

Universidade de São Paulo
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

JULIANA JORGE PASCHOAL

Efeito da dieta contendo alta inclusão de soja extrusada e fonte orgânica de selênio sobre a composição, teor de CLA, perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas

JULIANA JORGE PASCHOAL

Efeito da dieta contendo alta inclusão de soja extrusada e fonte orgânica de selênio sobre a composição, teor de CLA, perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Marcus Antonio Zanetti

FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

P279e

Paschoal, Juliana Jorge

Efeito da dieta contendo alta inclusão de soja extrusada e fonte orgânica de selênio sobre a composição, teor de CLA, perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas / Juliana Jorge Paschoal – Pirassununga, 2007.

74 f.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.

Departamento de Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Antonio Zanetti.

Unitermos: 1. Ácidos graxos poliinsaturados 2. Gordura do leite 3. Índice de peróxido 4. Suplementação com selênio 5. TBARS 6. Vacas leiteiras. I. Título.

*Aos meus amores Arnaldo, Bruna e Vitor
Por participarem das minhas conquistas, dos meus sonhos, da minha vida.*

*Aos meus pais Mario e Regina,
por serem, simplesmente, os melhores pais do mundo.*

*Ao Prof. Dr. Marcus Antonio Zanetti,
a minha since*

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo – *Campus* de Pirassununga pela oportunidade na realização deste trabalho.

À FAPESP pelo suporte financeiro dado a esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcus Antonio Zanetti pela orientação.

Aos professores Marcelo de Cerqueira César e Mariza Pires de Melo pela colaboração na execução deste trabalho de pesquisa.

Aos especialistas em laboratório: Rose, Raphael, Ana Mônica (ZAZ), Mirella, Andrea (ZAB) e, especialmente à Silvana Puggine e José Aparecido Cunha, pela amizade e significativa ajuda nas análises laboratoriais.

Aos funcionários do setor leiteiro com especial agradecimento ao Valmir, pelo esforço e dedicação.

Ao Zequinha pelo esforço e responsabilidade na condução do experimento.

Aos funcionários: Rosilda, Regina, Érica, Estelinha, Gláucia, Ciça e Conceição pela dedicação.

Aos amigos da FZEA, pelos bons momentos, com agradecimentos especiais à Angélica, Gustavo, Helena, José Henrique, Márcia Coelho, Poliana, Saulo e Soraia que, direta ou indiretamente, participaram desta realização.

Aos funcionários da biblioteca da FZEA pela colaboração.

RESUMO

PASCHOAL, J.J. 2007. **Efeito da dieta contendo alta inclusão de soja extrusada e fonte orgânica de selênio sobre a composição, teor de CLA, perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas.** 2007. 79p. Tese de Doutorado - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

A formulação de dietas para ruminantes pode alterar o perfil de ácidos do leite, potencializando o valor nutritivo e nutracêutico do mesmo. Estas alterações podem, no entanto, aumentar a susceptibilidade do leite à oxidação, perdendo qualidade em sabor e tempo de prateleira. O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o efeito do fornecimento de dieta com alto teor de soja integral extrusada, associada ou não à suplementação com selênio orgânico, sobre a produção, a composição, a concentração de CLA, o perfil de ácidos graxos e a estabilidade oxidativa do leite. Vinte e quatro vacas holandesas foram agrupadas em três blocos, de acordo com o número de lactações e alimentadas com dieta total contendo 56% de volumoso e 44% de concentrado. Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos: A) dieta controle, B) dieta contendo 21% de soja extrusada e C) dieta contendo 21% de soja extrusada + 5 mg de selênio orgânico. As dietas foram balanceadas para obtenção dos mesmos níveis de energia e proteína. O fornecimento de soja extrusada não afetou o consumo de matéria seca, o peso vivo dos animais e a produção de leite. As vacas alimentadas com soja extrusada produziram leite com menor ($P<0,01$) porcentagem de gordura, menor ($P<0,01$) concentração de ácidos graxos de cadeias curta e média e maior ($P<0,01$) concentração de ácidos graxos de cadeia longa, quando comparadas às vacas alimentadas com a dieta controle. Com relação ao teor de saturação, produziram leite com menor ($P<0,01$) concentração de ácidos graxos saturados e maior ($P<0,01$) concentração de ácidos graxos poliinsaturados e de ácido linoléico conjugado (CLA). A concentração de colesterol total foi maior ($P<0,01$) no soro sanguíneo das vacas alimentadas com soja extrusada, quando comparado ao controle. A suplementação com selênio aumentou ($P<0,05$) significativamente a concentração do mineral no leite e retardou a oxidação do mesmo, avaliada pelo índice de peróxido ($P<0,01$). O fornecimento da dieta contendo 21% de soja alterou o perfil de ácidos graxos do leite, diminuindo a concentração de ácidos graxos saturados e aumentando a concentração de ácidos graxos poliinsaturados e ácido linoléico conjugado, no entanto, produziu um leite mais susceptível à oxidação. O enriquecimento do leite com selênio conseguiu minimizar este efeito influenciando positivamente a estabilidade do leite.

Palavras-chave: ácidos graxos poliinsaturados, gordura do leite, índice de peróxido, suplementação com selênio, TBARS, vacas leiteiras

ABSTRACT

PASCHOAL, J.J. **Effect of extruded soybean diet and organic selenium on milk composition, CLA content, fatty acid profiles and oxidative stability of milk.** 2007. 79p. Tese de Doutorado - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2007.

The manipulation of ruminant diet can modify the fatty acid profiles increasing its nutritive and therapeutic value. However, this change in fatty acid composition can increase milk oxidation and can affect its flavor and shelf life. The objective of this study was to evaluate the effect of extruded soybean diet and organic selenium supplementation on milk composition, CLA content, fatty acid profiles and oxidative stability of milk. Twenty four Holstein cows were grouped into three blocks according to number of parturition and were fed diets containing 56% forage and 44% concentrate. The animals were allocated to three treatments: A) control diet, B) 21% extruded soybean diet and C) 21% extruded soybean diet + 5 mg of organic selenium. The diets were formulated to provide the same energy and protein levels. The extruded soybean did not affect the dry matter intake, body weight and milk production. The cows fed extruded soybean diet produced milk with lower ($P<0,01$) concentration of fat, lower ($P<0,01$) concentration of short and medium chain fatty acids and higher ($P<0,01$) concentration of long chain fatty acids when compared to control group. Regarding to saturation level, those animals produced milk with lower ($P<0,01$) concentration of saturated fatty acids and higher ($P<0,01$) concentration of polyunsaturated fatty acids and CLA content. The serum concentration of cholesterol was higher ($P<0,01$) for treatments containing extruded soybean when compared to control. The organic selenium supplementation increased ($P<0,05$) milk selenium concentration and delayed milk oxidation measured by peroxide value ($P<0,01$). The inclusion of 21% of extruded soybean in dairy cattle diet resulted in production of milk fat with modified fatty acid profile with lower concentration of saturated fatty acids and higher concentration of polyunsaturated fatty acids and CLA content. However the milk fat was more susceptible to oxidation. The organic selenium supplementation was efficient to overcome this problem and therefore could maintain the stability of milk.

Key words: dairy cattle, milk fat, peroxide value, polyunsaturated fatty acids, selenium supplementation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Suplementação com selênio.....	41
Figura 2. Colheita de sangue.....	44
Figura 3. Produção de leite de acordo com as dietas experimentais.....	52
Figura 4. Porcentagem de gordura no leite de acordo com as dietas experimentais.....	53
Figura 5. Teores de uréia no leite (mg/dl) de acordo com as dietas experimentais.....	55
Figura 6. pH do leite de acordo com as dietas experimentais.....	55
Figura 7. Concentração de colesterol no leite (mg/100ml) de acordo com as dietas experimentais.....	57
Figura 8. Concentração sérica de selênio ($\mu\text{g/ml}$) de acordo com as dietas experimentais nas semanas 0 (antes do início da suplementação), três e seis, após o início da suplementação.....	63
Figura 9. Concentração de selênio no leite ($\mu\text{g/ml}$) de acordo com as dietas experimentais nas semanas 0 (antes do início da suplementação), três e seis, após o início da suplementação.....	64
Figura 10. Índice de peróxido analisado nos tempos 7, 32 e 102 horas após a colheita do leite de vacas recebendo as dietas experimentais.....	65
Figura 11. TBARS (Abs_{532}) analisado nos tempos 0, 24 e 96 horas após a colheita do leite de vacas recebendo as dietas experimentais.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do leite de vacas Holandesa, Zebu e suas respectivas cruzas nos trópicos.....	15
Tabela 2. Ingredientes e composição química das dietas experimentais (valores expressos em porcentagem da matéria-seca).....	41
Tabela 3. Produção e composição do leite de acordo com as dietas experimentais.....	51
Tabela 4. Concentração sérica de colesterol total (COL), triglicérides (TGA) e glicose (GLI) de acordo com as dietas experimentais.....	56
Tabela 5. Perfil de ácidos graxos do leite (g/100g) de vacas recebendo as dietas experimentais	59
Tabela 6. Concentração de selênio (g/ml), no soro sanguíneo e no leite, de acordo com as dietas experimentais.....	62
Tabela 7. Índice de peróxido (meq O ₂ /Kg de óleo) e valores de TBARS (absorbância 532 nm) no leite de vacas alimentadas com as dietas experimentais.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCL - Ácido graxo de cadeia longa

AGPI - Ácido graxo poliinsaturado

CCS - Contagem de células somáticas

CLA - Ácido linoléico conjugado

EE - Extrato Etéreo

FB - Fibra Bruta

FDN - Fibra em Detergente Neutro

MM - Matéria Mineral

MS - Matéria Seca

MST - Matéria Seca Total

PB - Proteína Bruta

PV - Peso Vivo

SOF - “Spontaneous oxidized flavor”

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Propriedades e composição do leite.....	14
2.2 A gordura do leite – aspectos gerais	18
2.3 Nutrição e composição da gordura do leite.....	20
2.3.1 Soja Extrusada.....	22
2.4 Ácido Linoléico Conjugado (CLA).....	24
2.4.1 CLA e depressão da gordura do leite.....	27
2.5 Outros fatores relevantes sobre a composição da gordura do leite.....	29
2.6 Oxidação do leite.....	30
2.7 Dieta e estabilidade oxidativa do leite.....	32
2.8 Antioxidantes e estabilidade oxidativa do leite.....	34
2.9 Fontes de selênio.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Local.....	39
3.2 Animais, instalações e manejo de ordenha.....	39

3.3 Delineamento experimental e tratamentos.....	39
3.4 Dietas experimentais.....	40
3.4.1 Análises bromatológicas.....	42
3.5 Amostras de sangue.....	43
3.6 Produção e composição do leite.....	44
3.7 Colesterol e perfil de ácidos graxos do leite.....	45
3.8 Taxa de oxidação do leite.....	47
3.9 Análise estatística.....	49
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 Desempenho, produção e composição do leite.....	51
4.2 Parâmetros sanguíneos.....	56
4.3 Concentração de colesterol no leite.....	57
4.4 Perfil de ácidos graxos do leite.....	58
4.5 Concentração de selênio no soro e no leite.....	61
4.6 Estabilidade oxidativa do leite.....	64
5 CONCLUSÕES	68
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

O valor nutricional do leite foi reconhecido há várias décadas e uma busca constante por qualidade vem sendo observada, relativa aos teores de gordura e proteína, às propriedades organolépticas, à contagem de células somáticas e à presença de agentes contaminantes no leite.

A porcentagem de gordura e o perfil de ácidos graxos passaram a assumir importante papel na cadeia leiteira, sob influência das exigências estabelecidas pelo mercado consumidor. A tendência atual tem sido de demanda crescente por alimentos saudáveis, com baixos teores de gordura saturada, sem o comprometimento das características organolépticas e tempo de prateleira.

Resultados recentes têm mostrado que o fornecimento de dietas contendo alta inclusão de soja extrusada pode alterar a concentração e a composição da gordura do leite. A fonte de gordura fornecida e a sua “proteção” contra a hidrólise e a biohidrogenação ruminal aumentam a absorção intestinal de ácidos graxos poliinsaturados e sua incorporação ao leite. A biohidrogenação incompleta pode, ainda, aumentar a concentração de ácido linoléico conjugado (CLA), considerado um importante agente anticarcinogênico.

Estas alterações vantajosas podem, por outro lado, aumentar a susceptibilidade do leite à oxidação, perdendo qualidade em sabor e tempo de prateleira. Antioxidantes naturais, como o selênio e a vitamina E, podem desempenhar importante papel na conservação do leite

abaixo dos níveis recomendados na maioria das regiões. O enriquecimento de alimentos com selênio aumentaria a ingestão diária e uma estratégia eficaz seria fornecer selênio orgânico aos animais de consumo humano, para aumentar o teor deste oligoelemento essencial na carne, leite e ovos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da dieta contendo alto teor de soja extrusada e selênio orgânico sobre a composição, a produção, o perfil de ácidos graxos, a concentração de CLA, a concentração de selênio e a estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Propriedades e composição do leite

O leite é uma combinação de várias substâncias na água podendo ser classificado como uma emulsão (de glóbulos de gordura dispersos na fase aquosa) ou uma suspensão (de micelas de caseína, proteínas globulares e partículas lipoprotéicas). Além disso, a fase líquida é uma solução de lactose, proteínas hidrossolúveis, minerais e outros compostos (FONSECA SANTOS, 2000). Sua densidade situa-se entre 1,028 e 1,032 g/ml e seu ponto crioscópico (temperatura de congelamento) variam de -0,525 a -0,535°C.

A acidez do leite pode ser medida por dois parâmetros: pH ou titulação com solução de hidróxido de sódio (Dornic). Assim, o leite apresenta uma faixa de variação de pH entre 6,5 e 6,7 e um valor de Dornic de 16-18. A acidez tem por objetivo detectar aumento na concentração de ácido láctico, uma vez que esse ácido é formado pela fermentação da lactose por bactérias mesófilas e, conseqüentemente, pode servir como indicativo da qualidade microbiológica da matéria prima. No entanto, não é somente a presença de ácido láctico que determina a acidez outros componentes do leite podem interferir neste parâmetro como a concentração dos citratos, dos fosfatos e das proteínas. Portanto, o leite fresco pode apresentar variações significativas independentes da presença de ácido láctico. O leite de vacas com maior teor de proteína pode apresentar-se mais ácido (FONSECA SANTOS, 2000).

No geral, o leite é composto por 87% de água e 13% de sólidos, dos quais 4,00% correspondem à gordura, 3,25% à proteína e 4,60% à lactose o restante inclui

os minerais, as vitaminas, os ácidos e as enzimas. A gordura, a lactose, a proteína, o nitrogênio uréico e os sólidos totais do leite são componentes rotineiramente analisados, mas apenas a porcentagem de gordura e a concentração de uréia apresentam variações significativas. Existe uma variação na composição do leite de vacas de raças diferentes, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição do leite de vacas Holandesa, Zebu e suas respectivas cruzas nos trópicos

	Holandesa	1/2Hol -1/2 Zebu	Zebu
Proteína (%)	3,00	3,52	3,83
Gordura (%)	3,32	4,00	4,39
Lactose (%)	4,56	4,80	4,85
ESD ¹ (%)	8,26	9,02	9,43
EST ¹ (%)	11,58	13,02	13,82
Cálcio (mg/100ml)	108,70	125,20	136,00
Fósforo (mg/100ml)	82,60	92,40	103,00

¹ESD: extrato seco desengordurado ²EST: extrato seco total

Fonte: Adaptado de PONCE * (1996 apud FONSECA SANTOS, 2000)

As proteínas do leite são sintetizadas nas células alveolares a partir de aminoácidos do sangue, exceto a albumina e imunoglobulinas, as quais são transportadas pelo sangue até entrarem no lúmen alveolar (FONSECA SANTOS, 2000). A

composição de aminoácidos absorvidos no trato digestivo e pela utilização de aminoácidos pelos tecidos corporais. O potencial de alteração do teor de proteína do leite por meio da nutrição é modesto, em torno de 0,1 a 0,2 unidades percentuais (HINDERS, 1997). Situação onde o teor de proteína é baixo pode estar relacionada à produção insuficiente de proteína microbiana e/ou aminoácidos

Entretanto, a elevação do teor de proteína na dieta, especialmente proteína de rápida degradabilidade ruminal, pode elevar os níveis de nitrogênio não protéico do leite, o que pode ser aferido pela quantificação da uréia (BLOCK, 2000).

Normalmente, a concentração de uréia no leite é 5%, podendo chegar a 11% em situações em que haja menor aproveitamento do nitrogênio da dieta (FONSECA SANTOS, 2000). A uréia do leite está altamente relacionada à uréia sanguínea, que, por sua vez, reflete o excesso de proteína ou a insuficiência de carboidratos fermentescíveis no rúmen (BLOCK, 2000).

A lactose, cuja média é 4,75%, é um dissacarídeo composto por glicose e galactose. Sua secreção dentro do lúmen alveolar causa a entrada de água, exercendo importante papel no controle do volume de leite (FONSECA SANTOS, 2000). O teor de lactose varia pouco por estar sujeita à regulação endócrina e, principalmente, por ser o principal agente osmótico envolvido na secreção do leite (KHORASANI et al., 1991 KENNELLY et al., 1999 ABUGHAZALEH et al., 2002).

A contagem de células somáticas (CCS) é o termo utilizado para designar todas as células presentes no leite, que incluem as células de origem do sangue (leucócitos) e células de descamação do epitélio secretor (NATZKE, 1981). O fator que tem mais efeito sobre a CCS é o nível de infecção da glândula mamária, porém, outros fatores indiretos têm sido estudados: idade da vaca, estágio de lactação, estação do ano, estresse térmico, entre outros (FONSECA SANTOS, 2000). A CCS pode influenciar alguns parâmetros envolvidos na composição do leite. Em animais com mastite, ocorre aumento na concentração de proteína de origem sanguínea, com concomitante redução na concentração de caseína, resultando em mínimas alterações no teor de proteína total (AULDIST et al., 1998).

Com relação às alterações na gordura do leite, alguns estudos relataram menor concentração de gordura no leite de vacas com mastite (AULDIST et al., 1995) e segundo Duncan et al. (1991) pode ocorrer ação enzimática de lipases de origem leucocitária, aumentando a concentração de ácidos graxos livres. Diversos autores relataram diminuição na concentração de lactose no leite de vacas com alta CCS, possivelmente, pela passagem de lactose do leite para o sangue (AULDIST et al., 1995).

2.2 A gordura do leite – aspectos gerais

O leite é composto por mais de 100.000 tipos diferentes de moléculas e cada uma delas apresenta uma função específica. O leite bovino contém de 3,0 a 5,0 % de lipídios totais na forma de emulsão de glóbulos de gordura, podendo variar de acordo com fatores nutricionais e não nutricionais, como estágio de lactação, raça, ambiente e sanidade (JENSEN et al., 1991).

A gordura do leite é composta em quase sua totalidade por triacilgliceróis (98% da gordura total), os quais são encontrados no glóbulo. Os fosfolipídios (0,5 a 1,0 %) e esteróis (0,2 a 5%) se encontram, basicamente, na membrana do glóbulo de gordura do leite. A grande maioria dos esteróis é representada pelo colesterol (FONSECA SANTOS, 2000).

Os ácidos graxos que compõem os triacilgliceróis podem ser sintetizados na glândula mamária, a partir da síntese “de novo” que ocorre nas células epiteliais ou podem ser originados do sangue (CLEGG et al., 2001).

As células epiteliais da glândula mamária de vacas lactantes são bastante ativas na biossíntese de triacilgliceróis a partir do acetato e B-hidroxiacetato e as enzimas-chave desta rota metabólica são: acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintetase. Esta síntese “de novo” resulta, em sua grande maioria, em ácidos graxos saturados de cadeia curta e média (C4:0 – C16:0). Este processo ocorre na superfície externa do retículo endoplasmático liso, ocorrendo, então, a formação de micro gotículas de gordura. A fusão de várias gotículas leva à formação de gotículas maiores que são recobertas por uma bicamada de membrana plasmática e são secretadas por meio de sua fusão com a membrana apical da célula epitelial (CLEGG et al. 2001).

Os triacilgliceróis presentes na corrente sanguínea são hidrolisados pela lipase nos capilares do endotélio e uma parte dos ácidos graxos hidrolisados é utilizada pela glândula mamária. Os ácidos graxos não esterificados também são incorporados ao leite, porém, em menor quantidade. É provável que sua entrada nas células epiteliais seja dependente da atividade de proteínas ligantes ou translocadores (CLEGG et al. 2001).

O leite bovino é composto por 70% de ácidos graxos saturados, 25% de ácidos graxos monoinsaturados e 5% de ácidos graxos poliinsaturados. Quanto ao tamanho da cadeia carbônica pode-se dizer que cerca de 30% dos ácidos graxos são de cadeia longa (C18) e o restante corresponde a ácidos graxos de cadeias curta e média (GRUMMER, 1991).

2.3 Nutrição e composição da gordura do leite

A composição da gordura do leite pode ser influenciada por uma série de fatores nutricionais que interagem entre si: quantidade e qualidade da fibra fornecida, proporção volumoso:concentrado, sítio de digestão e taxa de degradabilidade do amido, composição dos ácidos graxos da dieta e “proteção” contra fermentação ruminal de suplementos de gordura (JENKINS, 1993 KENELLY GLIM, 1998).

De acordo com Valadares Filho e Pina (2006) os lipídeos podem alterar a fermentação ruminal dependendo da quantidade e da fonte utilizada. A principal explicação é a ação dos lipídeos sobre a população de bactérias Gram-positivas. Neste caso, a fermentação dos carboidratos estruturais é reduzida, assim como, os substratos necessários para a síntese “de novo” de lipídeos pela glândula mamária, diminuindo a concentração de gordura no leite.

A biohidrogenação ruminal influencia o fornecimento de ácidos graxos insaturados para a deposição no tecido adiposo ou incorporação pela glândula mamária, pois a maior parte dos ácidos graxos poliinsaturados são biohidrogenados. Em média, 80% do ácido graxo linoléico e 92% do ácido graxo linolênico são saturados (FELLNER et al., 1995).

A extensão da biohidrogenação depende, dentre outros fatores, da natureza da dieta. Dietas contendo 70% de concentrado reduzem a taxa de biohidrogenação dos ácidos graxos linoléico e linolênico para 50 e 65%, respectivamente. A queda do pH normalmente associada à este tipo de dieta reduz a hidrólise, passo essencial para que ocorra a biohidrogenação (CHOUINARD et al., 1999).

O fornecimento de ácidos graxos protegidos pelo processo de saponificação (complexados com Ca) ou fornecimento de dietas contendo alta concentração de ácidos graxos inibe a biohidrogenação e aumenta a passagem de ácidos graxos poliinsaturados pelo rúmen (BEAM et al., 2000). No entanto, existe uma grande variabilidade no grau de proteção ruminal e no perfil de ácidos graxos das diversas formas de suplementos de gordura, influenciando a composição e o perfil de ácidos graxos do leite.

De acordo com Murphy et al. (1990), a alimentação de vacas leiteiras com óleo de canola e girassol diminuiu em 20-40% a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (C4:0 e C16:0) e aumentou em 55-80% a proporção de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) na gordura do leite.

Ashes et al. (1992) trabalharam com vacas leiteiras suplementadas com canola protegida (750g/dia), contendo 5% de C16:0, 3% de C18:0, 51% de C18:1 (ácido oléico), 29% de C18:2 (ácido linoléico) e 11% de C18:3 (ácido linolênico) e observaram diminuição na proporção de C12:0, C14:0 e C16:0 e aumento na proporção de C18:1, C18:2 e C18:3 na composição da gordura do leite. Não foi observada nenhuma alteração no teor de proteína e na produção de leite. Da mesma maneira, Schingoethe et al. (1996) encontraram maior concentração de AGCL e ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) no leite de vacas alimentadas com soja extrusada ou semente de girassol.

Al-Mabruk et al. (2004) observaram que silagem de trevo vermelho leva a uma mudança significativa no perfil de ácidos graxos do leite, com aumento expressivo na concentração de AGPI.

2.3.1 Soja Extrusada

A soja extrusada vem sendo amplamente utilizada como fonte de AGPI na alimentação de vacas leiteiras, alcançando resultados bastante satisfatórios.

Baer et al. (1996) observaram que o fornecimento de dieta contendo soja extrusada para vacas em lactação aumentou a concentração de AGCL e diminuiu a concentração de ácidos graxos de cadeias média e curta do leite, ocorrendo também redução expressiva na porcentagem de gordura. Da mesma maneira, Dhiman et al. (1999) constataram aumento na concentração de AGCL no leite de vacas alimentadas com dieta contendo 12% de soja extrusada. O consumo de MS e a produção de leite não foram afetados pelo tratamento, porém, foi observada diminuição na concentração de gordura e proteína do leite.

De acordo com Ramaswamy et al. (2001), a dieta contendo soja extrusada aumentou a concentração de AGPI no leite, creme de leite, queijo e manteiga, quando comparada à dieta controle. Não foi observado efeito dos tratamentos sobre a porcentagem de gordura do leite.

Solomon et al (2000) avaliaram o efeito da utilização de soja extrusada como fonte de AGPI sobre a composição da gordura do leite, e constataram aumento significativo na concentração de AGCL e diminuição na concentração de ácidos graxos de cadeia curta, com ausência de efeito sobre a porcentagem de gordura do leite.

Em trabalho recente, Kristensen et al. (2004) constataram que o leite de vacas alimentadas com dieta pobre em gordura continha menos ácidos graxos insaturados, quando comparado ao leite de vacas alimentadas com alta quantidade de soja

extrusada. Não foi observado efeito sobre a porcentagem de proteína e gordura do leite.

Schmidely et al. (2005) observaram que a dieta contendo soja extrusada aumentou a proporção dos ácidos graxos oléico, linoléico e linolênico em contraposição aos ácidos graxos saturados no leite de cabras.

Em experimento comparando o efeito da gordura complexada com sais de cálcio e fornecimento de soja extrusada, Kim et al. (1993) observaram que o leite de vacas suplementadas com soja extrusada apresentou maior teor de AGPI quando comparado à dieta controle e à dieta contendo gordura protegida. Do mesmo modo, Schauff et al. (1992) observaram aumento dos ácidos graxos C18:1 e C18:2 no leite de vacas alimentadas com dieta contendo 16% de soja extrusada.

Experimentos “in vitro” foram realizados com objetivo de identificar fatores atuantes sobre a taxa de hidrólise e biohidrogenação ruminal. Beam et al. (2000) avaliaram a influência da quantidade e da qualidade da gordura adicionada ao substrato e à composição da dieta. Os autores concluíram que dietas ricas em ácido linoléico (óleo de soja) diminuíram a taxa de biohidrogenação, aumentando a passagem de ácidos graxos insaturados pelo rúmen. A taxa de hidrólise variou consideravelmente sob influência da quantidade e da composição da gordura dietética.

2.4 Ácido Linoléico Conjugado (CLA)

O ácido linoléico conjugado não é, na verdade, uma molécula única, mas um conjunto de isômeros do ácido linoléico (MEDEIROS, 2002). Há 56 possíveis isômeros do CLA (YURAWECZ et al., 2001).

O CLA é formado no rúmen pela biohidrogenação incompleta do ácido linoléico da dieta (C18:2 cis-9, cis-12). A maior parte, porém, é produzida endogenamente na glândula mamária através da dessaturaN o

endógena de CLA que ocorre na glândula mamária, a partir do ácido vacênico presente na manteiga.

Corl et al. (2003) observaram que o fornecimento de ácido vacênico via dieta resultou em acúmulo tecidual de CLA e decréscimo na formação de tumores na glândula mamária. Lock et al. (2004) concluíram que a ação anticarcinogênica do ácido vacênico está relacionada à sua conversão em CLA cis-9 trans-11, via ação da enzima delta-9-dessaturase e quando esta conversão é bloqueada, a resposta biológica ao ácido vacênico é atenuada.

A concentração média de CLA encontrada no leite varia de 0,30 a 0,55 g/100g de gordura. O consumo de CLA por humanos é menor do que o recomendado para redução da incidência de tumores em modelos animais (IP et al., 1994) e pode ser aumentado através da ingestão de leite e carne com maior concentração deste ácido graxo. O aumento de CLA e de ácido graxo vacênico no leite tem o potencial de aumentar o valor nutritivo e nutracêutico do mesmo. Há diferentes estratégias para aumento da concentração de CLA no leite, incluindo o uso de fontes de óleos poliinsaturados (óleos vegetais) e suplementação com CLA (CORL et al., 2000).

Jiang et al. (1996) encontraram variação de 2,5 a 17,7 mg de CLA/g de gordura de leite, quando influenciada pela dieta de vacas leiteiras. Kelly et al. (1998) compararam o efeito da adição de óleo de amendoim (rico em ácido oléico), óleo de girassol (rico em ácido linoléico) e óleo de linhaça (rico em ácido linolênico) em dietas formuladas para vacas leiteiras e avaliaram a concentração de CLA no leite. Não foi encontrada diferença entre os tratamentos com relação à produção de leite e ao teor de gordura, porém, a concentração de CLA e de ácido vacênico foi maior no leite das vacas suplementadas com óleo de girassol.

Dhiman et al. (1999) determinaram a concentração de CLA no leite de vacas alimentadas com diferentes dietas, em quatro experimentos. No primeiro experimento, as vacas foram alimentadas com silagem de milho e óleo de milho em dois níveis (normal e alto). As concentrações de CLA encontradas nos leites foram 3,8 e 3,9 mg/g de gordura. No segundo experimento, as vacas consumiram 1/3, 2/3 ou 3/3 do total de matéria seca na forma de pastagem. Feno de alfafa e concentrado foram utilizados para balanceamento das dietas. As concentrações de CLA encontradas nos leites foram 8,9, 14,3 e 22,1 mg/g de gordura, respectivamente. No terceiro experimento, vacas foram submetidas a quatro tratamentos: Controle (55% de silagem de alfafa e 45% de concentrado) Controle com adição de farinha de peixe Controle com adição de monensina Controle com adição de monensina + farinha de peixe. As concentrações de CLA nos leites foram de 5,3, 8,6, 6,8 e 8,9 mg/g de gordura. No quarto experimento os animais foram distribuídos em quatro tratamentos: Feno de alfafa finamente moído + concentrado (50:50) Feno de alfafa grosseiramente moído + concentrado (50:50) Feno de alfafa + concentrado (66,6:33,4) e 98,2% de feno de alfafa. As concentrações de CLA nos leites foram 7,3, 8,3, 9,0 e 7,9 mg/g de gordura, respectivamente. Os autores concluíram que a suplementação com 1% de gordura, na forma de óleo de milho, não influenciou os níveis de CLA no leite. Animais criados à pasto apresentaram concentração de CLA no leite 500% superior aos animais alimentados com dieta convencional (50% concentrado e 50% volumoso). O fornecimento de volumoso conservado na forma de feno não afetou os teores de CLA do leite.

Dhiman et al. (1999a) também estudaram o efeito de dietas contendo caroço de algodão e soja extrusada sobre a concentração de CLA no leite e observaram aumento de 77% e 109%, respectivamente, quando comparadas à dieta controle.

Abughazaleh et al. (2002 e 2002a) trabalhando com animais fistulados, encontraram aumento significativo nos níveis de CLA e ácido graxo vacênico no leite de vacas alimentadas com gordura proveniente de soja extrusada. Em experimento mais recente, Abughazaleh et al. (2004) constataram que uma dieta contendo 0,5 % de óleo de peixe associada a 2% de óleo de soja (proveniente de soja extrusada) aumentou a concentração de CLA e ácido graxo vacênico em 2,5 vezes, quando comparada à dieta controle

Whitlock et al. (2002) observaram aumento de 50% na concentração de CLA no leite de vacas alimentadas com óleo de peixe associado à soja extrusada. Da mesma forma, Donovan et al. (2000) demonstraram haver um aumento de 3,7 vezes na concentração de CLA em vacas suplementadas com 2% de óleo de peixe.

2.4.1 CLA e depressão da gordura do leite

De uma forma geral, parece que isômeros de CLA ou seus metabólitos contendo uma dupla ligação de configuração do tipo trans na posição 10 da cadeia exercem um efeito inibitório sobre a síntese de gordura do leite (NRC, 2001).

Vários experimentos têm avaliado o efeito da infusão abomasal ou suplementação oral de ácidos graxos trans e/ou ácido linoléico conjugado sobre a depressão da gordura do leite, porém, o mecanismo exato pelo qual o CLA e/ou seus metabólitos atuam no metabolismo de lipídeos não está totalmente elucidado. No caso da síntese de gordura do leite, evidências indicaram que a inibição se dá pela redução da síntese “de novo” (CHOUINARD et al., 1999), através da inibição da atividade das

enzimas acetil-Coa carboxilase (ACC) e ácido graxo sintetase (AGS) na glândula mamária (PIPEROVA, 2000).

Gaynor et al. (1994) distribuíram seis vacas fistuladas, recebendo dieta basal contendo 60% de concentrado e 40% de volumoso, em três tratamentos: Controle 750 g/dia de uma mistura contendo “gordura-cis” (65% de óleo de girassol e 35% de manteiga de cacau) e infusão abomasal de “gordura-trans”. Não foi verificada diferença entre os tratamentos em relação à produção de leite. A porcentagem de gordura foi menor para o tratamento com gordura trans.

Chouinard et al. (1998) observaram uma significativa redução no teor de gordura do leite após infusão abomasal de uma mistura comercial de ácidos graxos contendo 60% de CLA, com predominância dos isômeros cis-9 trans-11 e trans-10, cis-12. Piperova et al. (2000) estudaram alterações enzimáticas e o perfil de ácidos graxos em animais submetidos à dieta indutora de depressão da gordura do leite e constataram que além do CLA trans-10 cis-12, outros isômeros de CLA desempenham importante papel na ocorrência desta síndrome.

Baumgard et al. (2000) com o objetivo de avaliar o efeito de isômeros específicos sobre a síntese de gordura do leite trabalharam com infusão abomasal de isômeros cis-9 trans-11 e trans-10 cis-12 e observaram que apenas o isômero trans-10 cis-12 causou diminuição de 42% e 44% na concentração e produção de gordura, respectivamente. Trabalhos publicados posteriormente (BAUMGARD et al., 2001 BAUMGARD et al., 2002 PETERSON et al. 2003 PETERSON et al., 2004 VETH et al., 2005 LOCK et al., 2006 LOCK et al., 2007) constataram a ação do isômero trans-10 cis-12 sobre a depressão da gordura do leite, porém, os mecanismos moleculares envolvidos no processo ainda estão sendo investigados.

2.5 Outros fatores relevantes sobre a composição da gordura do leite

É provável que a relação volumoso:concentrado tenha efeito importante sobre o perfil de ácidos graxos do leite quando uma suplementação de gordura é efetuada. Existe pouca informação disponível quantificando a interação existente entre a quantidade de forragem fornecida e a gordura suplementar, afetando a composição da gordura do leite. Palmquist e Mattos (1978), observaram que a transferência de C18:2 marcado, do sangue para o leite, foi menor para os animais que receberam dieta pobre em fibra, comparativamente àqueles que receberam uma dieta padrão (GRUMMER, 1991).

A frequência de alimentação pode interferir na

2.6 Oxidação do leite

A oxidação do leite pode ser catalisada pela presença de metais, exposição à luz solar ou pode acontecer espontaneamente, com o desenvolvimento de SOF (“spontaneous oxidized flavor”). Este parâmetro tem sido reconhecido como um dos principais fatores atuantes sobre a qualidade de produtos lácteos, pois reduz o valor nutricional do leite e o tempo de prateleira (VAN-AARDT et al., 2005).

A autooxidação de lipídeos insaturados envolve reações de iniciação, propagação e terminação. A iniciação da oxidação está relacionada com a formação de radicais livres e é seguida pela formação de hidroperóxidos. Esses compostos são relativamente instáveis, sobretudo a altas temperaturas e em presença de metais de transição. O processo oxidativo é autocatalítico, requerendo apenas um radical inicial para produção de hidroperóxidos lipídicos (FRANKEL, 1991). Pode-se mensurar a concentração de hidroperóxidos por cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC) ou índice de peróxido (SHANTHA DECKER, 1994). De acordo com esta metodologia, os peróxidos presentes na gordura oxidam o Fe^{2+} a Fe^{3+} e as leituras são realizadas em comprimento de onda de 500nm, sob a forma de cloreto ou tiocianato férrico. As gorduras devem apresentar valores de peróxido menores do que 1 meq de peróxido/kg de óleo, para serem consideradas frescas (HOFFMANN, 1962; ROSSELL, 1989). Nesses níveis, nenhuma alteração organoléptica pode ser percebida. Baseado nos dados do International Dairy Federation (IDF), o valor padrão para a gordura do leite é 0,2 meq de oxigênio/kg de gordura (KAYLEGIAN LINDSAY, 1995).

No decurso da decomposição dos hidroperóxidos ocorre formação de compostos de naturezas muito diversas, os chamados produtos secundários da oxidação

(aldeídos, cetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos, polímeros) e, vários desses compostos, são voláteis e responsáveis pela formação de “off-flavor”. Os produtos secundários da oxidação têm sido determinados por reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS) ou método utilizando cromatografia gasosa associada à espectrômetro de massa (STAPEFELD et al., 1997 KRISTENSEN SKIBSTED, 1999). O teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é um teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formado no processo oxidativo é o malonaldeído (MA), um aldeído com três átomos de carbono. Geralmente, uma molécula de MA reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor vermelha, o qual absorve a 532-537nm (MELTON, 1983). Tem sido reportado, no entanto, que reações com TBA podem produzir pigmento amarelo, dependendo das condições da reação e quantidade de TBARS presente (KOSUGI et al., 1987). Fioriti et al. (1974) observaram que aldeídos monoinsaturados foram responsáveis pela formação de pigmento amarelo, enquanto poliinsaturados foram responsáveis pela formação de pigmento vermelho. Kenaston et al. (1955) demonstraram que o teste com TBA foi o mais sensível de todos os outros testes químicos usados para a detecção de produtos de oxidação dos ácidos graxos linoléico e linolênico, porém, foi relativamente insensível para o ácido graxo oléico.

2.7 Dieta e estabilidade oxidativa do leite

Conforme exposto em capítulo anterior, a concentração de AGPI no leite de ruminantes é baixa devido à biohidrogenação. A utilização de suplementos dietéticos específicos (óleo vegetal, gordura protegida) pode aumentar a concentração de AGPI no leite. Esta modificação no perfil de ácidos graxos pode alterar várias propriedades físicas e químicas da gordura do leite, como firmeza, ponto de fusão, viscosidade, estabilidade oxidativa e “flavor”. O número de duplas ligações dos ácidos graxos influencia o ponto de fusão e a estabilidade oxidativa, enquanto a distribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis influencia o comportamento de cristalização, ponto de fusão e aspectos nutricionais (KAYLEGIAN LINDSAY, 1995).

Timmons et al (2001) observaram correlação positiva (0,82) entre porcentagem de soja tostada na dieta e concentração AGPI no leite. O desenvolvimento de “spontaneous oxidized flavor” (SOF) após oito dias de armazenamento foi correlacionado positivamente com concentração de C18:2 (0,49), C18:3 (0,55) e ácidos graxos poliinsaturados totais (0,50). Não foi encontrada correlação significativa entre desenvolvimento de SOF e concentração de alfa-tocoferol no leite. Dietas com alta proporção de soja tostada aumentaram a concentração de AGPI no leite e a probabilidade de ocorrência de oxidação, especialmente quando o leite apresentou alta concentração de cobre.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ramaswamy et al. (2001) com relação às alterações na concentração de AGPI do leite após fornecimento de dieta com alta inclusão de soja extrusada, porém, os autores não encontraram diferenças

entre os tratamentos com relação ao índice de peróxido (0,41 e 0,39 para os tratamentos controle e soja extrusada) e avaliação sensorial.

Gonzalez et al. (2003) avaliaram características físicas e oxidativas de subprodutos do leite com diferentes perfis de ácidos graxos: alta concentração de oléico, alta concentração de linoléico ou controle. Os autores não observaram efeito de tratamento sobre o índice de peróxido.

Dois experimentos foram conduzidos a fim de estudar o efeito do fornecimento de silagem de leguminosa e suplementação com vitamina E sobre a estabilidade oxidativa do leite (AL-MALBRUK et al., 2004). Este parâmetro foi avaliado através da ingestão de alfa-tocoferol e aparecimento de substâncias reagentes com ácido tiobarbitúrico (TBARS). O fornecimento de silagem de trevo vermelho aumentou a concentração AGPI no leite e foi observado maior valor de TBARS para este tratamento. A suplementação com vitamina E conseguiu manter os níveis de TBARS baixos, mesmo no leite com perfil alterado de ácidos graxos.

Kristensen et al. (2004) avaliaram dois diferentes tipos de leite: um foi obtido de vacas alimentadas com dieta pobre em gordura e rica em cereais, resultando em alta síntese “de novo” de ácidos graxos e o outro tipo de leite foi obtido de vacas alimentadas com dieta rica em gordura oriunda de soja tostada. O leite do primeiro grupo de vacas apresentou maior concentração de ácidos graxos saturados enquanto o leite do segundo grupo apresentou maior concentração de ácidos graxos insaturados. Durante 11 dias de armazenamento a concentração de hidroperóxidos lipídicos foi monitorada juntamente com a determinação de hexanal, um produto secundário da oxidação com importante efeito sobre o “flavor”. A capacidade anti-oxidativa da fase lipídica foi monitorada pela concentração de alfa-tocoferol e beta-caroteno, e a

capacidade oxidativa do soro foi monitorada por espectroscopia. As vacas alimentadas com a segunda dieta produziram leite com maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados e de cadeia longa. Após oito dias de armazenamento, maior concentração de hidroperóxidos e hexanal foi encontrada, deixando claro que a estabilidade oxidativa depende do grau de insaturação dos ácidos graxos presentes no leite. Por outro lado, o consumo de alfa-tocoferol e beta-caroteno mantiveram-se constantes durante o período de armazenamento e uma diminuição significativa foi observada na capacidade anti-oxidativa do soro, indicando que a formação de radicais atuantes no início do processo de oxidação pode estar relacionada com a fase sérica do leite, onde enzimas e íons metálicos catalisam a ativação do oxigênio. Aparentemente essa ativação do oxigênio depende não do grau de insaturação dos ácidos graxos, mas sim, da concentração de anti-oxidantes solúveis em água (KRISTENSEN et al. 2004).

2.8 Antioxidantes e estabilidade oxidativa do leite

Os lipídeos são proP

e

p

podem ser degradados pela enzima glutathione peroxidase (selênio-dependente) e

entre concentração de Cu no leite e a ocorrência de oxidação, porém, com efeito significativo somente na presença de AGPI. Neste mesmo experimento foi observada maior utilização de ácido ascórbico do que alfa-tocoferol, durante o período de armazenamento, e, a quantidade de vitamina E utilizada (1000UI vit.E/dia) não foi suficiente para prevenir a oxidação do leite, após 8 dias de armazenamento.

Em trabalho recente, Van-Aardt et al. (2005) observaram que a adição de 0,025% de alfa-tocoferol + 0,025% de ácido ascórbico no leite protegeu o mesmo da oxidação (TBARS) nas primeiras 10 horas de armazenamento, sob tratamento de luz, sem interferências sobre as análises sensoriais. Em contrapartida, a suplementação com 0,05% de alfa-tocoferol não afetou positivamente a estabilidade do leite.

2.9 Fontes de selênio

O selênio é um elemento químico com número atômico 34 e peso atômico 78,96 pertencendo ao grupo VI da tabela periódica. Este grupo inclui outros não-metais como o enxofre e o oxigênio (SURAI, 2006). Na natureza, o selênio existe em duas formas químicas: orgânica e inorgânica. O selênio inorgânico pode ser encontrado na forma de Se elementar (Se⁰), selênio reduzido Se⁻² (seleneto) ou selênio oxidado Se⁺⁴ (selenito) e Se⁺⁶ (selenato). O selênio orgânico presente nos alimentos encontra-se, principalmente, sob a forma de selenometionina (SURAI, 2006).

Avanços recentes na bioquímica do selênio têm caracterizado muito bem as diferenças no metabolismo das duas formas do mineral. A selenometionina é metabolizada da mesma forma que é metabolizada a metionina as moléculas são

inertes e absorvidas no jejuno atravessam as células da mucosa intestinal e passam diretamente para o plasma. O mineral pode ser acumulado em tecidos como o fígado e músculo. A separação do aminoácido quelante se dá no local onde o elemento é utilizado (SURAI, 2006). Trabalhos “in vivo” têm demonstrado que minerais sob a forma de sais inorgânicos são ionizados no estômago e absorvidos no duodeno, onde o pH determina sua solubilidade. O transporte para o interior das células dá-se pela difusão passiva ou pelo transporte ativo (proteínas transportadoras). Nessas condições é que podem ocorrer perdas por reação com compostos, ou competição pelos sítios de absorção entre os elementos minerais, com interações antagônicas que podem inibir a absorção (SURAI, 2006). Pode-se citar ainda que grande parte do selênio inorgânico é excretado nas fezes e urina e muito pouco fica retido nos tecidos de reserva (SURAI, 2006). Um número grande de fatores podem influenciar a biodisponibilidade e distribuição do selênio no corpo como: forma química do mineral, outros compostos da dieta, “status” do selênio e espécie animal (SURAI, 2006).

Estudos têm sido publicados provando que a taxa de absorção do selênio orgânico é maior quando comparada ao selênio inorgânico (UNDERWOOD SUTTLE, 1999). No Brasil, Zanetti e Cunha (1992) avaliaram o efeito da administração de selênio orgânico e inorgânico sobre os teores do mineral no soro. Os animais que receberam selênio orgânico atingiram concentração sérica máxima 30 dias antes dos animais que receberam selênio inorgânico. Zanetti e Cunha (1997), trabalhando com ovinos, encontraram uma biodisponibilidade de 100% para o selênio orgânico e de 84,2% para o selênio inorgânico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local

O experimento foi realizado no setor leiteiro da Prefeitura do “Campus” Administrativo da USP em Pirassununga, SP.

3.2 Animais, instalações e manejo de ordenha

Foram utilizadas vinte e quatro vacas leiteiras da raça Holandesa, de 60 a 240 dias em lactação e produção média de 23 kg de leite/dia. A ordenha foi realizada duas vezes ao dia (6:00 e 15:00 horas) em sala de ordenha do tipo espinha de peixe. As medidas gerais de higiene consistiram em lavagem dos tetos, secagem com papel toalha, pré e pós “dipping” com anti-séptico. A detecção de mastite clínica foi realizada através do teste de caneca de fundo preto, antes da ordenha dos animais. Entre as ordenhas, os animais foram alojados em instalação do tipo “free-stall” com cochos coletivos.

3.3 Delineamento experimental e tratamentos

Os animais foram divididos em três blocos, de acordo com o número de lactações: bloco1 (6 novilhas) bloco 2 (12 vacas de 2 a 5 lactações) bloco 3 (6 vacas com mais de 5 lactações) e distribuídos ao acaso em três tratamentos, de modo que

cada tratamento fosse composto por 2 novilhas, 4 vacas de 2 a 5 lactações e 2 vacas com mais de 5 lactações. Os tratamentos utilizados foram:

A) Dieta Controle (Controle)

B) Dieta contendo 21% de soja extrusada (SojaExt)

C) Dieta contendo 21% de soja extrusada + 5 mg de selênio orgânico (SojaExt+Se)

O galpão “free-stall” foi dividido em duas partes. Uma das partes alojou 1/3 dos animais e estes receberam a dieta controle a segunda parte foi destinada à 2/3 dos animais e estes receberam a dieta contendo soja extrusada (SojaExt e SojaExt+Se). O selênio foi fornecido diariamente à metade das vacas alojadas neste grupo. O selênio orgânico utilizado (Zimpro®) continha 1000 ppm de selênio, na forma de selênio-metionina. A dose diária (5mg) foi pesada, acondicionada em saquinhos de papel (13,5cm x 7,0cm), os quais foram imersos em melaço de cana, antes de serem colocados dentro da boca dos animais, garantindo consumo total (Figura 1).

3.4 Dietas experimentais

As vacas foram alimentadas com dieta total contendo 56% de volumoso (89% de silagem de milho e 11% de feno de coast-cross) e 44% de concentrado, na matéria-seca. As dietas foram balanceadas para manutenção dos mesmos níveis de energia e proteína. Os animais tiveram livre acesso à dieta total, água e sal mineral. Os ingredientes e a composição química das dietas experimentais encontram-se na Tabela 2.

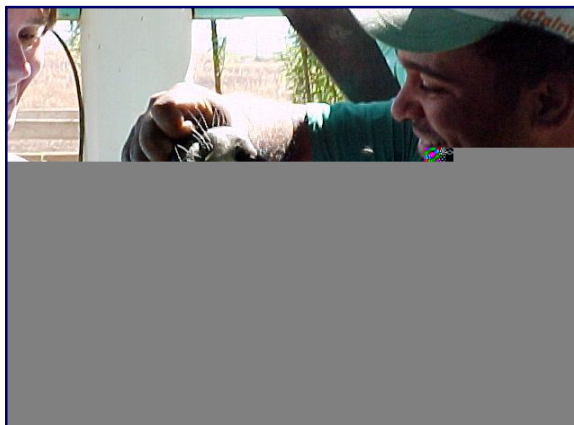


Figura 1. Suplementação com selênio

Tabela 2 - Ingredientes e composição química das dietas experimentais (valores expressos em porcentagem da matéria-seca)

Ingredientes	Dietas		
	Controle	SojaExt	SojaExt+Se
Silagem de milho	50,00	50,00	50,00
Feno de coast cross	6,00	6,00	6,00
Fubá de milho	-	10,47	10,47
Milho moído	26,40	-	-
Casca de soja	-	6,952	6,952
Farelo de soja	8,80	-	-
Soja extrusada	-	20,86	20,86
Farinha de peixe	1,98	2,99	2,99
Farelo de trigo	3,52	-	-
Uréia	0,89	0,32	0,32
Calcáreo	0,26	-	-
Óxido de magnésio	0,26	0,26	0,26
Sal comum	0,44	0,44	0,44
Premix mineral ¹	0,88	0,88	0,88
Sulfato de amônia	0,04	0,04	0,04
Bicarbonato de sódio	0,53	0,53	0,53
Composição química			
MS (%)	54,20	54,90	54,90
PB (%)	17,10	17,30	17,30
EE (%)	3,40	7,10	7,10
FDN (%)	36,70	39,50	39,50
MM (%)	5,90	6,10	6,10
NDT (%)	71,50	72,00	72,00
Selênio (ppm)	0,31	0,31	0,54

¹ Composição por Kg do produto: Enxofre (S) 80 g, Magnésio (Mg) 20 g, Potássio (K) 20 g, Manganês (Mn) 1.000 mg,, Zinco (Zn) 2500 mg, Cobre (Cu) 1.500 mg, Cobalto (Co) 100 mg, Iodo (I) 80 mg, Selênio (Se) 20 mg, Cálcio (Ca) 180 g, Fósforo (P) 90 g, Flúor (F) máx. 300mg

Durante o período de adaptação de 14 dias, foram fornecidos água e alimento à vontade, cujas quantidades foram mensuradas. De acordo com o consumo deste período, o fornecimento foi ajustado de modo a minimizar as sobras de ração e, assim, a seleção da porção ingerida pelos animais, durante o período de colheita. O período experimental teve duração de seis semanas. O consumo dos lotes foi monitorado a cada sete dias as quantidades de alimentos (concentrado, silagem e feno) foram pesadas antes do fornecimento aos animais (de manhã e à tarde) e as sobras dos lotes foram retiradas e pesadas na manhã do dia seguinte. Amostras dos concentrados, feno, silagem e das sobras foram colhidas, semanalmente, para análises bromatológicas e de selênio. Os animais foram pesados a cada sete dias, logo após a ordenha da manhã.

3.4.1 Análises bromatológicas

As análises bromatológicas e de selênio foram realizadas nos Laboratórios de Bromatologia e de Minerais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP. Logo após a colheita, as amostras dos alimentos foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 65 C, durante 72 horas. Em seguida, todas as amostras foram moídas em peneira de 2 mm, retirando-se uma sub-amostra para análises de matéria-seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), matéria mineral (MM), cálcio (Ca) e fósforo (P), de acordo com AOAC (1990). Também foram realizadas as análises de fibra em detergente neutro (FDN), conforme Silva e Queiroz (2005) e análise de selênio (OLSON et al., 1975).

3.5 Amostras de sangue

Foram realizadas três colheitas de sangue em cada animal nas semanas 0 (antes do início do experimento), 3 e 6, para as análises de glicose (autoanalisador Accu Check Active®) colesterol total (método enzimático-colorimétrico / Laborlab®), triglicérides (método enzimático-colorimétrico / Laborlab®) e para análises de selênio (OLSON et al., 1975). As amostras foram colhidas logo após a ordenha da manhã, em tubos com vácuo (sem reagentes) e imediatamente encaminhadas ao laboratório. A determinação da glicose foi realizada em analisador automático, logo após a colheita. Este equipamento possui uma membrana contendo duas enzimas que oxidam a glicose liberando elétrons, os quais geram uma corrente que é medida e comparada com a gerada por uma solução de concentração conhecida (padrão). As amostras restantes foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos. O soro foi pipetado, acondicionado em *ependorfs* de plástico e congelado a -20 C. As análises laboratoriais para determinação do selênio, foram realizadas após a digestão úmida com mistura nítrico-perclórica e posterior leitura fluorimétrica, seguindo-se a sensibilização por diamino-naftaleno (OLSON et al., 1975).



Figura 2. Colheita de sangue

3.6 Produção e composição do leite

A produção de leite diária, correspondente à ordenha da manhã somada à ordenha da tarde, foi medida diariamente durante todo o período experimental, através da leitura no balão volumétrico. As amostras de leite foram colhidas semanalmente para as análises de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e Contagem de Células Somáticas (CCS). Foram utilizados tubos plásticos contendo 1 pastilha do conservante dicromato de potássio. As amostras foram colhidas durante a ordenha da manhã, ao final da extração total do leite dos animais, diretamente do balão volumétrico, após 5 segundos de homogeneização. Os componentes químicos do leite foram determinados por infravermelho e a CCS foi determinada por citometria de fluxo, utilizando-se os aparelhos BENTLEY 2000® e SOMACOUNT 300®, respectivamente. A concentração de uréia no leite foi determinada por colorimetria utilizando-se kit comercial (Sigma Diagnostics®). As análises foram realizadas no Laboratório Clínica do Leite da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP).

Para as análises de selênio, o leite foi colhido nas semanas 0 (antes do início do experimento), 3 e 6. As análises foram realizadas após a digestão úmida com mistura nítrico-perclórica e posterior leitura fluorimétrica, seguindo-se a sensibilização por diamino-naftaleno, segundo metodologia proposta por Olson et al. (1975), no Laboratório de Minerais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP (FZEA/USP).

3.7 Colesterol e perfil de ácidos graxos do leite

As amostras de leite para o levantamento da concentração de colesterol e perfil de ácidos graxos foram colhidas na última semana experimental e congeladas a -20°C . Foram utilizados tubos plásticos com capacidade para 100 ml, sem adição de conservantes. As amostras foram colhidas durante a ordenha da manhã, ao final da extração total do leite dos animais, diretamente do balão volumétrico, após 5 segundos de homogeneização.

As análises de colesterol foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP de acordo com a metodologia proposta por Saldanha et al. (2004). Ao leite previamente descongelado e homogeneizado (10g) foram adicionados 8 ml de solução aquosa de KOH 50% e 12 ml de álcool etílico e a solução foi colocada em banho-maria a 60°C sob agitação constante por 15 minutos. Foram acrescentados 10 ml de água destilada até resfriamento completo. A extração foi realizada com hexano sob agitação intensa. Após separação, uma amostra de 4 ml da fase hexânica foi retirada, seca sob N_2 e misturada à 0,5 ml de isopropanol, com agitação em vortex até completa solubilização. Para

quantificação do colesterol através da metodologia enzimática, utilizou-se kit laboratorial da Laborlab S/A, composto por dois reativos de cor (o nº 1, contendo 0,025 mol/L de 4 aminofenazona e o nº 2 contendo 0,055 mol/L de fenol), além do reativo enzimático (colesterol-oxidase 3U/mol, POD 20U / mol, lipase 300U/mol). Preparou-se o reagente de trabalho através da adição de 0,5 ml de reativo de cor nº1, 0,5 ml do reativo de cor nº2, 19 ml de água destilada e 0,4 ml do reativo enzimático. Adicionou-se 3ml do reagente de trabalho às amostras e procedeu-se tratamento térmico por 10 minutos a 37°C em banho-maria. Após repouso de 30 minutos, uma alíquota de 2ml foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. Após repouso de mais trinta minutos leu-se a absorbância contra o branco, igualmente preparado a 499nm. A curva de calibração foi construída a partir de uma solução padrão de colesterol (1,006 mg/100ml), com concentrações variando de 0,01 a 0,08 mg/ml.

O perfil de ácidos graxos foi determinado pelo Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP). Para a extração da gordura as amostras de leite foram descongeladas e centrifugadas (11000 rpm) por 30 minutos. Da nata sobrenadante foram retiradas 400mg para a extração da gordura segundo Hara e Radim (1978). A metilação foi feita através do uso de uma solução metanólica de metóxido de sódio, de acordo com Christie (1982). O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa (ThermoFinnigan®, modelo Trace 2000), utilizando coluna capilar de sílica fundida, SP-2560 (100mm x 0,25mm x 0,2um Supelco) e detector de ionização de chama (FID). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1ml/min e as temperaturas do injetor e detector foram de 250 a 300°C, respectivamente. A razão de injeção das amostras foi de 25:1, o fluxo de ar foi ajustado a 460 ml/min e o fluxo de nitrogênio (gás auxiliar) a

30ml/min. A temperatura inicial foi de 70°C. Quatro minutos após a injeção das amostras, a temperatura foi elevada a 175°C (13°C/min) e então mantida por 27 minutos. Por fim, a temperatura foi elevada a 215°C (4°C/min) e mantida por 21 minutos. Um padrão de manteiga (CRM-164 Commission of the European Communities, Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium) contendo valores certificados para alguns ácidos graxos (especialmente os de cadeia curta) foi utilizado para determinar suas recuperações e calcular os respectivos fatores de correção. A concentração dos ácidos graxos foi expressa em g/100g de ácidos graxos totais.

3.8 Taxa de oxidação do leite

Para o acompanhamento dos produtos iniciais da oxidação, 500 ml de leite foram colhidos no último dia do experimento, em recipientes plásticos, durante a ordenha da manhã, diretamente do balão volumétrico, após 5 segundos de homogeneização. As amostras foram imediatamente levadas ao laboratório para extração da gordura de acordo com Feng et al. (2004), pelo método de centrifugação. Sessenta (60) ml de leite fresco foram centrifugados a 12 000 rpm (17800xg) por 30 minutos a 4°C. Uma alíquota de 1,0 g do sobrenadante foi transferida para um microtubo ou *epperdorf* e novamente centrifugada à temperatura ambiente por 20 minutos a uma rotação de 13 000 rpm (19300 x g). Finalmente, 100 µl foram retirados da camada superficial para determinação do índice de peróxido, de acordo com a metodologia proposta pelo International Dairy Federation (IDF, 1990) citada por Shanta e Decker (1994). Cada amostra (100 µl) foi colocada em tubo de vidro contendo 9,8 ml de solução clorofórmio-metanol (7+3 V/V) sob constante agitação. Foram adicionados

50 µl de solução de tiocianato de amônio + 50 µl de solução de Fe^{2+} . Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi determinada a 500nm em espectrofotômetro, contra o branco (solução contendo todos os reagentes menos a amostra). De acordo com esta metodologia, os peróxidos presentes na gordura oxidam o Fe^{2+} a Fe^{3+} e as leituras são realizadas em comprimento de onda de 500nm, sob a forma de tiocianato férrico. Os mesmos procedimentos (extração e análise de peróxido) foram repetidos nas mesmas amostras 24 e 96 horas após a colheita.

Para os produtos secundários de oxidação, análises de TBARS foram realizadas imediatamente após a colheita de leite, 24 e 96 horas depois, de acordo com a metodologia proposta por King (1962), sendo que 17,6 ml de leite foram colocados em frasco com tampa de vidro e aquecidos a 30°C. Foram adicionados 1 ml de solução de ácido tricloroacético (1 g/ml) e 2ml de etanol 95%, sob agitação vagarosa. Após 5 minutos em repouso a solução foi filtrada em papel da marca *Whatman*, número 42 e 4ml do filtrado foram retirados e misturados a 1ml de solução TBA (1,4 g de ácido 2-tiobarbitúrico dissolvido em 100 ml de etanol 95%). A nova solução foi colocada em banho-maria por 60 minutos a 60°C e, após resfriamento completo, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 532nm usando água destilada como padrão. O teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é um teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído (MA), um aldeído com três átomos de carbono. Geralmente, uma molécula de MA reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor vermelha, o qual absorve a 532 nm.

3.9 Análise estatística

Foi utilizado delineamento em blocos casualizados (DBC), onde os blocos foram elaborados de acordo com o número de lactações dos animais.

Todas as variáveis, exceto perfil de ácidos graxos e colesterol no leite, foram comparadas em cada tempo de colheita utilizando o procedimento Proc Mixed do Sas (2000). Por não seguirem uma distribuição normal, os valores de contagem de células somáticas (CCS) foram transformados em \log_e e, desta forma, analisados e reportados.

Modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + T_j + T_{pk} + (B \times T)_{ij} + (T_p \times T)_{kj} + e_{ijkl}, \text{ onde:}$$

Y_{ijkl} = variável dependente

μ = média geral

B_i = efeito de bloco

T_j = efeito de tratamento

T_{pk} = efeito de tempo

$(B \times T)_{ij}$ = interação entre bloco e tratamento

$(T_p \times T)_{kj}$ = interação entre tempo e tratamento

e_{ijkl} = erro padrão

Os dados de perfil de ácidos graxos e colesterol no leite foram analisados utilizando-se Proc Glm do Sas (2000) de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + T_j + (B \times T)_{ij} + e_{ijkl}, \text{ onde:}$$

Y_{ijkl} = variável dependente

= média geral

B_i = efeito de bloco

T_j = efeito de tratamento

$(B \times T)_{ij}$ = interação entre bloco e tratamento

e_{ijkl} = erro padrão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desempenho, produção e composição do leite

Não foi observado efeito das dietas experimentais sobre o consumo de matéria seca (18,48 Kg/animal/dia) e peso vivo dos animais (598Kg). Com relação à produção diária de leite, pode-se notar que as médias foram semelhantes para os três tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3 - Produção e composição do leite de acordo com as dietas experimentais

	Controle	SojaExt	SojaExt+Se	dp	cv	Trat	Bloco	Tempo
Prod. de leite(kg)	23,018 ^a	25,123 ^a	23,763 ^a	0,722	3,012	NS	***	NS
Gordura, %	2,631 ^a	2,225 ^b	2,309 ^b	0,084	3,518	***	***	NS
Proteína, %	2,922 ^b	3,166 ^a	3,000 ^b	0,067	2,223	**	***	NS
Lactose, %	4,465 ^a	4,463 ^a	4,475 ^a	0,032	0,716	NS	NS	NS
Uréia, mg/dl	17,143 ^b	18,530 ^a	17,023 ^b	0,388	2,209	***	***	***
Sólidos Totais, %	10,926 ^a	10,771 ^a	10,679 ^a	0,112	1,038	NS	***	NS
CCS, log _e	4,221 ^a	4,203 ^a	4,248 ^a	0,155	3,370	NS	NS	NS
pH	6,743 ^a	6,741 ^a	6,709 ^b	0,009	0,134	**	***	NS
Gordura, kg	0,601 ^a	0,548 ^b	0,537 ^b	0,020	3,559	**	NS	NS
Proteína, kg	0,668 ^b	0,793 ^a	0,670 ^b	0,022	3,100	***	***	NS
Lactose, kg	1,051 ^a	1,094 ^a	1,068 ^a	0,029	2,708	NS	NS	NS
Sólidos Totais,kg	2,563 ^a	2,621 ^a	2,523 ^a	0,064	2,491	NS	***	NS

Letras apresentadas na linha se referem ao efeito de tratamento

*P<0,10 ** P<0,05 ***P<0,01 NS: não significativo

dp: desvio padrão cv: coeficiente de variação

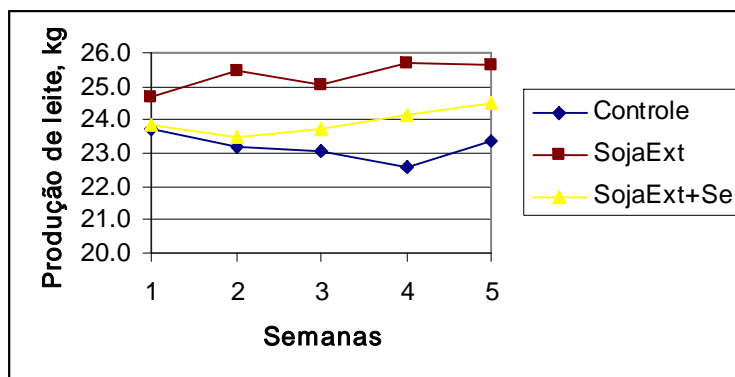


Figura 3. Produção de leite de acordo com as dietas experimentais

A concentração e a produção diária de gordura (Tabela 3 e Figura 4) foram menores no leite das vacas alimentadas com a dieta contendo alta inclusão de soja extrusada (tratamentos SojaExt e SojaExt+Se). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Dhiman et al. (1999) que constataram diminuição nos teores de gordura e proteína no leite de vacas alimentadas com 12% de soja extrusada.

As novilhas primíparas produziram menos leite ($P < 0,01$) com maior concentração de gordura ($P < 0,01$) quando comparadas às vacas de duas ou mais crias. Foi observada interação entre bloco e tratamento para esta variável onde as novilhas primíparas produziram leite com maior quantidade de gordura nos tratamentos SojaExt e SojaExt+Se, porém, a mesma tendência não foi observada para o tratamento controle.

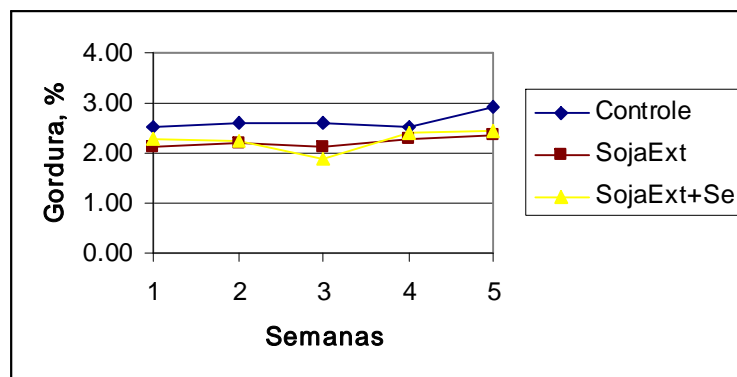


Figura 4. Porcentagem de gordura no leite de acordo com as dietas experimentais

Foi observado efeito das dietas experimentais sobre a concentração de proteína do leite. Os animais pertencentes ao tratamento SojaExt apresentaram maior porcentagem de proteína no leite quando comparados aos animais pertencentes aos outros dois tratamentos. A mesma tendência também foi observada para produção de proteína (kg/dia), conforme ilustrada na Tabela 3.

A adição de gordura em dietas formuladas para vacas leiteiras têm resultado em redução da proteína do leite, provavelmente devido ao efeito deletério sobre a produção de proteína microbiana. Vários trabalhos dão suporte a essa teoria (KHORASANI et al., 1991 DHIMAN et al., 1999a ABUGHAZALEH et al., 2002a ABUGHAZALEH et al., 2004 GONTHIER et al., 2005).

O resultado obtido no presente trabalho é diferente daqueles apresentados pelos estudos descritos acima e pode estar relacionado ao maior fluxo intestinal de proteína microbiana devido à redução no número de protozoários ciliados em animais recebendo dieta rica em lipídeos (VALADARES FILHO PINA, 2006). Uma outra hipótese estaria relacionada à ingestão excessiva de proteína dietética, a qual aumentaria a proteína total do leite devido ao aumento do teor de nitrogênio não-protéico (BLOCK, 2000).

Pôde-se observar ainda efeito de bloco para esta variável, indicando que os animais mais velhos (cinco ou mais lactações) produziram leite com menor concentração de proteína ($P < 0,01$) quando comparados às novilhas e às vacas de segunda a quarta lactações.

A redução na concentração de gordura no leite dos animais pertencentes aos tratamentos SojaExt e SojaExt+Se não influenciou a concentração e a produção diária de sólidos totais (Tabela 3). Os animais mais velhos (cinco ou mais lactações) produziram leite com menor concentração de sólidos em decorrência da menor concentração de proteína.

Não foi observado efeito de tratamento, bloco e tempo sobre os teores e produção de lactose (Tabela 3). É de conhecimento comum que a lactose varia muito pouco por estar sujeita à regulação endócrina e, principalmente, por ser o principal agente osmótico envolvido na secreção do leite (KHORASANI et al., 1991 KENNELLY et al., 1998 ABUGHAZALEH et al., 2002).

Os valores de nitrogênio uréico encontrados neste trabalho são elevados em virtude do elevado teor de proteína utilizado nas dietas. O leite das vacas pertencentes ao tratamento SojaExt apresentou teores maiores de uréia, quando comparado ao leite produzido pelas vacas dos outros dois tratamentos (Tabela 3 e Figura 5). Neste caso, a maior concentração de proteína observada no leite desses animais (SojaExt) pode ser resultante da transferência do excesso de nitrogênio uréico do sangue para o leite, aumentando a proteína total por aumento do nitrogênio não protéico (NNP) e não por aumento da proteína verdadeira. As vacas com cinco ou mais lactações apresentaram menores teores de uréia no leite, seguindo a mesma tendência ocorrida para os teores de proteína.

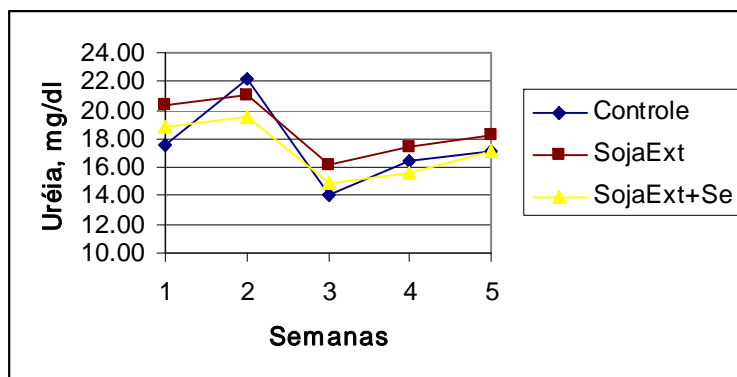


Figura 5. Teores de uréia no leite (mg/dl) de acordo com as dietas experimentais

Os três tratamentos apresentaram valores de pH no leite superiores a 6,7, possivelmente explicado pelo alto teor de uréia. O leite das vacas suplementadas com selênio (SojaExt+Se) apresentou pH mais baixo (Tabela 3 e Figura 6) quando comparado ao leite das vacas pertencentes aos outros tratamentos. Foi encontrado efeito de bloco sobre esta variável, onde o leite das primíparas apresentou-se mais básico.

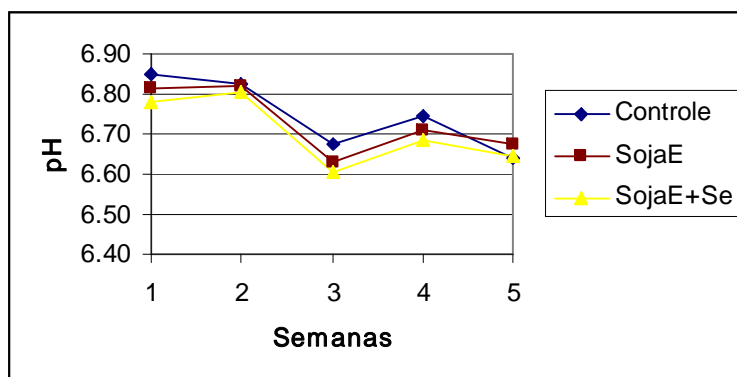


Figura 6. pH do leite de acordo com as dietas experimentais

A contagem de células somáticas (CCS) transformada em Log_e não foi afetada pelas dietas experimentais, assim como, não foi encontrado efeito de tempo e bloco para esta variável.

Não foi observada interação dupla (tratamento x tempo) ou tripla (tratamento x tempo x bloco) para nenhuma das variáveis estudadas.

4.2 Parâmetros sanguíneos

Os animais que receberam as dietas contendo alta inclusão de soja extrusada (SojaExt e SojaExt+Se) apresentaram maiores teores de colesterol total no soro quando comparados aos animais do grupo controle (Tabela 4), pois estavam ingerindo maior quantidade de gordura. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Gonthier et al. (2005) quando suplementaram vacas leiteiras com 12,6% de semente de linhaça e observaram maiores teores de colesterol no sangue desses animais.

As vacas com duas a quatro lactações apresentaram maiores teores de colesterol total no sangue ($P < 0,01$) tal fato pode estar relacionado à maior produção de leite desses animais, e, portanto, maior mobilização de reservas corporais dos mesmos.

Tabela 4 - Concentração sérica de colesterol total (COL), triglicérides (TGA) e glicose (GLI) de acordo com as dietas experimentais

	Controle	SojaExt	SojaExt+ Se	dp	cv	Trat	Tempo	Bloco
COL (mg/dl)	162,71 ^b	221,08 ^a	237,15 ^a	13,16	6,36	***	***	***
TGA (mg/dl)	19,12 ^a	21,73 ^a	20,82 ^a	2,01	9,78	NS	NS	NS
GLI (mg/dl)	51,74 ^a	51,23 ^a	50,66 ^a	1,02	1,99	NS	NS	NS

Letras apresentadas na linha se referem ao efeito de tratamento.

* $P < 0,10$ ** $P < 0,05$ *** $P < 0,01$ NS: não significativo

dp : desvio padrão cv: coeficiente de variação

Não foi observado efeito das dietas experimentais sobre a concentração sérica de triglicérides e teor de glicose no sangue, porém, numericamente, os valores de TGA foram mais altos para os tratamentos com alta inclusão de soja extrusada na dieta (SojaExt e SojaExt+Se), onde os níveis via dieta foram maiores.

4.3 Concentração de colesterol no leite

As concentrações de colesterol no leite foram $9,929 \pm 5,1$, $14,216 \pm 5,1$ e $13,859 \pm 5,1$ mg/100ml para os tratamentos Controle, SojaExt e SojaExt+Se, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 7. Os valores determinados mostraram-se semelhantes aos obtidos por Huber et al. (1995) utilizando cromatografia gasosa e superiores aos resultados obtidos por Saldanha et al. (2004) utilizando metodologia enzimática. Apesar do tratamento controle ter apresentado concentração de colesterol numericamente inferior aos outros dois tratamentos, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($P=0,1976$), possivelmente devido à variação dos dados.

4.4 Perfil de ácidos graxos do leite

O perfil de ácidos graxos das amostras de leite está apresentado na Tabela 5. Os valores obtidos representam o perfil de animais consumindo forragem conservada e concentrado com alta concentração de óleo vegetal (RAMASWANI et al., 2001).

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos do leite (g/100g) de vacas recebendo as dietas experimentais

Controle SojaExt SojaExt+

dados foram ilustrados na Tabela 5. Abughazaleh et al. (2002) e Dhiman et al. (1999) também encontraram aumento na concentração de ácidos graxos de cadeia longa quando forneceram dieta com alta inclusão de soja extrusada às vacas leiteiras.

Resultados satisfatórios foram observados em relação ao teor de saturação dos ácidos graxos. O leite produzido pelas vacas recebendo tratamento com soja extrusada (SojaExt e SojaExt + Se) apresentaram menor concentração de ácidos graxos saturados e maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados e monoinsaturados quando comparados ao grupo controle, conforme observações realizadas por Dhiman et al. (1999), Abughazaleh et al. (2002), Kristensen et al. (2004).

No presente estudo, dois isômeros de CLA foram isolados. O isômero biologicamente ativo (cis-9 trans-11) aumentou 3,2 vezes no leite das vacas alimentadas com soja extrusada ($P < 0,01$). Esta tendência foi observada por Ramaswani et al. (2001) e Abughazaleh et al. (2002), porém, os valores encontrados por esses autores foram expressivamente mais altos: 1,24 e 0,87 g/100g, respectivamente, contra 0,29 g/100g obtido neste trabalho. Em estudo desenvolvido no Brasil, Santos et al. (2001) encontraram concentração de 0,18 g de CLA por 100g de gordura no leite de vacas alimentadas com grão de soja triturado. Os autores afirmaram que o baixo nível de CLA encontrado poderia estar relacionado à baixa disponibilidade dos lipídeos à biohidrogenação, uma vez que estariam presos à matriz protéica da semente.

A concentração de ácido graxo C18:1 trans11 (transvacênico-TVA) foi aumentada no leite das vacas que receberam as dietas contendo soja extrusada (Tabela 5). O aumento na concentração de TVA é benéfico desde que os tecidos possam sintetizar CLA (cis-9 trans-11) a partir do TVA pela ação da enzima delta-9 dessaturase. De acordo com Corl et al. (2000), a delta-9 dessaturase é responsável

pela produção de 65% do isômero de CLA cis-9, trans-11 na gordura do leite. Os valores de TVA encontrados neste estudo são mais elevados que os observados por Ramaswani et al. (2001), ao contrário dos teores de CLA. Esta discrepância de valores pode estar relacionada à ação ineficiente da enzima, comprometendo os valores de CLA.

4.5 Concentração de selênio no soro e no leite

O teor médio do selênio na dieta basal durante o período experimental foi 0,31mg/kg MS (0,31 ppm), ou seja, consumo de 6,5 mg de selênio/dia, valor superior ao que era encontrado nas fazendas do Estado de São Paulo na década de oitenta (LUCCI et al. 1984) e no Estado de Ohio, EUA (WEISS et al. 1990). Atualmente estão sendo utilizados níveis superiores de selênio, sendo o sal mineral a principal via de fornecimento. Os animais deste experimento, suplementados com 5 mg de selênio/dia, passaram a consumir 11,52 mg de selênio diário ou 0,54 mg/kg MS (0,54 ppm).

Os níveis séricos de selênio não foram diferentes em função das dietas experimentais e estão apresentados na Tabela 6. Foi observado efeito de tempo para esta variável onde três semanas após o início da suplementação, os níveis de selênio aumentaram significativamente ($P < 0,01$) para todos os tratamentos e mantiveram-se constantes até o final do período experimental (Figura 8). Os resultados encontrados não foram esperados e uma possível explicação poderia estar relacionada à lise das células vermelhas ocorrida no processo de remoção do coágulo durante o procedimento de pipetagem do soro. O ciclo de vida das células vermelhas é de 90 a 120 dias, e, portanto, o período de tratamento pode não ter sido suficiente para que

houvesse completo “turn over” de células vermelhas em resposta à suplementação com selênio. Desta forma, a lise das células vermelhas pode ter afetado a concentração de selênio no soro.

Segundo Weiss et al. (1990), a concentração de selênio no soro sanguíneo estava correlacionada com a concentração do selênio na dieta para vacas secas, porém, a mesma correlação não fora encontrada para vacas em lactação. A discrepância entre estes dados pode estar relacionada ao maior fornecimento de selênio aos animais em produção, onde, após certo nível de suplementação (5 mg/dia), a concentração plasmática de selênio atingira um platô de 0,08 g/ml. A partir deste nível de suplementação, a concentração plasmática passa a ser uma medida pouco sensível.

Tabela 6 - Concentração de selênio (g/ml), no soro sanguíneo e no leite, de acordo com as dietas experimentais

	Controle	SojaExt	SojaExt+Se	dp	cv	Trat	Bloco	Tempo
Selênio no soro, (g/ml)	0,0789 ^a	0,0791 ^a	0,0769 ^a	0,0027	3,448	NS	NS	***
Selênio no leite, (g/ml)	0,0272 ^b	0,0267 ^b	0,0312 ^a	0,0012	4,225	**	NS	***

Letras apresentadas na linha se referem ao efeito de tratamento.

* P<0,10 ** P<0,05 ***P<0,01 NS: não significativo

dp : desvio padrão cv: coeficiente de variação

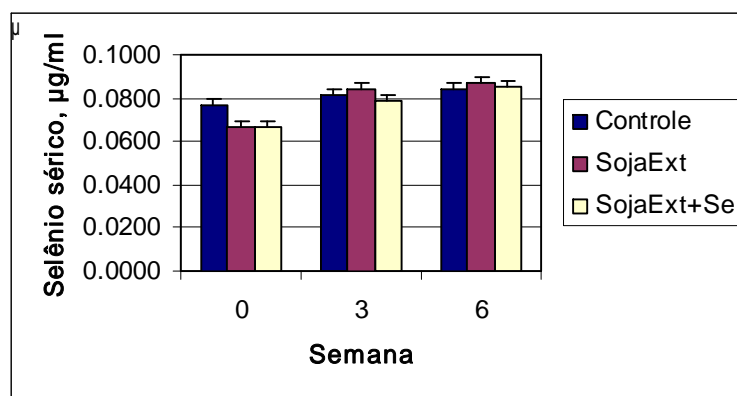


Figura 8. Concentração sérica de selênio ($\mu\text{g/ml}$) de acordo com as dietas experimentais nas semanas 0 (antes do início da suplementação), três e seis, após o início da suplementação

A concentração de selênio no leite das vacas suplementadas com o mineral foi maior ($P < 0,05$) quando comparada ao leite das vacas pertencentes aos outros dois tratamentos (Tabela 6). Foi verificado efeito de tempo para esta variável onde se pode observar na Figura 9 que antes do início dos tratamentos (tempo 0), os níveis de selênio foram semelhantes (0,02561 0,02650 0,02336 g/ml, para os tratamentos Controle, Soja extrusada e Soja extrusada + Selênio, respectivamente). A partir da terceira semana de suplementação, as vacas que receberam selênio orgânico produziram leite com maior teor de selênio (0,0272 0,0267 0,0312 para os tratamentos Controle, Soja extrusada e Soja extrusada + Selênio, respectivamente), mostrando serem suficientes a concentração e o período de suplementação utilizados. Resultado bastante próximo foi obtido por Muniz-Naviero as

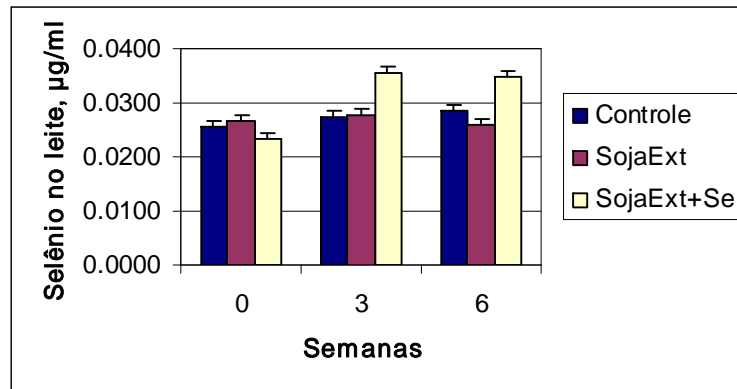


Figura 9. Concentração de selênio no leite ($\mu\text{g/ml}$) de acordo com as dietas experimentais nas semanas 0 (antes do início da suplementação), três e seis, após o início da suplementação

4.6 Estabilidade oxidativa do leite

Os níveis de peróxido aumentam vagarosamente nos estágios iniciais de oxidação, mas ao final do período de indução, a concentração de peróxido aumenta rapidamente e então declina alcançando valores próximos de zero (LABUZA, 1975).

A iniciação da oxidação envolve a formação de radicais livres seguida pela formação de hidroperóxidos, estes são relativamente instáveis, sobretudo às altas temperaturas e em presença de metais de transição. No decurso de sua decomposição produzem compostos de naturezas muito diversas, os chamados produtos secundários da oxidação (aldeídos, cetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos, polímeros) e, vários desses compostos, são voláteis e responsáveis pela formação de “off-flavor” (FRANKEL, 1991).

Analisando a Figura 10, pode-se observar altos valores de peróxido nas primeiras 7 horas pós-colheita, indicando grande concentração de hidroperóxidos e término da fase de indução. Foi observada queda acentuada após 32 horas de

armazenamento e manutenção dos índices de peróxido 102 horas após a colheita do leite. Os índices de peróxido obtidos não ilustraram a clássica curva da formação dos hidroperóxidos e subsequente quebra em inúmeros produtos de reação. Provavelmente, a formação dos hidroperóxidos foi iniciada durante a colheita e processamento das amostras, antes das primeiras sete horas.

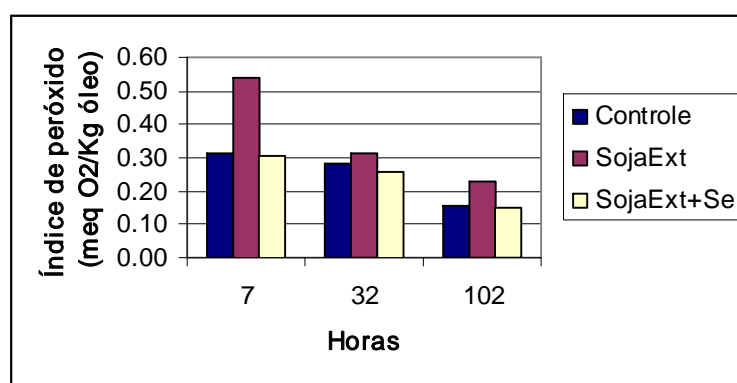


Figura 10. Índice de peróxido analisado nos tempos 7, 32 e 102 horas após a colheita do leite de vacas recebendo as dietas experimentais

O leite com perfil modificado de ácidos graxos, oriundo das vacas alimentadas com alta inclusão de soja extrusada (SojaExt), apresentou maior índice de peróxido quando comparado ao leite das vacas pertencentes aos tratamentos Controle e SojaExt+Se (Tabela 7), comprovando que a suplementação com selênio, realizada no último tratamento, influenciou positivamente a oxidação do leite com perfil modificado de ácidos graxos. Os valores obtidos neste trabalho estão próximos do valor padrão especificado pelo International Dairy Federation (IDF) de 0,2 meq de O₂/kg de gordura citado por Kaylegian e Lindsay (1995).

Tabela 7 - Índice de peróxido (meq de O₂/kg de óleo) e valores de TBARS (absorbância 532 nm) no leite de vacas alimentadas com as dietas experimentais

	<i>Controle</i>	<i>SojaExt</i>	<i>SojaExt+Se</i>	<i>dp</i>	<i>cv</i>	<i>Trat</i>	<i>Bloco</i>	<i>Tempo</i>
Índice de peróxido, meq O ₂ / Kg óleo	0,2469 ^b	0,3399 ^a	0,2340 ^b	0,0271	9,9	***	NS	***
TBARS, Absorbância (532 nm)	0,0607 ^a	0,0553 ^a	0,0341 ^a	0,0124	24,8	NS	NS	***

Letras apresentadas na linha se referem ao efeito de tratamento.

* P<0,10 ** P<0,05 ***P<0,01, NS: não significativo

dp : desvio padrão, cv: coeficiente de variação

O teste de TBARS foi realizado para quantificar os produtos secundários da oxidação. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 532 nm e os resultados foram expressos em unidades de absorbância. Não foi observado efeito das dietas experimentais sobre esta variável (Tabela 7), apesar do valor de TBARS ter sido numericamente inferior para a dieta SojaExt+Se, nos três tempos de análise. Foi observado efeito de tempo, onde os valores de TBARS foram maiores 96 horas após a colheita do leite, quando comparado aos tempos 0 e 24 horas (Figura 11).

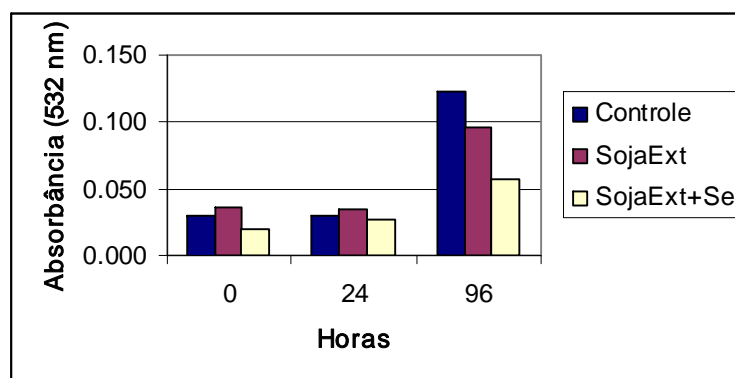


Figura 11. TBARS (Abs₅₃₂) analisado nos tempos 0, 24 e 96 horas após a colheita do leite de vacas recebendo as dietas experimentais

Os resultados obtidos estão de acordo com os observados por King (1962). O autor publicou os dados correlacionando os valores de TBARS (Abs₅₃₂) com

características organolépticas do leite e concluiu que valores de TBARS variando entre 0,010 e 0,023 não apresentaram “flavor” oxidado entre 0,024 e 0,029 apresentaram “flavor” oxidado questionável entre 0,030 e 0,040 apresentaram “flavor” oxidado leve entre 0,041 e 0,055, “flavor” oxidado forte, e, TBARS > 0,056, apresentaram “flavor” oxidado muito forte.

Os resultados encontrados na literatura são bastante variados, principalmente, pela diversidade de fontes lácteas utilizadas, e, pela unidade utilizada para expressar os resultados, dificultando a base de comparação.

De acordo com Stapefeld et al. (1997), os valores de TBARS (A_{532}) para leite em pó variaram entre 0,07 e 0,08, no tempo zero de armazenamento a 25°C. Em trabalho utilizando o queijo como parâmetro de análise, Kristensen e Skibsted (1999) observaram valores próximos de 0,02 unidades de absorbância para queijos armazenados a 5°C por

k

5 CONCLUSÕES

Vacas alimentadas com dieta contendo 21% de soja extrusada produziram leite com menor porcentagem de gordura e perfil modificado de ácidos graxos, com menor concentração de ácidos graxos saturados e maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados e ácido linoléico conjugado, no entanto, produziram um leite mais susceptível à oxidação. O enriquecimento do leite com selênio conseguiu minimizar este efeito influenciando positivamente a estabilidade do leite.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUGHAZALEH, A.A. SCHINGOETHE, D.J. HIPPEN, A.R. et al. Fatty acid profile of milk and rumen digesta from cows fed fish oil, extruded soybeans or their blend. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2266-2276, 2002.

ABUGHAZALEH, A.A. SCHINGOETHE, D.J. HIPPEN, A.R. et al. Feeding fish meal and extruded soybeans enhance conjugated linoleic acid (CLA) content of milk. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.624-631, 2002a.

ABUGHAZALEH, A.A. SCHINGOETHE, D.J. HIPPEN, A.R. Conjugated linoleic acid increases in milk when cows fed fish meal and extruded soybeans for an extended period of time. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p.1758-1766, 2004.

AL-MABRUK, R.M. BECK, N.F. DEWHURST, R.J. Effects of silage species and supplemental vitamin E on the oxidative stability of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 406-412, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 12 th ed. Washington, 1990.

ASHES, J.R. WELCH, P.ST.V. GULATI, S.K. et al. Manipulation of the fatty acid composition of milk by feeding protected canola seeds. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1090-1096, 1992.

AULDIST, M.J. COATS, S. ROGERS, G.L. et al. Changes in the compositional of milk from normal and mastitic dairy cows during the lactation cycle. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 35, p. 427-436, 1995.

AULDIST, M.J. HUBBLE, I.B. Effect of mastitis on raw milk and dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, p. 28-36, 1998.

BAER, R.J. LENTSCH, M.R. SCHINGOETHE, D.J. et al. Characteristics of milk and reduced fat cheddar cheese from cows fed extruded soybeans and niacin. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1127-1136, 1996.

BANKS, W. CLAPPERTON, J.L. KELLY, M.E. et al. The yield, fatty acid composition and physical properties of milk fat obtained by feeding Soya oil to dairy cows. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.31, p.638, 1980.

BAUMGARD, L.H. CORL, B.A. DWYER, D.A. et al. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Integrative Comp. Physiology**, v.278, p.R179-R184, 2000.

BAUMGARD, L.H. MATITASHVILI, E. CORL, B.A. et al. trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2155-2163, 2002.

BAUMGARD, L.H. SANGSTER, J.K. BAUMAN, D.E. Milk fat synthesis in dairy cows in progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). **The Journal of Nutrition**, v.131, p.1764-1768, 2001.

BEAM, T.M. JENKINS, T.C. MOATE, P.J. et al. Effect of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids on ruminal contents. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2564-2573, 2000.

BLOCK, E. Nutrição de vacas leiteiras e composição do leite. In: Simpósio Internacional sobre Qualidade do Leite, 2., 2000, Curitiba. **Anais**. Curitiba, 2000. p.85-88.

CHIN, S.F. LIU, J.M. STORKSON, Y.L. et al. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.5, p.185-197, 1992.

CHOUINARD, P.Y. BAUMAN, B.A. BAUMGARD, M.A. An update and conjugated linoleic acid. In: Cornell nutritional conference feed manufactory, 1999, Ithaca. **Proceedings**. Ithaca: Cornell University, 1999. p.93-101.

CHOUINARD, P.Y. CORNEAU, L. BAUMAN, D.E. et al. Milk yield and composition during abomasal infusion of CLA. **Journal of Dairy Science**, v.81 (Suppl.1), p.1385, 1998.

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

CLEGG, R.A. BARBER, M.C. ERNENS, L. et al. Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. **Livestock Production Science**, v.70, p.3-14, 2001.

CORL, B.A. BARBANO, D.M. BAUMAN, D.E. et al. cis-9 trans-11 CLA derived endogenously from trans-11 18:1 reduces cancer risk in rats. **The Journal of Nutrition**, v.133, p.2893-2900, 2003.

CORL, B.A. BAUMGARD, L.H. DWYER, D.A. et al. The role of delta-9-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA and other delta-9 desaturated fatty acids in milk fat. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.164, 2000, supplement 1.

DHIMAN, T.R. ANAND, G.R. SATTER, L.D. et al. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.2146-2156, 1999.

DHIMAN, T.R. HELMINK, E.D. McMAHON, D.J. et al. Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows fed extruded oilseeds. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.412-409, 1999a.

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

DUNCAN, S.E. CHRISTEN, G.L. PENFIELD, M.P. Rancid flavor of milk: relationship of acid degree value, free fatty acids and sensory perception. **Journal of Food Protection**, v.56, p.394-397, 1991.

DUNSHEA, T.R. WAGNER, D.G. YATES, L.D. et al. Dietary conjugated linoleic acid decrease back fat in finisher gilts. **Journal of Animal Science**. V.76, 1998, supplement 1.

FELLNER, V. SAUER, F.D. KRAMER, J.K.G. Steady-state rates of linoleic acid and biohydrogenation by ruminal bacteria in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.1815-1823, 1995.

FENG, S. LOCK, A.L. GARNSWORTHY, P.C. Technical note: a rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3785-3788, 2004.

FIORITE, J.A. KANUK, M.J. e SIMS, R.J. Chemical and organoleptic properties of oxidized fats. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 51, p.219-223, 1974.

FONSECA, L.F.L SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. 1. ed. São Paulo: Lemos, 2000.

FRANKEL, E. N. Review: Recent advances in lipid oxidation. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.54, p.495-511, 1991.

GAYNOR, P.J. ERDMAN, R.A. TETER, B.B. et al. Milk fat and composition during abomasal infusion of cis or trans octadecenoates in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.157-165, 1994.

GONTHIER, C. MUSTAFA, A.F. OUELLET, D.R. et al. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: effects on blood parameters and milk fatty acid composition. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.748-756, 2005.

GONZALEZ, S. DUNCAN, S.E. O'KEEFE, S.F. et al. Oxidation and textural characteristics of butter and ice cream with modified fatty acid profiles. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.70-77, 2003.

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

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

HAWKINS, G.E. CUMMINS, K.A SILVERIO, M. et al. Physiological effects of whole cottonseed in the diet of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.68, p.2608, 1985.

HINDERS, J. Additional research needed to increase milk protein through the ration. **Feedstuffs**, 1997.

HOFFMAN, G. Vegetable oils. *In*: Symposium of foods. 1962, Wesport. **Proceedings**. Westport: AVI Publishing Company Inc., 1962. p.215-226.

HUBER, W. MOLERO, A. PEREYRA, C. et al. Determination of cholesterol in milk by supercritical fluid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.715, p.333-336, 1995.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **International IDF standards**. 2th ed. Brussels, 1991.

IP, C. BANNI, S. ANGIONI, E. et al. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. **Journal of Nutrition**, v.129, p. 2135-2142, 1999.

IP, C. CHIN, S.F. SCIMECA, J.A. et al. Mammary cancer prevention by conjugated linoleic acid. **Cancer Research**, v.51, p.6118-6124, 1991.

IP, C. SINGH, J.A.M. THOMPSON, H.J. et al. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. **Cancer Research**, v.54, p.1212-1215, 1994.

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

JENSEN, R.G. FERRIS, A.M. LAMMI-KEEFE, C. Symposium: milk fat – composition, function and potential for change. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3228-3243, 1991.

JIANG, J. BJOERCK, L. FONDEN, R. et al. Occurrence of conjugated cis-9 trans-11 octadecadienoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.438-455, 1996.

JUNIPER, D.T. PHIPPIS, R.H. JONES, A.K. et al. Selenium supplementation of lactating cows: effects on selenium concentration in blood, milk, urine and feces. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p.3544-3551, 2006.

KAYLEGIAN, K.E. e LINDSAY, R.C. **Handbook of milk fat fractionation technology and application**. Champaign: AOAC Press, 1995.

KENASTON, C.B. WILBUR, K.M. OTTOLENGHI, A. et al. Comparison of methods for determining fatty acid oxidation produced by ultraviolet irradiation. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v. 32, p.33-35, 1955.

KELLY, M.L. BERRY, J.R. DWYER, D.A. et al. Dietary fatty acid sources affect conjugated linolenic acid concentrations in milk from dairy cows. **Journal of Nutrition**, v.128, p.881-885, 1998.

KENNELLY, J.J. GLIMM, D.R. The biological potential to alter the composition of milk. **Canadian Journal of Animal Science**, v.78, p.23-56, 1998.

KENNELLY, J.J. GLIMM, D.R. OZIMEK, L. Milk composition in the cow. In: Cornell nutrition conference, 61, 1999, Ithaca. **Proceedings**. Ithaca: Cornell University, 1999. p-1-21.

KHORASANI, P.H. ROBINSON, P.H. BOER, G. et al. Influence of canola fat on yield, fat percentage, fatty acid profile and nitrogen fractions in Holstein milk. **Journal of Dairy Science**, v.74, p. 1904-1911, 1991.

KIM, Y.K. SCHINGOETHE, D.J. CASPER, D.A. et al. Supplemental fat from extruded soybeans and calcium soap of fatty acids for lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.197-204, 1993.

KING, R.L. Oxidation of milk fat globule membrane material. I – Thiobarbituric acid reaction as a measure of oxidized flavor in milk and model systems. **Journal of Dairy Science**, p.1165-1171, 1962.

KOGUSI, H. KATO, T.e KIKUGAWA, K. Formation of yellow, orange and red pigment in the reaction of alk-2-enals with thiobarbituric acid. **Analytical Biochemistry**, v.165, p.456-464, 1987.

KRISTENSEN, D. HEDEGAARD, R.V. NIELSEN, J.H. et al. Oxidative stability of buttermilk as influenced by the fatty acid composition of cows' milk manipulated diet. **Journal of Dairy Research**, v. 71 , p.46-50, 2004.

KRISTENSEN, D. SKIBSTED, L.H. Comparison of three methods based on electron spin resonance spectrometry for evaluation of oxidative stability of processed cheese. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.47, p.3099-3104, 1999.

LABUZA, T.O. Oxidative changes in food at low and intermediate moisture levels. In: **Food Science and Technology**. New York: Academic Press, 1975, p.455-472.

LOCK, A.L. CORL, B.A. BARBANO, D.M. et al. The anticarcinogenic effect of trans-11 C18:1 in dependent on its conversion to cis-9 trans-11 CLA by delta-9-dessaturase in rats. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.2698-2704, 2004.

LOCK, A.L. TELES, B.M. PERFIELD, J.W. et al. A conjugated linoleic acid supplement containing trans-10 cis-12 reduces milk fat synthesis in lactating sheep. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1525-1532, 2006.

LOCK, A.L. TYBURCZY, C. DWYER, D.A. et al. Trans-10 octadecenoic acid does not reduce milk fat synthesis in dairy cows. **The Journal of Nutrition**, v.137, p.71-76, 2007.

LUCCI, C.S. MOXON, A.L. ZANETTI, M.A. et al. Selênio em Bovinos leiteiros do estado de São Paulo. I. Níveis de Selênio em soros sangüíneos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.21, p.65-70, 1984.

MACKLE, T. BAUMAN, D.E. Recent developments in the regulation of milk protein production. In: Cornell nutrition conference, 60, 1998, Ithaca. **Proceedings**. Ithaca: Cornell University, 1998. p. 104-112.

MANSON, L. AKESSON, B. Antioxidative factors in milk. **British Journal of Nutrition**, v.84 (Suppl.1), p.103, 2000.

MAIHARA, V.A. GONZAGA, I.B. SILVA, V.L. et al. Dily dietary selenium intake of selected population groups. **Journal of radioanalytical and nuclear chemistry**, v.259, p.465-468, 2004.

MEDEIROS, S.R. **Ácido linoléico conjugado: teores nos alimentos e seu uso no aumento da produção de leite com maior teor de proteína e perfil de ácidos graxos modificado**. Piracicaba, 2002. Dissertação (Doutorado) – ESALQ- Universidade de São Paulo, 2002.

MELTON, S.L. methodology for following lipid oxidation in muscle foods. **Food Technology**, v.37, p.105-116, 1983.

MUNIZ-NAVIERO, O. DOMINGUEZ-GONZALES, R. BERMEJO-BARRERA, A. et al. Study of the bioavailability of selenium in cows' milk after a supplementation of cow feed with different forms of selenium. **Analysis, Bioanalysis and Chemistry**, v.385, p.189-196, 2006.

MUNIZ-NAVIERO, O. DOMINGUES-GONZALES, R. BERMEJO-BARRERA, A. et al. Selenium contents and distribution in cows' milk supplemented with two dietary selenium sources. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.53, p.9817-9822, 2005.

MURPHY, J. J. McNEILL, G.P. CONOLLY, J.F. et al. Effect on cow performance and milk fat composition of including full fat soybeans and rapeseeds in the concentrate mixture for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Research**, v.57, p.295, 1990.

NATZKE, R.P. Elements of mastitis control. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.1431-1442, 1981.

NICHOLSON, J.W.G. LAURENT, A.M. MC QUEEN, R.E. et al. The effect of feeding organically bound selenium and alfa-tocopherol to dairy cows on the susceptibility of milk to oxidation. **Canadian Journal of Animal Science**, v.71, p.135-143, 1991.

National Research Council. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7th ed. Washington D.C: National Academy Press, 2001.

OLSON, O.E. PALMER, L.S. CARY, E.L. Modification of the official Fluorimetric method for selenium in plants. **Journal AOAC**, v.58, p.117-121, 1975.

PALMQUIST, S.J. MATTOS, W. Turnover of lipoproteins and transfer to milk fat of dietary (l-carbon-14) linoleic acid in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.61, p.561, 1978.

PETERSON, D.G. MATITASHVILI, E.A. BAUMAN, D.E. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased trans-10 cis-12 in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. **The Journal of Nutrition**, v.133, p.3098-3102, 2003.

PETERSON, D.G. MATITASHVILI, E.A. BAUMAN, D.E. The inhibitory effect of trans-10 cis-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.2523-2527, 2004.

PIPEROVA, L.S. TETER, B.B. BRUCKENTAL, I. et al. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat depressing diet. **Journal of Nutrition**, v.130, p.2568-2574, 2000.

RAMASWAMY, N. SCHINGOETHE, D.J. HIPPEN, A. et al. Composition and flavor of milk and butter from cows fed fish oil, extruded soybeans, or their combination. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2144-2151, 2001.

ROSSELL, J.B. Measurement of rancidity. In: **Rancidity in foods**. Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1989. p. 23-30.

SALDANHA, T. MAZALI, M.R. BRAGAGNOLO, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, p.109-113, 2004.

SANTOS, F.L., SILVA, M.T.C., LANA, R.P. et al. Efeito da suplementação de lipídios na ração sobre a produção de ácido linoléico conjugado (CLA) e a composição da gordura do leite de vacas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1931-1938, 2001.

SAS Institute SAS/STAT™. **Guide for personal computers**. Cary: SAS Institute Inc, 2000.

SCHAUFF, D.J. CLARK, J.H. DRACKLEY, J.K. Effects of feeding lactating dairy cows diets containing extruded soybeans and calcium salts of long-chain fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.3030-3019, 1992.

SCHINGOETHE, D.J. BROUK, M.J. LIGHTFIELD, K.D. et al. Lactational responses of dairy cows fed unsaturated fat from extruded soybeans or sunflower seeds. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1244-1249, 1996.

SCHMIDELY, P. MORAND-FEHR, P. SAUVANT, D. Influence of extruded soybeans with or without bicarbonate on milk performance and fatty acid composition of goat milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p.757-765, 2005.

SHANTA, N.C. DECKER, E.A. Conjugated linoleic acid concentrations in processed cheese containing hydrogen donors, iron and dairy-based additives. **Food Chemistry**, v.47, p.257-261, 1994.

SILVA, D.J. QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos – Métodos químicos e biológicos**. 2 ed. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 2005.

SOLOMON, R. CHASE, L.E. BEM-GHEDALIA, D. et al. The effect of nonstructural carbohydrate and addition of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1322-1329, 2000.

STAPEFELD, H. NIELSEN, B.R. SKIBSTED, L.H. Effect of heat treatment, water activity and storage temperature on the oxidative stability of whole milk powder. **International Dairy Journal**, v7, p.331-339, 1997.

SURAI, P.F. **Selenium in nutrition and health**. 1th ed. United Kingdom: Nottingham University Press, 2006.

TIMMONS, J.S. WEISS, W.P. PALMQUIST, D, L. et al. Relationships among dietary roasted soybeans, milk components and spontaneous oxidized flavor of milk. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2440-2449, 2001.

UNDERWOOD, E.J. SUTTLE N.M

= eo

WEISS, W.P. HOGAN, J.S. SMITH, K.L. et al. Relationship among Selenium, Vitamin E and mammary gland health in commercial dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.381-390, 1990.

WHITLOCK, L.A. SCHINGOETHE, D.J. HIPPEN, A.R. et al. Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acid in milk of dairy cows more than when fed separately. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.234-243, 2002.

YURAWECZ, M.P. KRAMER, J.K.G. MOSSOBA, M.M. et al. Analytical methodology for CLA. In: International conference on CLA, 1., 2001, Alesund. **Proceedings**. Alesund, 2001. p. 14.

ZANETTI, M.A. CUNHA, J.A. Efeitos de diferentes níveis de Selênio orgânico e Inorgânico sobre os teores séricos do mineral. *In*: Reunião Anual da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 29., 1992, Lavras. **Anais**. São Paulo, 1992. p.488.

ZANETTI, M.A. CUNHA, J.A. Estimativa da biodisponibilidade de fontes orgânicas e inorgânicas de selênio. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.26, p.623-627, 1997.