO, C. G. S.; GAMA, M. A. S.; RODRIGUEZ, N. M. Economic viability of feeding dairy cows on diets containing different levels of soybean oil. *R. Bras. Zootec.*, v. 41, n. 9, p. 2085-2091, 2012c.
- LUCY, M. C. Desafios da reprodução em vacas de leite de alta produção. In: Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos, 15., Uberlândia, Minas Gerais. *Anais...* Uberlândia, Minas Gerais: 2011.
- LUI, O. L.; MAK, N. K.; LEUNG, K. N. Conjugated linoleic acid induces monocytic differentiation of murine myeloid leukemia cells. *Intern. J. Oncology*, v. 27, p. 1737-1743, 2005.
- MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRIES, G. A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 6, p. 1883-1886, 2000.
- MALNIC, G., MARCONDES, M. *Fisiologia renal*. 3.ed. São Paulo: EPU. 409p, 1986.
- MANDARINO, J. M. G.; *Características bioquímicas e nutricionais do óleo e do farelo de girassol*. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1992, 25p. (Embrapa-CNPSo, Documentos, 52).
- MANSON, S. *How the cow makes lactose*. Disponível em: <<http://www.western dairyscience.com>> Acesso em: 17/07/12.
- MARCKMANN, P.; SANDSTROM, B.; JESPERSEN, J. Low-fat, high-fiber diet favorably affects several independent risk markers of ischemic heart disease: observations on blood lipids, coagulation, and fibrinolysis from a trial of middle-aged Danes. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 59, p. 935-939, 1994.
- MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 19, p. 761-770, 2006.
- MASSART-LEEN, A. M.; ROETS, E.; PEETERS, G.; VERBEKE, R. Propionate for fatty acid synthesis by the mammary gland of the lactating goat. *J. Dairy Sci.*, v. 66, p. 1445-1454, 1983.
- MASOOD, A.; STARK, K. D.; SALEM JR, N. A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. *Journal of Lipid Research*. V. 46, p. 2299-2305, 2005.
- MCCANN, S. E.; IP, C.; IP, M. M.; MCGUIRE, M. K.; MUTI, P.; EDGE, S. B.; TREVISAN, M.; FREUDENHEIM, J. L. Dietary intake of conjugated linoleic acids and risk of premenopausal and postmenopausal breast cancer, Western New York Exposures and Breast Cancer Study. *Cancer Epidemiol Biomark Prevent.*, v. 13, p.1480-1484, 2004.
- MCDONALD, P.; EDWARD, R. A.; GREENHALGH, J. E. D. *Nutrición animal*. 5.ed. Zaragoza: Acríbia, 576 p., 1999.
- MCGARRY, J. D.; KUWAJIMA, M.; NEWGARD, C. B.; FOSTER, D. W.; KATZ, J. From Dietary Glucose to Liver Glycogen: The Full Circle. *Round Annual Review of Nutrition*, v. 7, p. 51-73, 1987.
- MCKAIN, N.; SHINGFIELD, K. J.; WALLACE, R. J. Metabolism of conjugated linoleic acids and 18:1 fatty acids by ruminal bacteria: products and mechanisms. *Microbiology*, v. 156, p. 579-588, 2010.
- MEIJER, G. W.; VAN TOL, A.; VAN BERKEL, T. J.; WESTSTRATE, J. A. Effect of dietary elaidic versus vaccenic acid on blood and liver lipids in the hamster. *Atherosclerosis*, v. 157, p. 31-40, 2001.

- MENOTTI, A.,; KROMHOUT, D.; BLACKBURN, H.; FIDANZA, F.; BUZINA, R.; NISSINEN, A.. Food intake patterns and 25-year mortality from coronary heart disease: Cross-cultural correlations in the Seven Countries Study. *Eur. J. Epidemiol.*, v. 15, p. 507–515, 1999.
- MENSINK, R. P.; KATAN, M. B. Effect of dietary *trans* fatty acids on highdensity and low-density lipoprotein cholesterol in healthy subjects. *The New England Journal of Medicine*, v. 323, p. 439-445, 1990.
- MENSINK, R. P.; ZOCK, P. L.; KESTER, A. D. M.; KATAN, M. B. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 77, p. 1146-1155, 2003.
- MERSMANN, H. J. Mechanism for conjugated linoleic acid-mediated reduction in fat deposition. *J. Anim. Sci.*, v. 80, p. 126-134, 2002.
- MIN, D. B.; BOFF, J. F. *Lipid oxidation of edible oil*. In: AKOH, C.; MIN, D. B. (Eds.), Food lipids, pp. 335–363. New York: Marcel Dekker, 2001.
- MITCHELL, G. E. Seasonal Variation in Citrate Content of Milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 34, n. 4, p. 158-160, 1979.
- MOON, Y. S.; LATASA, M. J.; GRIFFIN, M. J.; SUL, H. S. Suppression of fatty acid synthase promoter by polyunsaturated fatty acids. *Journal of Lipid Research*. v. 43, p. 691–698, 2002.
- MORALES, M.; PALMQUIST, D.; WEISS, W. Effects of fat source and copper on unsaturation of blood and milk triacylglycerol fatty acids in Holstein and Jersey cows. *J. Dairy Sci.*, v. 83, p. 2105–2111, 2000.
- MORALES-ALMARAZ, E.; SOLDADO, A.; GONZALEZ, A.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A.; DOMINGUEZ-VARA, I.; DELGADO, B. R.; VICENTE, F. Improving the fatty acid profile of dairy cow milk by combining grazing with feeding of total mixed ration. *Journal of Dairy Research*, v. 77, p. 225–230, 2010.
- MOSLEY, E. E.; NUDDA, A.; CORATO, A.; ROSSI, E.; JENKINS, T. C.; MCGUIRE, M. A. Differential biohydrogenation and isomerization of [U-13C]oleic and [1-13C]oleic-acids by mixed ruminal microbes. *Lipids*, v. 41, p. 513–517, 2006.
- MOURTHÉ, M. H. F.; REIS, R. B.; LOPES, C. F. C.; GAMA, M. A. S.; SOUZA, R. C. Desempenho, composição do leite e metabólitos sanguíneos de vacas Holandês x Gir manejadas em pastagem de Brachiaria brizantha cv. Marandu e suplementadas com grão de soja tostado. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 64, n. 5, p. 1223-1231, 2012a.
- MOURTHÉ, M. H. F.; LOPES, F. C. F.; REIS, R. B.; BARROS, P. A. V., GAMA, M. A. S.; ALMEIDA, M. M. Índices de qualidade nutricional da gordura do leite de vacas Holandês x Gir manejadas em pastagem de Brachiaria suplementada com quantidades crescentes de grão de soja tostado. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49., Brasília, DF. *Anais...*, Brasília: SBZ, 2012b.
- MURPHY, J. J.; CONNOLLY, J. F.; MCNEILL, G. P. Effects on milk fat composition and cow performance of feeding concentrates containing full fat rapeseed and maize distillers grains on grass-silage based diets. *Livestock Production Science*, v. 44, 1995.
- MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; VICTOR, W. R. *Harper's Illustrated Biochemistry*. Cidade: McGraw-Hill. 36ed, 2003.
- NAGAO, K.; INOUE, N.; WANG, Y. M.; YANAGITA, T. Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin level and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 310, p. 562-566, 2003.

- NAM, I. S.; GARNSWORTHY, P. C. Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, v. 103, p. 551–556, 2007.
- NAVARRO, V.; ZABALA, A.; MACARULLA, M. T.; FERNANDEZ-QUINTELA, A.; RODRIGUEZ, V. M.; SIMON, E.; PORTILLO, M. P. Effects of conjugated linoleic acid on body fat accumulation and serum lipids in hamsters fed na atherogenic diet. *J. Physiol. Biochem.*, v. 59, p.193-199, 2003.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: Principles of Biochemistry*. Sarvier, 4Ed, 2004, 1024p.
- NESS, A. R.; SMITH, G. D.; HART, C. Milk, coronary heart disease and mortality. *J. Epidemiol. Community Health*, v. 55, p. 379-382, 2000.
- NICOLOSI, R. J.; WOOLFREY, B.; WILSON, T. A.; SCOLLIN, P.; *et al.*: Decreased aortic early atherosclerosis and associated risk factors in hypercholesterolemic hamsters fed a high- or mid-oleic acid oil compared to a high-linoleic acid oil. *J. Nutr. Biochem.*, v. 15, p. 540-47, 2004.
- NOAKES, M.; NESTEL, P. J.; CLIFTON, P. M. Modifying the fatty acid profile of dairy products through feedlot technology lowers plasma cholesterol of humans consuming the products. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 63, p. 42-46, 1996.
- NOBLE, R. C.; MOORE, J. H.; HARFOOT, C. G. Observations on the pattern on biohydrogenation of esterified and unesterified linoleic acid in the rumen. *British Journal of Nutrition*, v. 31, p. 99-108, 1974.
- NOLAN, J. V. Nitrogen metabolism by ruminal microorganisms: current understanding and future perspectives. *Aust. J. Agric. Res.*, v. 47, p. 227-246, 1993.
- NOONE, E. J.; ROCHE, H. M.; NUGENT, A. P.; GIBNEY, M. J. The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects. *Brit. J. Nutr.*, v. 88, p. 243-251, 2002.
- NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7.ed. Washington: National Academy, 2001, 381p.
- NTAMBI, J. M.; MIYAZAKI, M. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid Res.*, v. 43, p. 91–104, 2004.
- OCHOA, J. J.; FARQUHARSON, A. J.; GRANT, I.; MOFFAT, L. E.; HEYS, S. D.; WAHLE, K. W. Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 isomers. *Carcinogenesis*, v. 25, p. 1185-1191, 2004.
- O'DONNELL-MEGARO, A. M.; BARBANO, D. M.; BAUMAN, D. E. Survey of fatty acid composition of retail milk in the United States including regional and seasonal variations. *J Dairy Sci.*, v. 94, p. 59-65, 2011.
- OLIVEIRA, M. D. S.; CÁCERES, D. R. *girassol na alimentação de bovinos*. Jaboticabal: FUNEP, 2005, 20p.
- OLIVEIRA, M. A. *Proporção de forragem e teor de lipídeos na dieta de vacas leiteiras, sobre o consumo, produção e a composição do leite*. 53 f. Dissertação (Mestrado Zootecnia) - Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, 2005.
- OLIVEIRA, D. S.; TIMM, C. D. Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.*, v. 102, p. 17-22, 2007.
- 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. *J. Anim. Sci.*, v. 85, p. 1228–1234, 2007.

- O'SHEA, M.; BASSAGANYA-RIERA, J.; MOHEDE, I. C. M. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 79, p. 1199S-1206S, 2004.
- OSPINA, P. A.; NYDAM, D. V.; STOKOL, T.; OVERTON, T. R. Evaluation of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 546-554, 2010.
- OSTROWSKA, E.; CROSS, R. F.; MURALITHARAN, M.; BAUMAN, D. E.; DUNSHEA, F. R. Effects of dietary fat and conjugated linoleic acid on plasma metabolite concentrations and metabolic responses to homeostatic signals in pigs. *Br J Nutr.*, v. 88, p. 625-634, 2002.
- PALMQUIST, D. A kinetic concept of lipid transport in ruminants: A review, *J. Dairy Sci.*, v. 59, p. 355-363, 1976.
- PALMQUIST, D. L.; KINSEY, D. J. Lipolysis of triglyceride by ruminal microorganisms. In: *Proc. 22nd Conf. Rumen Function*, Chicago, IL (Abstr.). 1993.
- PALMQUIST, D. L.; LOCK, A. L.; SHINGFIELD, K. J.; BAUMAN, D. E. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid in Ruminants and Humans. *Advances in Food and Nutrition Research*, v. 50, p. 179-217, 2005.
- PALMQUIST, D. L. Great discoveries of milk for a healthy diet and a healthy life. *R. Bras. Zootec.*, v. 39, p. 465-477, Supl. especial, 2010.
- PALLADINO, R. A.; O'DONOVAN, M.; KENNEDY, E.; MURPHY, J. J.; BOLAND, T. M.; KENNY, D. A. Fatty acid composition and nutritive value of twelve cultivars of perennial ryegrass. *Grass and Forage Science*, v. 64, p. 219-226, 2009.
- PALOMBO, J. D.; GANGULY, A.; BISTRIAN, B. R.; MENARD, M. P. The antiproliferative effects of biologically active isomers of conjugated linoleic acid on human colorectal and prostatic cancer cells. *Cancer Lett*, v. 177, p. 163-172, 2002.
- PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. Minireview: Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: Evidence and speculation. *P. S. E. B. M.*, v. 223, p. 8-13, 2000.
- PARODI, P. W. Distribution of Isomeric Octadecenoic Fatty Acids in Milk Fat, *J. Dairy Sci.*, v. 59, p. 1870-1873, 1976.
- PARODI, P. W. Cows' Milk Fat Components as Potential Anticarcinogenic Agents. *J. Nutr.*, v. 127, p. 1055-1060, 1997.
- PARODI, P. W. Conjugated linoleic acid in food. In: SEBEDIO, J. L.; CHRISTIE, W. W.; ADLOF, R. (eds.). *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* Champaign: AOCS Press, 2003. v. 2, p. 101-122.
- PARODI, P. W. Has the association between saturated fatty acids, serum cholesterol and coronary heart disease been over emphasized? *Int. Dairy J.*, v. 19, p. 345-361, 2009.
- PEREZ, J. B.; SOUZA, R. S. C.; ANTONIASSI, R.; BIZZO, H. R.; GAMA, M. A. S.; LOPES, F. C. F. Perfil de ácidos graxos em cultivares de capim elefante utilizados na alimentação de vacas leiteiras. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 33., Águas de Lindoia, SP. *Anais...*, Águas de Lindoia: SBQ, 2008.
- PEREZ-MATUTE, P.; MARTI, A.; MARTÍNEZ, J. A.; FERNANDEZ-OTERO, M. P.; STANHOPE, K. L.; HAVEL, P. J.; MORENO-ALIAGA, M. J. Conjugated linoleic acid inhibits glucose metabolism, leptin and adiponectin secretion in primary cultured rat adipocytes. *Molec Cellul Endocrinol.*, v. 268, p. 250-258, 2007.
- PERFIELD, J. W.; LOCK, A. L.; GRINARI, 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. *J. Dairy Sci.*, v. 90, p. 2211-2218, 2007.

- PETERSON, D. G.; MATITASHVILI, E. 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. Nutr.*, v. 133, p. 3098–3102, 2003.
- PETERSON, D. G.; MATITASHVILI, E. A.; BAUMAN, D. E. The Inhibitory Effect of *trans*-10, *cis*-12 CLA on Lipid Synthesis in Bovine Mammary Epithelial Cells Involves Reduced Proteolytic Activation of the Transcription Factor SREBP-1. *J. Nutr.* v. 134, p. 2523–2527, 2004.
- PETIT, H. V. Digestion, Milk Production, Milk Composition, and Blood Composition of Dairy Cows Fed Formaldehyde Treated Flaxseed or Sunflower Seed. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 2637–2646, 2003.
- PIPEROVA, L. S.; TETER, B. B.; BRUCKENTAL, I.; SAMPUGNA, J.; MILLS, S. E.; YURAWECZ, M. P.; FRITSCH, J.; KU, K.; ERDMAN, R. E. Mammary Lipogenic Enzyme Activity, *trans* Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acids Are Altered in Lactating Dairy Cows Fed a Milk Fat-Depressing Diet. *Journal of Nutrition*, v. 130, p. 2568–2574, 2000.
- PIPEROVA, L. S.; SAMPUGNA, J.; TETER, B. B.; KALSCHEUR, K. F.; YURAWECZ, M. P.; KU, Y.; MOREHOUSE, K. M.; ERDMAN, R. A. Duodenal and Milk *Trans* Octadecenoic Acid and Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomers Indicate that Postabsorptive Synthesis Is the Predominant Source of *cis*-9-Containing CLA in Lactating Dairy Cows. *Journal of Nutrition*, v. 132, p. 1235–1241, 2002.
- POLIDORI, P.; MAGGI, G. L.; MORETTI, V. M.; VALFRE, F.; NAVAROTTO, P. A note on the effect of the use of bovine somatotrophin on the fatty acid composition of the milk fat in dairy cows. *Anim. Prod.*, v. 57, p. 319–322, 1993.
- PULLEN, D. L.; EMERY, R. S.; AMES, N. R. Turnover of hepatic and plasma triacylglycerol in sheep. *J. Anim. Sci.*, v. 66, p. 1538–1547, 1988.
- RAMAKERS, J. D.; PLAT, J.; SEBEDIO, J. L.; MENSINK, R. P. Effects of the individual isomers *cis*-9, *trans*-11 vs. *trans*-10, *cis*-12 of conjugated linoleic acid (CLA) on inflammation parameters in moderately overweight subjects with LDL-phenotype B. *Lipids*, v. 40, p. 909–918, 2005.
- RANA, S. M.; TYAGI, A.; HOSSAIN, S. A.; TYAGI, A. K. Efecte of tanniferous *Terminalia chebula* extract on rumen biohydrogenation,  $\Delta^9$ -desaturase activity, CLA content and fatty acid composition in *longissimus dorsi* muscle of kids. *Meat Science*, v. 90, p. 558–563, 2012.
- REGO, O. A.; ROSA, H. J. D.; PORTUGAL, P. V.; FRANCO, T.; VOUZELA, C. M.; BORBA, A. E. S.; BESSA, R. J. B. The effects of supplementation with sunflower and soybean oils on the fatty acid profile of milk fat from grazing dairy cows. *Anim. Res.*, v. 54, p. 17–24, 2005.
- RENNÓ, L. N.; VALADARES, R. F. D.; VALADARES FILHO, S. C.; LEÃO, M. I.; SILVA, J. F. C.; CECON, P. R.; GONÇALVES, L. C.; DIAS, H. L. C.; LINHARES, R. S. Concentração Plasmática de Ureia e Excreções de Ureia e Creatinina em Novilhos, *Rev. Bras. Zootec.*, v. 29, p. 1235–1243, 2000.
- RIBEIRO, C. V.; EASTRIDGE, M. L.; FIRKINS, J. L.; ST-PIERRE, N. R.; PALMQUIST, D. L. Kinetics of fatty acid biohydrogenation in vitro. *J. Dairy Sci.* v. 90, p. 1405–1416, 2007.
- RIBEIRO, C. G. S. *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 mestiças.* 2009. 119p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Minas Gerias, Belo Horizonte, 2009a.
- RIBEIRO, C. G. S.; LOPES, F. C. F.; RODRIGUEZ, N. M. *et al.* Parâmetros ruminais de vacas Holandês x Zebu recebendo dietas baseadas em capim-elefante picado suplementado com níveis crescentes de óleo de soja. In: REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46., 2009, Maringá. *Anais...* Maringá: SBZ, 2009b.

- RIBEIRO, C. G. S.; LOPES, F. C. F.; GAMA, M. A. S.; MORENZ, M. J. F. et al. Produção e composição do leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com dois tipos de óleo de girassol e dois modos de fornecimento do concentrado em dietas à base de capim-elefante picado. In: Congresso Internacional do Leite, 11., 2012, Goiânia, Goiás. *Anais...* Goiânia, Goiás: Embrapa, 2012.
- RINGSEIS, R.; MULLER, A.; HERTER, C.; GAHLER, S.; STEINHART, H.; EDER, K. CLA isomers inhibit TNF alpha-induced eicosanoid release from human vascular smooth muscle cells via a PPAR-gamma ligand-like action. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1760, p. 290-300, 2006.
- RITZENTHALER, K. L.; MCGUIRE, M. K.; FALEN, R.; SHULTZ, T. D.; DASGUPTA, N.; MCGUIRE, M. A. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *J. Nutr.*, v. 131, p. 1548-1554, 2001.
- ROACH, J. A. G.; MASSOBA, M. M.; YURAWECZ, P. M. et al. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. *Analytica Chimica Acta*, v.465, p.207-226, 2002.
- ROCHE, H. M.; NOONE, E.; SEWTER, C. Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid: insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXRA. *Diabetes*, v. 51, p. 2037-44, 2002.
- ROJAS, A.; LOPEZBOTE, C.; ROTA, A.; MARTIN, L.; RODRIGUEZ, P. L.; TOVAR, J. J. Fatty acid composition of Verata goat kids fed either goat milk or commercial milk replacer. *Small Rumin. Res.*, v. 14, p. 61-66, 1994.
- ROMERO, F. J.; BOSCH-MORELL, F.; ROMERO, M. J.; ROMERO, B.; MARIN, N.; ROMA, J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ. Health. Perspect.*, v. 106, p. 1229-1234, 1998.
- RUDOLPH, M.; MARIANS, R.; BURNS, V.; RUSSELL, T.; NEVILLE, M. C. SREBP1-c plays a regulatory, but not essential role in mammary lipogenesis during lactation. *The Endocrine's Society 87th Annual Meeting Abstracts*, p. 604, 2005.
- RUSSELL, J. B.; O'CONNOR, J. D.; FOX, D. J.; VAN SOEST, P. J.; SNIFFEN, C. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I. Ruminant fermentation. *J. Anim. Sci.*, v. 70, p. 3551-3561, 1992.
- SALAS-SALVADO, J.; MARQUEZ-SANDOVAL, F.; BULLO, M. Conjugated linoleic acid intake in humans: A systematic review focusing on its effect on body composition, glucose, and lipid metabolism. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 46, p. 479-488, 2006.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.
- SAMPATH, H.; NTAMBI, J. M. Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, v. 25, p. 317-40, 2005.
- SANDSTROM, B.; MARCKMANN, P.; BINDSLEV, N. An eight-month controlled study of a low-fat high-fibre diet: effects on blood lipids and blood pressure in healthy young subjects. *Eur J Clin Nutr*, v. 46, p. 95-109, 1992.
- SANTOS, M. V. Efeito da mastite sobre a qualidade do leite e dos derivados lácteos. In: 2º Congresso Panamericano de Qualidade do Leite e Controle da Mastite, 2002. *Anais...* Ribeirão Preto: Instituto Fernando Costa, p.179-188, 2002.
- SANTOS, J. E. P. *Distúrbios metabólicos*. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S. G. (eds.) *Nutrição de ruminantes*. 2ª Edição. Prol Editora Gráfica, 616p, 2011.
- SBRISSIA, A. F.; SCHIMITT, D.; DIAS, K. M.; PADILHA, D. A.; SANTOS, G. T.; ZANINI, G. D.; RODOLFO, G. R.; DUCHINI, P.; MIQUELOTO, T. Manejo intensivo de pastagens para gado de

- leite. In: Simpósio nacional sobre nutrição de gado de leite, 1, 2012, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: FEPMVZ Editora – UFMG, 2012. 231p.
- SCHILSTRA, M. J.; VELDINK, G. A.; VERHAGEN, J.; Vliegenthart, J. F. Effect of lipid hydroperoxide on lipoxygenase kinetics. *Biochemistry.*, v. 31, p. 7692-7699, 1992.
- SEIDEL, C.; DEUFEL, T.; JAHREIS, G. Effects of fat-modified dairy products on blood lipids in humans in comparison with other fats. *Ann. Nutr. Metab.*, v. 49, p. 42-48, 2005.
- SELNER, D. R., SCHULTZ, R. H. Effects of feeding oleic acid or hydrogenated vegetable oils to lactating cows. *J. Dairy Sci.*, v. 63, p. 1235–1241, 1980.
- SHINGFIELD, K. J.; AHVENJÄRVI, 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.; REYNOLDS, C. K.; HERVA, 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, 2006.
- SHINGFIELD, K. J.; GRIINARI, J. M. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *European Journal of Lipid Science and Technology*. V. 109, p. 799–816, 2007.
- 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.
- SHINGFIELD, K. J.; BERNARD, L.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y. Role of *Trans* Fatty Acids in the Nutritional Regulation of Mammary Lipogenesis in Ruminants. *Animal*, v. 4, p. 1140-1166, 2010.
- SIMOPOULOS, A. P. The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Experimental Biology and Medicine*, v. 233, p. 674-688, 2008.
- SIRI-TARINO, P. W.; SUN, Q.; HU, F. B.; KRAUSS, R. M. Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 91, p. 535-546, 2010.
- SKLAN, D.; ASHKENNAZI, R.; BRAUN, A. *et al.* Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows. *Journal of Dairy Science*, v.75, n.9, p.2463-2472, 1992.
- SLOTS, T.; BUTLER, G.; LEIFERT, C.; KRISTENSEN, T.; SKIBSTED, L. H.; NIELSEN, J. H. Potentials to differentiate milk composition by different feeding strategies. *J. Dairy Sci.*, v. 92, p.2057–2066, 2009.
- SMEDMAN, A. E.; GUSTAFSSON, I. B.; BERGLUND, L. G.; VESSBY, B. O. Pentadecanoic acid in serum as a marker for intake of milk fat: relations between intake of milk fat and metabolic risk factors. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 69, p. 22-29, 1999.
- SMEDMAN, A.; VESSBY, B.; BASU, S. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid on lipid peroxidation in humans: regulation by alpha-tocopherol and cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin. Sci. (Lond)*, v. 106, p. 67-73, 2004.
- SMITH, S. B., PRIOR, R. L.; MERSMANN, H. J. Interrelationship between insulin and lipid metabolism in normal and alloxan-diabetic cattle. *J. Nutr.*, v. 113, p. 1002–1014, 1983.
- SMITH, S. B.; PRIOR, A. L. Comparisons of Lipogenesis and Glucose Metabolism Between Ovine and Bovine. *Adipose Tissues. J. Nutr.*, v. 116, p. 1279-1286, 1986.
- SMITH, S. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.*, v. 8, p. 1248–1259, 1994.

- SMITH, S. A.; KING, R. E.; MIN, D. B. Oxidative and thermal stabilities of genetically modified high oleic sunflower oil. *Food Chemistry*, v. 102, p. 1208–1213, 2007.
- SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; van SOEST, P. J. *et al.* A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, v. 70, n. 12, p. 3562-3577, 1992.
- 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.
- SOUZA, S. M. *Desempenho e perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de girassol em dietas à base de cana-de-açúcar*. 2011. 98 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.
- SOYEURT, H.; DEHARENG, F.; MAYERES, P.; BERTOZZI, C.; GENGLER, N. Variation of  $\Delta 9$ -Desaturase Activity in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 91, p. 3211–3224, 2008.
- SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A. H.; BERTOLAMI, M. C. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 88, Supl. I, p. 1-19, 2007.
- STAPLES, C. R. Microwave drying for measurement of forage moisture. University of Florida. Cooperative Extension Service. P. 1-2, 1988. Disponível no endereço: <http://edis.ifas.ufl.edu/ds158>. Acessado em: 06/08/2012.
- STEELE, W.; MOORE, J. H. The effects of mono-unsaturated and saturated fatty acids in the diet on milk-fat secretion in the cow. *J. Dairy Res.*, v. 35, p. 353, 1968.
- STEINHART, H.; RICKERT, R.; WINKLER, K. Identification and analysis of conjugated linoleic acid isomers (CLA). *Eur. J. Med. Res.*, v. 8, p. 370-372, 2003.
- ST-PIERRE, A. C.; CANTIN, B.; DAGENAIS, G. R.; MAURIEGE, P.; BERNARD, P. M.; DESPRES, J. P.; LAMARCHE, B. Low-density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease in men: 13- year follow-up data from the quebec cardiovascular study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 25, p. 553-559, 2005.
- 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.* 36:1202–1206, 1988.
- SYNGENTA. Projeto girassol Syngenta. Disponível em: <http://www.syngenta.com/country/br/pt/Pages/home.aspx> . Acessado em: 23/08/2012.
- SYVERTSEN, C.; HALSE, J.; HOIVIK, H. O.; GAULLIER, J. M.; NURMINIEMI, M.; KRISTIENSEN, K.; EINERHAND, A.; O'SHEA, M.; GUDMUNDSSEN, O. The effect of 6 months supplementation with conjugated linoleic acid on insulin resistance in overweight and obese. *Internat. J. Obesity*, v. 31, p. 1148-1154, 2007.
- SWESSON, J. M.; REECE, W. O. *Dukes's physiology of domestic animal*. Cornell: Cornell University, 1993. 856p.
- TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; MATSUI, H.; NAKAMURA, M.; BENNO, Y. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, p. 2766–2774, 2001.
- TAUBES, G. The soft science of dietary fat. *Science*, v. 291, p. 2535-2541, 2001.
- TAYLOR, C. G.; ZAHRADKA, P.; Dietary conjugated linoleic acid and insulin sensitivity and resistance in rodent models. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 79, p.1164S-1168S, 2004.

- THIVIERGE, M.; CHOUINARD, P.; LEVESQUE, J.; GIRARD, V.; SEOANE, J.; BRISSON, G. Effects of buffer on milk fatty acids and mammary arteriovenous differences in dairy cows fed Ca salts of fatty acids. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 2001–2010, 1998.
- THOMAS, A.; YEUNG, C. H.; YANG, L.; HUANG, Y.; WANG, J.; CHEN, Z. Y. Dietary conjugated linoleic acid mixture affects the activity of intestinal acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase in hamsters. *Br. J. Nutr.*, v. 84, p. 935-41, 2000.
- THORMAR, H.; ISAACS, E. E.; KIM, K. S.; BROWN, H. R. Interaction of visna virus and other enveloped viruses by free fatty acids and monoglycerides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 724, p. 465-71, 1994.
- 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.
- TIMMEN, H.; PATTON, S. Milk fat globules: fatty acid composition, size and *in vivo* regulation of fat liquidity. *Lipids*. V. 23, p. 685–689, 1988.
- TONSTAD, S.; HJERMANN, I. A high risk score for coronary heart disease is associated with the metabolic syndrome in 40-yearold men and women. *J. Cardiovasc. Risk..*, v. 10, p. 129-35, 2003.
- TOOMEY, S.; MCMONAGLE, J.; ROCHE, H. M. Conjugated linoleic acid: a functional nutrient in the different pathophysiological components of the metabolic syndrome?. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, v. 9, p. 740-747, 2006.
- TRICON, S.; BURDGE, G. C.; KEW, S.; BANERJEE, T.; RUSSELL, J. J.; JONES, E. L.; GRIMBLE, R. F.; WILLIAMS, C. M.; YAQOUB, P.; CALDER, P. C. Opposing effects of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 80, p. 614-620, 2004a.
- TRICON, S.; BURDGE, G. C.; KEW, S.; BANERJEE, T.; RUSSELL, J. J.; GRIMBLE, R. F.; WILLIAMS, C. M.; CALDER, P. C.; YAQOUB, P. Effects of *cis*-9,*trans*-11 and *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid on immune cell function in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 80, p. 1626–1633, 2004b.
- TRICON, S.; BURDGE, G. C.; JONES, E. L.; RUSSELL, J. J.; EL-KHAZEN, S.; MORETTI, E.; HALL, W. L.; GERRY, A. B.; LEAKE, D. S.; GRIMBLE, R. F.; WILLIAMS, C. M.; CALDER, P. C.; YAQOUB, P. Effects of dairy products naturally enriched with *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 83, p. 744-753, 2006.
- 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. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 76, p. 504–510, 2002.
- UAUY, R.; ARO, A.; CLARKE, R.; GHAFLOORUNISSA, R.; L'ABBÉ, M.; MOZAFFARIAN, D.; SKEAFF, M.; STENDER, S.; TAVELLA, M. WHO scientific update on *trans* fatty acids: summary and conclusions. *European Journal of Clinical Nutrition.*, v. 63, p. s68-s75, 2009
- ULBRIGHT, T. I. V.; SOUTHGATE, D. A. T. Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*, v. 338, p. 985-992, 1991.
- ULYATT, M. J.; LASSEY, K. R.; SHELTON, I. D.; WALKER, C. F. Methane emission from dairy cows and wether sheep fed subtropical grass-dominant pastures in midsummer in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 45, p. 227–234, 2002.
- USDA. Dietary Guidelines for Americans 2005. Washington DC: USDA, 2005.
- VALADARES FILHO, S. C.; MACHADO, P. A. S.; CHIZZOTTI, M. L.; AMARAL, H. F.; MAGALHÃES, K. A.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; CAPELLE, E. R. 2ª Edição, *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos para Bovinos*. Editora UFV. UFV, Viçosa – MG, 502 p., 2010.

- VALEILLE, K.; GRIPOIS, D.; BLOUQUIT, M. F.; SOUIDI, M.; RIOTTOT, M.; BOUTHEGOURD, J. C.; SEROUGNE, C.; MARTIN, J. C. Lipid atherogenic risk markers can be more favourably influenced by the *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoate isomer than a conjugated linoleic acid mixture or fish oil in hamsters. *Br J Nutr.*, v. 91, p. 191-199, 2004.
- VAN NEVEL, D. J.; DEMEYER, D. I. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.*, v. 36, p. 53-63, 1996.
- VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994, 724 p.
- WISEK, W. J. Ammonia metabolism, urea cycle capacity and their biochemical assesment. *Nutr. Rev.*, v. 37, p. 273-282, 1979.
- VLAEMINCK, B.; DEWHURST, R. J.; DEMEYER, D.; FIEVEZ, V. Odd and branched chain fatty acids to estimate proportions of cellulolytic and amylolytic particle associated bacteria. *J. Anim. Feed Sci.*, v. 13 (Suppl. 1), p. 235–238, 2004.
- VLAEMINCK, B.; DUFOUR, C.; VAN VUUREN, A. M.; CABRITA, A. M. R.; DEWHURST, R. J.; DEMEYER, D.; FIEVEZ, V. Potential of odd and branched chain fatty acids as microbial markers: evaluation in rumen contents and milk. *J. Dairy Sci.*, v. 88, p. 1031–1041, 2005.
- 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. *J. Dairy Sci.*, v. 89, p. 2668–2678, 2006a.
- VLAEMINCK, B.; FIEVEZ, V.; CABRITA, R. 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.
- WAHLE, K.; HEYS, S.; ROTONDO, D. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Progr. Lipid Res.*, v. 43, p. 553-587, 2004.
- WARD, A. T.; WITTENBERG, K. M.; FROEBE, H. M.; PRZYBYLSKI, R.; MALCOLMSON, L. Fresh Forage and Solin Supplementation on Conjugated Linoleic Acid Levels in Plasma and Milk. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 1742–1750, 2003.
- WARENSJÖ, E.; JANSSON, J. H.; BERGLUND, L.; BOMAN, K.; AHREN, B.; WEINEHALL, L.; LINDAHL, B.; HALLMANS, G.; VESSBY, B. Estimated intake of milk fat is negatively associated with cardiovascular risk factors and does not increase the risk of a first acute myocardial infarction. A prospective case-control study. *Br. J. Nutr.*, v. 91, p. 635-642, 2004.
- WARENSJÖ, E.; SMEDMAN, A.; STEGMAYR, B.; HALLMANS, G.; WEINEHALL, L.; VESSBY, B.; JOHANSSON, I. Stroke and plasma markers of milk fat intake – a prospective nested case-control study. *Nutrition Journal*, v. 8, 2009.
- WARENSJÖ, E.; NOLAN, D.; TAPSELL, L. Dairy Food Consumption and Obesity-Related Chronic Disease. *Advances in Food and Nutrition Research*, v. 59, p. 1-41, 2010.
- WASOWSKA, I.; MAIA, M. R. G.; NIEDZWIEDZKA, K. M.; CZAUDERNA, M.; RAMALHO RIBEIRO, J. M. C.; DEVILLARD, E.; SHINGFIELD, K. J.; WALLACE, R. J. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. *Br. J. Nutr.* v. 95, p. 1199–1211, 2006.
- WILLETT, W. C.; STAMPFER, M. J.; MANSON, J. E.; COLDITZ, G. A.; SPEIZER, F. E.; ROSNER, B. A.; SAMPSON, L. A.; HENNEKENS, C. H. Intake of *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *The Lancet*, v. 341, p. 581-35, 1993.
- WILLIAMS, A. G.; COLEMAN, A. G. *The Rumen Protozoa*. New York: Springer-Verlag, 1992, 453p.
- 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.

- WHIGHAM, L. D.; COOK, M. E.; ATKINSON, R. L. Conjugated linoleic acid: Implications for human health. *Pharmacol. Res.*, v. 42, p. 503–510, 2000.
- WHITLOCK, L. A.; SCHINGOETHE, D. J.; HIPPEN, A. R.; KALSCHEUR, K. F.; BAER, R. J.; RAMASWAMY, N.; KASPERSON, K. M. Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acids in milk of dairy cows more than when fed separately. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 234–243, 2002.
- WHITE, S. L.; BERTRAND, J. A.; WADE, M. R.; WASHBURN, S. P.; GREEN, J. T.; JENKINS, T. C. Comparison of Fatty Acid Content of Milk from Jersey and Holstein Cows Consuming Pasture or a Total Mixed Ration. *J. Dairy Sci.*, v. 84, p. 2295–2301, 2001.
- WOLK, A.; VESSBY, B.; LJUNG, H.; BARREFORS, P. Evaluation of a biological marker of dairy fat intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 68, p. 291–295, 1998.
- WOLFF, R. L.; BAYARD, C. C.; FABIEN, R.J. Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on trans-18:1 acids. Application to the study of seasonal variations in french butters. *Journal of the American Oil Chemists Society*. Vol. 72, n. 12, p. 1471-1483, 1995.
- WOLFINGER, R. D. Covariance structure selection in general mixed models. *Communications in Statistics Simulation and Computation*, v. 22, p. 1079-1106, 1993.
- WONGTANGTINTHARN, S.; OKU, H.; IWASAKI, H.; TODA, T. Effect of branched-chain fatty acids on fatty acid biosynthesis of human breast cancer cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v. 50, p. 137–143, 2004.
- WRENN, T. R.; WEYANT, J. R.; WOOD, D. L.; BITMANN, J. Increasing polyunsaturation of milk fats by feeding formaldehyde protected sunflower-soybean supplement. *J. Dairy Sci.*, v. 59, p. 627, 1976.
- YANEZ-RUIZ, D. R., SCOLLAN, N. D.; MERRY, R. J.; NEWBOLD, C. J. Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their water-soluble carbohydrate content. *Br. J. Nutr.*, v. 96, p. 861–869. 2006.
- YANG, Y.; SHANGPEI, L.; CHEN, X.; CHEN, H.; HUANG, M.; ZHENG, J. Induction of apoptotic cell death and *in vivo* growth inhibition of human cancer cells by a saturated branched-chain fatty acid, 13-Methyltetradecanoic acid. *Cancer Res.*, v. 60, p. 505–509, 2000.
- YANG, Z. Z.; TSCHOPP, O.; BAUDRY, A.; DUMMLER, B.; HYNX, D.; HEMMING, B. A. Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochemical Society Transactions*, v. 32, p. 350–354, 2004.
- YASHODHARA, B.M.; UMAKANTH, S.; PAPPACHAN, J. M.; BHAT, S. K.; KAMATH, R.; CHOO, B. H. Omega-3 fatty acids: a comprehensive review of their role in health and disease. *Postgrad. Med. J.*, v. 85, p. 84-90, 2009.
- YIN, H.; PORTER, N. A. New Insights Regarding the Autoxidation of Polyunsaturated Fatty Acids. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 7, p. 170-184, 2005.
- YOUNG, G.; CONQUER, J. Omega-3 fatty acids and neuropsychiatric disorders. *Reprod. Nutr. Dev.*, v. 45, p. 1–28, 2005.
- YURAWECZ, M. P.; ROACH, J. A. G.; SEHAT, N.; MOSSOBA, M. M.; KRAMER, J. K. G.; FRITSCH, J.; STEINHART, H.; KU, Y. A New Conjugated Linoleic Acid Isomer, 7-trans, 9-cis-Octadecadienoic Acid, in Cow Milk, Cheese, Beef, and Human Milk and Adipose Tissue. *Lipids*, v. 33, p. 803–809, 1998.