

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Perfil de ácidos graxos do leite e metabolismo de lipídios no rúmen de vacas recebendo dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou de peixe

Laudí Cunha Leite

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Laudí Cunha Leite
Médico Veterinário

**Perfil de ácidos graxos do leite e metabolismo de lipídios no rúmen de vacas
recebendo dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou de
peixe**

Orientador:
Prof. Dr. **DANTE PAZZANESE DUARTE LANNA**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2006**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Leite, Laudí Cunha

Perfil de ácidos graxos do leite e metabolismo de lipídios no rúmen de vacas recebendo dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou de peixe / Laudí Cunha Leite. - - Piracicaba, 2006.
97 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Ácidos graxos 2. Bovinos leiteiros 3. Dieta animal 4. Leite 5. Lipídios
6. Metabolismo animal 7. Omaso de animal – Colheita I. Título

CDD 636.214

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICATÓRIA**À****meus pais,****Lauro e Doroti,****e a meus irmãos,****Lauro Bontorin, Laudo,****Lauro Júnior, Laurí,****Lucimara, Lílian e Letícia****Dedico****A minha noiva,****Meiby Carneiro de Paula,****por compartilhar os sonhos,****pelo sorriso, carinho e dedicação****sempre presentes****durante todos estes anos.****Ofereço**

AGRADECIMENTOS

À **USP/ESALQ**, por meio do **Departamento de Zootecnia**, pela oportunidade de realização do doutorado.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento deste projeto, e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. **Dante Pazzanese Duarte Lanna** pela orientação, amizade e confiança em mim depositada para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Humberto Maciel de França Madeira** pela colaboração e acolhida durante a realização dos trabalhos em Curitiba.

À Prof. Dra. **Maria Ignês Leão** pelos ensinamentos de coleta no omaso e participação neste trabalho.

Aos demais professores do departamento de Zootecnia de ESALQ, pelos ensinamentos.

Ao Dr. **Eduardo da Costa Eifert** pela ajuda na realização deste trabalho e pela amizade.

À **Maria Antônia Etchegaray (Tuka)** pelo carinho com que resolveu todos os problemas burocráticos deste trabalho e sobretudo pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal, **Marco Antonio, Andréa, Rodrigo Almeida, Rogrigo Goulart, Liana, Tiago, Beatriz, Mariana, João, Alexandre, Amanda, Liris, Patrícia, Dimas, Raphael, Ana Paula, Ana Julia, Nice**, pela amizade e excelente convívio durante estes anos.

À Dra. **Carla Bittar**, chefe do Laboratório de Bromatologia, pela amizade e presteza durante as análises laboratoriais.

Aos colegas da PUC-PR, **Gisele Muraro, Bárbara, Daniela, Ana, Carla, Kárita, Jeane**, pela ajuda na realização deste trabalho.

Aos colegas de república meus sinceros agradecimentos pela amizade e companheirismo durante estes anos de convívio, em especial ao **Daniel de Paula Sousa**, pelo espírito competitivo e pelas aulas de tênis, ao **Marconi Batista Teixeira**,

pela simplicidade e humildade, ao **Rodrigo Goulart**, pelo carisma e por me ensinar a valorizar as coisas antigas, ao **José César Cruz Jr**, pela descontração e alegria, e também ao **Rafael Soria** e **Marcos Biehl**.

Aos colegas de departamento, **Patrick**, **José Leonardo**, **Maity**, **Sarturi**, **Marta**, **Lucas Mari**, **Lucas**, **Solidete**, **Vanessa**, **Varginha**, **Mack**, **Júnio Martinez**, **Fiat**, **Bigode**, **Hugo**, **Flávia**, **Molambo**, **Clayton Mendes**, **Gustavo**, **Rafael Canonenco**, **Mario**, **Rafael** e **Janice**, pela amizade.

Ao **Carlos César Alves**, técnico do laboratório de Bromatologia de ESALQ, pela ajuda.

Ao **Joelcio**, técnico do departamento de Zootecnia da UFV, pelos ensinamentos de coleta no omaso e pela confecção dos aparatos necessários a esta coleta.

Aos funcionários **Laureano**, **Juscelino**, **Neco** e **Joaquim**, pela colaboração.

Ao **Antonio Facíola**, pela colaboração nos cálculos de reconstituição das amostras de omaso.

À Cargill pela doação do farelo de soja.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE TABELA.....	9
LISTA DE SIGLAS.....	11
LISTA DE SÍMBOLOS.....	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
Referências.....	22
2 PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DA GORDURA DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM DIETA COM DOIS TEORES DE CONCENTRADO E COM ÓLEO DE SOJA OU DE PEIXE.....	28
Resumo.....	28
Abstract.....	29
2.1 Introdução.....	30
2.2 Desenvolvimento.....	33
2.2.1 Material e Métodos.....	33
2.2.2 Resultados e Discussão.....	38
2.2.2.1 Produção e composição do leite.....	39
2.2.2.2 Perfil de ácidos graxos da gordura do leite.....	43
2.2.2.3 Perfil dos ácidos graxos <i>cis</i> e <i>trans</i> octadecenóicos da gordura do leite.....	50
2.2.2.4 Perfil dos ácidos graxos octadienóicos conjugados (CLA) da gordura do leite.....	53
2.2.2.5 Índice de dessaturase.....	56
2.3 Conclusões.....	59
Referências.....	59
3 CONSUMO, DIGESTIBILIDADE E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO OMASO EM VACAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM DIETA COM DOIS TEORES DE CONCENTRADO E COM ÓLEO DE SOJA OU DE PEIXE.....	65
Resumo.....	65

Abstract.....	66
3.1 Introdução.....	67
3.2 Desenvolvimento.....	69
3.2.1 Material e Métodos.....	69
3.2.2 Resultados e Discussão.....	76
3.2.2.1 Consumo, fluxo de nutrientes e digestibilidades aparentes total e ruminal..	76
3.2.2.2 Perfil de ácidos graxos no canal do omaso.....	80
3.2.2.3 Perfil de ácidos graxos octadecenóicos no canal do omaso.....	86
3.2.2.4 Biohidrogenação ruminal de ácidos graxos.....	90
3.3 Conclusões.....	91
Referências.....	91

RESUMO

Perfil de ácidos graxos do leite e metabolismo de lipídios no rúmen de vacas recebendo dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou de peixe

Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos do teor de concentrado em dietas com óleo de soja ou peixe sobre o consumo, a produção e composição do leite, digestibilidades aparentes total e ruminal e sobre os perfis de ácidos graxos no omaso e na gordura do leite de vacas leiteiras. Foram utilizadas quatro vacas da raça Holandesa, com cânulas ruminais, 109 ± 10 dias em lactação, produção média de 31,24 ± 8,57 kg de leite e peso médio de 652 ± 37 kg, no início do experimento. Foi utilizado o delineamento experimental em Quadrado Latino 4x4, com períodos de 21 dias, sendo os 14 primeiros para adaptação e os sete últimos para colheita de amostras, com arranjo fatorial (2x2) dos tratamentos. Os tratamentos foram dietas totais misturadas, contendo silagem de milho, suplementadas com baixos (40%) ou altos (60%) teores de concentrado e com 2% de óleo de soja ou de peixe na matéria seca (MS). Não houve interação entre a fonte de óleo e o teor de concentrado para a maioria das variáveis estudadas. A presença do óleo de peixe na dieta reduziu o consumo de MS (18,77 x 14,16 kg/d, respectivamente para óleo de soja e peixe - todos os demais dados estão na mesma ordem), as produções de leite (28,72 x 24,34 kg/d), gordura (0,796 x 0,562 kg/d), proteína (0,806 x 0,630 kg/d) e sólidos totais (2,995 x 2,411 kg/d) e os percentuais de gordura (2,81 x 2,34%) e proteína (2,82 x 2,59%) no leite. O tratamento com óleo de peixe aumentou os ácidos graxos insaturados (30,12 x 35,56%) e os ácidos graxos poliinsaturados (4,43 x 5,85%), e reduziu os ácidos graxos saturados (69,66 x 60,05%), na gordura do leite em relação ao óleo de soja. O tratamento com óleo de peixe promoveu uma redução no teor de C_{18:0} no leite (18,90 x 6,82%) e omaso (52,35 x 15,81%) e aumentou de C_{18:1} *trans*-11 no leite (2,84 x 9,75%) e no omaso (6,72 x 18,42%). Os teores de CLA *cis*-9, *trans*-11 (0,61 x 1,41%) foram aumentados no leite, mas não no omaso, com dietas com óleo de peixe. Os teores de C_{20:5} e C_{22:6} foram aumentados na gordura do leite e no omaso com as dietas com óleo de peixe. Não houve efeito de óleo para o CLA *trans*-10, *cis*-12 (P=0,61) na gordura do leite, mas este foi maior para o óleo de soja no omaso (0,09 x 0,02%). O óleo de peixe diminuiu o consumo e fluxo de nutrientes no canal do omaso, aumentou as digestibilidades aparentes total e ruminal de nutrientes, diminuiu a produção de leite, alterou composição do leite e o perfil de ácidos graxos do leite e do omaso.

Palavras-chave: Ácido linoléico conjugado; Ácidos graxos *trans*; Biohidrogenação; Colheita no omaso; depressão da gordura do leite

ABSTRACT

Milk fatty acid profile and lipid metabolism in the rumen of dairy cows fed diets with high or low level of concentrate and soybean or fish oil

The objective of this work was to evaluate the effect of concentrate level and oil source on dry matter intake, milk production and composition, apparent ruminal and total tract digestibilities, omasal and milk fatty acid profiles in dairy cows. Four Holstein cows, fitted with rumen cannula, averaging 109 ± 10 days in milk, producing 31.24 ± 8.57 kg milk per day and live weight 652 ± 37 kg, at start of the trial, were used in a 2 x 2 factorial arrangement of treatments applied to a 4 x 4 Latin square design. The length of periods was 21 days, including 14 days of adjustment to the experimental diets followed by seven days of sampling. The treatments were 4 different diets (total mixed ration) containing maize silage supplemented with low (40%) or high (60%) levels of concentrate and 2% of soybean oil or fish oil on a dry matter (DM) basis. It was found that the level of concentrate and oil source interaction had no effect on almost all the variables. Dry matter intake (18.77×14.16 kg/d, respectively for soybean oil and fish oil – all data is in the same order), milk yield (28.72×24.34 kg/day), fat yield (0.796×0.562 kg/day), protein yield (0.806×0.630 kg/day), total solids yield (2.995×2.411 kg/day), fat percentage ($2.81 \times 2.34\%$) and protein percentage ($2.82 \times 2.59\%$) decreased when fish oil was present. Fish oil increased unsaturated fatty acids (FA) ($30.12 \times 35.56\%$) and polyunsaturated FA ($4.43 \times 5.85\%$), and decreased saturated FA ($69.66 \times 60.05\%$) in milk, when compared to soybean oil. Fish oil decreased $C_{18:0}$ level in milk ($18.90 \times 6.82\%$) and omasum ($52.35 \times 15.81\%$) and increased *trans*-11 $C_{18:1}$ level in milk ($2.84 \times 9.75\%$) and omasum ($6.72 \times 18.42\%$). *cis*-9, *trans*-11 CLA level ($0.61 \times 1.41\%$) was increased in milk for fish oil diet, but did not in omasum. $C_{20:5}$ and $C_{22:6}$ levels were increased in milk and omasum for fish oil diet. *trans*-10, *cis*-12 CLA had no oil effect ($P=0.61$) in milk, but it was higher in omasum for soybean oil diet ($0.09 \times 0.02\%$). Fish oil decreased nutrients intake and omasal flow, increased apparent ruminal and total tract digestibilities, decreased milk production, changed milk composition and fatty acids profile in milk and omasum.

Keywords: Biohydrogenation; Conjugated linoleic acid; Milk fat depression; Omasal sampling; *Trans* fatty acid

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporção dos ingredientes e composição químico-bromatológica das dietas experimentais.....	34
Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais e dos óleos de soja e peixe.....	35
Tabela 3 - Produção e composição do leite de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe.....	40
Tabela 4 - Classes de ácidos graxos da gordura do leite de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe.....	47
Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos da gordura do leite (g/100g) de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe.....	48
Tabela 6 - Perfil de ácidos graxos <i>cis</i> e <i>trans</i> octadecenóicos da gordura do leite (g/100g) de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe.....	52
Tabela 7 - Perfil de ácidos graxos octadienóicos conjugados (CLA) da gordura do leite (g/100g) de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe.....	55
Tabela 8 - Índice de dessaturase de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe.....	57
Tabela 9 - Proporção dos ingredientes e composição químico-bromatológica das dietas experimentais.....	70
Tabela 10 - Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais e dos óleos de soja e peixe.....	71
Tabela 11 - Programa de aquecimento para decomposição de amostras com auxílio de microondas.....	74
Tabela 12 - Consumo e fluxo omasal de nutrientes de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe..	77

Tabela 13 - Digestibilidades aparentes ruminal e total de nutrientes de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe.....	80
Tabela 14 - Perfil de ácidos graxos da digesta do omaso (g/100g) de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe.....	84
Tabela 15 - Perfil de ácidos graxos octadecenóicos da digesta do omaso (g/100g) de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe.....	89

LISTA DE SIGLAS

AGCC – Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AGCI – Ácidos Graxos de Cadeia Ímpar
AGCL – Ácidos Graxos de Cadeia Longa
AGCM – Ácidos Graxos de Cadeia Média
AGCR – Ácidos Graxos de Cadeia Ramificada
AGS – Ácidos Graxos Saturados
AGI – Ácidos Graxos Insaturados
CLA – Ácido Linoléico Conjugado
CMS – Consumo de Matéria Seca
FDA – Fibra Insolúvel em Detergente Ácido
FDN – Fibra Insolúvel em Detergente Neutro
MS – Matéria Seca
MUFA – Ácidos Graxos Monoinsaturados
PB – Proteína Bruta
PUFA – Ácidos Graxos Poliinsaturados

LISTA DE SÍMBOLOS

C_{18:0} – Ácido Esteárico ou Ácido Octadecanóico

C_{18:1} – Ácido Oléico ou Ácido Octadecenóico *cis*-9

C_{18:1} *trans*-11 – Ácido Vaccênico ou Ácido Octadecenóico *trans*-11

C_{18:2} – Ácido Linoléico ou Ácido Octadienóico *cis*-9, *cis*-12

C_{20:5} – EPA ou Ácido Eicosapentaenóico *cis*-5, *cis*-8, *cis*-11, *cis*-14, *cis*-17

C_{22:6} – DHA ou Ácido Docosahexaenóico *cis*-4, *cis*-7, *cis*-10, *cis*-13, *cis*-16, *cis*-19

n - Ômega

sn – *Stereospecifically Numbered* – Número Estereoespecífico

1 INTRODUÇÃO

Em produtos de origem animal, é crescente a preocupação com fatores que desenvolvem ou previnem doenças (BAUMAN et al., 1999). Entre os primeiros trabalhos nesta área, Pariza et al. (1979) encontraram na gordura da carne um fator que possui propriedades anticarcinogênicas, o ácido linoléico conjugado (CLA).

O CLA refere-se a uma classe de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoléico que possui duas insaturações (ligações duplas) alternadas por uma ligação simples, ao contrário do ácido linoléico, onde as insaturações são separadas por uma ligação metilênica.

Recentemente, uma variedade de efeitos benéficos à saúde associados com o CLA tem sido encontrada em modelos experimentais, e incluem, além do efeito anticancerígeno, redução na deposição de gordura corporal, alteração na partição de nutrientes, efeitos antidiabetogênicos, redução no desenvolvimento de aterosclerose, aumento na mineralização óssea, e modulação do sistema imune (McGUIRE; McGUIRE, 1999).

Estes resultados vem estimulando as pesquisas para aumentar o teor de CLA na dieta humana através do aumento do teor de CLA nos produtos originários de animais ruminantes, sua principal fonte (BAUMAN et al., 1999).

O CLA encontrado na gordura do leite e na carne de ruminantes tem duas origens: a biohidrogenação parcial do ácido linoléico no rúmen e a síntese endógena no tecido adiposo e glândula mamária.

O processo de biohidrogenação ruminal é bem descrito para o ácido linoléico, mas outros ácidos graxos ainda não tiveram seu processo totalmente esclarecido. Para que ocorra a biohidrogenação, os lipídios da dieta sofrem inicialmente a hidrólise das ligações éster, catalisadas pelas lipases microbianas. Os ácidos graxos insaturados livres sofrem então a isomerização da dupla ligação *cis*-12, tanto no ácido linoléico como no ácido γ -linolênico, formando as duplas ligações conjugadas contendo a ligação *trans*-11. O CLA *cis*-9, *trans*-11 é formado então como um intermediário transitório na biohidrogenação do ácido linoléico. A seguir ocorre a redução das ligações *cis*, com formação do ácido vaccênico (C_{18:1} *trans*-11), intermediário comum para os ácidos

linoléico e γ -linolênicos. O último passo no processo de biohidrogenação é a redução final do ácido vaccênico até o ácido esteárico ($C_{18:0}$) (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1988). A hidrogenação de $C_{18:1}$ *trans*-11 parece ser um passo limitante na seqüência da biohidrogenação e, como consequência, este penúltimo intermediário se acumula no rúmen e se torna mais disponível para a absorção (BAUMAN et al., 1999).

Destailats et al. (2005) recentemente estudaram a biohidrogenação do ácido α -linolênico e propuseram a formação dos conjugados trienólicos $C_{18:3}$ *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15 e $C_{18:3}$ *cis*-9, *trans*-13, *cis*-15, na proporção de 4:1, respectivamente, como os primeiros intermediários após a isomerização inicial do ácido α -linolênico. Ao final das seqüências de reduções, também há a formação de $C_{18:1}$ *trans*-11 e de $C_{18:1}$ *trans*-13, como intermediários monoenólicos, sendo o primeiro o mais abundante.

Já a biohidrogenação dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), presentes em maiores quantidades no óleo de peixe, parece resultar numa gama muito grande de intermediários pouco conhecidos. O mecanismo de biohidrogenação de EPA e DHA é muito mais complexo e não está totalmente compreendido.

Outra forma de síntese de CLA é a endógena, que envolve a enzima Δ^9 -dessaturase e $C_{18:1}$ *trans*-11 como substrato (CORL et al., 1998; CORL et al., 2001; GRIINARI et al., 2000; MOSLEY et al., 2006). Esta enzima atua adicionando uma insaturação no carbono 9 do ácido vaccênico, formando o CLA *cis*-9, *trans*-11, ou em ácidos graxos saturados, como o ácido esteárico, formando ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oléico. Este é um processo importante na manutenção da fluidez do leite (CHILLIARD et al., 2000).

O aumento da concentração de CLA no leite pode ser obtido por estratégias de alimentação de vacas leiteiras que busquem o aumento do próprio CLA no rúmen como também de seu precursor para síntese endógena, o ácido vaccênico (BAUMAN; LOCK, 2006). Harfoot; Noble e Moore (1973) mostraram que altos teores de ácido linoléico inibem irreversivelmente a hidrogenação de ácido *trans*-11 octadecenóico, aumentando a quantidade de substrato para síntese endógena do CLA *cis*-9, *trans*-11.

O óleo de peixe também promove um aumento significativo na concentração de $C_{18:1}$ *trans*-11 na gordura do leite, com redução drástica dos níveis de ácido esteárico

(C_{18:0}), o que corrobora com a teoria de inibição deste passo no processo de biohidrogenação (ABUGHAZALEH et al., 2002; DONOVAN et al., 2000; SHINGFIELD et al., 2003; SHINGFIELD et al., 2006; WHITLOCK et al., 2002, WHITLOCK et al., 2006). Porém este efeito parece ser muito mais acentuado com a adição do óleo de peixe do que em dietas com lipídios de origem vegetal (RAMASWAMY et al., 2001; WHITLOCK et al., 2002). Abughazaleh et al. (2002) e Whitlock et al. (2002) observaram que, embora o ácido vaccênico e CLA tenham poucos precursores em dietas contendo óleo de peixe, estes dois intermediários tem sua concentração elevada, indicando haver interferência do EPA e DHA na biohidrogenação dos ácidos linoléico e linolênico provenientes de outras fontes de lipídios da dieta. Consistente com esta hipótese, Whitlock et al. (2002) e Ramaswamy et al. (2001) observaram sinergismo na associação do óleo de peixe com outra fonte de gordura insaturada em aumentar a concentração de CLA no leite.

A síntese endógena tem sido demonstrada, por diversos autores, ser mais importante que a biohidrogenação ruminal na secreção de CLA no leite. Griinari et al (2000) infundiram, no abomaso de vacas em lactação, 10 g por dia de óleo de esterculina, rico em ácidos ciclopropenóicos e potente inibidor da enzima Δ^9 -dessaturase, e observaram que 64% do CLA do leite era de origem endógena. Em um trabalho semelhante, Corl et al. (2001) também infundiram no abomaso de vacas em lactação o óleo de esterculina e observaram uma redução de 60-65% no teor de CLA do leite.

Consistente com a constatação da importância da síntese endógena na secreção de CLA, Piperova et al. (2002) mostraram que o fluxo de CLA para o duodeno era muito menor do que a secreção deste na gordura do leite. A relação ácido vaccênico:CLA no duodeno, que foi ao redor de 60:1, caiu para menos de 6:1 na gordura do leite. Neste trabalho, mesmo se todo o CLA presente no duodeno fosse secretado na gordura do leite, ainda assim a síntese endógena contribuiria com 93% do total de CLA. Outro fato que reforça a importância da síntese endógena foi a descoberta do CLA *trans*-7, *cis*-9 (YURAWECES et al., 1998), o segundo isômero mais abundante de CLA. Este isômero de CLA não é intermediário na biohidrogenação de nenhum ácido graxo poliinsaturado

e Corl et al. (1998) demonstraram que o CLA *trans*-7, *cis*-9 era produzido quase que exclusivamente pela síntese endógena.

A comprovação definitiva do papel da síntese endógena na secreção de CLA no leite foi realizada por Mosley et al. (2006) com a infusão no abomaso de 1,5 g de ácido vaccênico marcado com ^{13}C . Estes autores observaram que a síntese endógena foi responsável por 83,1% do CLA do leite e que, devido à ausência de leitura de ^{13}C no CLA do plasma, a glândula mamária foi o principal sítio de ação da Δ^9 -dessorase em vacas em lactação.

Outro isômero de CLA importante é o *trans*-10, *cis*-12. Ao contrário do anterior, este não é sintetizado pelos tecidos animais, sendo resultado apenas da biohidrogenação parcial de ácidos graxos poliinsaturados no rúmen. Porém a formação do CLA *trans*-10, *cis*-12 está ligado a certas dietas que causam grande redução na secreção de gordura do leite em ruminantes, conhecida como depressão da gordura do leite (DGL), cujo mecanismo envolve inter-relação entre processos microbianos no rúmen e o metabolismo em tecidos.

Três principais teorias foram propostas para explicar a DGL, sendo que duas delas relacionam a DGL à limitação de substratos lipogênicos para a glândula mamária, devido à suposta redução na produção de ácido acético e butírico no rúmen (SUTTON, 1989) ou por competição, mediada pela insulina, entre a glândula mamária e outros tecidos (McCLYMONT; VALLANCE, 1962). Apenas a segunda teoria, chamada de insulino-glicogênica, explica parcialmente a redução da gordura do leite, e só nas situações onde há maior dependência da mobilização de lipídios das reservas corporais, como em vacas no início da lactação. A redução na gordura do leite é, neste caso, devido à diminuição dos ácidos graxos de cadeia longa.

Uma terceira teoria propõe uma inibição direta da síntese de gordura da glândula mamária por ação de ácidos graxos *trans*, formados no rúmen pela biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados presentes na dieta (DAVIS; BROWN, 1970). Esta teoria surgiu porque vários trabalhos encontraram forte relação entre o aumento na concentração de ácidos graxos *trans* e DGL (ASTRUP et al., 1976; BANKS et al., 1980; BANKS et al., 1984; GAYNOR et al., 1994; GAYNOR et al., 1995; ERDMAN, 1999; apud BAUMAN; GRIINARI, 2003).

Embora a concentração de ácidos graxos *trans* fosse elevada no leite de todas as vacas com DGL, existiam algumas situações onde não havia DGL e a concentração destes ácidos também era alta (SELNER; SCHULTZ, 1980; KALSCHEUR et al., 1997), criando dúvidas sobre esta teoria. Até que Griinari et al. (1998) demonstraram que o padrão de isômeros *trans* e não o total de isômeros *trans* era a chave para explicar a redução na gordura do leite induzida pela dieta. Estes autores mostraram que a diminuição na gordura do leite estava associada com o aumento na produção de C_{18:1} *trans*-10, e também estabeleceram que duas condições eram necessárias para se observar DGL induzida pela dieta: o suprimento dietético de ácidos graxos poliinsaturados e uma mudança na atividade microbiana no rúmen, provocada por altos teores de concentrado na dieta.

Esta mudança na atividade microbiana envolve a alteração no processo de biohidrogenação que resulta num aumento na formação de C_{18:1} *trans*-10 e seus intermediários. A diminuição do pH ruminal resulta em mudança da população microbiana e conseqüente alteração no padrão dos produtos finais de fermentação (Van SOEST, 1994). Leat et al. (1977) mostraram que mudanças na população bacteriana no rúmen estão associadas com modificações no processo de biohidrogenação consistentes com a alteração do perfil de ácidos *trans*-octadecenóicos achados nos lipídeos da digesta ruminal e nos tecidos. Durante esta situação, o ácido octadecenóico *trans*-10 substitui o C_{18:1} *trans*-11 como o predominante isômero C_{18:1} *trans* na gordura do leite.

A produção de C_{18:1} *trans*-11 é maior em situações de dietas ricas em fibra e isto pode estar relacionado ao fato de que a bactéria celulolítica *Butyrivibrio fibrisolvens*, utilizada como bactéria padrão para formação de CLA *in vitro*, cresce melhor nestas condições. Como ela possui a isomerase *trans*-11, ela produz o CLA *cis*-9, *trans*-11 como o primeiro intermediário na seqüência de biohidrogenação do ácido linoléico e o C_{18:1} *trans*-11 após a redução da ligação *cis* (KEPLER; TOVE, 1967). Já em dietas com baixo teor de fibra, típicas de vacas leiteiras de alta produção, há o desvio na seqüência de biohidrogenação devido ao favorecimento de outras bactérias, tais como *Megasphaera elsdenii*. Estas utilizam lactato como substrato e, como possuem a isomerase *trans*-10, produzem o CLA *trans*-10, *cis*-12 como o primeiro produto da

biohidrogenação. Na seqüência de biohidrogenação, a redução das ligações *cis* deste CLA produz o C_{18:1} *trans*-10 (KIM et al., 2002).

Embora o aumento de C_{18:1} *trans*-10 na gordura do leite tem sido observado em dietas que causam DGL, sua função como inibidor da síntese de gordura do leite não tem sido examinada diretamente devido a falta deste metabólito puro. Em contraste, estudos têm claramente demonstrado que o CLA *trans*-10, *cis*-12 é potente inibidor da síntese de gordura do leite em vacas leiteiras (BAUMGARD et al., 2000; PIPEROVA et al., 2000; VISWANADHA et al., 2003).

O efeito do CLA *trans*-10, *cis*-12 na redução da síntese de lipídios na glândula mamária é devido, pelo menos em parte, a inibição da atividade das enzimas lipogênicas Acetil-CoA Carboxilase e Sintase de Ácido Graxo (PIPEROVA et al., 2000; HAYASHI; MEDEIROS; LANNA, 2002). Redução do conteúdo da gordura do leite tem sido mostrado ser principalmente decorrente da redução de ácidos graxos sintetizados *de novo* pela glândula mamária (PIPEROVA et al., 2000).

Lor e Herbein (2003) enfatizam que este isômero de CLA também inibe a enzima Δ^9 -dessorase, o que resulta numa redução ainda maior na gordura do leite. Neste trabalho, os autores observaram aumento na concentração de C_{18:0} e redução de C_{18:1} na gordura do leite; ambos são, respectivamente, substrato e produto da Δ^9 -dessorase, sendo que a redução de C_{18:1} respondeu por 40% da redução na produção total de ácidos graxos do leite. Bauman e Lock (2006) afirmaram que a inibição da Δ^9 -dessorase só ocorreu em situações onde a dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 promoveu reduções na produção de gordura do leite maior do que 20%.

A infusão de doses crescentes de CLA *trans*-10, *cis*-12 (PETERSON; BAUMGARD; BAUMAN, 2002) ou o fornecimento de uma dieta que causa DGL (PETERSON; MATITASHVILI; BAUMAN, 2003) promoveram uma redução da produção de gordura e a análise do perfil da gordura do leite mostrou que a redução foi devida tanto aos ácidos graxos sintetizados *de novo* pela glândula mamária quanto pelos ácidos graxos pré-formados provenientes da circulação sangüínea.

Uma redução coordenada da abundância de RNAm de vários genes de enzimas ligadas a síntese *de novo* de ácidos graxos (acetil CoA carboxilase, ácido graxo sintase), ao consumo e transporte de ácidos graxos circulantes (lipoproteína lípase,

proteína ligadora de ácidos graxos), a dessaturação de ácidos graxos (Δ^9 - dessaturase), a síntese de triglicerídeo (acil graxo CoA ligase, glicerol fosfato acil transferase e acil glicerol fosfato acil transferase) foi observada em vacas recebendo dieta que causa DGL (PETERSON; MATITASHVILI; BAUMAN, 2003). A resposta bioquímica descrita acima suporta a hipótese de que a redução na produção de gordura envolve uma coordenada regulação de enzimas lipogênicas na glândula mamária, através de um controle central no metabolismo de lipídios desenvolvido por proteínas chamadas de SREBP (sterol response element-binding protein) (BAUMAN; LOCK, 2006).

Ao contrário do que se observa quando da suplementação da dieta com lipídios de origem vegetal, reduções significativas de teor e secreção da gordura do leite têm sido observadas em resposta à inclusão de óleo de peixe na dieta, mesmo quando esta apresenta teores adequados de fibra (CHILLIARD et al., 1999; GAMA, 2004; OFFER et al., 1999; ÄRÖLÄ et al., 2002). Além disso, a DGL observada neste caso não está associada a aumentos no teor de CLA *trans*-10, *cis*-12 e não se sabe qual o fator que inibe a síntese de gordura do leite (GRIINARI et al., 2000; OFFER et al., 2001).

Os ácidos graxos de cadeia longa, presentes no óleo de peixe, são potentes inibidores da secreção de gordura pela glândula mamária, porém o efeito é mais pronunciado quando o óleo é administrado no rúmen do que quando infundido diretamente no abomaso (CHILLIARD et al., 1999).

Em um trabalho de revisão, Chilliard; Ferlay e Doreau (2001) observaram uma redução média de 9,1 g/kg na gordura do leite com a inclusão de 180-450 g de óleo de peixe na dieta de 27 grupos de vacas. Estes mesmos autores observaram também que as principais mudanças no perfil de ácidos graxos da gordura do leite foram as reduções dos teores de ácido palmítico, ácido esteárico e oléico e aumentos nos teores de ácidos C18:1 *trans*. O aumento nos teores de C18:1 *trans* foi devido principalmente (74 a 82%) ao isômero C18:1 *trans*-11, junto com pequenos aumentos nos isômeros C18:1 *trans*-6, *trans*-9, *trans*-10 e *cis*-11. O conteúdo de CLA aumentou de 0,2-0,6% nas dietas controle para 1,5-2,7% nas dietas suplementadas com óleo de peixe.

O óleo de peixe aumenta a concentração na gordura do leite de ácido vaccênico e de CLA, porém ele contém baixas quantidades de precursores destes ácidos graxos. Por isso acredita-se que o óleo de peixe aumenta a conversão de ácido linoléico e

linolênico de outros ingredientes da dieta em ácido vaccênico e CLA através da inibição do último passo do processo de biohidrogenação (CHILLIARD; FERLAY; DOREAU, 2001; SHINGFIELD et al., 2003). O aumento do teor de ácido vaccênico com o óleo de peixe é importante porque tanto os bovinos (GRIINARI et al., 2000) e humanos (ADLOF; DUVAL; EMKEN, 2000) são capazes de sintetizar CLA a partir do ácido vaccênico.

Devido ao efeito do óleo de peixe sobre o consumo de matéria seca (CMS) de vacas em lactação, vários trabalhos têm buscado utilizar o óleo de peixe em associação com outras fontes de ácidos graxos poliinsaturados para aumentar o teor de CLA do leite, mas sem afetar negativamente o consumo de alimentos. WHITLOCK et al. (2002) observaram que a mistura de óleo de peixe com outras fontes de ácido linoléico, como a soja extrusada, aumenta mais o teor de CLA no leite do que o esperado pelo efeito dos óleos separados. Para verificar qual o menor teor de óleo de peixe necessário para aumentar o teor de CLA no leite, WHITLOCK et al (2006) estudaram o efeito da adição de doses crescentes (0,33, 0,67 e 1%) de óleo de peixe misturadas com doses decrescentes de óleo de soja para conjuntamente fornecer 2% de óleo na dieta e observaram que não houve incremento entre as doses de óleo de peixe no teor de CLA e ácido vaccênico. Os autores sugerem que doses menores de óleo de peixe podem afetar o ambiente ruminal para produzir mais CLA e seus precursores sem o risco de afetar negativamente o CMS e a produção de leite.

Chilliard; Ferlay e Doreau (2001) citam vários mecanismos de ação que podem explicar o efeito negativo do óleo de sobre a secreção de gordura do leite, que ainda permanece desconhecido. O óleo de peixe tem um efeito inibidor por si, como demonstrado nos experimentos com infusão pós-ruminal, mas a redução no teor de gordura (-3 a -4 g/kg) é muito menor do que quando administrado na dieta. A diminuição na relação C18:1/C18:0 no leite após a infusão duodenal pode indicar um efeito inibitório específico sobre a expressão gênica da delta-9 dessaturase. Um efeito sobre o componente tioesterase do complexo enzimático sintase de ácido graxo pode ser predito da diminuição específica do conteúdo do ácido palmítico na infusão duodenal de óleo de peixe. O óleo de peixe ou os produtos do seu metabolismo tem

efeito inibitório sobre a lipase lipoprotéica e redução no mRNA desta enzima na glândula mamária foi observada nesta situação (AHNADI et al., 1998).

Chilliard; Ferlay e Doreau (2001), estudando 24 grupos de vacas que receberam óleo de peixe na dieta, observaram que a redução no teor de gordura do leite foi melhor explicada pela quantidade de EPA ($r^2 = 0,75$) do que pela quantidade de DHA ($r^2 = 0,21$) ou de óleo de peixe ($r^2 = 0,38$). Porém, AbuGhazaleh e Jenkins (2004), trabalhando com culturas ruminais mistas, identificaram o DHA, quando incubado com ácido linoléico, como o componente ativo do óleo de peixe que promove acúmulo de ácido vaccênico. Este resultado não exclui o EPA ou os produtos de seu metabolismo como possíveis causadores da redução na secreção do leite.

Outros ácidos graxos omega 3 ($n-3$) presentes no óleo de peixe, como o ácido eicosatrienóico ($C_{20:3} n-3$) e docosatrienóico ($C_{22:3} n-3$), também foram testados como possíveis componentes capazes de aumentar o teor de ácido vaccênico, mas não mostraram nenhum efeito (ABUGHAZALEH et al., 2006).

O óleo de peixe é rico em ácidos graxos de cadeia mais longa e com maior grau de insaturação do que os normalmente presentes em óleos vegetais. Estes ácidos graxos, principalmente o EPA ($C_{20:5} n-3$) e o DHA ($C_{22:6} n-3$), são potencialmente mais tóxicos para as bactérias ruminais. Além disso, as alterações na população microbiana induzidas por dietas baixas em fibra parecem não afetar as bactérias que produzem o fator inibidor da síntese de gordura do leite em dietas contendo óleo de peixe. Estes fatos, somados ao desconhecimento do processo de biohidrogenação de ácidos graxos com mais de três insaturações, demonstram grande necessidade de maiores estudos sobre o efeito do óleo de peixe na biohidrogenação de lipídios no rúmen e na síntese de gordura na glândula mamária.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o perfil de ácido graxos da gordura do leite e o fluxo de nutrientes e de ácidos graxos que escapam do rúmen em vacas leiteiras alimentadas com dietas com óleo de soja ou óleo de peixe e com dois teores de concentrado na dieta.

Referências

- ABUGHAZALEH, A.A.; HOLMES, D.L.; JACOBSON, B.N.; KALSCHEUR, K.F. Eicosatrienoic acid and docosatrienoic acid do not promote vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.89, p.4336-4339, 2006.
- ABUGHAZALEH, A.A.; JENKINS, T.C. Docosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.87, p.1047-1050, 2004.
- ABUGHAZALEH, A.A.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R.; KALSCHEUR, K.F.; WHITLOCK, L.A. Fatty acid profiles of milk and rumen digesta from cows fed fish oil, extruded soybeans or their blend. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.85, p.2266-2276, 2002.
- ADLOF, R.O.; DUVAL, S.; EMKEN, E.A. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in humans. **Lipids**, Chicago, v.35, p.131-135, 2000.
- AHNADI, C.E.; BESWICK, N.; KENNELLY, J.J.; LACASSE, P. Feeding protected and unprotected fish oil to dairy cows: III. Effect on mammary lipid metabolism. **Journal of Animal Science**, Albany, v.76, p. 232, 1998. Abstract.
- AROLA, A.; SHINGFIELD, K.J.; VANHATALO, A.; TOIVONEN, V.; HUHTANEN, P.; GRIINARI, J.M. Biohydrogenation shift and milk fat depression in lactating dairy cows fed increasing levels of oil fish. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.85, n.1, p.143, 2002. Abstract.
- BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Reviews of Nutrition**, Palo Alto, v.23, p.203-227, 2003.
- BAUMAN, D.E.; LOCK, A.L. Conjugated linoleic acid: biosynthesis and nutritional significance. In: FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry**. New York:: Springer, 2006. v.3, p.93-136.
- 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**, Albany, v.77, p.1-15, 1999.

BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; SAEBO, A.; BAUMAN, D.E.. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v.278, p.R179-R184, 2000.

CHILLIARD, Y.; CHARDIGNY, J.M.; CHABROT, J.; OLLIER, A.; SÉBÉDIO, J.L.; DUREAL, M. Effects of ruminal or postruminal fish oil supply on conjugated linoleic acid (CLA) content of cow milk fat. **Proceedings of Nutrition Society**, London, v.58, p.70, 1999. Abstract.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, R.M.; DOREAU, M. Ruminal milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. **Annales de Zootechnie**, Paris, v.49, p.181-205, 2000.

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

CORL, B.A.; CHOUINARD, P.Y.; BAUMAN, D.E.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; NURMELA, K.V. Conjugated linoleic acid in milk fat of dairy cows originates in part by endogenous synthesis from *trans*-11 octadecenoic acid. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.81, n.1, p.233, 1998. Abstract.

CORL, B.A.; BAUMGARD, L.H.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; PHILLIPS, B.S.; BAUMAN, D.E. The role of Δ^9 -desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 12, p. 622-630, 2001.

DAVIS, C.L.; BROWN, R.E. Low-fat milk syndrome. In: PHILLIPSON, A.T. **Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant**. Newcastle-upon-Tyne: Oriel Press, 1970. p. 545-518.

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

DONOVAN, D.C.; SCHINGOETHE, D.J.; BAER, R.J.; RYALI, J.; HIPPEN, A.R.; FRANKLIN, S.T. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.83, p. 2620-2628, 2000.

GAMA, M.A.S. **Desempenho, composição do leite e mecanismos envolvidos na depressão da gordura do leite (DGL) de vacas recebendo ácidos linoléicos conjugados (CLA) e óleo de peixe na dieta.** 2004. 120 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

GRIINARI, J.M.; CORL, B.A.; LACY, S.H.; CHOUINARD, P.Y.; NURMELA, K.V.; BAUMAN, D.E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 desaturase. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.130, p.2285-2291, 2000.

GRIINARI, J.M.; DWYER, D.A.; McGUIRE, M.A.; BAUMAN, D.E.; PALMQUIST, D.L.; NURMELA, K.V.V. *Trans*-octadecenoic acid and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.81, p.1251-1261, 1998.

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

HARFOOT, C.G.; NOBLE, R.C.; MOORE, J.H. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen micro-organisms in vitro. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.24, p.961-970, 1973.

HAYASHI, A.A.; MEDEIROS, S.R.; LANNA, D.P.D. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) on milk fatty acid profiles and activities of lipogenic enzymes in the mammary gland, liver and adipose tissue of lactating rats. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.85, n.1, p.10, 2002. Abstract.

KALSCHEUR, K.F.; TETER, B.B.; PIPEROVA, L.S.; ERDMAN, R.A. Effect of fat source on duodenal flow of *trans*-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.80, p.2115-2126, 1997.

KEPLER, C.R.; TOVE, S.B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: Purification and properties of a linoleate Δ^{12} *cis*- Δ^{11} *trans* isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.242, n.24, p.5686-5692, 1967.

KIM, Y.J.; LIU, R.H.; RYCHLIK, J.L.; RUSSEL, J.B. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.92, p.976-982, 2002.

KNUDSEN, J.; HANSEN, H.O.; MIKKELSEN, J.M. Medium-chain fatty acid synthesis. **Biochemical Society Transactions**, Essex, v. 14, n. 3, p. 575-576, 1986.

LEAT, W.M.F.; KEMP, P.; LYSONS, R.J.; ALEXANDER, T.J.L. Fatty acid composition of depot fats from gnotobiotic lambs. **Journal of Agricultural Science**, v. 88, p.175-179, 1977.

LOOR, J.J.; HERBEIN, J.H. Reduced fatty acid synthesis and desaturation due to exogenous *trans*¹⁰,*cis*¹²-CLA in cows fed oleic or linoleic oil. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.86, p.1354-1369, 2003.

McCLYMONT, G.L.; VALLANCE, S. Depression of blood glycerides and milk fat synthesis by glucose infusion. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v.21, p.151, 1962. Abstract.

McGUIRE, M.A.; McGUIRE, M.K. Conjugated linoleic acid (CLA): a ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, Albany, 1999. Disponível em: <<http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0938.pdf>>. Acesso em: 6 ago. 2003.

MOSLEY, E.E.; SHAFFI, B.; MOATE, P.J.; McGUIRE, M.A. cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 136, p. 570-575, 2006.

OFFER, N.W.; MARSDEN, M.; DIXON, J.; SPEAKE, B.K.; THACKER, F.E. Effect of dietary fat supplements on levels of n-3 polyunsaturated fatty acids, trans acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. **Animal Science**, East Lothian, v.69, p.613-625, 1999.

OFFER, N.W.; MARSDEN, M.; PHIPPS, R.H. Effect of oil supplementation of a diet containing a high concentration of starch on levels of trans fatty acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. **Animal Science**, East Lothian, v.73, p.533-540, 2001.

PARIZA, M.W.; ASHOOT, S.H.; CHU, F.S.; LUND, D.B. Effects of temperature and time on mutagen formation in pain fried hamburger. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.7, p.63-69, 1979.

PETERSON, D.G.; BAUMGARD, L.H.; BAUMAN, D.E. Milk fat response to low doses of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.85, p.1764-1766, 2002.

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. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 133, p. 3098-3102, 2003.

PIPEROVA, L.S.; SAMPUGNA, J.; TETER, B.B.; KALSCHEUR, K.F.; YURAWECZ, M.P.; 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**, Bethesda, v.132, p.1235-1241, 2002.

PIPEROVA L.S.; TETER, B.B.; BRUCKENTAL, I.; SAMPUGNA, J.; MILLS, S.E.; YURAWECZ, M.P.; FRITSCH, J.; KU, K.; ERDMAN, R.A. Mammary lipogenic enzyme activity, *trans* fatty acids and conjugated linoleic acid are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, p. 2568-2574, 2000.

RAMASWAMY, N.; BAER, R.J.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R.; KASPERSON, K.M.; WHITLOCK, L.A. Composition and flavor of milk and butter from cows fed fish oil, extruded soybeans, or their combination. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.84, p.2144-2151, 2001.

SELNER, D.R.; SCHULTZ, L.H. Effects of feeding oleic acid or hydrogenated vegetable oils to lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.63, p.1235-1241, 1980.

SHINGFIELD, K.J.; AHVENJÄRVI, S.; TOIVONEN, V.; ÄRÖLÄ, A.; NURMELA, K.V.V.; HUHTANEN, P.; GRIINARI, J.M. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. **Animal Science**, East Lothian, v. 77, p. 165-179, 2003.

SHINGFIELD, K.J.; REYNOLDS, C.K.; HERVÁS, 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. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.89, p.714-732, 2006.

SUTTON, J.D. Altering milk composition by feeding. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.72, p.2801-2814, 1989.

Van SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd. . New York: Cornell University Press, 1994. 476p.

VISWANADHA, S.; GIESY, J.G.; HANSON, T.W.; McGUIRE, M.A. Dose response of milk fat to intravenous administration of the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.86, p.3229-3236, 2003.

WHITLOCK, L.A.; SCHINGOETHE, D.J.; ABUGHAZALEH, A.A.; HIPPEN, A.R.; KALSCHEUR, K.F. Milk production and composition from cows fed small amounts of fish oil with extruded soybeans. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.89, p.3972-3980, 2006.

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. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.85, p.234-243, 2002.

YURAWECES, 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**, Chicago, v. 33, p. 803-809, 1998.

2 PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE DE VACAS LEITEIRAS RECEBENDO DIETAS COM DOIS TEORES DE CONCENTRADO E COM ÓLEO DE SOJA OU DE PEIXE

Resumo

Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos do teor de concentrado e da fonte de óleo sobre a produção e composição do leite e perfil de ácidos graxos da gordura do leite de vacas leiteiras. Foram utilizadas quatro vacas Holandesas, com cânulas ruminais, 109 ± 10 dias em lactação, produção média de $31,24 \pm 8,57$ kg de leite e peso médio de 652 ± 37 kg, no início do experimento. Foi utilizado o delineamento experimental em Quadrado Latino 4x4, com períodos de 21 dias, sendo os 14 primeiros para adaptação e os sete últimos para colheita de amostras, com arranjo fatorial (2x2) dos tratamentos. Os tratamentos foram dietas totais misturadas, contendo silagem de milho e suplementadas com baixos (40%) ou altos (60%) teores de concentrado e com 2% de óleo de soja ou óleo de peixe na matéria seca (MS). Não houve efeito do teor de concentrado e nem da interação entre a fonte de óleo e o teor de concentrado para nenhuma variável estudada. A presença do óleo de peixe na dieta reduziu as produções de leite ($28,72 \times 24,34$ kg/d, respectivamente para óleo de soja e peixe - todos os demais dados estão na mesma ordem), gordura ($0,796 \times 0,562$ kg/d), proteína ($0,806 \times 0,630$ kg/d) e sólidos totais ($2,995 \times 2,411$ kg/d) e os percentuais de gordura ($2,81 \times 2,34\%$) e proteína ($2,82 \times 2,59\%$) do leite. O tratamento com óleo de peixe aumentou os ácidos graxos insaturados ($30,12 \times 35,56\%$), ácidos graxos monoinsaturados ($25,69 \times 29,71\%$) e os ácidos graxos poliinsaturados ($4,43 \times 5,85\%$), e reduziu os ácidos graxos saturados ($69,66 \times 60,05\%$), em relação ao óleo de soja. O tratamento com óleo de peixe reduziu o teor de $C_{18:0}$ ($18,90 \times 6,82\%$) e aumentou a maioria dos isômeros *trans* octadecenóicos da gordura do leite, principalmente de *trans*-11 $C_{18:1}$ ($2,84 \times 9,75\%$). Os teores de CLA *cis*-9, *trans*-11 ($0,61 \times 1,41\%$) e de $C_{20:5}$ ($0,05 \times 0,28\%$) e $C_{22:6}$ ($0,04 \times 0,24\%$) foram aumentados na gordura do leite com as dietas com óleo de peixe. Não houve efeito de óleo para o CLA *trans*-10, *cis*-12 ($P=0,61$). O óleo de peixe diminuiu a produção de leite, alterou composição e o perfil de ácidos graxos do leite e promoveu aumento dos teores de CLA, ácido vaccênico e ácidos graxos poliinsaturados (*n*-3), em relação ao óleo de soja.

Palavras-chave: Ácidos graxos *trans*; Ácido linoléico conjugado; Biohidrogenação; Depressão da gordura do leite

MILK PRODUCTION, COMPOSITION AND FATTY ACID PROFILE IN DAIRY COWS FED DIETS WITH TWO LEVELS OF CONCENTRATE AND SUPPLEMENTED WITH SOYBEAN OR FISH OIL

Abstract

The objective this work was to evaluate the effect of concentrate level and source of oil on milk production, composition and fatty acid profile in dairy cows. Four Holstein cows, fitted with rumen cannula, averaging 109 ± 10 days in milk, producing 31.24 ± 8.57 kg milk per day and live weight 652 ± 37 kg, at start of the trial, were used in a 2×2 factorial arrangement of treatments applied to a 4×4 Latin square design. Length of periods were 21 days, including 14 days of adjustment to the experimental diets followed by seven days of sampling. Treatments were 4 different diets (total mixed ration) containing maize silage supplemented with low (40%) or high (60%) levels of concentrate and 2% of soybean oil or fish oil on a dry matter (DM) basis. Concentrate level and interaction of concentrate level and oil source had no effect on any variable. Milk yield (28.72×24.34 kg/day, respectively for soybean oil and fish oil – all data is in the same order), fat yield (0.796×0.562 kg/day), protein yield (0.806×0.630 kg/day), total solids yield (2.995×2.411 kg/day), fat percentage ($2.81 \times 2.34\%$) and protein percentage ($2.82 \times 2.59\%$) decreased when fish oil was present. Fish oil increased unsaturated fatty acids (FA) ($30.12 \times 35.56\%$), monounsaturated FA ($25.69 \times 29.71\%$) and polyunsaturated FA ($4.43 \times 5.85\%$), and decreased saturated FA ($69.66 \times 60.05\%$), when compared to soybean oil. Fish oil reduced $C_{18:0}$ ($18.90 \times 6.82\%$) and increased most *trans* octadecenoic isomers of milk fat, mainly *trans*-11 $C_{18:1}$ ($2.84 \times 9.75\%$). Levels of *cis*-9, *trans*-11 CLA ($0.61 \times 1.41\%$), $C_{20:5}$ ($0.05 \times 0.28\%$) and $C_{22:6}$ ($0.04 \times 0.24\%$) were increased in milk fat of cows offered fish oil. Fish oil decrease milk production, changed milk composition and fatty acids profile and increased *cis*-9, *trans*-11 CLA, *trans*-11 $C_{18:1}$ and PUFA (*n*-3) when compared to soybean oil.

Keywords: Biohydrogenation; Conjugated linoleic acid; Milk fat depression; *Trans* fatty acids

2.1 Introdução

A busca por uma melhor qualidade de vida e a maior consciência da população sobre a associação entre saúde e dieta, são crescentes no mundo atual. Neste sentido, alimentos que contêm componentes que têm efeitos benéficos à saúde, que vão além do valor nutritivo tradicional, também conhecidos como alimentos funcionais, devem fazer, cada vez mais, parte da dieta humana. Um destes componentes é o ácido linoléico conjugado (CLA).

O CLA é uma classe de isômeros do ácido linoléico com comprovada ação anticancerígena (PARIZA et al., 1979). Outros efeitos benéficos à saúde também têm sido descobertos, como redução na deposição de gordura corporal, alteração na partição de nutrientes, efeitos antidiabetogênicos, redução no desenvolvimento de aterosclerose, aumento na mineralização óssea e modulação do sistema imune (McGUIRE; McGUIRE, 2003).

A principal fonte de CLA na dieta humana são os produtos originários de animais ruminantes (BAUMAN et al., 1999). O CLA encontrado na gordura do leite e na carne de ruminantes tem duas origens: a biohidrogenação parcial do ácido linoléico no rúmen, onde o CLA *cis*-9, *trans*-11 é formado como um intermediário transitório (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1988), e a síntese endógena no tecido adiposo e glândula mamária, através da ação da enzima Δ^9 -dessoratase sobre o C_{18:1} *trans*-11 (CORL et al., 1998; CORL et al., 2001; GRIINARI et al., 2000; MOSLEY et al., 2006).

O método mais eficaz de aumento no teor de CLA na gordura do leite é através da manipulação da dieta de vacas leiteiras e isto pode ser obtido por estratégias de alimentação que busquem o aumento tanto do próprio CLA no rúmen como também de seu precursor para síntese endógena, o ácido vaccênico (BAUMAN; LOCK, 2006). Porém, a síntese endógena tem sido mostrada ser mais importante que a biohidrogenação ruminal na secreção de CLA no leite, contribuindo com 64 a 93% do CLA do leite (CORL et al., 2001; GRIINARI et al., 2000; MOSLEY et al., 2006; PIPEROVA et al., 2002).

Harfoot; Noble e Moore (1973) mostraram que altos teores de ácido linoléico inibem a hidrogenação de ácido *trans*-11 octadecenóico, aumentando a quantidade de

substrato para síntese endógena do CLA *cis*-9, *trans*-11. O óleo de peixe também promove um aumento significativo na concentração de C_{18:1} *trans*-11 na gordura do leite, com redução drástica dos níveis de ácido esteárico (ABUGHAZALEH et al., 2002; DONOVAN et al., 2000; SHINGFIELD et al., 2003; SHINGFIELD et al., 2006; WHITLOCK et al., 2002, WHITLOCK et al., 2006). Porém este efeito parece ser muito mais acentuado com a adição do óleo de peixe do que em dietas com lipídios de origem vegetal (RAMASWAMY et al., 2001; WHITLOCK et al., 2002). Abughazaleh et al. (2002) e Whitlock et al. (2002) observaram que, embora o ácido vaccênico e CLA tenham poucos precursores em dietas contendo óleo de peixe, estes dois intermediários tem sua concentração elevada, indicando haver interferência do EPA e DHA na biohidrogenação dos ácidos linoléico e linolênico provenientes de outras fontes de lipídios da dieta.

Bauman e Lock (2006) apontaram quatro fatores que poderiam contribuir para o aumento do teor de CLA no leite: 1) aumento na ingestão de ácidos graxos poliinsaturados de 18C (ácido linoléico e linolênico); 2) manutenção do processo de biohidrogenação que resulta na produção de ácido vaccênico como intermediário; 3) inibição do último passo no processo de biohidrogenação para acúmulo do ácido vaccênico; 4) aumento na atividade da Δ^9 – dessaturase na glândula mamária. Estes autores também comentam que a inibição do último passo no processo de biohidrogenação pode ser realizada pela modificação do ambiente ruminal através da dieta, como alterações na proporção de forragem:concentrado, restrição alimentar e, principalmente, pelo uso de óleo de peixe na dieta.

A tentativa de se aumentar a concentração de CLA no leite, através da adição de fontes de gorduras poliinsaturadas em dietas de vacas leiteiras com alto concentrado, tem levado, entretanto, a redução no teor de gordura do leite, denominada síndrome da depressão da gordura do leite (DGL). A DGL é caracterizada por uma diminuição na secreção da gordura do leite, devido à inibição da síntese de lipídio na glândula mamária e modificação no perfil de ácidos graxos do leite, com redução dos ácidos graxos de cadeia curta e com aumento no teor de C_{18:1} *trans*-10. Esta é uma situação clássica de DGL (GRIINARI et al., 1998). Posteriormente se comprovou que o CLA

trans-10, *cis*-12 é o maior responsável pela redução do teor de gordura do leite nestas condições (BAUMGARD et al., 2000).

A mudança no padrão de biohidrogenação ruminal no sentido da formação de *trans*-10 C_{18:1}, às custas de *trans*-11 C_{18:1}, diminui o substrato para a síntese endógena de CLA *cis*-9, *trans*-11 pela enzima Δ^9 – dessaturase e pode contribuir para uma menor secreção de CLA na gordura do leite (SHINGFIELD et al., 2005).

O uso de óleo de peixe como fonte de lipídios poliinsaturados também tem causado a DGL, porém este efeito parece ser independente dos teores de fibra da dieta (GAMA, 2004) e não está relacionado com a formação do CLA *trans*-10, *cis*-12 (CHILLIARD et al., 2000; LOOR et al., 2005). Em vários trabalhos com óleo de peixe, há fortes indícios de que existem outras moléculas que inibem a síntese de gordura do leite além do C_{18:2} *trans*-10, *cis*-12.

O óleo de peixe é rico em ácidos graxos de cadeia mais longa e com maior grau de insaturação do que os normalmente presentes em óleos vegetais. Estes ácidos graxos, principalmente o EPA (C_{20:5} *n*-3) e o DHA (C_{22:6} *n*-3), são potencialmente mais tóxicos para as bactérias ruminais. Além disso, as alterações na população microbiana induzidas por dietas baixas em fibra parecem não afetar as bactérias que produzem o fator inibidor da síntese de gordura do leite em dietas contendo óleo de peixe. Estes fatos, somados ao desconhecimento do processo de biohidrogenação de ácidos graxos com mais de três insaturações, indicam a necessidade de mais estudos sobre o efeito do óleo de peixe na biohidrogenação de lipídios no rúmen e na síntese de gordura na glândula mamária.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a produção e composição do leite e o perfil de ácido graxos da gordura do leite de vacas leiteiras alimentadas com dietas com dois teores de concentrado e suplementadas com óleo de soja ou de peixe.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba – SP, no período de julho a dezembro de 2005.

Foram utilizadas quatro vacas leiteiras da raça Holandesa, com cânulas ruminais, com 109 ± 10 dias em lactação, produção média de $31,24 \pm 8,57$ kg de leite e peso médio de 652 ± 37 kg, no início do experimento. Foi utilizado o delineamento experimental em Quadrado Latino 4x4, com quatro períodos de 21 dias, sendo os 14 primeiros para adaptação e os sete últimos para colheita de amostras. Os tratamentos consistiram de um arranjo fatorial 2x2, sendo duas doses de concentrado (40 e 60% da MS da dieta) e duas fontes de óleo (2% de óleo de soja ou de óleo de peixe na MS da dieta). Foi criado um período inicial, chamado de basal, onde as vacas receberam uma dieta sem óleo e com 40% de concentrado, para ser usado como um valor de referência, já que todos os tratamentos deste experimento continham óleo na dieta.

A dieta teve como único volumoso a silagem de milho e o concentrado foi composto por milho, farelo de soja, núcleo mineral e vitamínico, além da inclusão de 2% de óleo de soja ou de peixe utilizados nos tratamentos. As dietas foram formuladas para atender ou exceder os requerimentos para vacas em lactação com produção de 30 kg de leite ao dia, segundo o NRC (2001), com exceção da proteína bruta, que foi inferior ao recomendado. A proporção dos ingredientes e a composição químico-bromatológica das dietas experimentais estão apresentadas na Tabela 1 e o perfil de ácidos graxos na Tabela 2. O concentrado e a silagem de milho foram misturados imediatamente antes de serem oferecidos às vacas.

Tabela 1 – Proporção dos ingredientes e composição químico-bromatológica das dietas experimentais

Ingredientes	Fonte de óleo ¹				
	Basal ³	Óleo de soja		Óleo de peixe	
		Teor de concentrado ²		Teor de concentrado	
		Alto	Baixo	Alto	Baixo
Proporção dos Ingredientes, %					
Silagem de milho	60,13	40,02	60,13	40,02	60,13
Milho moído	16,26	34,12	14,02	34,12	14,02
Farelo de soja	20,44	20,70	20,68	20,70	20,68
Óleo de Soja	-	2	2	-	-
Óleo de Peixe	-	-	-	2	2
Núcleo mineral ⁴	1,52	1,52	1,52	1,52	1,52
Calcáreo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sal comum	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
Óxido de Magnésio	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
Vitamina A ⁵	0,00013	0,000145	0,0001	0,00015	0,000135
Vitamina E ⁶	0,00124	0,00135	0,001	0,0014	0,0013
Composição bromatológica, %					
PB	15,33	13,83	14,63	14,77	14,25
EE	2,89	4,66	4,35	4,79	4,43
FDN	34,42	27,73	32,01	27,91	32,73
FDA	20,35	16,10	19,20	16,20	19,31
CHO	74,39	75,50	73,76	73,73	74,36
CNF	39,97	47,78	41,75	45,82	41,63
Cinzas	7,38	6,01	7,26	6,71	6,96
EL _L (Mcal/kg MS) ⁷	1,63	1,82	1,71	1,82	1,71

¹2 % de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

²Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

³Dieta sem óleo e com 40% de concentrado.

⁴Composição por kg: P – 55 g; Ca – 220 g; Mg – 35 g; S – 22 g; Na – 70 g; Cl – 105 g; Mn – 1500 mg; Fe – 500 mg; Zn – 1550 mg; Cu – 450 mg; Co – 50 mg; I – 40 mg; Se – 20 mg; vitamina A 90.000 UI; vitamina D₃ 75.000 UI; vitamina E 1.000 UI.

⁵Composição por kg: 500.000.000 UI de vitamina A.

⁶Composição por kg: 500.000 UI de vitamina E.

⁷Calculado a partir do NRC (2001).

Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais e dos óleos de soja e peixe

Ácidos Graxos	Fonte de óleo ¹						
	Basal ³	Óleo de soja		Óleo de peixe		Óleo	
		Teor de concentrado ²		Teor de concentrado		Soja	Peixe
		Alto	Baixo	Alto	Baixo		
C _{12:0}	0,19	0,21	0,11	0,27	0,16	nd	0,08
C _{14:0}	3,37	1,99	1,21	5,13	5,15	0,11	5,55
C _{14:1}	0,01	0,00	0,00	0,02	0,02	nd	0,04
C _{15:0}	0,23	0,28	0,15	0,32	0,18	nd	nd
C _{16:0}	20,70	20,84	18,52	22,70	20,74	13,32	15,84
C _{16:1}	2,09	0,32	0,20	3,51	4,35	0,10	6,38
C _{17:0}	0,39	0,29	0,22	0,52	0,53	0,09	0,42
C _{17:1}	0,14	0,01	0,02	0,23	0,29	0,04	0,43
C _{18:0}	9,37	10,48	8,24	10,66	8,09	4,47	3,88
C _{18:1}	24,32	25,41	24,28	24,56	23,05	21,11	15,62
C _{18:2}	19,71	28,13	35,80	6,51	8,40	50,80	6,40
C _{18:3}	2,11	2,96	3,90	0,70	0,90	6,19	1,35
C _{20:1}	0,14	0,10	0,20	0,03	0,22	nd	nd
C _{20:4}	0,12	0,20	0,26	0,01	0,03	0,41	0,05
C _{22:2}	0,44	0,04	0,07	0,72	0,95	nd	1,29
C _{20:5}	3,67	1,09	0,59	6,08	6,91	nd	9,33
C _{22:6}	3,42	nd	nd	6,00	7,66	nd	11,30
outros	9,57	7,66	6,23	12,04	12,36	3,36	22,05

¹2 % de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

²Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

³Dieta sem óleo e com 40% de concentrado.

⁴nd - Não detectado.

As vacas foram mantidas presas por corrente em baias individuais e alimentadas duas vezes ao dia, às 8:00 e às 17:00h, e as sobras foram retiradas e pesadas na manhã do dia seguinte. O nível de oferta da dieta foi ajustado para manter 10% de sobras. Durante os períodos de colheitas, amostras de silagem de milho, concentrado e sobras de alimentos foram colhidas de cada vaca todos os dias e congeladas. Posteriormente estas amostras foram descongeladas e misturadas para compor uma amostra por período e por vaca. A silagem de milho foi reconstituída de forma a obter uma amostra por período.

Nas amostras de silagem de milho, concentrado e sobras foram determinados os teores de matéria seca (MS), cinzas e extrato etéreo (EE), de acordo com a AOAC (1990). O teor de nitrogênio foi determinado no aparelho Leco FP – 528, sendo o teor de proteína bruta (PB) obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25. Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram

obtidos pelos métodos descritos por Van Soest; Robertson e Lewis (1991), utilizando-se α -amilase e sulfito de sódio na determinação do FDN.

A ordenha foi realizada duas vezes ao dia, às 7:00 e às 18:00h. Nos últimos três dias de cada período, o leite de cada ordenha foi pesado, homogeneizado e duas amostras foram colhidas. Uma amostra foi conservada com Bromopol e enviada ao Laboratório da Clínica do Leite, ESALQ/USP, onde foram realizadas as análises da composição do leite por método infravermelho, em um aparelho Bentley 2000. A outra amostra foi congelada, sem conservante, para posterior análise do perfil de ácidos graxos da gordura do leite.

Para o cálculo da produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (Plcorr) utilizou-se a fórmula citada por Leiva; Hall e Van Horn (2000):

$$Plcorr = (12,82 * Pgord) + (7,13 * Pprot) + (0,323 * PL) \quad (1)$$

Onde: PL = produção de leite, kg/dia;

Pgord = produção de gordura, kg/dia;

Pprot = produção de proteína, kg/dia.

A partir da equação sugerida pelo AFRC (1993), calculou-se a concentração energética do leite, conforme a fórmula:

$$EL \text{ (Mcal/kg)} = (0,0929 * G) + (0,0547 * PB) + (0,0395 * Lact) \quad (2)$$

Onde G, PB e Lact são as percentagens de gordura, proteína e lactose do leite.

Após o fim do experimento, as amostras de leite foram descongeladas e centrifugadas a 10.000 x g por 30 minutos para a separação da gordura. Alíquotas das amostras de gordura dos últimos três dias de colheitas foram misturadas, levando-se em consideração o total de gordura produzido em cada ordenha, para compor uma única amostra por vaca e por período.

Para determinação do perfil de ácidos graxos dos alimentos e sobras, os ácidos graxos metil esterificados foram obtidos pelo método descrito por Rodrigues-Ruiz et al. (1998). Em seguida, o perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa utilizando-se uma coluna capilar de 100 m de sílica fundida (CP-Sil 88), hidrogênio como gás de arraste (1,0 mL/min), detector de ionização de chama (FID), temperatura do injetor de 250°C e do detector de 300°C, e razão de injeção das amostras de 50:1. O protocolo de corrida iniciou com 70°C e foi mantido por quatro minutos, depois elevou 13°C/min até 175°C e foi mantido por mais 27 minutos, seguido por mais uma elevação de 4°C/min até 215°C e manutenção por mais nove minutos, e finalmente nova elevação de 7°C/min até 230°C e manutenção por mais cinco minutos.

Para a análise do perfil de ácidos graxos da gordura do leite, os lipídios foram extraídos por uma mistura de solventes orgânicos (hexano: isopropanol), conforme Hara e Radim (1978), e a fração lipídica foi metilada com uma solução básica de metóxido de sódio, segundo Christie (1982), com as adaptações de Chouinard; Girard e Brisson (1998). O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa utilizando-se uma coluna capilar de 200 m de sílica fundida (Varian CP-2571), hidrogênio como gás de arraste (1,8mL/min), detector de ionização de chama (FID), temperatura do injetor e detector de 250°C e 300°C, respectivamente, e razão de injeção das amostras de 20:1. O protocolo de corrida para os ácidos graxos da gordura do leite, dos óleos de soja e peixe iniciou com 100°C e foi mantido por sete minutos, depois elevou 10°C/min até 165°C e foi mantido por mais cinco minutos, seguido por mais uma elevação de 0,5°C/min até 210°C e manutenção por mais 10 minutos, e finalmente nova elevação de 5°C/min até 240°C e manutenção por mais cinco minutos.

A identificação dos ácidos graxos se deu por comparação de seus tempos de retenção com os observados em padrões comerciais (C₄-C₂₂), como o 18919-1AMP – SUPELCO, metil-éster da mistura de 37 ácidos graxos, e a manteiga padrão (CRM 164 - Commission of the European Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium). Os ácidos graxos mais importantes foram identificados através de padrões comerciais puros: 05632 – SIGMA, metil-éster da mistura dos ácidos linolêicos conjugados *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12; V1381 – SIGMA, metil-éster do ácido vaccênico; D2659 – SIGMA, metil-éster do ácido docosahexaenóico *cis*-4, 7, 10, 13, 16, 19 (DHA); E2012 –

SIGMA, metil-éster do ácido eicosapentaenóico *cis*-5, 8, 11, 14, 17 (EPA). A manteiga de referência padrão (CRM 164) também foi utilizada para calcular os fatores de recuperação de ácidos graxos de cadeia curta.

Os dados foram submetidos à análise de variância segundo o modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + O_j + OC_{ij} + V_k + P_l + e_{ijkl}$$

Onde: Y_{ijkl} é a variável dependente; μ é a média das observações; C_i é o i -ésimo efeito do teor de concentrado; O_j é o j -ésimo efeito do óleo; OC_{ij} é ij -ésimo efeito da interação; V_k é o k -ésimo efeito da vaca; P_l é o l -ésimo efeito do período e e_{ijkl} é o erro experimental associado a cada observação. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa SAS (2001), utilizando o comando Proc Mixed, sendo que o efeito de vaca foi considerado aleatório. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com o nível de significância de 5%.

2.2.2 Resultados e Discussão

Como todos os tratamentos deste experimento tiveram óleo na dieta, foi criado um período inicial, chamado de basal, onde as vacas receberam uma dieta igual às dietas de baixos teores de concentrado, mas sem adição de óleo. Os resultados obtidos neste período foram usados como valor de referência em relação aos efeitos nas dietas experimentais, sem análise estatística ou estudo de fator (fonte de óleo ou teor de concentrado) responsável pela alteração nos resultados.

Houve dois casos de acidose ruminal em vacas durante o tratamento com alto teor de concentrado e óleo de soja, que obrigou a uma redução temporária no teor de concentrado deste tratamento de 60 para 55% da dieta. Como não houve diferença estatística entre esta dieta e a dieta com alto teor de concentrado e óleo de peixe, os dados foram avaliados com arranjo fatorial 2 x 2 dos tratamentos.

De um modo geral, não houve efeito da interação entre a fonte de óleo e o teor de concentrado para nenhuma variável. O efeito de teor de concentrado foi significativo apenas para algumas variáveis, e isto se deve ao fato das dietas com baixos e altos

teores de concentrado apresentarem diferenças relativamente pequenas em relação ao teor de carboidratos não fibrosos (CNF) e de fibra em detergente neutro (FDN). As dietas com altos teores de concentrado apresentaram teores de CNF acima dos níveis máximos de 44%, recomendados pelo NRC (2001), enquanto as dietas com baixos teores de concentrado apresentaram teores de CNF acima de 40%. Além disso, este experimento teve como única fonte de volumoso a silagem de milho e o concentrado foi composto por milho moído e farelo de soja (Tabela 1). Considerando que 50% da silagem de milho é composta por grãos e que 80% do CNF do milho é composto de amido (NRC, 2001), as dietas com baixos teores de concentrado tinham 26% de amido, contra 32% para as dietas com altos teores de concentrado. Isto deve ter contribuído para o efeito de concentrado não ser significativo para a maioria das variáveis estudadas. Estes resultados mostram que a relação volumoso:concentrado da dieta não causou alteração no padrão de biohidrogenação ruminal, apesar da dieta alto concentrado ter levado alguns animais até a condição de acidose. Aparentemente a dieta de baixo teor de concentrado continha quantidade elevada de amido, ou a silagem utilizada não apresentou efeito de fibra efetiva suficiente para alterar o padrão de fermentação.

2.2.2.1 Produção e composição do leite

Os resultados de produção e composição do leite podem ser visualizados na Tabela 3. Em comparação com a dieta basal, as dietas experimentais mostraram a redução numérica na produção de leite e em todas as variáveis de composição do leite. De um modo geral, as vacas que foram alimentadas com óleo de peixe produziram menor quantidade de leite, gordura, proteína, sólidos totais e energia por dia e apresentaram menores teores de gordura e proteína e menor concentração de energia no leite do que as vacas alimentadas com óleo de soja.

Tabela 3 – Produção e composição do leite de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe

Variáveis	Fonte de óleo ¹					EP	P>F		
	Basal ³	Óleo de soja		Óleo de peixe			Óleo	Concentrado	Interação
		Teor de concentrado ²		Teor de concentrado					
		Alto	Baixo	Alto	Baixo				
Produção de leite									
kg/d	31,24	29,32	28,13	23,41	25,27	2,3873	0,0997	0,8911	0,5392
Corrigida ⁴ , kg/d	29,53	25,54	24,91	19,05	20,08	1,5320	0,0049	0,8990	0,6022
EL ⁵									
Mcal/kg	0,640	0,575	0,580	0,533	0,513	0,0205	0,0252	0,7231	0,5574
Mcal/d	19,807	16,673	16,238	12,470	12,958	0,9639	0,0037	0,9789	0,6437
Gordura									
%	3,34	2,76	2,87	2,40	2,28	0,1835	0,0303	0,9736	0,5508
kg/d	1,019	0,794	0,797	0,551	0,573	0,0396	0,0002	0,7569	0,8131
Proteína									
%	2,92	2,83	2,81	2,64	2,54	0,0908	0,0327	0,5167	0,6989
kg/d	0,894	0,826	0,786	0,620	0,640	0,0566	0,0126	0,8639	0,6105
Lactose									
%	4,36	4,14	4,07	4,24	4,16	0,2006	0,6513	0,7126	0,9855
kg/d	1,363	1,207	1,147	1,001	1,047	0,1106	0,1990	0,9510	0,6441
Sólidos totais									
%	11,58	10,30	10,64	10,09	9,77	0,2688	0,0732	0,9639	0,2541
kg/d	3,572	3,007	2,984	2,362	2,459	0,2074	0,0201	0,8615	0,7797

¹2 % de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

²Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

³Dieta sem óleo e com 40% de concentrado.

⁴Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura segundo Leiva et al. (2000).

⁵Energia líquida calculada segundo AFRC (1993).

A produção de leite tendeu a ser reduzida ($P=0,0997$) nas dietas com óleo de peixe e foi significativamente reduzida ($P=0,0049$) quando a produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura em comparação ao óleo de soja. Os efeitos do óleo de peixe sobre a produção de leite variam de diminuição (GAMA, 2004; OFFER; MARSDEN; PHIPPS, 2001; SHINGFIELD et al., 2003; WHITLOCK et al., 2002) ou nenhum efeito (ABUGHAZALEH et al., 2002; CANT et al., 1997; OFFER et al., 1999; PALMQUIST; GRIINARI, 2006). Donovan et al. (2000) observaram um aumento na produção de leite com a adição de 1% de óleo de peixe na dieta, mas houve redução linear a partir deste nível até 3% de óleo. Não houve diferença entre as dietas com 0 e 2 % de óleo de peixe. A produção de leite foi menor nas dietas com óleo de peixe e o efeito foi mais pronunciado com a produção corrigida para 3,5% de gordura. No presente trabalho a redução na produção de leite nas vacas que foram alimentadas com óleo de peixe pode ter sido consequência do menor consumo de matéria seca.

Em relação ao teor e produção diária de gordura no leite, as médias das dietas experimentais foram numericamente menores que a dieta basal e foram fortemente reduzidas nas dietas com óleo de peixe. O efeito da adição de óleo sobre a síntese e secreção de gordura da glândula mamária é influenciado por vários fatores dietéticos, como a quantidade e a qualidade da fibra, proporção de concentrado e forragem, local e taxa de degradação do amido, composição de ácidos graxos e a digestibilidade e nível de proteção da fonte de gordura (ASHES; GULATI; SCOTT, 1997). Em relação ao óleo de soja, Griinari et al. (1998) demonstraram que, além da presença de óleos poliinsaturados, uma alteração no ambiente ruminal provocada por altos teores de concentrado na dieta eram necessárias para que houvesse redução do teor de gordura sintetizado pela glândula mamária. Nesta situação, ocorreria um desvio da rota normal de biohidrogenação, com a formação de um intermediário específico, com potente ação inibidora da síntese de ácidos graxos pela glândula mamária. No presente trabalho não houve diferença entre os teores e secreção diária de gordura entre as dietas com alto e baixo teor de concentrado e suplementadas com óleo de soja, mas ambas apresentaram médias baixas e inferiores à dieta basal, demonstrando que pode ter havido redução na síntese de gordura nas duas dietas. O efeito do óleo de peixe na redução do teor (CANT et al., 1997; GAMA, 2004; OFFER; MARSDEN e PHIPPS, 2001;

OFFER et al.,1999; PALMQUIST e GRIINARI, 2006; WHITLOCK et al., 2002; WHITLOCK et al., 2006) e da secreção diária de gordura no leite (CANT et al., 1997; CHILLIARD et al., 1999; GAMA, 2004; OFFER et al.,1999; OFFER; MARSDEN e PHIPPS, 2001; SHINGFIELD et al., 2003; WHITLOCK et al., 2002) tem sido bem relatado na literatura e ocorre de forma independente do teor de concentrado na dieta (GAMA, 2004).

O mecanismo pelo qual o óleo de peixe reduz a síntese de gordura ainda não está esclarecido. O efeito do óleo de peixe é mais pronunciado quando este é infundido no rúmen do que quando infundido no abomaso (CHILLIARD et al., 1999; LOOR et al., 2005), o que significa que a redução na síntese de gordura é decorrente de algum fator produzido no rúmen. Porém, o CLA *trans*-10, *cis*-12, única molécula com comprovada ação inibidora da síntese de lipídios na glândula mamária, não tem sido encontrado em dietas com óleo de peixe (CHILLIARD et al., 2000; LOOR et al., 2005). Dietas com óleo de peixe (625 mL/dia) resultaram em menor abundância de RNAm da acetil CoA carboxilase, ácido graxo sintase e lipoproteína lípase na glândula mamária de vacas em lactação (AHNADI et al., 2002). Estes resultados sugerem que outra molécula formada no processo de biohidrogenação do óleo de peixe no rúmen inibe a síntese de ácidos graxos na glândula mamária e captação de ácidos da circulação, reduzindo a secreção de gordura no leite.

O teor e secreção de proteína foram reduzidos nas dietas com óleo de peixe. Em geral, a inclusão de lipídios na dieta reduz o teor de proteína do leite (SUTON, 1989), o que parece consistente com a diferença numérica entre as dietas com óleo de soja e a dieta basal. As diferenças na produção diária de proteína são relacionadas à produção de leite, assim em trabalhos onde houve diminuição da produção de leite, houve também uma redução na produção de proteína (CANT et al., 1997; DONOVAN et al., 2000; SHINGFIELD et al., 2003; WHITLOCK et al., 2002). Offer et al. (1999) observaram uma redução no teor de proteína do leite mas sem alteração da produção de leite com a adição de 250g por dia de óleo de peixe. Segundo Sutton (1989), o aumento na ingestão de energia é o método mais confiável para aumentar a concentração de proteína no leite. A redução no teor e produção diária de proteína

deste trabalho se deve a diminuição no consumo de alimentos e ingestão de energia causados pelo óleo de peixe.

O teor de sólidos totais tendeu a ser reduzida ($P=0,07$) pelo óleo de peixe, em parte pela compensação ocorrida por aumento numérico no teor de lactose. Já a secreção de sólidos totais acompanhou as alterações dos outros componentes, sendo bastante reduzida na presença de óleo de peixe na dieta.

2.2.2.2 Perfil de ácidos graxos da gordura do leite

As classes de ácidos graxos, criadas em função do comprimento de cadeia e grau de insaturação da molécula, podem ser visualizadas na Tabela 4 e o perfil dos ácidos graxos pode ser visualizado na Tabela 5. Houve diferença entre as dietas experimentais e a dieta basal para o teor e produção diária de todas as classes de ácidos graxos, refletindo o efeito da suplementação com óleo sobre o perfil de ácidos graxos da gordura do leite. As dietas experimentais apresentaram redução na produção diária de 40% para ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), 48% para ácidos graxos de cadeia média (AGCM) e 43% para ácidos graxos de cadeia saturada (AGS), em relação à dieta basal. Apenas as dietas com óleo de peixe apresentaram menor produção diária de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA, 18%) e ácidos graxos de cadeia longa (AGCL, 28,5%), enquanto que somente as dietas com óleo de soja apresentaram aumento nos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA, 9%) e AGCL (8,4%), em relação à dieta basal. Não houve efeito de concentrado para nenhuma das classes de ácidos graxos porque a dieta com baixo teor de concentrado também inibiu a síntese de ácidos graxos pela glândula mamária, como pode ser observado pelo menor valor de produção diária de AGCC e AGCM entre as dietas com baixos teores de concentrado e a dieta basal.

O leite das vacas alimentadas com óleo de soja apresentou maior teor de AGS e menores teores de ácidos graxos de cadeia ímpar (AGCI), ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR), ácidos graxos insaturados (AGI), MUFA e PUFA do que o leite das vacas alimentadas com óleo de peixe. O leite das vacas alimentadas com óleo de peixe

apresentou menores produções diárias de todas as classes de ácidos graxos, com exceção dos AGCI, AGCR e PUFA.

As dietas experimentais apresentaram menores teores de ácidos graxos $C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$ e maiores teores de $C_{4:0}$, $C_{18:1}$ e $C_{18:2}$ do que a dieta basal. Grummer (1991) mostrou que as proporções de ácidos graxos sintetizados de novo pela glândula mamária diminuíram linearmente quando a gordura suplementar da dieta aumentou de 1 para 5% da MS. O autor ainda acrescenta que as mudanças em C_{16} e C_{18} são dependentes da relação entre estes dois ácidos graxos no suplemento. Este efeito tem sido bem relatado na literatura quando se compara a suplementação de fontes de gordura em relação à não suplementação.

Não houve efeito de concentrado para nenhum ácido graxo específico, com exceção do $C_{17:0}$, que foi menor para as dietas com alto teor de concentrado.

Em relação aos efeitos da fonte de óleo, não houve efeito para a maioria dos ácidos graxos com menos de 16 carbonos. Houve forte redução dos teores de $C_{18:0}$ e aumento nos teores de ácidos graxos de cadeia longa ($>C_{18}$) e $C_{16:1}$ para as dietas com óleo de peixe.

A ausência do efeito da fonte de óleo sobre a maioria dos ácidos graxos de cadeia curta e média também foi encontrada em trabalhos usando as mesmas fontes de óleos do presente trabalho (ABUGHAZALEH et al., 2002; RASMASWAMY et al., 2001). As médias de cada AGCC e AGCM foram inferiores à dieta basal, com exceção de $C_{4:0}$, indicando que houve depressão da síntese *de novo* de ácidos graxos por ambas as fontes de óleo. Em relação ao $C_{4:0}$, a suplementação de lipídios não tem mostrado efeito devido a origem deste ácido graxo ser independente da acetil CoA carboxilase, sendo que metade vem do ácido β -OH-butírico e a outra metade vem da condensação de unidades acetil por um mecanismo independente do malonil-CoA (PALMQUIST; BEAULIEU; BARBANO, 1993).

As dietas com óleo de soja tiveram maior teor de $C_{18:0}$ e menor teor de $C_{16:1}$ do que as dietas com óleo de peixe. Estes resultados também têm sido observados por outros autores, com as mesmas fontes de óleos (ABUGHAZALEH et al., 2002; RASMASWAMY et al., 2001; WHITLOCK et al., 2002). Em relação ao $C_{18:0}$, o óleo de peixe é conhecido por alterar o ambiente ruminal e impedir o último passo no processo

de biohidrogenação ruminal (ABUGHAZALEH et al., 2002; DONOVAN et al., 2000; LOOR et al., 2005; WHITLOCK et al., 2002), impedindo a redução final do ácido graxo monoinsaturado até o esteárico (C_{18:0}).

Houve efeito da fonte de óleo sobre os teores de ácidos graxos de cadeia longa, principalmente para EPA e DHA, sendo que o óleo de peixe apresentou os maiores teores (0,28 e 0,24 g/100g, respectivamente para EPA e DHA) em relação ao óleo de soja (0,05 e 0,04, respectivamente para EPA e DHA). Chilliard; Ferlay e Doreau (2001) observaram que os teores de EPA e DHA aumentavam pouco em dietas com óleo de peixe, com grandes variações entre experimentos. O teor de EPA foi de $0,12 \pm 0,15$ e de DHA foi de $0,15 \pm 0,20$, com eficiências de transferência da dieta para o leite de 2,6% para o EPA e 4,1% para o DHA.

O menor teor de C_{18:0} e maior teores de ácidos graxos de cadeia longa indicam que a biohidrogenação não é completa em vacas recebendo óleo de peixe (LOOR et al., 2005). Byers e Schelling (1988) apud DONOVAN et al. (2000) afirmam que menos de 50% dos lipídios do óleo de peixe são hidrolisados no rúmen, contra mais de 90% para os óleos vegetais.

O mecanismo pelo qual o óleo de peixe promove diminuição da secreção de gordura do leite ainda não está completamente elucidado. O óleo de peixe parece ter uma ação por si só, como demonstrado por estudos com infusão duodenal, mas o efeito é muito mais pronunciado quando fornecido na dieta ou infundido no rúmen (CHILLIARD et al., 1999). Uma maior concentração de lipídios contendo ácidos graxos de cadeia longa chegando ao intestino pode ter um maior efeito sobre a síntese de gordura na glândula mamária.

Bauman e Griinari (2003) afirmam que, em situações onde houve depressão da gordura do leite, houve diminuição de ácidos graxos de todos os comprimentos de cadeia, mas a diminuição dos ácidos graxos sintetizados *de novo* tende a ser maior, especialmente quando a redução é mais pronunciada. Este resultado também sido mostrado com o óleo de peixe, onde a proporção de C₄-C₁₄ foi diminuída de forma mais acentuada quando a redução do teor de gordura do leite foi maior do que 10 g/kg (CHILLIARD; FERLAY; DOREAU, 2001). Porém, o óleo de peixe diminui a gordura do

leite sem aumentar significativamente o CLA *trans*-10, *cis*-12 (CHILLIARD et al., 2000; LOOR et al., 2005).

Segundo Knudsen; Hansen e Mikkelsen (1986), os AGCC (C₄+C₆) e AGCM (C₈+C₁₀) são encontrados na posição *sn*-2 e *sn*-3 dos triglicerídios do leite, enquanto que a posição *sn*-1 sempre contém um AGCL (C₁₄-C₁₈). A taxa de síntese *de novo* de AGCC e AGCM pela glândula mamária é dependente da ativação de ácidos graxos exógenos à glândula mamária. Uma quantidade suficiente destes ácidos graxos exógenos ativados é necessária para a acilação inicial na posição *sn*-1 na molécula de glicerol-3 fosfato. Quantidades excessivas de AGCL ativados irão competir com AGCM pela posição *sn*-2 e *sn*-3 do triglicerídio, inibindo a síntese *de novo* destes ácidos graxos. O aumento na disponibilidade de ácidos graxos exógenos inibe diretamente a Acetil CoA Carboxilase (BARBER et al., 1997). Knudsen; Hansen e Mikkelsen (1986) afirmam que a composição dos ácidos graxos também interfere com a síntese *de novo*, sendo que, em baixas doses, o ácido palmítico estimulou a síntese enquanto que os ácidos esteárico e oléico inibiram a síntese *de novo* em qualquer concentração. O ácido palmítico estimula a síntese de lipídios devido à preferência que este ácido graxo tem para a acilação inicial no glicerol-3 fosfato (BARBER et al., 1997).

Loor e Herbein (2003) e Loor et al. (2005) supõem que a síntese de triglicerídio da gordura do leite pode ter um requerimento rigoroso de ácido oléico sintetizado pela Δ^9 -dessaturase, a partir de C_{18:0} derivado do plasma, o qual é importante para a regulação da fluidez do glóbulo de gordura dentro da célula mamária.

Uma vez que o ponto de fusão de ácidos graxos *trans* é muito diferente do seu isômero *cis* correspondente, e porque a fluidez de lipídios nas estruturas celulares pode limitar o empacotamento do glóbulo de gordura e/ou sua secreção, é esperado que a percentagem de diferentes ácidos graxos, tão bem como sua posição na molécula de glicerol, contribuam juntos para a fluidez da gordura do leite em um mecanismo regulatório geral. Este mecanismo integraria efeitos complexos de um número de fatores fisiológicos e ambientais que podem modificar a composição da gordura do leite (CHILLIARD et al., 2000).

Tabela 4 – Classes de ácidos graxos da gordura do leite de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe

Ácidos Graxos	Fonte de óleo ¹					EP	P>F		
	Basal ³	Óleo de soja		Óleo de peixe			Óleo	Concentrado	Interação
		Teor de concentrado ²		Teor de concentrado					
		Alto	Baixo	Alto	Baixo				
	-----g/100g-----								
Cadeia curta ⁴	9,56	9,05	8,41	8,57	8,23	0,5631	0,5557	0,4086	0,7975
Cadeia média ⁵	54,99	42,80	40,88	42,94	46,15	1,402	0,0853	0,6578	0,1009
Cadeia longa ⁶	35,54	48,19	50,73	48,52	45,67	1,8662	0,2369	0,9347	0,1822
Cadeia ímpar	3,58	2,58	2,66	3,17	3,27	0,1116	0,0004	0,4367	0,8982
Cadeia ramificada	2,76	1,97	2,01	2,31	2,37	0,0922	0,0043	0,5907	0,9241
Saturados	77,15	70,73	68,59	58,58	61,52	2,0713	0,0012	0,8499	0,2521
Insaturados	22,77	29,02	31,21	37,23	33,89	1,9428	0,0206	0,7737	0,1885
MUFA ⁷	19,64	24,65	26,73	31,19	28,23	1,585	0,0319	0,7874	0,1462
PUFA ⁸	3,13	4,37	4,48	6,04	5,66	0,5714	0,0339	0,8182	0,6804
	-----g/dia-----								
Cadeia curta ⁴	97,08	71,81	67,39	47,39	48,01	5,96	0,035	0,771	0,701
Cadeia média ⁵	559,78	340,23	326,45	237,27	266,11	22,38	0,0355	0,7586	0,4113
Cadeia longa ⁶	362,85	382,69	403,74	266,53	259,39	16,96	0,0046	0,7094	0,4668
Cadeia ímpar	36,57	20,58	21,18	17,59	18,66	1,33	0,1298	0,5761	0,8689
Cadeia ramificada	28,22	15,70	16,07	12,85	13,50	1,13	0,0959	0,6833	0,9091
Saturados	784,52	560,94	548,32	323,88	353,80	33,24	0,0074	0,8116	0,5678
Insaturados	233,59	231,46	247,56	204,01	192,71	11,24	0,0352	0,8446	0,31
MUFA ⁷	201,44	196,50	212,35	170,91	160,02	10,55	0,0345	0,8293	0,2947
PUFA ⁸	32,15	34,96	35,21	33,10	32,69	2,63	0,4664	0,978	0,9076

¹ 2 % de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

² Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

³ Dieta sem óleo e com 40% de concentrado.

⁴ Σ C₄-C₁₀.

⁵ Σ C₁₁-C₁₆.

⁶ > C₁₇.

⁷ Ácidos graxos monoinsaturados.

⁸ Ácidos graxos poliinsaturados.

Tabela 5 – Perfil de ácidos graxos da gordura do leite (g/100g) de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe

(continua)

Ácidos Gaxos	Fonte de óleo ¹					EP	P>F		
	Basal ³	Óleo de soja		Óleo de peixe			Óleo	Concentrado	Interação
		Teor de concentrado ²		Teor de concentrado					
		Alto	Baixo	Alto	Baixo				
C _{4:0}	2,90	3,42	3,36	3,15	3,25	0,1443	0,2058	0,9065	0,5902
C _{6:0}	2,13	2,01	1,92	1,89	1,98	0,1154	0,7619	0,9924	0,4541
C _{8:0}	0,92	0,96	0,78	0,99	0,61	0,1787	0,6860	0,1552	0,5798
C _{10:0}	3,50	2,61	2,32	2,51	2,36	0,2605	0,9095	0,4181	0,7852
C _{10:1}	0,10	0,04	0,03	0,04	0,04	0,0086	0,8024	0,4985	0,4096
C _{11:0}	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,0023	0,1534	0,2744	0,6137
C _{12:0}	4,38	2,95	2,59	2,82	2,93	0,2813	0,7313	0,6643	0,4251
C _{13:0} iso	0,07	0,03	0,03	0,03	0,03	0,0047	0,6598	0,3638	0,8906
C _{13:0} anteiso	0,05	0,05	0,05	0,06	0,07	0,0065	0,0395	0,5360	0,3472
C _{12:1}	0,10	0,05	0,05	0,05	0,04	0,0085	0,3739	0,4864	0,9177
C _{13:0}	0,16	0,10	0,09	0,09	0,10	0,0079	0,7513	0,8151	0,5425
C _{14:0} iso	0,12	0,10	0,13	0,10	0,10	0,0117	0,1574	0,2240	0,2782
C _{14:0}	13,50	10,78	10,23	10,46	11,35	0,4151	0,3636	0,6943	0,1172
C _{15:0} iso	0,71	0,41	0,38	0,38	0,31	0,0370	0,2083	0,1761	0,6009
C _{15:0} anteiso	1,29	0,84	0,88	0,95	1,05	0,0434	0,0120	0,1422	0,5596
C _{14:1}	0,25	0,23	0,26	0,27	0,28	0,0372	0,4533	0,5388	0,9023
C _{16:0}	33,42	26,66	25,59	26,78	29,02	0,9941	0,1079	0,5694	0,1308
C _{17:0} iso	0,19	0,18	0,19	0,26	0,26	0,0136	0,0005	0,6555	0,8325
C _{17:0} anteiso	0,34	0,35	0,35	0,53	0,56	0,0354	0,0004	0,6885	0,7139
C _{16:1}	0,84	0,54	0,56	0,92	0,84	0,0684	0,0010	0,6770	0,4328
C _{17:0}	0,58	0,48	0,53	0,66	0,71	0,0169	<0,0001	0,0144	0,8876
C _{17:1}	0,19	0,13	0,15	0,20	0,19	0,0110	0,0006	0,4810	0,1672
C _{18:0}	12,83	18,71	19,09	6,86	6,77	1,4429	<,0001	0,9239	0,8770
C _{18:1}	18,14	23,62	25,64	29,61	26,69	1,5627	0,0508	0,7798	0,1492
C _{18:2} t-11, c-15	0,05	0,07	0,15	0,37	0,52	0,0910	0,0048	0,2513	0,7387
C _{18:2} c-9, c-12	2,13	3,00	2,79	2,05	1,67	0,2035	0,0007	0,1858	0,6951
C _{18:3} n-6	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,0048	0,1268	0,7538	0,9004
C _{18:3} n-3	0,18	0,26	0,28	0,29	0,27	0,0355	0,7895	0,9919	0,5119
C _{20:1}	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,0052	0,0181	0,0921	0,3715
C _{22:0}	0,02	0,04	0,05	0,05	0,06	0,0075	0,1767	0,1674	0,8583
C _{24:0}	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,0082	0,5005	0,5519	0,9674

Tabela 5 – Perfil de ácidos graxos da gordura do leite (g/100g) de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe

(conclusão)

Ácidos Gaxos	Fonte de óleo ¹					EP	P>F		
	Basal ³	Óleo de soja		Óleo de peixe			Óleo	Concentrado	Interação
		Teor de concentrado ²		Teor de concentrado					
		Alto	Baixo	Alto	Baixo				
C _{22:1}	0,02	0,03	0,03	0,09	0,10	0,0057	<0,0001	0,4194	0,4720
C _{20:3}	0,10	0,07	0,06	0,09	0,08	0,0138	0,1557	0,6977	0,9276
C _{20:4}	0,16	0,11	0,10	0,13	0,08	0,0531	0,9256	0,5692	0,7565
C _{22:2}	0,01	0,03	0,03	0,37	0,37	0,0510	<0,0001	0,9753	0,9529
C _{20:5}	0,01	0,04	0,05	0,28	0,28	0,0359	0,0001	0,8777	0,9585
C _{24:1}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0021	0,1189	0,9070	0,9070
C _{22:5}	0,03	0,02	0,03	0,04	0,05	0,0083	0,0691	0,3352	0,8660
C _{22:6}	0,00	0,05	0,03	0,26	0,22	0,0535	0,0053	0,6371	0,8000
Total não identificado ⁴	0,06	0,24	0,18	4,18	4,59	0,3407	<0,0001	0,6195	0,5083

¹2% de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

²Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

³Dieta sem óleo e com 40% de concentrado.

⁴Soma dos ácidos graxos não identificados com mais de 20 carbonos.

2.2.2.3 Perfil dos ácidos graxos *cis* e *trans* octadecenóicos da gordura do leite

O perfil de ácidos graxos *cis* e *trans* octadecenóicos da gordura do leite pode ser visualizado na Tabela 6. Houve alteração para todos os ácidos graxos das dietas experimentais em relação à dieta basal. O óleo de peixe afetou os teores de ácidos graxos *trans*, onde os teores de *trans*-5, *trans*-9, *trans*-11, *trans*-12, *trans*-13 e total de C_{18:1} *trans* foram aumentados e o teor de *trans*-16 reduzido em relação às dietas com óleo de soja. Houve efeito do teor de concentrado sobre *trans*-13, com as dietas com baixos teores de concentrado apresentando os maiores valores. Em relação aos ácidos graxos *cis*, o óleo de soja apresentou maiores teores de ácidos graxos *cis*-9, *cis*-12 e total de C_{18:1} *cis* e menores teores de *cis*-11 e *cis*-15 em relação às dietas com óleo de peixe. Houve efeito da interação entre a fonte de óleo e o teor de concentrado para a variável *cis*-12. O ácido vaccênico representou 55% do total de C_{18:1} *trans* na dieta com óleo de peixe contra 41% na dieta com óleo de soja.

Loor et al. (2005) também observaram aumentos de C_{18:1} *trans* com a infusão de 300 mL/d de óleo de peixe no rúmen. Os teores de *trans*-5 até *trans*-13+14 foram maiores e o teor de *trans*-16 foi menor com a infusão ruminal de óleo de peixe em comparação a infusão duodenal ou a dieta controle, sem infusão de óleo. O ácido vaccênico representou 33% do total de C_{18:1} *trans* para o óleo infundido no duodeno em comparação à 66% quando o óleo de peixe foi infundido no rúmen. Estes resultados são muito semelhantes aos obtidos por Shingfield et al. (2003), que forneceu 250 g/d de óleo de peixe na dieta. Chilliard; Ferlay e Doreau (2001) também observaram aumento da porcentagem de C_{18:1} *trans* em dietas com óleo de peixe, sendo que o 74-82% deste aumento foi devido ao isômero *trans*-11.

O aumento no teor de ácidos graxos *trans* se dá porque, embora a biohidrogenação dos ácidos graxos do óleo de peixe seja extensa, ela é menor do que a dos ácidos graxos de óleos vegetais. Na biohidrogenação do óleo de peixe, muitos intermediários são formados e a saturação total não é alcançada (CHILLIARD; FERLAY; DOREAU, 2001).

O efeito do óleo de peixe no aumento da concentração de C_{18:1} *trans*-11 na gordura do leite, e na redução drástica dos níveis de ácido esteárico, foi a base para a

teoria de que o óleo de peixe inibe o último passo no processo de biohidrogenação (ABUGHAZALEH et al., 2002; DONOVAN et al., 2000; LOOR et al., 2005; WHITLOCK et al., 2002). Altas doses de óleo vegetal rico em ácido linoléico também inibem o último passo da biohidrogenação (HARFOOT; NOBLE; MOORE, 1973), porém este efeito parece ser muito mais acentuado com a adição do óleo de peixe do que em dietas com lipídios de origem vegetal (RAMASWAMY et al., 2001; WHITLOCK et al., 2002).

Abughazaleh et al. (2002) e Whitlock et al. (2002) observaram que, embora o ácido vaccênico e CLA tenham poucos precursores em dietas contendo óleo de peixe, estes dois intermediários tem sua concentração elevada, indicando haver interferência do EPA e DHA na biohidrogenação dos ácidos linoléico e linolênico provenientes de outras fontes de lipídios da dieta. Consistente com esta hipótese, Whitlock et al. (2002) e Ramaswamy et al. (2001) observaram sinergismo na associação do óleo de peixe com outra fonte de gordura insaturada em aumentar a concentração de CLA no leite.

Diferente do esperado, não houve efeito do teor de concentrado sobre o teor de ácidos graxos *trans*-10, como demonstrado por Griinari et al. (1998) em dietas que causam depressão da gordura do leite. Aumento no teor de *trans*-10 em dietas com óleo de peixe tem sido freqüentemente reportado na literatura (SHINGFIELD et al., 2003; WHITLOCK et al., 2002; OFFER et al., 1999; OFFER; MARSDEN; PHIPPS, 2001). Este aumento pode ser decorrente da redução do CLA *trans*-10, *cis*-12 no rúmen (BAUMAN; GRIINARI, 2003) ou da isomerização do ácido oléico (MOSLEY et al., 2002).

Tabela 6 – Perfil de ácidos graxos *cis* e *trans* octadecenóicos da gordura do leite (g/100g) de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe

Ácidos Gaxos	Fonte de óleo ¹					EP	P>F		
	Basal ³	Óleo de soja		Óleo de peixe			Óleo	Concentrado	Interação
		Teor de concentrado ²		Teor de concentrado					
		Alto	Baixo	Alto	Baixo				
<i>trans</i> -4	0,03	0,05	0,06	0,07	0,06	0,0051	0,2138	0,5824	0,0758
<i>trans</i> -5	0,01	0,04	0,05	0,07	0,07	0,0081	0,0117	0,8485	0,4766
<i>trans</i> -6-8	0,22	0,48	0,51	0,80	0,59	0,1239	0,1413	0,4953	0,3529
<i>trans</i> -9	0,29	0,48	0,51	0,84	0,76	0,0444	<0,0001	0,5848	0,2215
<i>trans</i> -10	0,37	1,62	1,04	4,88	3,78	1,4380	0,0665	0,5768	0,8594
<i>trans</i> -11	1,13	2,21	3,47	9,52	9,98	1,5965	0,0019	0,6025	0,8106
<i>trans</i> -12	0,30	0,58	0,67	0,94	1,01	0,0367	<0,0001	0,0528	0,7626
<i>trans</i> -13	0,36	0,52	0,64	0,83	0,94	0,0378	<0,0001	0,0134	0,8830
<i>trans</i> -16	0,25	0,39	0,43	0,14	0,18	0,0247	<0,0001	0,1082	0,9377
Total <i>trans</i>	2,97	6,36	7,39	18,09	17,38	1,2581	<0,0001	0,9023	0,5061
<i>cis</i> -9	14,42	16,17	16,90	9,81	7,74	0,8458	<0,0001	0,4501	0,1312
<i>cis</i> -11	0,40	0,49	0,54	1,22	1,12	0,0983	<0,0001	0,8354	0,4573
<i>cis</i> -12	0,24	0,43	0,61	0,23	0,19	0,0467	<0,0001	0,1721	0,0355
<i>cis</i> -13	0,07	0,09	0,11	0,13	0,14	0,0120	0,0229	0,3316	0,4307
<i>cis</i> -15	0,04	0,09	0,07	0,12	0,13	0,0394	0,2778	0,9631	0,7503
Total <i>cis</i>	15,17	17,26	18,24	11,52	9,32	0,8539	<0,0001	0,4937	0,0949

¹2 % de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

²Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

³Dieta sem óleo e com 40% de concentrado.

2.2.2.4 Perfil dos ácidos graxos octadienóicos conjugados (CLA) da gordura do leite

O teor de ácidos graxos octadienóicos conjugados (CLA) na gordura do leite pode ser visualizado na Tabela 7. A suplementação da dieta com óleo aumentou os teores de CLA em relação à dieta basal. O óleo de peixe apresentou maiores teores de CLA *cis-9 trans-11* e CLA *cis-11 trans-13* em relação ao óleo de soja.

Chilliard; Ferlay e Doreau (2001) observaram aumentos no teor de CLA da gordura do leite com inclusão de 180-450 g de óleo de peixe na dieta de 27 grupos de vacas. O teor de CLA aumentou de 0,2-0,6% na dieta basal para 1,5-2,7% nas dietas suplementadas, sendo que este aumento foi quase que exclusivamente devido ao CLA *cis-9, trans-11*. Loo et al. (2005) observaram teores de 3,2 g/100g de CLA *cis-9, trans-11* com a infusão ruminal de 300 mL/d de óleo de peixe.

Bauman e Lock (2006) citam quatro fatores que podem contribuir para o aumento do teor de CLA no leite: 1) aumentar na ingestão de ácidos graxos poliinsaturados de 18C (ácido linoléico e linolênico); 2) manter o processo de biohidrogenação que resulta na produção de ácido vaccênico como intermediário; 3) inibir o último passo no processo de biohidrogenação para acúmulo do ácido vaccênico; 4) aumentar a Δ^9 – dessaturase na glândula mamária.

Neste trabalho, o óleo de soja apresentou 50,80 g/100g de ácido linoléico, enquanto que o óleo de peixe apresentou apenas 6,40 g/100g. Era de se esperar, então, que o óleo de soja fosse muito mais efetivo em aumentar o teor de CLA do leite do que o óleo de peixe, visto ser o CLA um intermediário no processo de biohidrogenação do ácido linoléico. Este efeito não é observado porque o CLA é um intermediário transitório no processo de biohidrogenação, e muito pouco CLA alcança o intestino para ser absorvido (PIPEROVA et al., 2002).

Vários trabalhos têm demonstrado que a síntese endógena de CLA pela Δ^9 -dessaturase é mais importante que a biohidrogenação ruminal na secreção de CLA no leite (CORL et al. 2001; GRIINARI et al., 2000; PIPEROVA et al., 2002; MOSLEY et al. 2006), sendo que a síntese endógena tem contribuído com 64 a 93% do CLA do leite.

Baseados neste fato, aumentos no teor de CLA na gordura do leite podem ser mais eficientemente obtidos pelo aumento da concentração do seu precursor na síntese endógena, o ácido vaccênico. Neste trabalho, o óleo de peixe aumentou o teor de ácido vaccênico em 343% em relação ao óleo de soja. Loo et al. (2005) acrescentam que o aumento no teor de CLA *cis-9*, *trans-11* através da síntese endógena em dietas com óleo de peixe é também facilitado por uma concomitante redução no teor de ácido esteárico, o substrato preferencial da Δ^9 - dessaturase. Este resultado também foi observado neste trabalho, onde o óleo de peixe reduziu em 64% o teor de ácido esteárico em relação ao óleo de soja.

Um fator que pode diminuir a resposta de aumento de CLA em dietas com óleo de peixe é o teor de concentrado. Shingfield et al. (2005) mostraram que o aumento do teor de concentrado na dieta de 35 para 65% da MS aumentou a concentração de $C_{18:1}$ *trans-10* (7,84 x 12,73 para baixo e alto teor de concentrado, respectivamente) e reduziu o teor de $C_{18:1}$ *trans-11* (8,04 x 3,48 para baixo e alto teor de concentrado, respectivamente). Como a principal via de síntese de CLA é a endógena, estes autores afirmam que mudanças no padrão de biohidrogenação de ácidos graxos provocadas por maiores teores de concentrado na dieta podem reduzir a quantidade de precursor para síntese de CLA na glândula mamária e diminuir o teor de CLA no leite. O teor de CLA *cis-9*, *trans-11* tendeu a reduzir com aumento no teor de concentrado. No presente trabalho não houve efeito do teor de concentrado para o CLA *cis-9*, *trans-11* e nem para $C_{18:1}$ *trans-10* e $C_{18:1}$ *trans-11*, mas a proporção de $C_{18:1}$ *trans-10*/ $C_{18:1}$ *trans-11* caiu de 0,55 para 0,36 com o aumento do teor de concentrado de 40 para 60% da MS da dieta.

Os teores de CLA *trans-10 cis-12* não foram afetados pelo teor de concentrado e nem pela fonte de óleo. O CLA *trans-10, cis-12* não tem sido encontrado (LOOR et al., 2005; SHINGFIELD et al., 2003) ou tem aumentado (ABUGHAZALEH et al., 2002; WHITLOCK et al., 2002; WHITLOCK et al., 2006) em dietas com óleo de peixe. O óleo de peixe (109 g/d) também não altera o teor de CLA *trans-10 cis-12* quando comparado à dieta controle com alto teor de amido (24% da MS, OFFER; MARSDEN; PHIPPS, 2001). As variações encontradas na literatura demonstram que o CLA *trans-10, cis-12* não explica as reduções na secreção de gordura em dietas com óleo de peixe.

Tabela 7 – Perfil de ácidos graxos octadienóicos conjugados (CLA) da gordura do leite (g/100g) de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe

CLA	Fonte de óleo ¹					EP	P>F		
	Basal ³	Óleo de soja		Óleo de peixe			Óleo	Concentrado	Interação
		Teor de concentrado ²		Teor de concentrado					
		Alto	Baixo	Alto	Baixo				
<i>trans</i> -7, <i>cis</i> -9	0,02	0,04	0,05	0,07	0,03	0,0134	0,5687	0,3681	0,1720
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,31	0,50	0,71	1,44	1,38	0,2904	0,0223	0,8069	0,6502
a (74'45'') ⁴	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,0054	0,0143	0,3500	0,5233
b (74'65'')	0,00	0,01	0,01	0,05	0,05	0,0105	0,0060	0,9195	0,8975
<i>cis</i> -11, <i>trans</i> -13	0,00	0,01	0,01	0,04	0,05	0,0062	0,0002	0,2630	0,5365
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0,00	0,02	0,01	0,01	0,02	0,0074	0,6075	0,9928	0,2885

¹2 % de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

²Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

³Dieta sem óleo e com 40% de concentrado.

⁴a e b são CLAs não identificados (tempo de retenção).

2.2.2.5 Índice de dessaturase

A avaliação da atividade da Δ^9 -dessaturase é fundamental em estudos que buscam aumentar a concentração de CLA na gordura do leite devido à importância da síntese endógena na secreção de CLA (CORL et al., 2001; GRIINARI et al., 2000).

A atividade da Δ^9 -dessaturase pode ser avaliada indiretamente através da relação entre os pares de ácidos graxos representados pelos produtos ($C_{10:1}$ *cis*-9, $C_{12:1}$ *cis*-9, $C_{14:1}$ *cis*-9, $C_{16:1}$ *cis*-9, $C_{18:1}$ *cis*-9 e CLA *cis*-9, *trans*-11) e substratos ($C_{10:0}$, $C_{12:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ e $C_{18:1}$ *trans*-11) da enzima (BAUMAN; LOCK, 2006). Além disso, a proporção de produto:substrato da Δ^9 -dessaturase na gordura do leite é correlacionada com a abundância de RNAm e atividade da Δ^9 -dessaturase na glândula mamária de cabras (BERNARD et al., 2005).

O par que fornece a melhor indicação da atividade da enzima é o C_{14} porque o $C_{14:0}$ é sintetizado pela glândula mamária e o aparecimento de seu produto ($C_{14:1}$) na gordura do leite é quase que exclusivamente resultado da atividade da Δ^9 -dessaturase (GRIINARI et al., 2000). Embora outros ácidos graxos de cadeia menor que C_{14} possam também ser dessaturados, Chilliard et al. (2000) afirmam que a Δ^9 -dessaturase tem uma atividade muito baixa sobre ácidos graxos de cadeia menor que 18 carbonos e apenas uma pequena porção de $C_{14:0}$ e $C_{16:0}$ é dessaturada à $C_{14:1}$ *cis*-9 e $C_{16:1}$ *cis*-9, respectivamente.

Os resultados do índice de dessaturase de cada par de ácido graxo podem ser visualizados na Tabela 8. Não houve efeito do teor de concentrado para nenhuma destas variáveis. Em relação à dieta basal, a suplementação com óleo mostrou resultados bem variados.

Não houve diferença no índice de dessaturase entre as fontes de óleo para os pares C_{10} , C_{12} e C_{14} , mas houve redução nas vacas alimentadas com óleo de soja para os pares C_{16} e C_{18} e aumento para o par CLA. O menor valor no índice de dessaturase para o par C_{18} nas dietas com óleo de soja pode ser atribuído a maior concentração (277%) de $C_{18:0}$ na gordura do leite. A quantidade de ácido esteárico que chegou a glândula mamária pode ter excedido a capacidade de dessaturação, de modo similar ao relatado para $C_{18:1}$ *trans*-11 por Chilliard; Ferlay e Doreau (2001).

Tabela 8 – Índice de dessaturase de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe

Produto / substrato	Fonte de óleo ¹					EP	P>F		
	Basal ³	Soja		Peixe			Óleo	Concentrado	Interação
		Teor de concentrado ²		Teor de concentrado					
		Alto	Baixo	Alto	Baixo				
C _{10:1} / C _{10:0}	0,0278	0,0162	0,0136	0,0155	0,0172	0,0019	0,4744	0,8291	0,2746
C _{12:1} / C _{12:0}	0,0220	0,0177	0,0174	0,0161	0,0167	0,0027	0,6641	0,9617	0,8593
C _{14:1} / C _{14:0}	0,0187	0,0216	0,0251	0,0257	0,0255	0,0039	0,5837	0,6860	0,6497
C _{16:1} / C _{16:0}	0,0252	0,0202	0,0219	0,0345	0,0297	0,0027	0,0026	0,5891	0,2537
C _{18:1 cis-9} / C _{18:0}	1,1359	0,8812	0,8883	1,5129	1,3195	0,1627	0,0097	0,5809	0,5532
CLA <i>c</i> -9, <i>t</i> -11/ C _{18:1 t-11}	0,2727	0,2270	0,2125	0,1640	0,1336	0,0156	0,0014	0,1838	0,6225

¹2 % de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

²Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

³Dieta sem óleo e com 40% de concentrado.

O índice de dessaturase para o par CLA foi menor para a dieta com óleo de peixe, mesmo apresentando um valor 231% maior de CLA *cis*-9, *trans*-11 do que as vacas que receberam óleo de soja. Isto foi devido a maior concentração de C18:1 *trans*-11 (344%) na gordura do leite para as vacas que receberam a dieta com óleo de peixe. Chilliard; Ferlay e Doreau (2001) afirmam que a diminuição da proporção de CLA *cis*-9, *trans*-11/C18:1 *trans*-11 em dietas com óleo de peixe pode ser resultado do fluxo de C18:1 *trans*-11 exceder a capacidade de dessaturação da glândula mamária quando sua porcentagem foi maior que 10-12% dos ácidos graxos do leite. No presente trabalho a porcentagem de C18:1 *trans*-11 foi de 9,75% em relação aos ácidos graxos totais presentes na gordura do leite.

Os valores de índice de dessaturase deste trabalho foram inferiores ao reportado por Looor et al. (2005), que observaram valores de 0,07, 0,05, 2,23 e 0,35, para os pares C_{14:1} *cis*-9/C_{14:0}, C_{16:1} *cis*-9/C_{16:0}, C_{18:1} *cis*-9/ C_{18:0} e CLA *cis*-9, *trans*-11/C_{18:1} *trans*-11, respectivamente, com a infusão 300 mL de óleo de peixe no rúmen ou duodeno de vacas em lactação. Porém, valores mais próximos aos obtidos no presente trabalho foram observados por Shingfield et al. (2003). Estes autores observaram médias de 0,03, 0,05, 1,18 e 0,18, respectivamente, para os mesmos pares citados acima, para vacas alimentadas com 250 g de óleo de peixe por dia.

Shingfield et al. (2006) mostraram que o uso da técnica do triplo marcador para avaliação do fluxo de nutrientes no trato digestivo (AHVENJARVI et al., 2003) afeta a atividade da Δ^9 -dessaturase. Estes autores verificaram que o uso de CoEDTA, acetato de itérbio e cromo mordante reduziu ($P < 0,001$) as proporções de C_{10:1} *cis*-9/C_{10:0}, C_{12:1} *cis*-9/C_{12:0}, C_{14:1} *cis*-9/C_{14:0}, C_{16:1} *cis*-9/C_{16:0}, C_{18:1} *cis*-9/ C_{18:0} e CLA *cis*-9, *trans*-11/C_{18:1} *trans*-11 em 44,6, 52,7, 58,7, 36,8, 44,3 e 43%, respectivamente. Devido à outros autores demonstrarem que o cromo, proveniente do cromo mordante (UDÉN; COLUCCI; Van SOEST, 1980), e o itérbio, derivado do acetato de itérbio (SIDDONSON et al., 1985), foram absorvidos de forma insignificante no trato gastrointestinal de ruminantes, e que cerca de 3% do cobalto, administrado como CoEDTA no rúmen, foi recuperado na urina (UDÉN; COLUCCI; Van SOEST, 1980), os autores supuseram que o efeito inibidor da Δ^9 -dessaturase foi causado pelos sais de lítio do CoEDTA. Estes resultados podem explicar os menores valores do índice de dessaturase encontrados

neste trabalho e a semelhança com os resultados reportados por Shingfield et al. (2003).

2.3 Conclusões

Não houve efeito de concentrado e nem da interação entre a fonte de óleo e o teor de concentrado para nenhuma variável. O óleo de peixe reduziu a produção e alterou a composição do leite em relação ao óleo de soja. Em relação ao perfil dos ácidos graxos, o óleo de peixe reduziu a produção diária de todas as classes de ácidos graxos, com exceção dos ácidos graxos poliinsaturados, aumentou os teores de ácidos graxos insaturados, monoinsaturados e poliinsaturados, e reduziu os teores de ácido graxos saturados em relação ao óleo de soja. O óleo de peixe também reduziu drasticamente os teores de ácido esteárico e aumentou o teor de ácidos graxos *trans*, principalmente do ácido vaccênico. Houve aumento do teor de CLA *cis-9, trans-11* na gordura do leite, nos tratamentos com óleo de peixe.

Referências

ABUGHAZALEH, A.A.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R.; KALSCHEUR, K.F.; WHITLOCK, L.A. Fatty acid profiles of milk and rumen digesta from cows fed fish oil, extruded soybeans or their blend. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.85 , p.2266-2276, 2002.

AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH (AFRC). **Energy and protein requirements of ruminants**. Wallingford: U.K., CAB International, 1993. 159p.

AHNADI, C.E.; BESWICK, N.; DELBECCHI, N.; KENNELLY, J.J.; LACASSE, P. addition of fish oil to diets for dairy cows. II. Effect on milk fat and gene expression of mammary lipogenic enzymes. **Journal Dairy Research**, London, v.69, p. 521-531, 2002.

AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; SHINGFIELD, K.J.; HUHTANEN, P. Determination of digesta flow entering the omasal canal of dairy cows using different marker systems. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 90, p. 41-52, 2003.

ALLEN, M.S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.83, p. 1598-1624, 2000.

ASHES, J.R.; GULATI, S.K.; SCOTT, T.W. Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.80, p. 2204-2212, 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington: AOAC, 1990. v.1, 1117p.

BARBER, M.C.; CLEGG, R.A.; TRAVERS, M.T.; VERNON, R.G. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1347, p. 101-126, 1997.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Reviews of Nutrition**, Palo Alto, v.23, p.203-227, 2003.

BAUMAN, D.E.; LOCK, A.L. Conjugated linoleic acid: biosynthesis and nutritional significance. In: FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry**. New York: Springer, 2006. chap. 3, p.93-136.

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**, Albany, v.77, p.1-15,1999.

BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; SAEBO, A.; BAUMAN, D.E.. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v.278, p.R179-R184, 2000.

BERNARD, L.; ROUEL, J.; LEROUX, C.; FERLAY, A.; FAULCONNIER, Y.; LEGRAND, P.; CHILLIARD, Y. Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in alpine goats fed vegetable lipids. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.88, p.1478-1489, 2005.

CANT; J.P.; FREDEEN, A.H.; MacINTYRE, T.; GUNN, J.; CROWE, N. Effect of fish oil and monensin on milk composition in dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.77, p. 125-131, 1997.

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

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, R.M.; DOREAU, M. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. **Annales de Zootechnie**, Paris, v.49, p.181-205, 2000.

CHILLIARD, Y.; CHARDIGNY, J.M.; CHABROT, J.; OLLIER, A.; SÉBÉDIO, J.L.; DUREAL, M. Effects of ruminant or postruminant fish oil supply on conjugated linoleic acid (CLA) content of cow milk fat. **Proceedings of Nutrition Society**, London, v.58, p.70, 1999. Abstract

CHOUINARD, P.Y.; GIRARD, V.; BRISSON, G.J. Fatty acids profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturation. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.81, p. 471-481, 1998.

CHRISTIE, W.W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and colesteryl esters. **Journal of Lipid Research**, New York, v.23, p.1072-1075, 1982.

CORL, B.A.; CHOUINARD, P.Y.; BAUMAN, D.E.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; NURMELA, K.V. Conjugated linoleic acid in milk fat of dairy cows originates in part by endogenous synthesis from *trans*-11 octadecenoic acid. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.81, n.1, p.233, 1998. Abstract.

CORL, B.A.; BAUMGARD, L.H.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; PHILLIPS, B.S.; BAUMAN, D.E. The role of Δ^9 -desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 12, p. 622-630, 2001.

DONOVAN, D.C.; SCHINGOETHE, D.J.; BAER, R.J.; RYALI, J.; HIPPEN, A.R.; FRANKLIN, S.T. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.83, p. 2620-2628, 2000.

DRACKLEY, J.K.; KLUSMEYER, T.H.; TRUSK, A.M.; CLARK, J.H. Infusion of long-chain fatty acids varying in saturation and chain length into the abomasum of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.75, p. 1517-1526, 1992.

GAMA, M.A.S. **Desempenho, composição do leite e mecanismos envolvidos na depressão da gordura do leite (DGL) de vacas recebendo ácidos linoléicos conjugados (CLA) e óleo de peixe na dieta.** 2004. 120 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

GRIINARI, J.M.; CORL, B.A.; LACY, S.H.; CHOUINARD, P.Y.; NURMELA, K.V.; BAUMAN, D.E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 desaturase. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.130, p.2285-2291, 2000.

GRIINARI, J.M.; DWYER, D.A.; McGUIRE, M.A.; BAUMAN, D.E.; PALMQUIST, D.L.; NURMELA, K.V.V. *Trans*-octadecenoic acid and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.81, p.1251-1261, 1998.

GRUMMER, R.R. Effect of feed on the composition of milk fat. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.74, p.3244-3257, 1991.

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

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

HARFOOT, C.G.; NOBLE, R.C.; MOORE, J.H. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen micro-organisms in vitro. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.24, p.961-970, 1973.

KNUDSEN, J.; HANSEN, H.O.; MIKKELSEN, J.M. Medium-chain fatty acid synthesis. **Biochemical Society Transactions**, Essex, v. 14, n. 3, 1986.

LEIVA, E.; HALL, M.B.; Van HORN, H.H. Performance of dairy cattle fed citrus pulp or corn products as source of neutral detergent-soluble carbohydrates. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.83, p.2866-2875, 2000.

LOOR, J.J.; HERBEIN, J.H. Reduced fatty acid synthesis and desaturation due to exogenous *trans*10,*cis*12-CLA in cows fed oleic or linoleic oil. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.86, p.1354-1369, 2003.

LOOR, J.J.; UEDA, K.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y.; DOREAU, M. Intestinal flow and digestibility of trans fatty acids and conjugated linoléico acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 119, p. 203-225, 2005.

McGUIRE, M.A.; McGUIRE, M.K. Conjugated linoleic acid (CLA): a ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, Albany, 1999. Disponível em: <<http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0938.pdf>>. Acesso em: 6 ago. 2003.

MOSLEY, E.E.; POWELL, G.L.; RILEY, M.B.; JENKINS, T.C. Microbial biohydrogenation of oleic acid to trans isomers in vitro. **Journal of Lipid Research**, New York, v.43, p.290-296, 2002.

MOSLEY, E.E.; SHAFFI, B.; MOATE, P.J.; McGUIRE, M.A. cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 136, p. 570-575, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academic Press, 2001. 381p.

OFFER, N.W.; MARSDEN, M.; PHIPPS, R.H. Effect of oil supplementation of a diet containing a high concentration of starch on levels of trans fatty acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. **Animal Science**, East Lothian, v.73, p.533-540, 2001.

OFFER, N.W.; MARSDEN, M.; DIXON, J.; SPEAKE, B.K.; THACKER, F.E. Effect of dietary fat supplements on levels of n-3 polyunsaturated fatty acids, trans acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. **Animal Science**, East Lothian, v.69, p.613-625, 1999.

PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, A.D.; BARBANO, D.M. Feed and animal factors influencing milk fatty acid composition. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.76, p.1753-1771, 1993.

PALMQUIST, D.L.; GRIINARI, J.M. Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oils in the diet. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 1 set. 2006.

PARIZA, M.W.; ASHOOT, S.H.; CHU, F.S.; LUND, D.B. Effects of temperature and time on mutagen formation in pain fried hamburger. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.7, p.63-69, 1979.

PIPEROVA, L.S.; SAMPUGNA, J.; TETER, B.B.; KALSCHEUR, K.F.; YURAWECZ, M.P.; MOREHOUSE, K.M.; ERDMAN, R.A. Duodenal and milk tans 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**, Bethesda, v.132, p.1235-1241, 2002.

RAMASWAMY, N.; BAER, R.J.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R.; KASPERSON, K.M.; WHITLOCK, L.A. Composition and flavor of milk and butter from cows fed fish oil, extruded soybeans, or their combination. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.84, p.2144-2151, 2001.

RODRIGUES-RUIZ, J.; BELARBI, H.; SÁNCHEZ, J.L.G.; ALONSO, D.L.; Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. **Biotechnology Techniques**, Surrey, v.12, n.9, p.689-691, 1998.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. Version 8.2. 5th ed. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001. 846p.

SHINGFIELD, K.J.; REYNOLDS, C.K.; HERVÁS, 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. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.89, p.714-732, 2006.

SHINGFIELD, K.J.; AHVENJÄRVI, S.; TOIVONEN, V.; ÄRÖLÄ, A.; NURMELA, K.V.V.; HUHTANEN, P.; GRIINARI, J.M. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. **Animal Science**, East Lothian, v. 77, p. 165-179, 2003.

SHINGFIELD, K.J.; REYNOLDS, C.K.; LUPOLI, B.; TOIVONEN, V.; YURAWECES, M.P.; DELMONTE, P.; GRIINARI, J.M.; GRANDISON, A.S.; BEEVER, D.E. Effect of forage type and proportion of concentrate in the diet on milk fatty acid composition in cows given sunflower oil and fish oil. **Animal Science**, East Lothian, v. 80, p. 225-238, 2005.

SIDDONS, R.C.; PARADINE, J.; BEEVER, D.E.; CORNELL, P.R. Ytterbium acetate as a particulate-phase digesta-flow marker. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.54, p. 509-519, 1985.

SUTTON, J.D. Altering milk composition by feeding. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.72, p.2801-2814, 1989.

UDÉN, P.; COLUCCI, P.E.; Van SOEST, P.J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.31, p.625-632, 1980.

Van SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.74, p.3583-3597, 1991.

WHITLOCK, L.A.; SCHINGOETHE, D.J.; ABUGHAZALEH, A.A.; HIPPEN, A.R.; KALSCHEUR, K.F. Milk production and composition from cows fed small amounts of fish oil with extruded soybeans. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.89, p.3972-3980, 2006.

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. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.85, p.234-243, 2002.

3 CONSUMO, DIGESTIBILIDADE E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO OMASO EM VACAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM DIETA COM DOIS TEORES DE CONCENTRADO E COM ÓLEO DE SOJA OU DE PEIXE

Resumo

Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos do teor de concentrado em dietas suplementadas com óleo de soja ou de peixe sobre o consumo, as digestibilidades aparentes total e ruminal e sobre o perfil de ácidos graxos da digesta do omaso de vacas leiteiras. Foram utilizadas quatro vacas da raça Holandesa, com cânulas ruminais, 109 ± 10 dias em lactação, produção média de 31,24 ± 8,57 kg de leite e peso médio de 652 ± 37 kg, no início do experimento. Foi utilizado o delineamento experimental em Quadrado Latino 4x4, com períodos de 21 dias, sendo os 14 primeiros para adaptação e os sete últimos para colheita de amostras, em arranjo fatorial (2x2) dos tratamentos. Os tratamentos foram dietas totais misturadas, contendo silagem de milho, suplementadas com baixos (40%) ou altos (60%) teores de concentrado e com 2% de óleo de soja ou peixe na matéria seca (MS). Para avaliação da digestibilidade aparente total foi utilizado o FDNi como indicador. A digestibilidade ruminal e o perfil de ácidos graxos no omaso foram obtidos de amostras colhidas no canal do omaso e reconstituídas pela técnica de triplo marcador, baseada no fluxo de acetato de itérbio, lítio-cobalto EDTA e FDNi. Não houve efeito da interação entre a fonte de óleo e o teor de concentrado para nenhuma variável estudada, com exceção de C_{18:1 cis-12}. As vacas alimentadas com óleo de peixe apresentaram menores consumos e fluxos no omaso de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) em relação às alimentadas com dietas com óleo de soja. Houve efeito de concentrado para FDN e FDA, com as dietas com baixos teores apresentando os maiores consumos e fluxos no omaso. As dietas com óleo de peixe apresentaram maiores digestibilidades aparentes ruminal para MS, MO, FDN e FDA e total para MO e FDN. As vacas alimentadas com óleo de peixe apresentaram menores teores de C_{18:0}, C_{18:1 trans-16} e C_{18:1 cis-12} e maiores teores de C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0}, C_{16:1}, total de C_{18:1}, total de C_{18:1 trans}, C_{18:1 trans-5}, C_{18:1 trans-9}, C_{18:1 trans-11}, C_{18:1 trans-12}, C_{18:1 trans-13}, total de C_{18:1 cis}, C_{18:1 cis-9}, C_{18:1 cis-11}, C_{18:1 cis-13}, C_{20:5} e C_{22:6} no canal do omaso em relação às vacas alimentadas com óleo de soja. Não houve efeito de fonte de óleo e nem de teor de concentrado sobre o teor de CLA *cis-9*, *trans-11*, mas o CLA *trans-10*, *cis-12* foi maior para as dietas com óleo de soja. O óleo de peixe promoveu menor consumo e fluxo no canal do omaso, e maiores digestibilidades aparente total e ruminal da maioria das variáveis estudadas e alterou o perfil de ácidos graxos no canal do omaso, caracterizado por redução dos teores de C_{18:0} e aumentos de C_{18:1 trans-11}, C_{20:5} e C_{22:6}.

Palavras-chave: Ácido linoléico conjugado; Biohidrogenação; Coleta no omaso; Digestibilidade; Suplementação com óleo

INTAKE, DIGESTIBILITY AND OMASAL FATTY ACID PROFILE IN DAIRY COWS FED DIET WITH TWO LEVELS OF CONCENTRATE AND SOYBEAN OR FISH OIL

Abstract

The objective this work was to evaluate the effect of concentrate level and soybean or fish oil supplementation on dry matter intake, apparent ruminal and total tract digestibilities and fatty acid profile of the omasal digesta. Four Holstein cows, fitted with rumen cannula, averaging 109 ± 10 days in milk, producing 31.24 ± 8.57 kg milk per day and live weight 652 ± 37 kg, at start of the trial, were used in a 2 x 2 factorial arrangement of treatments applied to a 4 x 4 Latin square design. Period length was 21 days, which included 14 days of adjustment to the experimental diets followed by seven days of sampling. Treatments included total mixed ration containing maize silage supplemented with low (40%) or high (60%) concentrate level and 2% of soybean oil or fish oil on a dry matter (DM) basis. Indigestible NDF was used to determine total apparent digestibility. Ruminal apparent digestibility and omasal fatty acid profiles were measured in omasal digesta obtained using a sampling technique through the rumen cannula and reconstituted using a triple indigestible marker method based on Yb-acetate, Li-Co-EDTA, and iNDF. Interactions of level of concentrate and source of oil had no effect for any variable, exception for *cis*-12 C_{18:1}. Cows fed with fish oil had lower feed intakes and omasal digesta flow for DM, organic matter (OM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) when compared to cows fed soybean oil. There was an effect of concentrate level for NDF and ADF, with higher intake and omasal flows for the low concentrate diets. Fish oil had higher apparent ruminal digestibility for DM, OM, NDF and ADF and higher apparent total digestibility for OM and NDF. Cows fed fish oil showed lower C_{18:0}, *trans*-16 C_{18:1} and *cis*-12 C_{18:1} content and higher C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0}, C_{16:1}, total C_{18:1}, total *trans* C_{18:1}, *trans*-5 C_{18:1}, *trans*-9 C_{18:1}, *trans*-11 C_{18:1}, *trans*-12 C_{18:1}, *trans*-13 C_{18:1}, total *cis* C_{18:1}, *cis*-9 C_{18:1}, *cis*-11 C_{18:1}, *cis*-13 C_{18:1}, C_{20:5} and C_{22:6} contents in the omasal digesta in relation to cows fed soybean oil. There was no effect of oil source nor concentrate level for *cis*-9, *trans*-11 CLA content, but *trans*-10, *cis*-12 CLA concentration was higher for diets supplemented with soybean oil. Fish oil decreased intake and omasal flows, increased apparent ruminal and total tract digestibilities on almost all the variables and altered omasal fatty acid profiles, mainly by reducing C_{18:0} concentration in the omasal digesta and increasing *trans*-11 C_{18:1}, C_{20:5} and C_{22:6}.

Keywords: Biohydrogenation; Conjugated linoleic acid; Digestibility; Oil supplementation; Omasal sampling

3.1 Introdução

A ingestão de energia é a limitação primária para altas produções de leite em vacas leiteiras e é determinado pelo conteúdo energético da dieta e o consumo de matéria seca (ALLEN, 2000).

O aumento no teor energético das dietas pode ser obtido pela inclusão de lipídios, com a vantagem de reduzir os efeitos nocivos de altas quantidades de concentrados, ricos em amido, sobre o ambiente ruminal (DOREAU; CHILLIARD, 1997a). Porém o uso de suplementos de gorduras pode reduzir a digestibilidade dos outros ingredientes da dieta e diminuir a ingestão de alimentos, devido às modificações na digestão ruminal e hidrogenação de ácidos graxos no rúmen (DOREAU; CHILLIARD, 1997b).

Desde a descoberta do ácido linoléico conjugado (CLA) como um composto anticancerígeno (PARIZA et al., 1979) e dos efeitos benéficos à saúde humana com a ingestão de ácidos graxos específicos, como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (LOCK; BAUMAN, 2004), a suplementação da dieta de ruminantes com lipídios tem sido avaliada para modificar o teor e o perfil de gordura produzido por vacas leiteiras. Isto permitiria aumentar a concentração de ácidos graxos insaturados, principalmente de CLA.

Os efeitos que a suplementação com lipídios terá sobre a composição da gordura do leite são decorrentes de dois processos: a lipólise, que libera ácidos graxos livres, e a biohidrogenação, que forma ácidos graxos saturados (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1988).

A biohidrogenação não é um processo simples e ocorre em várias etapas, com formação de várias moléculas intermediárias, como o CLA *cis*-9, *trans*-11, que é o primeiro intermediário na biohidrogenação do ácido linoléico. Estes intermediários podem ser posteriormente reduzidos até ácido esteárico, como no caso de ácidos insaturados com 18 carbonos, mas alguns podem escapar do rúmen ainda insaturados, serem absorvidos e aparecerem na gordura do leite. Grummer (1991) estimou que aproximadamente 50% da gordura do leite é derivada dos lipídios do plasma e Palmquist e Mattos (1978) estimaram que 88% dos ácidos graxos do sangue eram de

origem dietética, contra 12% de origem endógena. Isto ilustra a importância de se conhecer os ácidos graxos que escapam do rúmen.

Outra fonte de CLA *cis*-9, *trans*-11 para a gordura do leite é a síntese endógena, que envolve a enzima Δ^9 -dessaturase e outro intermediário no processo de biohidrogenação, o C_{18:1} *trans*-11, como substrato (CORL et al., 1998; CORL et al., 2001; GRIINARI et al., 2000; MOSLEY et al., 2006). Portanto, o aumento da concentração de CLA no leite pode ser obtido por estratégias de alimentação que busquem aumento do próprio CLA no rúmen como também de seu precursor para síntese endógena, o ácido vaccênico (BAUMAN; LOCK, 2006).

Em dietas com alto teor de concentrado, entretanto, pode ocorrer um desvio da rota normal de biohidrogenação, com formação de CLA *trans*-10, *cis*-12 (KIM et al., 2002) como o primeiro intermediário, e C_{18:1} *trans*-10 na seqüência da biohidrogenação. A mudança no padrão de biohidrogenação ruminal no sentido da formação de *trans*-10 C_{18:1}, às custas de *trans*-11 C_{18:1}, diminui o substrato para a síntese endógena de CLA *cis*-9, *trans*-11 pela enzima Δ^9 -dessaturase e pode contribuir para uma menor secreção deste CLA na gordura do leite (SHINGFIELD et al., 2005). Além disso, o CLA *trans*-10, *cis*-12 é um potente inibidor da síntese de gordura pela glândula mamária (BAUMGARD et al., 2000).

Bauman e Lock (2006) apontaram quatro fatores que poderiam contribuir para o aumento do teor de CLA no leite: 1) aumento na ingestão de ácidos graxos poliinsaturados de 18C (ácido linoléico e linolênico); 2) manutenção do processo de biohidrogenação que resulta na produção de ácido vaccênico como intermediário; 3) inibição do último passo no processo de biohidrogenação para acúmulo do ácido vaccênico; 4) aumento na atividade da Δ^9 -dessaturase na glândula mamária. Estes autores também comentam que a inibição do último passo no processo de biohidrogenação pode ser realizada pela modificação do ambiente ruminal através da dieta, como alterações na proporção de forragem:concentrado, restrição alimentar e, principalmente, pelo uso de óleo de peixe na dieta.

Com base nisso, os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos do teor de concentrado em dietas com óleo de soja ou peixe sobre o consumo, digestibilidades aparentes total e ruminal e sobre o perfil de ácidos graxos no omaso de vacas leiteiras.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

O experimento foi realizado no Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba – SP, no período de julho a dezembro de 2005.

Foram utilizadas quatro vacas leiteiras da raça Holandesa, com cânulas ruminais, com 109 ± 10 dias em lactação, com produção média de $31,24 \pm 8,57$ kg de leite e com peso médio de 652 ± 37 kg, no início do experimento. Foi utilizado o delineamento experimental em Quadrado Latino 4x4, com quatro períodos de 21 dias, sendo os 14 primeiros para adaptação e os sete últimos para colheita de amostras. Os tratamentos consistiram de um arranjo fatorial 2x2, sendo duas doses de concentrado (40 e 60% da MS da dieta) e duas fontes de óleo (2% de óleo de soja ou peixe na MS da dieta).

A dieta teve como único volumoso a silagem de milho e o concentrado foi composto por milho, farelo de soja, núcleo mineral e vitamínico, além da inclusão de 2% de óleo de soja ou de peixe utilizados nos tratamentos. As dietas foram formuladas para atender ou exceder os requerimentos para vacas em lactação com produção de 30 kg de leite ao dia, segundo o NRC (2001), com exceção da proteína bruta, que foi inferior ao recomendado. A proporção dos ingredientes e a composição químico-bromatológica das dietas experimentais estão apresentadas na Tabela 9 e o perfil de ácidos graxos na Tabela 10. O concentrado e a silagem de milho foram misturados imediatamente antes de serem oferecidos às vacas.

Tabela 9 – Proporção dos ingredientes e composição químico-bromatológica das dietas experimentais

Ingredientes	Fonte de óleo ¹			
	Óleo de soja		Óleo de peixe	
	Teor de concentrado ²		Teor de concentrado	
	Alto	Baixo	Alto	Baixo
Proporção dos Ingredientes, %				
Silagem de milho	40,02	60,13	40,02	60,13
Milho moído	34,12	14,02	34,12	14,02
Farelo de soja	20,70	20,68	20,70	20,68
Óleo de Soja	2	2	-	-
Óleo de Peixe	-	-	2	2
Núcleo mineral ³	1,52	1,52	1,52	1,52
Calcáreo	1,00	1,00	1,00	1,00
Sal comum	0,38	0,38	0,38	0,38
Óxido de Magnésio	0,26	0,26	0,26	0,26
Vitamina A ⁴	0,000145	0,0001	0,00015	0,000135
Vitamina E ⁵	0,00135	0,001	0,0014	0,0013
Composição bromatológica, %				
PB	13,83	14,63	14,77	14,25
EE	4,66	4,35	4,79	4,43
FDN	27,73	32,01	27,91	32,73
FDA	16,10	19,20	16,20	19,31
CHO	75,50	73,76	73,73	74,36
CNF	47,78	41,75	45,82	41,63
Cinzas	6,01	7,26	6,71	6,96
EL _L (Mcal/kg MS) ⁶	1,82	1,71	1,82	1,71

¹2 % de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

²Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

³Composição por kg: P – 55 g; Ca – 220 g; Mg – 35 g; S – 22 g; Na – 70 g; Cl – 105 g; Mn – 1500 mg; Fe – 500 mg; Zn – 1550 mg; Cu – 450 mg; Co – 50 mg; I – 40 mg; Se – 20 mg; vitamina A 90.000 UI; vitamina D₃ 75.000 UI; vitamina E 1.000 UI.

⁴Composição por kg: 500.000.000 UI de vitamina A.

⁵Composição por kg: 500.000 UI de vitamina E.

⁶Calculado a partir do NRC (2001).

Tabela 10 – Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais e dos óleos de soja e peixe

Ácidos Graxos	Fonte de óleo ¹				Óleo	
	Óleo de soja		Óleo de peixe			
	Teor de concentrado ²		Teor de concentrado		Soja	Peixe
	Alto	Baixo	Alto	Baixo		
C _{12:0}	0,21	0,11	0,27	0,16	nd ³	0,08
C _{14:0}	1,99	1,21	5,13	5,15	0,11	5,55
C _{14:1}	0,00	0,00	0,02	0,02	nd	0,04
C _{15:0}	0,28	0,15	0,32	0,18	nd	nd
C _{16:0}	20,84	18,52	22,70	20,74	13,32	15,84
C _{16:1}	0,32	0,20	3,51	4,35	0,10	6,38
C _{17:0}	0,29	0,22	0,52	0,53	0,09	0,42
C _{17:1}	0,01	0,02	0,23	0,29	0,04	0,43
C _{18:0}	10,48	8,24	10,66	8,09	4,47	3,88
C _{18:1}	25,41	24,28	24,56	23,05	21,11	15,62
C _{18:2}	28,13	35,80	6,51	8,40	50,80	6,40
C _{18:3}	2,96	3,90	0,70	0,90	6,19	1,35
C _{20:1}	0,10	0,20	0,03	0,22	nd	nd
C _{20:4}	0,20	0,26	0,01	0,03	0,41	0,05
C _{22:2}	0,04	0,07	0,72	0,95	nd	1,29
C _{20:5}	1,09	0,59	6,08	6,91	nd	9,33
C _{22:6}	nd	nd	6,00	7,66	nd	11,30
outros	7,66	6,23	12,04	12,36	3,36	22,05

¹2 % de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

²Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

³nd - Não detectado.

As vacas foram mantidas presas por correntes em baias individuais, alimentadas duas vezes ao dia, às 8:00 e às 17:00h, e as sobras foram retiradas e pesadas na manhã do dia seguinte. O nível de oferta da dieta foi ajustado para manter 10% de sobras. Durante os períodos de colheitas, amostras de silagem de milho, concentrado e sobras de alimentos foram colhidas de cada vaca todos os dias e congeladas. Posteriormente estas amostras foram descongeladas e misturadas para compor uma amostra por período de colheita e por vaca. A silagem de milho foi reconstituída de forma a obter uma amostra por período.

O fluxo de nutrientes no trato digestivo foi determinado utilizando a técnica do triplo marcador, descrita por Ahvenjärvi et al. (2000). Os marcadores LiCoEDTA (12g/dia por vaca), produzido segundo Udén; Colucci e Van Soest (1980), e acetato de itérbio (4,3 g/dia por vaca) foram diluídos em seis litros de água destilada e infundidos continuamente dentro do rúmen, com auxílio de uma bomba peristáltica. A infusão

iniciou as 17:00h do dia 13 e foi interrompida as 8:00h do dia 20 de cada período, sendo os primeiros quatro dias para saturação do trato digestivo com os marcadores e os últimos três dias para colheitas de amostras. O terceiro marcador foi a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi). Esta técnica não requer a utilização de marcadores ideais e permite a reconstituição do fluxo omasal verdadeiro em amostras não representativas (FRANCE; SIDDONS, 1986).

Para determinar o fluxo de nutrientes, 400 mL de digesta omasal foi colhida com auxílio de uma sonda conduzida manualmente até a entrada do orifício retículo-omasal, e o conteúdo foi aspirado dentro de um Kitassato de 2 L por alternância de pressão e vácuo, promovida por uma bomba de vácuo, segundo Leão (2002). As amostras de digesta omasal foram colhidas de cada vaca em intervalos de nove horas, iniciando as 17:00h do dia 17; e continuando as 2:00h, 11:00h e 20:00h do dia 18; 5:00h, 14:00h e 23:00h do dia 19; e as 8:00h do dia 20 de cada período. Estas amostras foram congeladas imediatamente e mantidas à -20°C. Ao final do experimento, estas amostras foram descongeladas e misturadas para compor uma única amostra por vaca e por período. Esta amostra composta foi separada em três fases de acordo com a metodologia descrita por Ahvenjärvi et al. (2003). Inicialmente a digesta omasal foi filtrada em uma camada de pano de algodão e o material retido no pano foi considerado como sendo a fase sólida de partículas grandes (FSG). O material filtrado foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos, sendo o sobrenadante definido como a fase líquida (FL) e o sedimento como a fase sólida de partículas pequenas (FSP). O conteúdo das três fases foi pesado, novamente congelado e liofilizado. A FSG foi moída em moinho tipo Milley, em peneira de um milímetro de diâmetro, enquanto que a FSP foi triturada em triturador Knifetec 1095, da Foss Tecator. A amostra de omaso verdadeira foi reconstituída pela mistura das proporções de cada fase segundo o cálculo descrito por France e Siddons (1986).

Nos mesmos horários de colheitas de amostras de digesta de omaso, amostras de fezes foram colhidas de cada animal e em cada período. Estas amostras foram descongeladas, secas em estufa com ar forçado a 55°C até peso constante e depois moída em moinho tipo Milley com peneira de um mm. Posteriormente uma alíquota de cada colheita foi misturada para compor uma única amostra por vaca e por período.

A digestibilidade ruminal foi obtida pela divisão da diferença entre quantidade de cada nutriente ingerida e a que chegou ao canal do omaso, pela quantidade ingerida de cada nutriente. Para determinação da digestibilidade aparente total, a produção fecal foi estimada usando como marcador interno a FNDi. A digestibilidade aparente total de cada nutriente foi determinada pela divisão da diferença entre quantidade ingerida e a quantidade excretada nas fezes de cada nutriente, pela quantidade ingerida de cada nutriente.

Nas amostras de silagem de milho, concentrado, sobras e fezes foram determinados os teores de matéria seca (MS), cinzas e extrato etéreo (EE), de acordo com as metodologias AOAC (1990). O teor de cinzas e EE das três fases da digesta de omaso foram determinados da mesma forma como para os alimentos, porém o teor de MS foi obtido pela liofilização das amostras. O teor de nitrogênio de todas as amostras foi determinado no aparelho Leco FP – 528, sendo o teor de proteína bruta (PB) obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25. Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram obtidos pelos métodos descritos por Van Soest; Robertson e Lewis (1991), utilizando-se α -amilase e sulfito de sódio na determinação do FDN. Para as amostras de fezes, o EE foi determinado usando a técnica modificada e descrita por Sukhija e Palmquist (1988), onde se empregou uma mistura de 10% de ácido acético glacial e 90% de éter de petróleo como solventes.

Para a determinação do FDNi, as amostras dos alimentos ofertados, sobras, fezes e da FSG da digesta do omaso foram incubadas por 288 horas no rúmen de uma vaca segundo Huhtanen; Kaustell e Jaakkola (1994), com a diferença de que os sacos de nylon foram substituídos pelos sacos Ankom (Ankom® filter bag nº57). Após a incubação, os sacos foram lavados e analisados para o teor de FDN segundo o método de Van Soest; Robertson e Lewis (1991), utilizando-se o aparelho ANKON²⁰⁰ (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA). A determinação do FDNi na FSP foi realizada por incubação por 144 horas in vitro, segundo o método descrito por Cochran et al. (1986). Após a incubação, procedeu-se a determinação de FDN pelo método descrito por Van Soest; Robertson e Lewis (1991).

O cobalto e itérbio das FSG e FSP foram analisados pela técnica de fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF) no Laboratório de

Instrumentação Nuclear do Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA. Nas amostras de FL, estes marcadores foram determinados por Espectrometria de Absorção Atômica, no aparelho Perkin-Elmer 4100ZL (Perkin-Elmer, Überlingen, Alemanha), equipado com corretor de fundo por efeito Zeeman longitudinal e tubo de grafite com aquecimento transversal (THGA) do tipo *standard*. Para isso, 250 mg das amostras foram digeridas por via úmida com 6 mL de ácido nítrico 20% v/v e dois mL de H₂O₂ 30% v/v em um forno de microondas modelo ETHOS 1600 (Milestone, Sorisole, Itália) equipado com rotor modelo HPR com capacidade para 10 frascos de reação de Teflon (TFM[®]). O programa de aquecimento é apresentado na Tabela 11. Após o resfriamento dos frascos de digestão, a solução do material digerido foi transferida para balões volumétricos de 50 mL e a análise realizada segundo Lima et al. (1997) no Laboratório de Química Analítica do CENA.

Tabela 11 - Programa de aquecimento para decomposição de amostras com auxílio de microondas¹

Etapa	Temperatura (°C)	Potência (W)	Tempo (min)
1	160	1000	3
2	180	0	2
3	200	1000	5
4	200	1000	10

¹Controle de potência versus temperatura automático, utilizando-se um termopar inserido no frasco de digestão (TFM[®]) e máxima temperatura externa programada para até 90 °C.

Para determinação do perfil de ácidos graxos dos alimentos e sobras, os ácidos graxos metil esterificados foram obtidos pelo método descrito por Rodrigues-Ruiz et al. (1998). Em seguida, o perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa utilizando-se uma coluna capilar de 100 m de sílica fundida (CP-Sil 88), hidrogênio como gás de arraste (1,0 mL/min), detector de ionização de chama (FID), temperatura do injetor de 250°C e do detector de 300°C, e razão de injeção das amostras de 50:1. O protocolo de corrida iniciou com 70°C e foi mantido por quatro minutos, depois elevou 13°C/min até 175°C e foi mantido por mais 27 minutos, seguido por mais uma elevação de 4°C/min até 215°C e manutenção por mais nove minutos, e finalmente nova elevação de 7°C/min até 230°C e manutenção por mais cinco minutos.

Para a análise do perfil de ácidos graxos das amostras de omaso, os lipídios foram extraídos das amostras liofilizadas seguindo o protocolo descrito por Shingfield et al. (2003). Para isso, 100 mg de amostra foi misturada com 0,5 mL de água e 1 mL de padrão interno dissolvido em etanol (2 mg C_{19:0}/mL), e acidificada com HCl 2 molar até pH 2. A seguir, os lipídios foram extraídos duas vezes com 4 mL de solução de Radin (3 partes de hexano para 2 partes de isopropanol, v/v). Os extratos solúveis em hexano foram combinados, lavados com água Millipore e secos com sulfato de sódio. Após a evaporação do hexano com corrente de nitrogênio, a fração lipídica foi metilada com uma solução básica de metóxido de sódio, segundo Christie (1982), com as adaptações de Chouinard; Girard e Brisson (1998). O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa utilizando-se uma coluna capilar de 200 m de sílica fundida (Varian CP-2571), hidrogênio como gás de arraste (1,8mL/min), detector de ionização de chama (FID), temperatura do injetor e detector de 250°C e 300°C, respectivamente, e razão de injeção das amostras de 20:1. O protocolo de corrida para os ácidos graxos iniciou com 100°C e foi mantido por sete minutos, depois elevou 10°C/min até 165°C e foi mantido por mais cinco minutos, seguido por mais uma elevação de 0,5°C/min até 210°C e manutenção por mais 10 minutos, e finalmente nova elevação de 5°C/min até 240°C e manutenção por mais cinco minutos.

A identificação dos ácidos graxos se deu por comparação de seus tempos de retenção com os observados em padrões comerciais (C₄-C₂₂), como o 18919-1AMP – SUPELCO, metil éster da mistura de 37 ácidos graxos, e uma manteiga padrão (CRM 164 - Commission of the European Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium). Os ácidos graxos mais importantes foram identificados através de padrões comerciais puros: 05632 – SIGMA, metil-éster da mistura dos ácidos linoléicos conjugados *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12; V1381 – SIGMA, metil-éster do ácido vaccênico; D2659 – SIGMA, metil-éster do ácido docosahexaenóico *cis*-4, 7, 10, 13, 16, 19 (DHA); E2012 – SIGMA, metil-éster do ácido eicosapentaenóico *cis*-5, 8, 11, 14, 17 (EPA). A manteiga de referência padrão (CRM 164) também foi utilizada para determinar os fatores de recuperação de ácidos graxos de cadeia curta.

Os dados foram submetidos à análise de variância segundo o modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + O_j + OC_{ij} + V_k + P_l + e_{ijkl}$$

Onde: Y_{ijkl} é a variável dependente; μ é a média das observações; C_i é o i -ésimo efeito do teor de concentrado; O_j é o j -ésimo efeito do óleo; OC_{ij} é ij -ésimo efeito da interação; V_k é o k -ésimo efeito da vaca; P_l é o l -ésimo efeito do período e e_{ijkl} é o erro experimental associado a cada observação. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa SAS (2001), utilizando o comando Proc Mixed, sendo que o efeito de vaca foi considerado aleatório. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com o nível de significância de 5%.

3.2.2 Resultados e Discussão

3.2.2.1 Consumo, fluxo de nutrientes e digestibilidades aparentes total e ruminal

Os resultados de consumo e fluxo de nutrientes no omaso de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) podem ser visualizados na Tabela 12. As vacas que foram alimentadas com óleo de peixe consumiram menores quantidades e apresentaram menores fluxos de todos os nutrientes estudados em relação às vacas alimentadas com óleo de soja. As vacas alimentadas com baixo teor de concentrado também apresentaram menores consumos e fluxos de FDN e FDA em relação às vacas que consumiram dietas com altos teores de concentrado.

Tabela 12 – Consumo e fluxo omasal de nutrientes de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe

Nutrientes ²	Fonte de óleo ¹				EP	P>F ⁴		
	Óleo de soja		Óleo de peixe			O	C	O x C
	Teor de concentrado ³		Teor de concentrado					
	Alto	Baixo	Alto	Baixo				
----- Consumo, kg/d -----								
MS	19,280	18,262	12,823	15,496	1,2428	0,0048	0,5220	0,1718
MO	18,119	16,933	11,956	14,414	1,1601	0,0046	0,5969	0,1508
PB	2,680	2,682	1,913	2,218	0,2172	0,0196	0,4960	0,5035
FDN	5,342	5,828	3,551	5,061	0,3234	0,0033	0,0130	0,1476
FDA	3,112	3,486	2,062	2,981	0,1974	0,0034	0,0096	0,2005
----- Fluxo omasal, kg/d -----								
MS	12,718	13,706	7,913	10,233	0,9249	0,0015	0,1073	0,4897
MO	10,055	11,057	6,005	7,876	0,7584	0,0010	0,0908	0,5805
PB	3,184	3,394	1,907	2,341	0,2211	0,0005	0,1787	0,6253
FDN	3,232	4,019	1,810	2,729	0,2707	0,0007	0,0118	0,8135
FDA	1,859	2,374	1,068	1,596	0,1729	0,0014	0,0145	0,9740

¹2 % de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

²MS – matéria seca; MO – matéria orgânica; PB – proteína bruta; FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido.

³Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

⁴Efeitos: O – fonte de óleo; C – teor de concentrado e O x C – interação entre a fonte óleo e teor de concentrado.

A adição de óleo de peixe geralmente causa uma redução no consumo de matéria seca (CMS) (ABUGHAZALEH et al., 2002; CANT et al., 1997; DONOVAN et al., 2000; GAMA, 2004; OFFER; MARSDEN; PHIPPS, 2001; PALMQUIST; GRIINARI, 2006; WHITLOCK et al., 2002) ou às vezes nenhum efeito (OFFER et al., 1999; WHITLOCK et al., 2006). Offer et al. (1999) não observaram efeito da adição de 250g por dia (1,6% na MS) de óleo de peixe na dieta sobre o CMS. Whitlock et al. (2006) também não encontraram efeito do óleo de peixe sobre o CMS, mas o nível de inclusão máximo foi de 1% e misturado com soja extrusada para fornecer 2% de gordura na MS da dieta. Donovan et al. (2000) não observaram efeito no CMS entre a dieta controle, sem óleo, e a dieta com 1% de óleo de peixe, mas encontraram redução de 19 e 32,2% para as dietas com 2 e 3% de óleo de peixe. Doreau e Chilliard (1997b) observaram uma redução no CMS com suplementação de 400 mL por dia de óleo de peixe mas não

com suplementação de 200 mL por dia em relação a dieta basal. Estes resultados ilustram que o efeito na redução no CMS está ligado ao teor de óleo de peixe na dieta.

Allen (2000) afirma que os mecanismos pelo qual a suplementação de gordura na dieta afeta o CMS, embora não sejam claros, podem envolver o efeito da gordura sobre a fermentação ruminal, motilidade intestinal, aceitabilidade da dieta com suplemento, liberação de hormônios intestinais e oxidação de gordura no fígado. Drackley et al. (1992) infundiram três misturas de óleos no abomaso de vacas leiteiras, em proporções crescentes de lipídios insaturados e observaram que, quando o comprimento e grau de insaturação da fonte de lipídio aumentava, maior era a redução do CMS. Lóor et al. (2005a) infundiram 300 mL/dia de óleo de peixe no rúmen ou no duodeno de vacas em lactação e observaram que apenas as vacas que receberam a infusão no rúmen apresentaram redução no CMS. Os autores postularam que o efeito do óleo de peixe sobre o CMS se dá ao nível de rúmen. Resultado semelhante foi observado por Doreau e Chilliard (1997b) também com a infusão de 300 mL de óleo de peixe no rúmen ou duodeno. Como a digestibilidade da MS e MO foi aumentada e a diminuição da palatabilidade da dieta não era esperada com a infusão do óleo de peixe no rúmen, estes autores colocam que a redução no CMS com o óleo de peixe ocorreu por efeito metabólico. Entre as fontes de lipídios, as características que podem afetar o CMS são a aceitabilidade da fonte de gordura, comprimento da cadeia, grau de insaturação, biohidrogenação, esterificação e efeito hiperfágico (ALLEN, 2000). O CMS foi mais afetado pelo óleo de peixe devido a um ou mais dos fatores citados acima. O consumo dos outros nutrientes refletiu a composição da dieta e o CMS.

As digestibilidades ruminais de MS, MO, FDN e FDA foram menores para as dietas com óleo de soja e de MS, MO e FDN foram menores para as dietas com baixos teores de concentrado (Tabela 13). A digestibilidade ruminal de PB foi negativa para todos os tratamentos, devido à reciclagem de nitrogênio endógeno, e foi menor para as dietas com óleo de soja. Este resultado pode ter ocorrido porque o teor de PB das dietas experimentais foi baixo (14,56%), menor do que os 17,0 % recomendados pelo NRC (2001) para o nível de produção das vacas deste experimento.

A digestibilidade aparente total foi maior para as dietas com óleo de peixe para MO e FDN e tendeu a ser maior ($P=0,0569$) para MS. Não houve efeito de concentrado sobre a digestibilidade aparente total para nenhuma característica estudada.

A maior parte da digestão de MO, FDN e FDA ocorreu no rúmen (Tabela 13). A proporção da digestibilidade ruminal em relação a digestibilidade total de MO, FDN e FDA foi maior para as dietas com óleo de peixe, sendo que para FDN e FDA, o rúmen respondeu por 100% da digestão na dieta com óleo de peixe.

Shingfield et al. (2003) também observaram uma redução consumo de silagem e no fluxo de MS e MO no canal do omaso em decorrência da suplementação com 250 g de óleo de peixe por dia, mas o CMS total e as digestibilidades aparentes total e ruminal não foram diferentes da dieta controle, sem óleo.

O aumento na digestibilidade aparente total da MS, MO e FND também foi observada com a suplementação de 400 mL de óleo de peixe por dia (DOREAU; CHILLIARD, 1997b). Wonsil; Herbein e Watkins (1994) observaram um aumento numérico, mas não significativo, nas digestibilidades aparentes ruminal e total para MS, MO e FDA em dietas com 1,5% de óleo de peixe e 1,5% de ácido esteárico em relação às dietas suplementada com uma mistura de 1,5% de óleo de soja e 1,5% de óleo de soja parcialmente hidrogenado e controle, sem óleo.

A suplementação da dieta com lipídios, principalmente aqueles com maiores teores de ácidos graxos poliinsaturados, é esperada reduzir a digestibilidade da fibra e de matéria orgânica, tão bem como a proporção de acetato:propionato, indicando haver interferência destes no ambiente ruminal (DOREAU; CHILLIARD, 1997b). Os lipídios da dieta diminuem a digestibilidade da fibra por formar um filme que recobre a partícula de alimento, impedindo a adesão microbiana ou através de um efeito tóxico direto sobre as bactérias celulolíticas (JENKINS, 1993). Os resultados de trabalhos com dietas com óleo de peixe parecem caminhar em sentido oposto. Huhtanen e Kukkonen (1995) mostraram que a redução no CMS reduz a taxa de passagem e aumenta o tempo de retenção da digesta. Este efeito parece superar os efeitos adversos do óleo sobre a digestão da fibra, aumentando a digestão dos nutrientes em dietas com óleo de peixe.

Tabela 13 – Digestibilidades aparentes ruminal e total de nutrientes de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe

Nutrientes ²	Fonte de óleo ¹				EP	P>F ⁴		
	Óleo de soja		Óleo de peixe			O	C	O x C
	Teor de concentrado ³		Teor de concentrado					
	Alto	Baixo	Alto	Baixo				
	----- Digestibilidade ruminal, % -----							
MS	34,01	24,89	37,73	33,75	2,4877	0,0323	0,0272	0,3288
MO	44,59	34,81	49,32	45,29	1,8430	0,0026	0,0046	0,1530
PB	-19,27	-27,04	-1,62	-6,10	4,9935	0,0038	0,2509	0,7493
FDN	39,69	31,34	48,38	45,96	1,8632	0,0001	0,0178	0,1454
FDA	40,10	32,39	47,40	46,37	2,7793	0,0040	0,1503	0,2602
	----- Digestibilidade total, % -----							
MS	63,14	58,99	66,43	63,86	1,8715	0,0569	0,1062	0,6822
MO	65,11	61,21	68,23	66,10	1,7519	0,0482	0,1192	0,6269
PB	52,42	51,05	57,38	54,99	2,3739	0,0938	0,4491	0,8353
FDN	43,18	38,41	45,49	46,33	2,0215	0,0322	0,3566	0,1995
FDA	43,51	39,75	45,39	46,00	2,4526	0,1318	0,5386	0,3960
	----- Proporção da digestibilidade ruminal ⁵ , % -----							
MS	54,05	42,80	56,87	52,84	4,2313	0,1629	0,1046	0,4154
MO	68,64	57,35	72,35	68,49	3,0873	0,0396	0,0365	0,2590
FDN	93,02	82,62	106,67	99,29	5,9748	0,0319	0,1711	0,8064
FDA	93,44	81,77	104,41	101,06	7,5097	0,0748	0,3434	0,5928

¹2 % de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

²MS – matéria seca; MO – matéria orgânica; PB – proteína bruta; FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido.

³Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

⁴Efeitos: O – fonte de óleo; C – teor de concentrado e O x C – interação entre a fonte óleo e teor de concentrado.

⁵Proporção da digestibilidade ruminal em relação a digestibilidade total.

3.2.2.2 Perfil de ácidos graxos no canal do omaso

Não houve efeito do teor de concentrado e nem para a interação entre o teor de concentrado a fonte de óleo para as variáveis de perfil de ácidos graxos no canal do omaso. A fonte de óleo afetou significativamente a maioria dos ácidos graxos (Tabela 14).

O óleo de peixe apresentou maiores teores de C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0}, C_{16:1}, C_{20:5} e C_{22:6} no canal do omaso do que as dietas com óleo de soja (Tabela 14) e isso foi

provavelmente um reflexo do maior teor destes ácidos graxos no óleo de peixe, como pode ser observado na Tabela 10.

O teor de $C_{18:0}$ foi 331% maior para as dietas com óleo de soja (52,35 g/100g) em relação as dietas com óleo de peixe (15,81 g/100g). Loor et al. (2005b) verificaram que a percentagem de $C_{18:0}$ no duodeno foi 2,5 vezes menor para a dieta com óleo de peixe do que para a dieta com óleo de girassol (alto teor de ácido linoléico). Shingfield et al. (2003) também observaram que o fluxo de $C_{18:0}$ diminuiu de 283 g/d para 47 g/d quando a dieta basal foi suplementada com 250 g/d de óleo de peixe. A redução do $C_{18:1}$ para $C_{18:0}$ é considerada um passo limitante no processo de biohidrogenação (BAUMAN et al., 1999) e a inibição deste último passo é observada com altas doses de óleo vegetal rico em ácido linoléico (HARFOOT; NOBLE; MOORE, 1973). Porém, a análise do perfil de ácidos graxos na gordura do leite deste trabalho confirma que este efeito parece ser muito mais acentuado com a adição do óleo de peixe do que em dietas com lipídios de origem vegetal (RAMASWAMY et al., 2001; WHITLOCK et al., 2002). O efeito do óleo de peixe no aumento da concentração de $C_{18:1}$ *trans*-11 na gordura do leite, e na redução drástica dos níveis de ácido esteárico, tem sido a base para a teoria de que o óleo de peixe inibe o último passo no processo de biohidrogenação ruminal (ABUGHAZALEH et al., 2002; DONOVAN et al., 2000; LOOR et al., 2005b; WHITLOCK et al., 2002).

A biohidrogenação do óleo de soja foi extensa, principalmente do ácido linoléico, que apresentava um teor de 31,97 g/100g na dieta e caiu para 4,61 g/100g no canal do omaso. Embora as dietas com óleo de peixe apresentassem baixos teores de $C_{18:2}$ (7,46 g/100g), o teor deste ácido graxo no canal do omaso não foi diferente das dietas com óleo de soja. Loor et al. (2005b) também observaram resultados semelhantes onde o teor de $C_{18:2}$ no duodeno foi um pouco maior para a dieta suplementada com óleo de girassol (5,20 g/100g) em relação a dieta com óleo de peixe (4,02 g/100g), a despeito da grande diferença na concentração de $C_{18:2}$ entre as duas dietas. Shingfield et al. (2003) observaram um aumento nos fluxos de $C_{18:2}$ de 8,2 g/d para 31,6 g/d com a suplementação de 250 g/d de óleo de peixe, sendo que os $C_{18:2}$ *trans* não conjugados representaram a maior parte. Estes autores afirmam que do mesmo modo que o óleo de peixe inibe a redução de $C_{18:1}$ a $C_{18:0}$, ele também inibe a redução de $C_{18:2}$ *trans*

porque a mesma bactéria seria responsável pela redução dos dois ácidos graxos. Beam et al. (2003) também afirmam que a diminuição da isomerização de C_{18:2} pode se dar por inibição competitiva da linoleato isomerase pelos intermediários da biohidrogenação. Um maior acúmulo de intermediários da biohidrogenação é esperado nas dietas com óleo de peixe devido à saturação completa de ácidos graxos não ocorrer nesta situação.

Não houve diferença no teor de CLA *cis*-9, *trans*-11 entre as fontes de variações estudadas neste experimento, mas os valores encontrados são muito altos quando comparados com outros trabalhos. Piperova et al. (2002) encontraram fluxo de CLA *cis*-9, *trans*-11 para o duodeno bem mais baixos, sendo que o teor dobrou quando a dieta com baixo teor de forragem (25% da MS, 0,244 g/d) foi fornecida sem a adição de 1,5% de bicarbonato de sódio e 0,5% de óxido de magnésio (0,529 g/d). Shingfield et al. (2003) não encontraram diferença entre o fluxo de CLA *cis*-9, *trans*-11 entre a dieta controle (2858 mg/d) e a dieta suplementada com 250 g/d de óleo de peixe (2077 mg/d). Looor et al. (2005b) observaram que o CLA *cis*-9, *trans*-11 foi maior no canal do omaso nas dietas com óleo de girassol (0,22 g/100g) em relação as dietas com óleo de peixe (0,06 g/100g). O CLA *cis*-9, *trans*-11 é um intermediário na biohidrogenação do ácido linoléico (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1988) e era de se esperar que as dietas com óleo de soja apresentassem os maiores teores deste CLA. Isto não ocorreu porque esta molécula é apenas um intermediário transitório no processo de biohidrogenação.

Não houve efeito do teor de concentrado sobre o teor de CLA *trans*-10, *cis*-12. Este resultado foi inesperado porque a associação de alto concentrado e suprimento de ácido linoléico na dieta é uma condição clássica para a redução do teor de gordura do leite (GRIINARI et al. 1998) mediada pela formação de CLA *trans*-10, *cis*-12 (BAUMAN; GRIINARI, 2003). No primeiro capítulo desta tese, foi demonstrado que não houve efeito do concentrado sobre o teor e a secreção diária de gordura do leite, devido basicamente à redução no teor de gordura do leite ocorrer também nas vacas alimentadas com a dieta com baixo teor de concentrado e óleo de soja. Isto justifica o aparecimento de teores semelhantes de CLA *trans*-10, *cis*-12 nas dietas com baixo e alto teores de concentrado e óleo de soja e corrobora com a hipótese de que a relação

concentrado:volumoso não separou as dietas em relação ao padrão de biohidrogenação esperado.

O teor de CLA *trans*-10, *cis*-12 foi maior para as dietas com óleo de soja. Loor et al. (2005b) também encontraram maiores teores de CLA *trans*-10, *cis*-12 no duodeno de vacas alimentadas com óleo de girassol em relação as vacas alimentadas com óleo de peixe em dietas com 60% de concentrado. Estes resultados reforçam a hipótese de que há outra molécula formada no rúmen em dietas com óleo de peixe que inibe a síntese de gordura na glândula mamária. Isto é consistente com os dados deste trabalho, uma vez que a variação nos teores de CLA *trans*-10, *cis*-12 encontrados no omaso não justificam os menores teores de gordura no leite das vacas alimentadas com óleo de peixe, conforme discutido no primeiro capítulo desta tese.

O teor de C_{18:2} *trans*-11, *cis*-15 foi aumentado no canal do omaso em dietas com óleo de peixe. Este isômero de ácido linoléico não conjugado é um intermediário na biohidrogenação do ácido α -linoléico (C_{18:3} *n*-3; DESTAILLATS et al. 2005). Loor et al. (2005b) mostraram que o fluxo de C_{18:2} *trans*-11, *cis*-15 foi maior em dietas suplementadas com 5% de óleo de linhaça (47,4 g/100g), rico em C_{18:3} *n*-3, em relação à dieta suplementada com 5% de óleo de girassol (7,6 g/100g), sendo o teor na dieta com óleo de peixe intermediário (17,5 g/100g). Shingfield et al. (2003) observaram um aumento no fluxo de C_{18:2} *trans*-11, *cis*-15 no canal do omaso de 2811 mg/d para a dieta controle para 18758 mg/d com suplementação de 250 g/d de óleo de peixe na dieta. O óleo de peixe aumenta o fluxo intestinal de C_{18:2} *trans*-11, *cis*-15, apesar da ingestão de C_{18:3} *n*-3 ser similar em comparação as dietas com óleo de girassol (LOOR et al., 2005b) ou sem óleo (SHINGFIELD et al., 2003). No presente trabalho o consumo de C_{18:3} *n*-3 também foi menor para a dieta com óleo de peixe do que para a dieta com óleo de soja. Loor et al. (2005b) afirmam que estes resultados são decorrentes da inibição da biohidrogenação completa de C_{18:3} *n*-3 de outras fontes da dieta pelo EPA e DHA presentes no óleo de peixe.

Tabela 14 – Perfil de ácidos graxos da digesta do omaso (g/100g) de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe

(continua)

Ácidos Gaxos	Fonte de óleo ¹				EP	P>F		
	Óleo de soja		Óleo de peixe			Óleo	Concentrado	Interação
	Teor de concentrado ²		Teor de concentrado					
	Alto	Baixo	Alto	Baixo				
C _{10:0}	0,01	0,03	0,02	0,04	0,0106	0,2459	0,1661	0,7408
C _{12:0}	0,16	0,14	0,22	0,24	0,0125	0,0001	0,895	0,0903
C _{13:0} anteiso	0,04	0,03	0,05	0,06	0,0136	0,1081	0,8872	0,6153
C _{12:1}	0,99	1,34	1,04	1,45	0,2709	0,7705	0,1877	0,9164
C _{13:0}	0,06	0,18	0,05	0,07	0,0597	0,3913	0,2821	0,4118
C _{14:0} isso	0,06	0,08	0,08	0,06	0,0231	0,8946	0,9892	0,4059
C _{14:0}	0,52	0,57	1,31	1,61	0,1208	<0,0001	0,1891	0,3389
C _{15:0} isso	0,24	0,21	0,47	0,44	0,0447	0,0006	0,5654	0,9389
C _{15:0} anteiso	0,43	0,45	0,63	0,77	0,0302	<0,0001	0,0267	0,1169
C _{14:1}	0,14	0,13	0,27	0,19	0,0637	0,1538	0,4945	0,5592
C _{16:0}	14,86	14,67	18,93	20,57	0,4744	<0,0001	0,1606	0,0875
C _{17:0} isso	0,03	0,01	0,18	0,21	0,0188	<0,0001	0,6646	0,1864
C _{17:0} anteiso	0,15	0,14	0,38	0,40	0,0287	<0,0001	0,9722	0,5085
C _{16:1}	0,22	0,22	0,65	0,79	0,0839	0,0002	0,4571	0,4048
C _{17:0}	0,40	0,40	0,53	0,64	0,0233	<0,0001	0,0638	0,0542
C _{17:1}	0,02	0,00	0,12	0,15	0,0216	0,0003	0,6123	0,3384
C _{18:0}	53,42	51,28	17,72	13,90	3,5978	<0,0001	0,429	0,8207
C _{18:1}	18,94	20,03	38,05	40,09	2,5599	<0,0001	0,5568	0,8562
C _{18:2} <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15	0,16	0,22	0,75	1,00	0,1227	0,0003	0,2289	0,4626
C _{18:2} <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	4,67	4,55	3,99	3,38	0,5295	0,1158	0,5074	0,652
C _{18:3} <i>n</i> -3	0,40	0,34	0,30	0,34	0,0373	0,2237	0,8949	0,2371
CLA <i>trans</i> -7, <i>cis</i> -9	0,02	0,00	0,00	0,00	0,0097	0,3434	0,3434	0,3434
CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	1,01	1,24	1,15	0,99	0,1000	0,6209	0,7269	0,0867
CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0,10	0,07	0,01	0,04	0,0263	0,039	0,9741	0,2996
C _{20:1}	0,00	0,00	0,02	0,00	0,0085	0,2878	0,4393	0,4393
C _{22:0}	0,17	0,21	0,09	0,07	0,0219	0,0007	0,6604	0,2447
C _{22:1}	0,01	0,00	0,12	0,11	0,0209	0,0004	0,7578	0,9798
C _{20:3}	0,00	0,00	0,02	0,01	0,0055	0,0444	0,5229	0,5229
C _{20:4}	0,00	0,00	0,00	0,06	0,0306	0,3434	0,3434	0,3434
C _{22:2}	0,01	0,00	0,25	0,22	0,0478	0,001	0,7617	0,9019
C _{20:5}	0,00	0,00	0,15	0,14	0,0405	0,0058	0,8994	0,9776

Tabela 14 – Perfil de ácidos graxos da digesta do omaso (g/100g) de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe

(conclusão)

Ácidos Gaxos	Fonte de óleo ¹				EP	P>F		
	Óleo de soja		Óleo de peixe			Óleo	Concentrado	Interação
	Teor de concentrado ²		Teor de concentrado					
	Alto	Baixo	Alto	Baixo				
C _{24:1}	0,06	0,00	0,00	0,01	0,0041	0,3434	0,3434	0,3434
C _{22:5}	0,27	0,22	0,23	0,29	0,0227	0,1182	0,1237	0,2914
C _{22:6}	0,03	0,01	0,30	0,33	0,0742	0,0024	0,8801	0,8166
Total de AG (g/d)	0,636	0,843	0,449	0,497	0,0604	0,0002	0,9109	0,5113

¹2% de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

²Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

3.2.2.3 Perfil de ácidos graxos octadecenóicos no canal do omaso

Os dados de perfil de ácidos graxos octadecenóicos no canal do omaso podem ser visualizados na Tabela 15. O teor total de $C_{18:1}$ não foi muito diferente entre a dieta (24,85 g/100g) e o canal do omaso (24,85 g/100g) para a dieta com óleo de soja, mas o perfil de $C_{18:1}$ foi bastante alterado, com redução do ácido oléico e aumento de ácidos graxos de cadeia *trans*. O teor total de $C_{18:1}$ aumentou bastante entre a dieta (23,81 g/100g) e o canal do omaso (39,07 g/100g) na dieta com óleo de peixe, devido principalmente ao $C_{18:1}$ *trans*-11 (57,9% do total de $C_{18:1}$ *trans*) e $C_{18:1}$ *trans*-10 (24,1% do total de $C_{18:1}$ *trans*).

Houve efeito de interação entre a fonte de óleo e o teor de concentrado apenas para a variável $C_{18:1}$ *cis*-12, onde a dieta com óleo de peixe e baixo teor de concentrado (0,26 g/100g) foi significativamente menor do que as dietas com óleo de soja (0,64 e 0,95 g/100g para alto e baixo teor de concentrado, respectivamente) mas não foi diferente da dieta com óleo de peixe e alto teor de concentrado (0,32 g/100g), sendo que esta também não diferiu das dietas com óleo de soja. O efeito de teor de concentrado só foi significativo para o ácido graxo $C_{18:1}$ *cis*-13, com as dietas com baixos teores de concentrado apresentando os maiores valores. O efeito de óleo foi significativo para a maioria das variáveis, com o óleo de peixe apresentando os maiores teores de total de $C_{18:1}$ *trans*, $C_{18:1}$ *trans*-5, $C_{18:1}$ *trans*-9, $C_{18:1}$ *trans*-11, $C_{18:1}$ *trans*-13, total de $C_{18:1}$ *cis*, $C_{18:1}$ *cis*-9, $C_{18:1}$ *cis*-11 e $C_{18:1}$ *cis*-13, e menor teor de $C_{18:1}$ *trans*-16.

Loor et al. (2005b) não observaram diferença entre os teores de $C_{18:1}$ *trans* e $C_{18:1}$ *cis* no duodeno entre dietas suplementadas com 2,5% de óleo de peixe e 5% de óleo de girassol, com exceção de $C_{18:1}$ *trans*-4 e $C_{18:1}$ *trans*-5, onde os valores para a dieta com óleo girassol foram maiores, e $C_{18:1}$ *cis*-11, onde o valor para a dieta com óleo de peixe foi maior. Shingfield et al. (2003) observaram um aumento no fluxo de total de $C_{18:1}$, no canal do omaso com a adição de 250 g por dia de óleo de peixe (201 g/d) em relação à dieta basal, sem óleo (50 g/d), sendo que o aumento no fluxo total de $C_{18:1}$ *trans* contribuiu com 95% e o de $C_{18:1}$ *trans*-11 com 69% deste aumento.

O aumento no teor de ácidos graxos *trans* se dá porque, embora a biohidrogenação dos ácidos graxos do óleo de peixe seja extensa, ela é menor do que

a dos ácidos graxos de óleos vegetais. Na biohidrogenação do óleo de peixe, muitos intermediários são formados e a saturação total não é alcançada (CHILLIARD; FERLAY; DOREAU, 2001). Isto pôde ser observado neste trabalho pelo maior teor de ácido esteárico no canal do omaso nas dietas com óleo de soja.

Não houve efeito de óleo e nem de concentrado sobre o teor de $C_{18:1}$ *trans*-10 no canal do omaso. A ausência do efeito do teor de concentrado não era esperada em função do que foi demonstrado por Griinari et al. (1998) em dietas que causam depressão da gordura do leite. Shingfield et al. (2005) mostraram que o aumento no teor de concentrado da dieta alterava o padrão de $C_{18:1}$ *trans* na gordura do leite, com o $C_{18:1}$ *trans*-10 sobrepondo o $C_{18:1}$ *trans*-11 como o principal isômero monoenoico *trans* em dietas com 3% de uma mistura de óleo de peixe e girassol. Estes autores também mostraram uma relação positiva entre o consumo de amido na dieta e o teor de $C_{18:1}$ *trans*-10 na gordura do leite. Estes resultados refletiram as mudanças ocorridas na biohidrogenação ruminal. Loor et al. (2005b) observaram que o teor de $C_{18:1}$ *trans*-10 (12,6 g/100g) foi igual ao teor de $C_{18:1}$ *trans*-11 (12,7 g/100g) no duodeno de vacas alimentadas com dietas com óleo de peixe e 65% de concentrado, resultado igual à dieta com óleo de girassol.

Dietas com alto teor de concentrado promovem o crescimento de *Megasphaera elsdenii* YJ-4 que pode converter $C_{18:2}$ *n*-6 em CLA *trans*-10, *cis*-12 (KIM et al., 2002), que é um precursor para formação de $C_{18:1}$ *trans*-10 no rúmen (BAUMAN; GRIINARI, 2003). Kemp; White e Lander (1975) estabeleceram que cepas de *Ruminococcus albus*, capazes de crescer com amido como único substrato, hidrogenaram extensivamente $C_{18:2}$ *n*-6 e $C_{18:3}$ *n*-3 a $C_{18:1}$ *trans* (95% dos produtos finais), com mais de 70% sendo $C_{18:1}$ *trans*-10.

Outra forma de síntese de $C_{18:1}$ *trans*-10 é pela isomerização do $C_{18:1}$ *cis*-9 (MOSLEY et al., 2002). Mas ainda não se estudou se a formação de isômeros *trans*-10 pode ser aumentada a partir do ácido oléico por alterações da dieta, como teor e tipo de concentrado ou fonte de óleo.

Loor et al. (2005b) compararam o teor de $C_{18:1}$ *trans*-10 no duodeno de vacas recebendo dietas com alto teor de concentrado e suplementadas com 2,5% de óleo de peixe, 5% de óleo de linhaça ou 5% de óleo de girassol. O teor de $C_{18:1}$ *trans*-10 foi igual

entre as dietas com óleo de peixe (12,6 g/100g) e girassol (11,8 g/100g) mas estes foram maiores do que o teor na dieta com óleo de linhaça (3,08 g/100g). Porém o teor de C_{18:2} *n*-6 na dieta foi quase 4 vezes maior para a dieta com óleo de girassol e o teor de C_{18:1} *cis*-9 na dieta foi quase o dobro na dieta com óleo de linhaça em relação aos teores no óleo de peixe. Estes resultados levaram os autores a sugerir que o teor de C_{18:1} *trans*-10 no duodeno de vacas alimentadas com óleo de peixe não está associado com a ingestão de ácido oléico ou linoléico e que a sua origem pode ser devido à parte do C_{18:1} *trans*-11 acumulado ser convertido à C_{18:1} *trans*-10. Isso ilustra que o aparecimento de C_{18:1} *trans*-10 em dietas com óleo de peixe pode ser resultado de uma combinação de fatores, tal como a isomerização de C_{18:1} *trans*-11 e outros C_{18:1} *trans*, incompleta biohidrogenação de C_{18:2} *n*-6 e isomerização do ácido oléico da dieta.

Tabela 15 – Perfil de ácidos graxos octadecenóicos da digesta do omaso (g/100g) de vacas alimentadas com dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou peixe

Ácidos Gaxos	Fonte de óleo ¹				EP	P>F		
	Óleo de soja		Óleo de peixe			Óleo	Concentrado	Interação
	Teor de concentrado ²		Teor de concentrado					
	Alto	Baixo	Alto	Baixo				
C _{18:1} <i>trans</i> -4	0,12	0,13	0,13	0,11	0,0167	0,7594	0,7484	0,3385
C _{18:1} <i>trans</i> -5	0,08	0,09	0,14	0,11	0,0170	0,0454	0,5506	0,391
C _{18:1} <i>trans</i> -6-8	0,95	1,00	1,27	1,11	0,2001	0,3041	0,7876	0,6003
C _{18:1} <i>trans</i> -9	0,64	0,67	1,14	1,11	0,0860	0,0004	0,9849	0,7054
C _{18:1} <i>trans</i> -10	2,78	1,95	8,00	7,33	2,5650	0,0689	0,7764	0,9764
C _{18:1} <i>trans</i> -11	6,16	7,27	17,59	19,25	2,9902	0,0035	0,6543	0,928
C _{18:1} <i>trans</i> -12	1,03	1,15	1,27	1,46	0,0840	0,0098	0,0992	0,6688
C _{18:1} <i>trans</i> -13	1,04	1,09	1,43	1,73	0,1779	0,019	0,3509	0,4968
C _{18:1} <i>trans</i> -16	0,70	0,75	0,21	0,23	0,0629	<0,0001	0,5278	0,7858
Total C _{18:1} <i>trans</i>	13,50	14,11	31,18	32,44	2,3519	<0,0001	0,7012	0,8926
C _{18:1} <i>cis</i> -9	4,15	4,38	4,86	5,60	0,3931	0,0361	0,2489	0,5391
C _{18:1} <i>cis</i> -11	0,51	0,43	1,50	1,59	0,1378	<0,0001	0,9801	0,5425
C _{18:1} <i>cis</i> -12	0,64	0,95	0,32	0,26	0,0723	<0,0001	0,1235	0,0292
C _{18:1} <i>cis</i> -13	0,04	0,05	0,08	0,09	0,0066	0,0002	0,045	0,9073
C _{18:1} <i>cis</i> -15	0,11	0,11	0,10	0,11	0,0406	0,941	0,9183	0,9924
Total C _{18:1} <i>cis</i>	5,44	5,92	6,87	7,65	0,4924	0,0108	0,2324	0,7667

¹2% de óleo de peixe ou 2% de óleo de soja na MS da dieta.

²Alto – 60% de concentrado; Baixo – 40% de concentrado.

3.2.2.4 Biohidrogenação ruminal de ácidos graxos

A biohidrogenação de ácidos graxos no rúmen foi avaliada em função do desaparecimento de $C_{18:1}$ *cis*-9, $C_{18:2}$ *n*-6, $C_{18:3}$ *n*-3, EPA e DHA entre a dieta e o canal do omaso. A biohidrogenação de $C_{18:1}$ *cis*-9 foi afetada apenas pelo nível de concentrado na dieta, sendo maior para a dieta com alto teor de concentrado (81,79%) em relação a dieta com baixo teor (74,70%). A fonte de óleo afetou significativamente a biohidrogenação de $C_{18:2}$ *n*-6 e $C_{18:3}$ *n*-3, sendo que o óleo de peixe apresentou os menores percentuais (61,55 e 66,57%, para $C_{18:2}$ *n*-6 e $C_{18:3}$ *n*-3, respectivamente) em relação ao óleo de soja (84,66 e 88,41%, para $C_{18:2}$ *n*-6 e $C_{18:3}$ *n*-3, respectivamente). A biohidrogenação de EPA foi de 98,30% e de DHA foi de 96,55% para as dietas com óleo de peixe.

Shingfield et al. (2003) não observaram efeito da suplementação de 250 g por dia de óleo de peixe sobre a biohidrogenação de $C_{18:1}$ *cis*-9, $C_{18:2}$ *n*-6 e $C_{18:3}$ *n*-3 em relação a dieta controle, com médias de 84, 96 e 99%, respectivamente. A biohidrogenação de EPA e DHA foi de 98%, semelhante ao resultado encontrado neste trabalho.

Loor et al. (2005b) encontraram menor biohidrogenação de $C_{18:1}$ *cis*-9 (64 x 0,80%) e $C_{18:2}$ *n*-6 (75 x 92%) com o fornecimento de 2,5% de óleo de peixe na dieta em relação ao fornecimento 5% de óleo de girassol em dietas com altos teores (65%) de concentrado. Estes autores sugerem que este resultado é decorrente da biohidrogenação ruminal ser sensível a mudanças na população microbiana induzidas por ácidos graxos específicos, como EPA, DPA e DHA, que podem ser tóxicos para as bactérias ruminais. Em um outro trabalho do mesmo grupo de pesquisa (UEDA et al., 2003b apud LOOR et al., 2005b) o maior número de protozoários encontrados nas dietas com óleo de peixe pode ser responsável pela redução na biohidrogenação de ácidos graxos poliinsaturados. A biohidrogenação de EPA e DHA foi de 92 e 89%, respectivamente. Aqueles autores atribuem os menores valores de biohidrogenação de EPA e DHA em comparação ao trabalho de Shingfield et al. (2003) à diferença no teor de concentrado das dietas.

3.3 Conclusões

Não houve efeito da interação entre o teor de concentrado e a fonte de óleo para todas as variáveis estudadas, com exceção de C_{18:1 cis-12}. As digestibilidades de MS, MO, FDN e FDA foram menores quando o teor de concentrado foi baixo. Isto foi consistente com o menor consumo observado.

A fonte de óleo teve efeito significativo para a maioria das variáveis estudadas. O óleo de peixe reduziu o consumo e o fluxo no omaso de MS e das demais variáveis avaliadas. O óleo de peixe também aumentou a digestibilidade aparente ruminal de MS, MO, PB, FDN e FDA e a digestibilidade aparente total de MO e FDN.

Em relação ao perfil de ácidos graxos da digesta no omaso, as dietas com óleo de peixe tiveram menores teores de ácido esteárico, maiores teores de ácidos graxos monoenóicos *trans*, principalmente de C_{18:1 trans-11}, maiores teores de C_{20:5} e C_{22:6}, e menores teores de CLA *trans-10*, *cis-12* em relação às dietas com óleo de soja. Não houve efeito de concentrado sobre os teores de CLA *trans-10*, *cis-12* e C_{18:1 trans-10} e nem efeito da fonte de óleo sobre o teor de CLA *cis-9*, *trans-11* na digesta do omaso.

Referências

ABUGHAZALEH, A.A.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R.; KALSCHEUR, K.F.; WHITLOCK, L.A. Fatty acid profiles of milk and rumen digesta from cows fed fish oil, extruded soybeans or their blend. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.85, p.2266-2276, 2002.

AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P.; VARVIKKO, T. Determination of reticulo-rumen and whole-stomach digestion in lactating cows by omasal canal or duodenal sampling. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 83, p. 67-77, 2000.

AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; SHINGFIELD, K.J.; HUHTANEN, P. Determination of digesta flow entering the omasal canal of dairy cows using different marker systems. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 90, p. 41-52, 2003.

ALLEN, M.S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.83, p. 1598-1624, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington: AOAC, 1990. v.1, 1117p.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Reviews of Nutrition**, Palo Alto, v.23, p.203-227, 2003.

BAUMAN, D.E.; LOCK, A.L. Conjugated linoleic acid: biosynthesis and nutritional significance. In: FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced Dairy Chemistry**. New York: Springer, 2006, p.93-136.

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**, Albany, v.77, p.1-15,1999.

BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; SAEBO, A.; BAUMAN, D.E.. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v.278, p.R179-R184, 2000.

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**, Lancaster, v.83, p. 2564-2573, 2000.

CANT; J.P.; FREDEEN, A.H.; MacINTYRE, T.; GUNN, J.; CROWE, N. Effect of fish oil and monensin on milk composition in dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.77, p. 125-131, 1997.

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

CHOUINARD, P.Y.; GIRARD, V.; BRISSON, G.J. Fatty acids profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturation. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.81, p. 471-481, 1998.

CHRISTIE, W.W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and colesteryl esters. **Journal of Lipid Research**, New York, v.23, p.1072-1075, 1982.

COCHRAN, R.C.; ADAMS, D.C.; WALLACE, J.D.; GALYEAN, M.L. Predicting digestibility of different diets with internal markers: evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, Albany, v.63, p.1476-1483, 1986.

CORL, B.A.; BAUMGARD, L.H.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; PHILLIPS, B.S.; BAUMAN, D.E. The role of Δ^9 -desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 12, p. 622-630, 2001.

CORL, B.A.; CHOUINARD, P.Y.; BAUMAN, D.E.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; NURMELA, K.V. Conjugated linoleic acid in milk fat of dairy cows originates in part by endogenous synthesis from *trans*-11 octadecenoic acid. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.81, n.1, p.233, 1998. Abstract.

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

DONOVAN, D.C.; SCHINGOETHE, D.J.; BAER, R.J.; RYALI, J.; HIPPEN, A.R.; FRANKLIN, S.T. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.83, p. 2620-2628, 2000.

DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.78, p. S15-S35, 1997a.

DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. **Reproduction, nutrition, development**, Paris, v.37, p. 113-124, 1997b.

DRACKLEY, J.K.; KLUSMEYER, T.H.; TRUSK, A.M.; CLARK, J.H. Infusion of long-chain fatty acids varying in saturation and chain length into the abomasum of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.75, p. 1517-1526, 1992.

FRANCE, J.; SIDDON, R.C. Determination of digest flow by continuous marker infusion. **Journal of Theoretical Biology** . London, v. 121, p. 105-119, 1986.

GAMA, M.A.S. **Desempenho, composição do leite e mecanismos envolvidos na depressão da gordura do leite (DGL) de vacas recebendo ácidos linoléicos conjugados (CLA) e óleo de peixe na dieta.** 2004. 120 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagem) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

GRIINARI, J.M.; DWYER, D.A.; McGUIRE, M.A.; BAUMAN, D.E.; PALMQUIST, D.L.; NURMELA, K.V.V. *Trans*-octadecenoic acid and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.81, p.1251-1261, 1998.

GRIINARI, J.M.; CORL, B.A.; LACY, S.H.; CHOUINARD, P.Y.; NURMELA, K.V.; BAUMAN, D.E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta-9 desaturase. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.130, p.2285-2291, 2000.

GRUMMER, R.R. Effect of feed on the composition of milk fat. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.74, p.3244-3257, 1991.

HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P.N. **The rumen microbial ecosystem**. London: Elsevier Applied Science, 1988. chap. 9, p.285-322.

HARFOOT, C.G.; NOBLE, R.C.; MOORE, J.H. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen micro-organisms in vitro. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.24, p.961-970, 1973.

HUHTANEN, P.; KUKKONEN, U. Comparison of methods, markers, sampling sites and models for estimating digesta passage kinetics in cattle fed at two levels of intake. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.52, p.141-158, 1995.

HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.48, p.211-227, 1994.

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

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. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.90, p.100-114, 1975.

KIM, Y.J.; LIU, R.H.; RYCHLIK, J.L.; RUSSEL, J.B. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.92, p.976-982, 2002.

LEÃO, M.I. **Metodologias de coletas de digesta omasal e abomasal em novilhos submetidos a três níveis de ingestão: consumo, digestibilidade e produção microbiana**. 2002. 57p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

LIMA, E.C.; KRUG, F.J.; NÓBREGA, J.A.; FERNANDES, E.A.N. Determination of ytterbium in digesta and animal faeces by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v.12, p.475-478, 1997.

LOCK, A.L.; BAUMAN, D.E. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. **Lipids**, Chicago, v. 39, n. 12, p. 1197-1206, 2004.

LOOR, J.J; DOREAU, M.; CHARDIGNY, J.M.; OLLIER, A.; SEBEDIO, J.L.; CHILLIARD, Y.; Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of *trans*-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 119, p. 227-246, 2005a.

LOOR, J.J; UEDA, K.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y.; DOREAU, M. Intestinal flow and digestibility of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 119, p. 203-225, 2005b.

MOSLEY, E.E.; POWELL, G.L.; RILEY, M.B.; JENKINS, T.C. Microbial biohydrogenation of oleic acid to *trans* isomers in vitro. **Journal of Lipid Research**, New York, v.43, p.290-296, 2002.

MOSLEY, E.E.; SHAFFI, B.; MOATE, P.J.; McGUIRE, M.A. *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 136, p. 570-575, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academic Press, 2001. 381p.

OFFER, N.W.; MARSDEN, M.; DIXON, J.; SPEAKE, B.K.; THACKER, F.E. Effect of dietary fat supplements on levels of n-3 polyunsaturated fatty acids, *trans* acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. **Animal Science**, East Lothian, v.69, p.613-625, 1999.

OFFER, N.W.; MARSDEN, M.; PHIPPS, R.H. Effect of oil supplementation of a diet containing a high concentration of starch on levels of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. **Animal Science**, East Lothian, v.73, p.533-540, 2001.

PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W. Turnover of lipoproteins and transfer to milk fat of dietary (1-carbon-14) linoleic acid in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.61, p.561-565, 1978.

PALMQUIST, D.L.; GRIINARI, J.M. Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oils in the diet. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 1 set. 2006.

PARIZA, M.W.; ASHOOT, S.H.; CHU, F.S.; LUND, D.B. Effects of temperature and time on mutagen formation in pain fried hamburger. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.7, p.63-69, 1979.

PIPEROVA, L.S.; SAMPUGNA, J.; TETER, B.B.; KALSCHEUR, K.F.; YURAWECZ, M.P.; MOREHOUSE, K.M.; ERDMAN, R.A. Duodenal and milk tans 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**, Bethesda, v.132, p.1235-1241, 2002.

RAMASWAMY, N.; BAER, R.J.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R.; KASPERSON, K.M.; WHITLOCK, L.A. Composition and flavor of milk and butter from cows fed fish oil, extruded soybeans, or their combination. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.84, p.2144-2151, 2001.

RODRIGUES-RUIZ, J.; BELARBI, H.; SÁNCHEZ, J.L.G.; ALONSO, D.L.; Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. **Biotechnology Techniques**, Surrey, v.12, n.9, p.689-691, 1998.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's guide**. Version 8.2. 5th ed. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001. 846p.

SHINGFIELD, K.J.; AHVENJÄRVI, S.; TOIVONEN, V.; ÄRÖLÄ, A.; NURMELA, K.V.V.; HUHTANEN, P.; GRIINARI, J.M. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. **Animal Science**, East Lothian, v. 77, p. 165-179, 2003.

SHINGFIELD, K.J.; REYNOLDS, C.K.; LUPOLI, B.; TOIVONEN, V.; YURAWECES, M.P.; DELMONTE, P.; GRIINARI, J.M.; GRANDISON, A.S.; BEEVER, D.E. Effect of forage type and proportion of concentrate in the diet on milk fatty acid composition in cows given sunflower oil and fish oil. **Animal Science**, East Lothian, v. 80, p. 225-238, 2005.

SUKHIJA, P.S.; PALMQUIST, D.L. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v.36, p.1202-1206, 1988.

UDÉN, P.; COLUCCI, P.E.; Van SOEST, P.J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.31, p.625-632, 1980.

Van SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.74, p.3583-3597, 1991.

WHITLOCK, L.A.; SCHINGOETHE, D.J.; ABUGHAZALEH, A.A.; HIPPEN, A.R.; KALSCHEUR, K.F. Milk production and composition from cows fed small amounts of fish oil with extruded soybeans. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.89, p.3972-3980, 2006.

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. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.85, p.234-243, 2002.

WONSIL, B.J.; HERBEIN, J.H.; WATKINS, B.A. Dietary and ruminally derived *trans*-18:1 fatty acids alter bovine milk lipids. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.124, p.556-565, 1994.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)