

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**BIOHIDROGENAÇÃO MICROBIANA E O FLUXO
DUODENAL DE ÁCIDOS GRAXOS DO RUMEN EM
NOVILHOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM
FONTES LIPÍDICAS EM DIETAS CONTENDO
GLICERINA**

Arturo Samuel Gómez Insuasti

Zootecnista

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**BIOHIDROGENAÇÃO MICROBIANA E O FLUXO
DUODENAL DE ÁCIDOS GRAXOS DO RUMEN EM
NOVILHOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM
FONTES LIPÍDICAS EM DIETAS CONTENDO
GLICERINA**

Arturo Samuel Gómez Insuasti

**Orientadora: Profa. Dra. Telma Teresinha Berchielli
Co-orientador: Dr. Bruno Ramalho Vieira**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

2015

G633b Gómez Insuasti, Arturo Samuel
Biohidrogenação microbiana e o fluxo duodenal de ácidos graxos do rumen em novilhos de corte suplementados com fontes lipídicas em dietas contendo glicerina / Arturo Samuel Gómez Insuasti. -- Jaboticabal, 2015
xix, 153 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientadora: Telma Teresinha Berchielli

Coorientador: Bruno Ramalho Vieira

Banca examinadora: Mário de Beni Arrigoni, Wilson Roberto Soares Mattos, Izabelle Auxiliadora M. de Almeida Teixeira, Otávio Rodrigues Machado Neto

Bibliografia

1. Ácido esteárico. 2. Ácido linoléico. 3. Ácido vaccênico. 3. Glicose. 4. Metabólitos sanguíneos. 5. Triglicéridos.. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.085.2:636.2

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

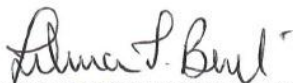
TÍTULO: BIOHIDROGENAÇÃO MICROBIANA E O FLUXO DUODENAL DE ÁCIDOS GRAXOS DO RUMEN EM NOVILHOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM FONTES LIPÍDICAS EM DIETAS CONTENDO GLICERINA

AUTOR: ARTURO SAMUEL GÓMEZ INSUASTI

ORIENTADORA: Profa. Dra. TELMA TERESINHA BERCHIELLI

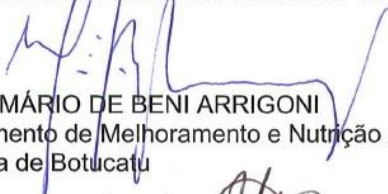
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. BRUNO RAMALHO VIEIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA , pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. TELMA TERESINHA BERCHIELLI

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



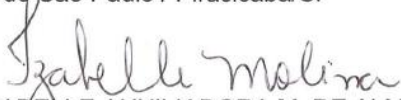
Prof. Dr. MÁRIO DE BENI ARRIGONI

Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu



Prof. Dr. WILSON ROBERTO SOARES MATTOS

Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP



Profa. Dra. IZABELLE AUXILIADORA M. DE ALMEIDA TEIXEIRA

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. OTÁVIO RODRIGUES MACHADO NETO

Departamento de Produção Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Data da realização: 30 de junho de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ARTURO SAMUEL GÓMEZ INSUASTI. Filho de Hilbrando Augusto e Fredesminda Insuasti Zamora, nascido em 12 de junho de 1970, natural da cidade San Juan de Pasto, Nariño, Colômbia. Em maio de 1994 graduou-se em Zootecnia pela Faculdade de Ciências Pecuárias da Universidade de Nariño, UDENAR, Colômbia; obteve o título de Especialista em Docência Universitária, em 2002, pela Universidade de Nariño, UDENAR, Colômbia; Obteve o título de Mestre em Ciências Agrárias com ênfase Produção Animal Tropical, pela Universidade Nacional de Colombia, campus Palmira. Ingressou no curso de Doutorado no programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, câmpus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil em agosto de 2011, sob orientação da Professora Dra. Telma Teresinha Berchielli e co-orientação do Dr. Bruno Ramalho Vieira. Em maio de 2011, lhe foi concedido pelo programa PAEDEX (Programa de Apoio a Estudantes de Doutorado do Exterior) da Pró-reitoria de Pós-graduação da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, São Paulo, uma bolsa de estudos no período (08/2011-04/2013), e a partir de maio de 2013 lhe foi concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Fapesp, uma bolsa de estudos para continuar estudos de doutorando na mesma Universidade, período (05/2013 – 06/2015).

Foi professor Auxiliar na Universidade de Nariño, Universidade do Cauca e da Fundação Universitaria San Martin, todas no país do origem. Também, desempenhou função como Director da Secretaría de Agricultura do Município La Florida, Nariño, Colômbia, em dois períodos (2001-2002 e 2008-2010).

*Nosso futuro depende inteiramente do conhecimento e como tiramos
proveito dele, e assim garantir um mundo melhor para
nossas novas gerações*

Adaptado de Carl Sagan

*Não é que não sejamos nada,
somos pequenos em tamanho ante um universo imenso.
No entanto, nosso cérebro tem um grande poder de raciocinar,
o que tem permitido descobrir a imensidade do universo
e conseguir compreender a sua complexidade.
A perfeição não existe como tal,
as transformações nos permitem evoluir e seguir na frente,
e é aqui onde está o sentido da vida.
Simplifica tua vida, tenta ser Feliz.*

Arturo Samuel Gómez Insuasti

OFEREÇO

A meus pais Fredesminda Insuasti Zamora e Augusto Hildebrando Gómez Bastidas e aos meus filhos Miguel Arturo e Daniel Alejandro Gómez Gómez, por estarem ao meu lado com amor incondicional, enfrentando o difícil trecho da separação que levou alcançar esta nova etapa de minha vida!

DEDICO

A meus irmãos Alvaro Augusto, Bolivar Alfredo, Jorge Laureano, Yomaira, e Patricia, e *in memoriam* de meus irmãs Luz Marina e Alexander pois sei que estariam orgulhosos. Aos demais integrantes da minha família, em especial minha tia Irma e Arturo Ortiz. Dedico também a Juliana Morais Boldini, uma pessoa muito especial pelo significado na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus irmãos e meus filhos por estarem do meu lado, pelo amor incondicional e por serem tudo na minha vida;

À FCAV-UNESP – Câmpus de Jaboticabal, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso, e ao Programa de Apoio a Estudantes estrangeiros de Doutorado (PAEDEX) da UNESP que me permitiu estar aqui.

À Professora Dr^a. Telma Teresinha Berchielli pela orientação, ensinamentos, confiança e pela oportunidade de trabalhar na sua equipe de pesquisa.

A meu co-orientador Bruno Ramalho Vieira, pelos conselhos, confiança e pelo amigo que se tornou.

Aos professores da FCAV-UNESP, aos quais tive a oportunidade de participar de suas disciplinas, pela excelência no ensino da Zootecnia.

Aos membros da banca de Qualificação e a defesa de Tese, pelas suas sugestões e considerações feitas.

Aos integrantes da equipe liderada pela professora Telma, pelo apoio nas diferentes etapas de condução desse trabalho.

Aos funcionários da FCAV-UNESP, aos quais tive a oportunidade de trabalhar e que contribuíram na realização deste trabalho.

Aos meus amigos Ivania, Lina Maria, Yury, Adriana, Dora, Hernando, Alisson Qurtinho, Luis Gabriel, Luis Gustavo (Belo), Lucas, Alvaro Maquez, Jesus Henrriques e a Maria Rita (Mãe de Juliana B); e a Juliana Boldini Moraes por seu amor e apoio.

FAPE P, pela concessão da bolsa de doutorado Processo 2012/23949-3) e auxílio à pesquisa (Processo 2011/00060-8).

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e sucesso deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii

	Página
CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1 Generalidades.....	2
2.2 A glicerina na alimentação do ruminante.....	3
2.3 Os lipídios na dieta do ruminante.....	6
2.3.1 Aspectos gerais dos lipídios.....	6
2.3.2 Suplementação lipídica na alimentação do ruminante.....	6
2.3.3 Efeitos dos lipídios na fermentação ruminal.....	10
2.4 Processo da lipólise e biohidrogenação no rumen.....	15
2.5 <i>Produção de metano, CO₂ e N₂O</i>	19
2.6 Fluxo e digestão intestinal de lipídios.....	20
2.7 Absorção intestinal e sínteses dos lipídios.....	23
3. Objetivos gerais.....	25
4. Referências.....	25
CAPÍTULO 2. FONTES DE ÓLEO DE SOJA EM ASSOCIAÇÃO COM GLICERINA AFETA O CONSUMO, DIGESTIBILIDADE DA MATÉRIA SECA E PARÂMETROS FERMENTATIVOS EM NOVILHOS NELORE	39
RESUMO.....	39
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1 Local e instalações.....	42
2.2 Animais e período experimental.....	42
2.3 Dietas experimentais e análise de alimentos da dieta.....	43
2.4 Coleta de amostras.....	43
2.4.1 Coleta das amostras de alimento, sobras e fezes.....	43
2.4.2 Coleta de amostras do líquido do rumen e conteúdo duodenal.....	44
2.4.3 Coletas de urina.....	44
2.5 Análises laboratoriais.....	44
2.5.1 Análises químico de alimento, sobras e fezes.....	44
2.5.2 Consumo e digestão total da matéria seca e dos nutrientes.....	47
2.5.3 Estimativa da digestão ruminal e intestinal da matéria seca e de nutrientes.....	47
2.5.4 Avaliações dos parâmetros ruminais.....	49
2.5.5 Produção de proteína microbiana no rumen.....	49

2.5.6 Cálculo do balanço de nitrogênio.....	50
2.6 Delineamento experimental e análise estatística.....	51
3. RESULTADOS.....	52
3.1 Consumo de matéria seca e nutrientes.....	52
3.2 Digestibilidade da matéria seca e nutrientes.....	54
3.3 Parâmetros ruminais.....	57
3.4 Síntese de proteína microbiana no rumen e fluxo ruminal de proteína.....	63
3.5 Balanço de nitrogênio.....	64
4. DISCUSSÃO.....	66
4.1 Consumo e digestibilidade.....	66
4.2 Parâmetros ruminais.....	69
4.3 Síntese de proteína microbiana.....	72
4.4 Balanço de nitrogênio.....	75
5. CONCLUSÕES.....	76
6. REFERÊNCIAS.....	76

CAPÍTULO 3. FONTES DE ÓLEO DE SOJA EM ASSOCIAÇÃO COM GLICERINA AFETA A EFICIÊNCIA DA BIOHIDROGENAÇÃO E FLUXO RUMINAL DE ÁCIDOS GRAXOS EM NOVILHOS DA RAÇA NELORE

RESUMO.....	83
1. INTRODUÇÃO.....	84
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	85
2.1 Local e instalações.....	85
2.2 Animais e período experimental.....	86
2.3 Diestas experimentais e análise de alimentos da dieta.....	86
2.4 Coleta de amostras.....	87
2.4.1 Coleta das amostras de alimento, sobras e fezes.....	87
2.4.2 Coleta de amostras do líquido do rumen e conteúdo duodenal	88
2.4.3 Coleta de amostras do plasma sanguíneo.....	89
2.5 Análises laboratoriais	90
2.5.1 Análise de ácidos graxos de cadeia longa.....	90
2.5.2 Estimativa da taxa de passagem de ácidos graxos e extensão da biohidrogenação em rumen.....	91
2.5.3 Análise de parâmetros sanguíneos.....	92
2.6 Delineamento experimental e análise estatística.....	92
3. RESULTADOS.....	93
3.1 Consumo e concentrações no rumen dos ácidos graxos.....	93
3.2 Biohidrogenação e fluxo ruminal de de ácidos graxos.....	98
3.3 Análise de parâmetros sanguíneos.....	103
4. DISCUSSÃO.....	106
4.1 Consumo e concentrações no rumen dos ácidos graxos.....	106
4.2 Biohidrogenação e fluxo ruminal de ácidos graxos.....	110
4.3 Parâmetros sanguíneos.....	113
5. CONCLUSÕES.....	115
6. REFERÊNCIAS.....	116

CAPÍTULO 4. FONTES DE ÓLEO DE SOJA EM ASSOCIAÇÃO COM GLICERINA AFETAM A EFICIÊNCIA DA BIOHIDROGENAÇÃO E PRODUÇÃO DE METANO E CO₂ EM DIETAS PARA BOVINOS DE CORTE AVALIADAS *In Vitro* 119

RESUMO.....	119
1. INTRODUÇÃO.....	120
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	123
2.1 Local e instalações.....	123
2.2 Coletas do líquido ruminal.....	123
2.3 Incubação in vitro.....	124
2.4 Análises laboratoriais.....	126
2.4.1 Produção de gases.....	126
2.4.2 Produção de ácidos graxos.....	127
2.5 Delineamento experimental e estatístico.....	129
3. RESULTADOS.....	130
3.1 Produção de gases.....	130
3.2 Análises de ácidos graxos.....	132
4. DISCUSSÃO.....	143
4.1 Produção de gases.....	143
4.2 Perfil e cinética dos ácidos graxos.....	145
5. CONCLUSÕES.....	149
6. REFERÊNCIAS.....	149

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2. FONTES DE ÓLEO DE SOJA EM ASSOCIAÇÃO COM GLICERINA AFETA O CONSUMO, DIGESTIBILIDADE DA MATÉRIA SECA E PARÂMETROS FERMENTATIVOS EM NOVILHOS NELORE	39
Tabela 1. Ingredientes e composição de nutrientes das dietas experimentais.....	46
Tabela 2. Consumo da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, FDNcp, carboidratos totais, carboidratos não fibrosos (kg/dia), e consumo de energia bruta (Mcal/dia), em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore....	53
Tabela 3. Digestibilidade ruminal e intestinal estimada, e digestibilidade total de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, FDNcp, carboidratos totais, carboidratos não fibrosos, e energia bruta, em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore.....	55
Tabela 4. Valores médios diários do pH, produção de N-NH ₃ e da concentração de ácidos acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, a proporção acético:propiônico (C2:C3), e soma total dos ácidos C2+C3+C4 no líquido ruminal, em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore.....	58
Tabela 5. Síntese ruminal de proteína microbiana (SRPM), fluxo ruminal de proteína não microbiana (FRPNM), digestibilidade de matéria orgânica aparente fermentada no rumen (DMOFR), e eficiência de síntese nitrogênio microbiano (ESNM) em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore....	64
Tabela 6. Balanço de nitrogênio (g/dia) em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore.....	65
 CAPÍTULO 3. FONTES DE ÓLEO DE SOJA EM ASSOCIAÇÃO COM GLICERINA AFETA A EFICIÊNCIA DA BIOHIDROGENAÇÃO E FLUXO RUMINAL DE ÁCIDOS GRAXOS EM NOVILHOS DA RAÇA NELORE	 83
Tabela 1. Ingredientes e composição de nutrientes das dietas experimentais.....	87

Tabela 2. Perfil e conteúdo de ácidos graxos das dietas experimentais para novilhos Nelore.....	94
Tabela 3. Consumo de ácidos graxos (g/dia) em dietas com fontes de óleo de soja em associação com glicerina para novilhos Nelore.....	95
Tabela 4. Estimação da concentração de ácidos graxos (g/dia) no rumen e taxa de rotatividade em dietas com fontes de óleo de soja em associação com glicerina para novilhos Nelore.....	96
Tabela 5. Taxa de passagem e desaparecimento de ácidos graxos no rumen em dietas com fontes de óleo de soja em associação com glicerina para novilhos Nelore.....	99
Tabela 6. Taxa e extensão da biohidrogenação em dietas com fontes de óleo de soja em associação com glicerina para novilhos Nelore.....	100
Tabela 7. Fluxo ruminal de ácidos graxos que atingem o duodeno em dietas com fontes de óleo de soja em associação com glicerina para novilhos Nelore.....	101
CAPÍTULO 4. FONTES DE ÓLEO DE SOJA EM ASSOCIAÇÃO COM GLICERINA AFETAM A EFICIÊNCIA DA BIOHIDROGENAÇÃO E PRODUÇÃO DE METANO E CO₂ EM DIETAS PARA BOVINOS DE CORTE AVALIADAS <i>In Vitro</i>	119
Tabela 1. Ingredientes e composição de nutrientes das dietas experimentais.....	125
Tabela 2. Efeito dos tratamentos e dos horários nos valores médios da produção de gases, porcentagem de metano, dióxido de carbono e óxido nítrico, em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliadas <i>in vitro</i>	131
Tabela 3. Perfil e quantidade dos ácidos graxos encontrados nas garrafas incubadoras para o tempo t_0 de acordo a dieta em mg/L em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliada <i>in vitro</i>	134
Tabela 4. Efeito da interação dos tratamentos nos horários em relação as concentrações médias (mg/L) da produção de ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9c), ácido linoléico (C18:2n6c) e ácido linolênico (C18:3n9c) em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliadas <i>in vitro</i>	136

Tabela 5. Efeito dos horários de incubação em relação as concentrações (mg/L) dos ácido palmítico (C16:0) e ácidos graxos com dezoito carbonos em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliadas <i>in vitro</i>	137
Tabela 6. Efeito da interação dos tratamentos nos horários em relação as concentrações médias (mg/L) da produção de ácido ácido vaccênico (C18:1-tras-11) em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliadas <i>in vitro</i>	138
Tabela 7. Efeito dos horários na formação de ácido esteárico, vaccênico e a taxa e eficiência da biohidrogenação do ácido oleico, linoléico e linolenico em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliada <i>in vitro</i>	139
Tabela 8. Efeito dos tratamentos em seus repetitivos horários na taxa de formação do ácido esteárico e o ácido vaccênico em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliada <i>in vitro</i>	140
Tabela 9. Efeito dos tratamentos na taxa de biohidrogenação do ácido oleico, ácido linoléico e ácido linolenico com relação aos horários em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliada <i>in vitro</i>	142
Tabela 10. Efeito dos tratamentos na eficiência da biohidrogenação do ácido oleico, ácido linoléico e ácido linolenico em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliada <i>in vitro</i>	143

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2. FONTES DE ÓLEO DE SOJA EM ASSOCIAÇÃO COM GLICERINA AFETA O CONSUMO, DIGESTIBILIDADE DA MATÉRIA SECA E PARÂMETROS FERMENTATIVOS EM NOVILHOS NELORE	39
Figura 1. Valores médios de pH do líquido ruminal, amostras feitas em diferentes horas do dia, em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore.....	59
Figura 2. Valores médios das concentrações ruminais de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃) (mg/dL) em diferentes tempos de amostragem, em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore....	59
Figura 3. Médias da concentração (mmol/mL) dos ácidos graxos de cadeia curta acético, propionato e butírico nos diferentes horários do dia (h), em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore.....	60
Figura 4. Médias da soma total dos ácidos graxos C2+C3+C4 e a proporção acético:propiónico (C2:C3) nos diferentes horários do dia (h), em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore.....	61
Figura 5. Médias da concentração (mmol/mL) dos ácidos graxos de cadeia curta (isobutírico, valérico e isovalérico) em diferentes horários do dia (h) em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore.....	62
CAPÍTULO 3. FONTES DE ÓLEO DE SOJA EM ASSOCIAÇÃO COM GLICERINA AFETA A EFICIÊNCIA DA BIOHIDROGENAÇÃO E FLUXO RUMINAL DE ÁCIDOS GRAXOS EM NOVILHOS DA RAÇA NELORE	83
Figura 1. Concentrações sanguíneas de glicose, triglicérides, colesterol total e lipoproteínas de alta, média e muito baixa densidade (HDL, LDL e VLDL) realizadas em dois horários (07:00 e 13:00 h) em função da fonte de óleo de soja em dietas para novilhos Nelore.....	104
Figura 2. Concentrações sanguíneas de albumina, uréia, AST/GOT e GGT. Realizadas em dois horários (07:00 e 13:00 h) em função da fonte de óleo de soja em dietas para novilhos Nelore.....	106

CAPÍTULO 4. FONTES DE ÓLEO DE SOJA EM ASSOCIAÇÃO COM GLICERINA AFETAN A EFICIÊNCIA DA BIOHIDROGENAÇÃO E PRODUÇÃO DE METANO E CO₂ EM DIETAS PARA BOVINOS DE CORTE AVALIADAS <i>In Vitro</i>	119
Figura 1. Desenho da disposição das garrafas nos diferentes tratamentos e horários e as garrafas em branco para a incubação <i>in vitro</i> , T: os tratamentos, LR: líquido ruminal.....	124
Figura 2. Evolução do pH durante a incubação <i>in vitro</i> , avaliando dietas com diferentes fontes de lipídio em associação com glicerina.....	130
Figura 3. Produção total de gás (mL), produção de metano (mL), e produção de dióxido de carbono (%) <i>in vitro</i> , em diferentes tempos de incubação, contendo dietas com diferentes fontes de lipídios em associação com glicerina <i>in vitro</i>	132
Figura 4. Perfil e quantidade de ácidos graxos de dezoito carbonos formados durante o período de incubação, em dietas com diferentes fontes de lipídios em associação com glicerina avaliadas <i>in vitro</i>	135



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 021119/11 do trabalho de pesquisa intitulado "Balanço de gases de efeito estufa e estratégias de mitigação em pastos de *Brachiaria* submetidos a diferentes manejos", sob a responsabilidade da Profª. Drª. Telma Teresinha Berchielli está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de Outubro de 2011.

Jaboticabal, 11 de Outubro de 2011.



Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA



Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

BIOHIDROGENAÇÃO MICROBIANA E O FLUXO DUODENAL DE ÁCIDOS GRAXOS DO RUMEN EM NOVILHOS DE CORTE SUPLEMENTADOS COM FONTES LIPÍDICAS EM DIETAS CONTENDO GLICERINA

RESUMO: As avaliações deste trabalho foram feitas *in vivo* e *in vitro*. O objetivo do trabalho *in vivo* foi avaliar o efeito de fontes de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para ruminantes sobre a fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana, eficiência da biohidrogenação ruminal e fluxo ruminal de ácidos graxos. Oito novilhos da raça Nelore, com peso inicial de $554,13 \pm 36,35$ kg e idade média de 30 meses, com cânula ruminal e duodenal, foram alimentados com dietas contendo glicerina (100 g/kg MS) e fontes de óleo de soja (50 g/kg MS). Foram fornecidas quatro tipos de dietas com proporção forragem:concentrado (30:70), silagem de milho foi fornecida como volumoso, e o concentrado diferenciado pela fonte de óleo de soja: 1) dieta controle CO; 2) dieta com soja grão SG; 3) dieta com óleo de soja OS; e 4) dieta com gordura protegida comercial GP. Os animais foram divididos em dois quadrados latinos 4x4, com quatro períodos experimentais de 16 dias cada. As médias foram submetidas à análise de contrastes ortogonais. O uso de fontes de óleo de soja (5% EE) em associação com glicerina (100 g/kg MS) não afeta o consumo da MS, mas sim a digestibilidade da MS, FDN_{cp} e EE; não resultando em mudanças no pH ruminal e nas concentrações dos ácidos graxos de cadeia curta. Não houve redução na produção de acetato (65,63 Mm/L), mas a produção de propionato foi incrementada (40,02 Mm/L) possivelmente pela inclusão da glicerina, provocando redução na relação acetato:propionato (1,69). A eficiência da síntese de nitrogênio microbiana foi favorecida para a dieta OS (15,14 g N-Mc/kg de MOAFN). O nitrogênio retido no tecido foi maior na dieta SG (46,74%). Os tratamentos afetaram as concentrações e o perfil dos ácidos graxos no rumen e o fluxo ruminal de ácidos graxos. A taxa de passagem para o ácido linoléico foi afetada com o menor valor para OS e maior valor para SG e GP; no entanto, a taxa de biohidrogenação para o ácido linoléico e ácido linolenico foi maior para OS. A maior eficiência da biohidrogenação do ácido oleico e o ácido linoléico foi para OS. O maior fluxo de ácido esteárico foi para OS, mesmo assim, apresentou o maior fluxo de ácido vaccênico; os maiores fluxos do ácido linoléico e ácido linolenico foram para o GP. Os metabólitos sanguíneos avaliados foram

afetados pelas dietas, mas, estiveram dentro da faixa de salubridade para este tipo de animais. No entanto, sugere-se que o uso de fontes de óleo de soja em relação a 5% de EE e em associação com glicerina (100 g/kg MS) pode ser utilizado em rações estratégicas para ruminantes, sendo importante levar em consideração a forma como o lipídio está disponível na fonte, influenciando na eficiência de alguns parâmetros da fermentação ruminal, a digestibilidade de nutrientes e a modificação da quantidade e qualidade dos ácidos graxos no rumen e o fluxo que atingiu o duodeno. No trabalho *in vitro*, estimou-se o taxa e a eficiência da biohidrogenação e a produção de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂). Foram avaliadas cinco dietas para ruminantes diferenciadas pela fonte de lipídio em associação com glicerina (100 g/kgMS): 1) óleo de soja (OS), 2) gordura protegida (GP), 3) ácido linoléico puro (AL), 4) ácido linolenico puro (ALN), 5) e controle (CO). Nove novilhos da raça Nelore foram utilizados como doadores do líquido ruminal, que foram alimentados com uma dieta (volumoso:concentrado 30:70). O líquido ruminal foi recolhido após 15 dias de adaptação. Foram três dias de coletas. Foram avaliados seis tempos de incubação (0:00, 1:00, 5:00, 12:00, 24:00 e 36:00 horas). A proporção total de gases em média para o tratamento foi afetada pela associação do lipídio com a glicerina. Houve efeito dos tratamentos na porcentagem da produção de CH₄ e CO₂, sendo os tratamentos ALN, AL e OS que apresentaram a menor concentração de CH₄ (15,3%; 15,2% e 16,7%), respectivamente; e a menor concentração de CO₂ foi para AL e OS (24,6% e 25,0%), respectivamente. A produção dos ácidos esteárico, oleico, linoléico, linolenico e o vaccênico foi influenciada pelos tratamentos e pelos horários. A taxa de biohidrogenação para os ácidos graxos é maior nas primeiras horas de incubação. Conseguiu-se estabelecer que os lipídios na forma de gordura protegida não garantem a inibição do processo de biohidrogenação. No entanto, o efeito associativo do uso da glicerina com o óleo de soja na forma não protegida permite reduzir a eficiência da biohidrogenação e garantir a diminuição de CH₄ e CO₂.

Palavras-chaves: ácido esteárico, ácido linoléico, ácido vaccênico, glicose, metabólitos sanguíneos, triglicérides.

BIOHYDROGENATION MICROBIAL AND THE DUODENAL FLUX OF FATTY ACID RUMINAL ON BEEF STEERS SUPPLEMENTS WITH LIPID SOURCES IN DIETS THAT CONTAIN GLYCERIN.

SUMMARY: Evaluations of this work were done in vivo and in vitro. The purpose of the in vivo study was to evaluate the effect of soybean oil sources in combination with glycerin in diets for ruminants in ruminal fermentation, microbial protein synthesis, ruminal efficiency and intestinal flow of fatty acids. Eight steers Nellore, with initial weight of $554.13 \pm 36,35$ kg and average age of 30 months, with ruminal and duodenal cannulas were fed diets containing glycerol (100 g/kg DM) and soybean oil sources (50 g/kg DM). Were provided four types of diets with proportion to forage:concentrate (30:70), corn silage was provided as roughage, and the concentrate was different soybean oil sources: 1) control diet CO; 2) diet with soybean GS; 3) diet with soybean oil OS; and 4) diet with commercial protected fat GP. The animals were divided into two Latin squares 4x4, with four experimental periods of 16 days each. Means were submitted to analysis of orthogonal contrasts. The use of soybean oil sources (5% EE) in combination with glycerin (100 g/kg DM) does not affect the consumption of MS, but the DM, FDNap and EE; not resulting in changes in rumen pH and concentrations of short-chain fatty acids. There was no reduction in the production acetate (65.63 Mm/L), but propionate production was increased (40.02 Mm/L) possibly due to the inclusion of glycerin, causing reduction in acetate: propionate ratio (1.69). The efficiency of microbial nitrogen synthesis was enhanced for diet OS (15.14 g N-Mc/kg MOAFR). Nitrogen retained in the tissue was greater in the diet SG (46.74%). The treatments affected the concentration and profile of fatty acids in the rumen and ruminal flow of fatty acids. The pass rate for linoleic acid was affected with the lowest value for OS and greater value for GS and GP; however, the biohydrogenation rate for linoleic and linolenic acid was higher for. The greater efficiency of the biohydrogenation of linoleic acid and oleic acid was to OS. The higher stearic acid flow was for OS nevertheless had the highest vaccenic acid stream; the largest flow of linoleic acid and linolenic acid went to the GP. The evaluated blood metabolites were affected by the diets, but were within the health range for this type of animal. However, it is suggested that the use of soybean oil sources with respect to 5% EE, and in combination with glycerin (100 g/kg DM)

can be used in strategies for ruminants, it is important to take into account how the lipid is available at the source, influencing the efficiency of some parameters of ruminal fermentation, digestibility of nutrients and modifying the quantity and quality of fatty acids in the rumen and flow that reached the duodenum. In vitro study, it estimated the rate and efficiency of biohydrogenation and the production of methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂). Five diets were evaluated for ruminants with different oil sources in combination with glycerin (100 g/kgDM): 1) soybean oil (SO), 2) protected fat (GP), 3) pure linoleic acid (AL), 4) pure linolenic acid (ALN), and 5) control (CO). Nine bulls Nelore were used as donors of rumen fluid, which received a diet (forage:concentrate, 30:70). The ruminal content was collected after 15 days of adaptation. The three days of collection. We evaluate six incubation times (0:00, 1:00, 5:00, 12:00, 24:00 and 36:00 hours). The proportion of the total gases in average for the treatment was affected by association with lipids or glycerol. Treatment effects in the percentage of the production of CH₄ and CO₂, the ALN treatments AL and OS had the lowest concentration of CH₄ (15.3%, 15.2% and 16.7%), respectively; and the lowest concentration of CO₂ was for LA and OS (24.6% and 25.0%), respectively. The production of stearic, oleic, linoleic, linolenic and vaccenic acids was influenced by treatment and by incubation times. The biohydrogenation rate for the fatty acids is higher in the early hours of incubation. There was an interaction effect treatments for times in biohydrogenation efficiency of linolenic acid, and no interaction effect for biohydrogenation of linolenic acid. It could be established that the lipids in the form of protected fat does not guarantee the inhibition of biohydrogenation process. However, the associative effect of the use of glycerol with soybean oil allows reducing the efficiency of biohydrogenation and can ensure the decrease of CH₄ and CO₂.

Keywords: blood metabolites, glucose, stearic acid, linoleic acid, triglycerides vaccenic acid.

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

O aumento no requerimento mundial de alimento para a população humana tem com exigência a busca por sistemas de produção mais eficientes, visando assim, estratégias de aumento na produtividade e redução do impacto ambiental. Desta forma, melhorar a eficiência de uso dos nutrientes pelo ruminante é uma estratégia importante para o aumento da produtividade além de permitir uma produção sustentável. Nesse sentido, o uso de resíduos agroindustriais com potencial energético na alimentação de ruminantes tem sido amplamente estudado, como é o caso da glicerina (MACH et al., 2009; PARSONS et al., 2009; SILVA, 2013) e dos lipídios (Van SOEST et al., 1994; ZINN; JORQUERA, 2007).

A glicerina é um produto gerado na produção do biodiesel, tem uso potencial na alimentação de ruminantes como fonte de energia, por suas características glicogênicas (PYATT et al., 2007; PARSONS et al., 2009). A glicerina está sendo utilizada para substituir parcialmente ingredientes da dieta à base de amido, principalmente o milho e diminuir custos produtivos. Estudos recentes têm incluído glicerina bruta em dietas de bovinos de corte em confinamento com resultados positivos, aumentando a eficiência alimentar e melhor desempenho (Van CLEEF et al., 2014; SILVA, 2013; LANGE, 2014).

Os lipídios além da vantagem como fonte energética, estudos em bovinos de corte têm sido avaliados para entender e estabelecer seus efeitos no ambiente ruminal e no fluxo duodenal de ácidos graxos de cadeia longa (LOOR et al., 2004; KOZLOSKI, 2011; PALMQUIST; MATTOS, 2011) para melhorar a qualidade da canal com a deposição em tecido principalmente de ácido linoléico conjugado (CLA), que tem sua origem na biohidrogenação (LOOR et al., 2004) e na síntese de *novo* no tecido (CORL et al., 1998; PIPEROVA et al., 2002). No entanto, também surgem como um dos mecanismos que pode ajudar em parte na redução da produção de metano de origem entérico, em especial os ácidos graxos insaturados permitindo o seqüestro de íons H^+ livres gerados na fermentação de carboidratos no rumen (LOOR et al., 2004).

A disponibilidade dos lipídios nas fontes alimentares é um fator importante que influencia a eficiência da lipólise, a biohidrogenação e a

deposição de ácidos graxos no tecido no rumen (Van Soest, et al., 1994; PALMQUIST; MATTOS, 2011). Pesquisas *in vivo* e *in vitro* da associação de lipídios com glicerina sobre efeito na lipólise, biohidrogenação e depósitos de gordura no tecido podem proporcionar oportunidades para descobrir e entender os efeitos favoráveis do metabolismo no rumen e o produto final. Como por exemplo, Silva (2013) encontrou um maior ganho de peso em novilhos Nelore recebendo óleo de soja em associação com glicerina, sendo importante conhecer alguns processos metabólicos no rumen que permitam entender o efeito associativo.

Por conseguinte, formulou-se a hipótese que dependendo da fonte de óleo de soja associado à glicerina pode haver alterações na fermentação ruminal, na biohidrogenação ruminal e no fluxo ruminal de ácidos graxos de cadeia longa, sem que haja alterações significativas no consumo e digestibilidade da matéria seca e de nutrientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA.

2.1 Generalidades

Nos últimos 15 anos, o consumo de carne e leite tem crescido em termos absolutos em 34% e 45% nos países em desenvolvimento e de 9% e 3% em países desenvolvidos, esta tendência deverá continuar durante os próximos 15 anos (THORNTON, 2010). E as populações de ruminantes vão contribuir para preencher essa demanda, evidenciado pelo aumento da população global de ruminantes entre 2000 e 2012 em 17% (FAO, 2014).

Os animais ruminantes possuem sistema digestivo complexo, e as simbioses com os microrganismos estabelecidos no rumen têm evoluído para se transformar em um sistema eficiente em operação, mas para o consumo de pastagem. A seleção de bovinos de corte com alto valor genético, representado por uma maior velocidade de ganho de peso e um melhor acabamento, aumenta as exigências nutricionais, sobretudo de energia. Para suprir as exigências de energia digestível em animais de alta produção é comum a suplementação de ruminantes com maiores quantidades de carboidratos não fibrosos (VALINOTE et al., 2006).

Surgindo alternativas de utilizar fontes de alimento *in natura* com grande potencial energético, como as sementes de oleaginosas, os produtos e

subprodutos da agroindústria como óleo de soja e glicerina, e fontes processadas como são as gorduras inertes ou protegidas. Mas, essa prática pode favorecer ou comprometer o funcionamento normal do rumen, afetando a ingestão e digestão da matéria seca, da fibra, refletindo em uma redução acentuada no pH ruminal, influenciando no metabolismo (Van SOEST, 1994). No entanto, a utilização de fontes de gordura associada à glicerina pode representar uma opção para conseguir um equilíbrio energético, incrementando a densidade energética da dieta e mantendo um balanço mais adequado entre carboidratos fibrosos e não fibrosos, sem afetar os parâmetros da fermentação ruminal.

2.2 A glicerina na alimentação de ruminantes

No Brasil está aumentando a produção de biodiesel das oleaginosas e conseqüentemente de glicerina bruta como coproduto. Segundo o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, o Brasil no ano 2013 consumiu 2,7 bilhões de litros de biodiesel, e estima-se a produção de glicerina aproximadamente em 0,27 bilhões de litros, volume considerável. A glicerina é um alimento seguro para uso em dietas de animais, e têm demonstrado seu potencial como fonte energética (4.320 kcal EB/kg do glicerol puro), tornando-se uma boa alternativa em dietas para ruminantes (PARSONS et al., 2009).

A qualidade da glicerina vai depender do seu estado de pureza, geralmente de 80% e 90% de glicerol sendo importante de considerar na hora da utilização na alimentação animal. A produção glicerina vai acompanhada de uma série de impurezas como: água (11%), resíduos de catalisador (alcalino ou ácido), metanol (não reagido, 0,04%), reagentes, ácidos graxos, ésteres dentre outros (FERRARI et al., 2005). O glicerol está presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal e junto com os ácidos graxos formam a molécula de triacilglicerol, o que faz que a glicerina seja um produto seguro para o consumo animal (PERES et al., 2005).

O uso da glicerina na alimentação de ruminantes não é recente; tem sido utilizado para tratar a cetose (FISHER et al., 1973), e para a prevenção da cetose induzida em vacas leiteiras em lactação (GOFF; HORST, 2003; DeFRAIN et al., 2004). A glicerina tem sido fornecida em dietas para vacas leiteiras, sendo que níveis de até os 15% na MS da ração demonstraram a

ausência de diferença no consumo de MS, sem prejuízos ou incidência na saúde, e sem efeitos na produção quando a glicerina é fornecida durante o período pré-parto e pós-parto (CHUNG et al., 2007; DONKIN et al., 2009). Estudos feitos com glicerina em dietas para bovino de corte, com o objetivo de substituir parcialmente o milho têm mostrado resultados favoráveis sobre o consumo da matéria seca e de produção, indicado que este ingrediente pode ser uma fonte de energia adequada em dietas para bovinos (GUNN et al., 2011; SILVA, 2013).

De acordo com Krehbiel (2008) o glicerol no rumen pode ter os seguintes destinos: 44% do glicerol ingerido são fermentados no rumen principalmente a propionato; 43% são absorvidos diretamente pelo epitélio ruminal; e 13% passam ao intestino. Após entrarem no sistema portal hepático, o glicerol e o propionato são metabolizado no fígado onde a enzima glicerol quinase o direciona para a gliconeogênese para ser transformado em glicose (PARSONS, 2009; WANG et al., 2009). Sendo de particular interesse em bovinos de corte, porque a glicose é a maior contribuinte de unidades de acetil-coA para a lipogênese em depósitos de gordura intramuscular (SMITH; CROUSE, 1984; PETHICK; DUNSHEA, 1996).

Trabalhos com uso da glicerina na dieta de ruminantes têm mostrado bom resultados. Françoze et al. (2013) demonstram que até 12% de glicerina bruta pode ser utilizada na alimentação de tourinhos em acabamento, com pouco ou nenhum efeito sobre o desempenho no crescimento e a composição da carcaça ou carne, com apenas pequeno efeito sobre o desempenho e os perfis de ácidos graxos do *Longissimus dorsi*. Silva (2013) estudou a inclusão lipídica associada à glicerina bruta (10% na MS) em dietas para novilhos Nelores, sem observar influência nas características qualitativas da carne como maciez, perfil de ácidos graxos, teor de gordura intramuscular e coloração; onde o óleo de soja em associação a glicerina bruta na dieta de novilhos Nelore, favorecendo o desempenho qualidade de carcaça.

Parsons et al. (2009) relataram que o ganho médio diário aumentou em 12,6%, 8,4%, e 5,0% para novilhas mestiças (421,6 kg \pm 28,9 de PV inicial) alimentadas com 2%, 4% e 8% de glicerina, respectivamente; no entanto, em 12% e 16% de glicerina o ganho médio diário foi reduzido em 1,7% e 13,4%, respectivamente quando comparado com o controle. Igualmente, relataram

uma diminuição na ingestão da MS e da gordura na 12ª costela. No entanto, os dados em bezerros alimentados com rações contendo glicerina sugeririam que o desempenho de vitelo é igual ou maior do que a dieta sem glicerina (GUNN et al., 2011). Pyatt et al. (2007) em dietas com glicerina para bovinos em terminação resultou em ganho médio diário de 11,4% quando glicerina substituiu 10% do milho seco, em dietas que também continha 30% de grãos secos de destilaria e 15% de casca de soja.

Lage et al., (2014) avaliou os efeitos da alimentação com glicerina bruta incluída em 10% da MS da dieta associada ao milho ou casca de soja em diferentes teores de concentrado (40% ou 60%), não observou diferenças no consumo e digestibilidade da matéria seca e FDN. Mas, apresentou maior porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados e ácido linoléico conjugado (CLA, 18:2 *cis*-9, *trans*-11; $P < 0,01$) na carne.

Abo El-Nor et al. (2010) *in vitro* avaliaram os efeitos da substituição de milho com três níveis de glicerina, utilizando fermentadores contínuos com quatro tratamentos (36, 72 e 108 g/kg MS da glicerina), os tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas respeito ao valor do pH (média de 6,54), na concentração de N-NH₃, na proporção molar do propionato e na digestibilidade da MS. Mas, as dietas com 72 e 108 g/kg MS da glicerina diminuí a digestibilidade na FDN, a proporção acetato:propionato, e a concentração do DNA do *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Selenomonas ruminantium*, indicando que os níveis elevados de glicerol estão inibindo o crescimento das bactérias celulolíticas afetando a digestibilidade da fibra. Concordando com trabalhos *in vitro* de (ROGER et al., 1992; PAGGI et al., 2004), onde a adição de glicerina inibiu o crescimento e atividade de bactérias celulíticas e fungos.

Da mesma forma, Castagnino et al. (2015) avaliaram *in vitro* o efeito de óleo de soja e óleo de linhaça com e sem glicerina (150 g/kg MS), onde o valor do pH e da concentração de amônia foram maiores nas dietas com óleo ao comparar com a dieta controle sem fontes de óleo, e que os valores foram independentes da adição de glicerina e do tempo, e a concentração do DNA o *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio* não se alterou com glicerol e adição de óleo ($P > 0,05$).

O excesso de propionato gerado pela dieta com níveis altos de concentrado pode causar um problema de obesidade nos animais (WATTIAUX;

ARMENTANO, 2014). O uso continuado deste tipo de dieta pode ter um efeito negativo na saúde do animal, ter problemas metabólicos como o fígado gordo. De acordo com Bines e Hart (1984) o aumento de propionato a partir do fornecimento de glicerina bruta, reduziu a lipólise no tecido, aumentando os níveis de insulina no sangue, contribuindo para a síntese de proteína e gordura.

De acordo com Mach (2009), a adição de glicerina bruta em níveis crescentes na dieta de touros holandeses (0%, 4%, 8%, e 12% de glicerina na MS) não afetou a concentração plasmática de glicose. No entanto, (PARKER et al., 2007) escreve que animais suplementados com 642 g de glicerina pura 48 h antes do abate apresentaram uma maior concentração de glicose no sangue em relação aos animais não suplementados. Estes resultados estão relacionados diretamente com o estado fisiológico e seu balanço energético.

2.3 Os lipídios na dieta do ruminante

2.3.1 Aspectos gerais dos lipídios

Todos os lipídios estão presentes em alimentos comumente consumidos pelos ruminantes, chamados de gordura na dieta, são compostos orgânicos de origem vegetal ou animal de alto potencial energético (VAN SOEST et al., 2004). Os ácidos graxos são classificados de acordo a seu estado de saturação: ácidos graxos saturados, onde seus carbonos estão ligados por meio de ligações simples; e os ácidos graxos insaturados, que em sua estrutura linear tem uma conformação com uma ou mais ligações duplas, que geram uma conformação curva na sua estrutura (LEHNINGER et al., 2005).

O tipo de ligação que compõe o ácido graxo determina o ponto de fusão, sendo o estado de saturação uma característica química muito importante (LEHNINGER et al., 2005) que determina seu estado físico (sólido ou líquido). O ponto de fusão é mais elevado quando as gorduras são saturadas e mais baixo quando as gorduras são insaturadas (LEHNINGER et al., 2005).

2.3.2 Suplementação lipídica na alimentação do ruminante

A utilização de lipídios na alimentação de ruminantes de alta produção cresceu de forma acentuada nas últimas décadas, pois houve maior conhecimento sobre o uso na alimentação animal (ZINN; JORQUERA, 2007). Uma das principais razões para o aumento do teor de lipídio da dieta é

aumentar seu conteúdo de energia (SUKHIJA; PALMQUIST, 1990; CAVALIERI et al., 2005), do mesmo modo, a inclusão de lipídios na dieta de ruminantes é de interesse por aumentar o teor de ácidos graxos essenciais no tecido, como o ácido linoléico conjugado, e ácidos graxos poliinsaturados como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA) (COLLOMB et al., 2006; GIVENS et al., 2006).

No entanto, os resultados estão intimamente ligados ao tipo da fonte e ao processo digestivo dos ruminantes, especialmente por causa das modificações que os lipídios sofrem no ambiente ruminal pela fermentação microbiana, onde seu uso possui algumas limitações (JENKINS, 1993; Van SOEST, 1994; HARFOOT; HAZLEWOOD, 1988; LOOR et al., 2004; SULLIVAN et al., 2004), como redução na ingestão de MS e na digestibilidade da fibra. (HIGHTSHOE et al., 1991; JENKINS et al., 2006).

Dietas de ruminantes geralmente possuem entre 2% e 3% de lipídios, dos quais cerca de metade são ácidos graxos (DOREAU; FERLAY, 1994; Van SOEST, 1994; MIR et al., 2001; KOZLOSKI, 2011). Entre vários estudos verificaram que teores de lipídios maiores que 7% da matéria seca podem ser prejudiciais ao consumo e degradação do alimento, reduzir a taxa de passagem pelo trato digestivo e o rendimento animal.

As bactérias do rumen não são tolerantes aos lipídios, principalmente aos ácidos graxos insaturados (HARFOOT, 1978; JENKINS, 1993; Van SOEST, 1994). A elevada incorporação de ácidos graxos insaturados pode ser inibitória à função microbiana com uma depressão no desempenho animal, quando altos níveis de lipídios são fornecidos de forma natural, tal como na forma de óleo de soja, devido ao elevado conteúdo de ácido graxo insaturado disponível no rumen (ENGLE et al., 2005). Os ácidos graxos insaturados apresenta uma natureza antimicrobiana, quando o ácido graxo penetrar na membrana bacteriana causando desorganização de fosfolipídios e um eventual dano citológico (JENKINS et al., 2008), além de reduzir a disponibilidade do cálcio necessário para a função microbiana (DEVENDRA; LEWIS, 1974; JENKINS; PALMQUIST, 1984). Também os óleos no ambiente ruminal podem representar uma barreira física para a degradação da partícula de alimento por formar um filme ao redor da mesma, impedindo a perfeita aderência das

bactérias, diminuindo a capacidade de degradação (JENKINS, 1993; Van SOEST, 1994; KOZLOSKI, 2011).

A inclusão de níveis de lipídios na faixa de 3% a 7% do EE nas dietas permite uma fermentação adequada (KOZLOSKI, 2011), possibilitando aumentos na densidade energética, quando a energia se torna limitante, potencializa há uma diminuição da incorporação de carboidratos não-fibrosos na dieta e aumentar a incorporação de carboidratos fibrosos, que vai permitir uma adequada relação de volumoso:concentrado, quando se fornece dietas para animais de alta produção com limitado consumo (JENKINS, 1993; CAVALIERI et al., 2005). Também, pode contribuir positivamente em algumas funções orgânicas, como uma estratégia que possibilita a redução de emissões de metano entérico (pela via da biohidrogenação ruminal) um gás de efeito estufa (JENKINS, 1993; SOUZA et al., 2009).

O lipídio dentro da produtividade animal é um nutriente essencial para a produção de músculo no ruminante, e a eficiência de produção, precocidade e acabamento no animal estão relacionados com o tipo de deposição de gordura no tecido. Estudos têm demonstrado que o tipo de dieta fornecida a ruminantes altera a composição dos lipídios na carne e do leite (LOOR et al., 2004; KOZLOSKI, 2011; PALMQUIST; MATTOS, 2011). Segundo Zinn (1989), Van Soest (1994) e Souza et al. (2009) a previsão da influência dos lipídios está em relação com a digestão ruminal da fibra e produtos finais da biohidrogenação, sendo o grau de insaturação a característica mais importante (JENKINS, 1993; PALMQUIST; MATTOS, 2011).

Outro efeito considerável na suplementação com lipídios, está associado à uma melhor eficiência na síntese microbiana (Van SOEST, 1994) apresentando uma diminuição da degradação da proteína, ocorrendo uma potencialização da utilização do nitrogênio pelas bactérias. O número das bactérias gram-negativas aumenta e a concentração da amônia diminui (JOUANY et al., 2007; SOUZA et al., 2009), melhora a síntese de proteína microbiana, acompanhada pelo aumento do fluxo de nitrogênio para o duodeno (JENKINS, 1993; PALMQUIST; MATTOS, 2011), aumento na produção de propionato, redução na produção de metano (Van SOEST, 1994; DOREAU; FERLAY, 1995; LOOR et al., 2004), e a melhoria nas reações de anabolismo no tecido adiposo podem ser atribuídas aos lipídios (SOUZA et al., 2009).

Investigações são justificadas para minimizar os efeitos negativos dos lipídios no ambiente ruminal (cinética ruminal) e conseqüentemente na degradabilidade da fibra, necessárias para o desenvolvimento de estratégias para proteger o ecossistema ruminal e gerar um maior aproveitamento nutricional de fontes que contém lipídios (JENKINS, 1993; Van SOEST, 1994; LOCK et al., 2008). O que leva primeiro, a utilização de sementes de oleaginosas em forma de grão (SULLIVAN et al., 2004); e segundo, o fornecimento de produtos industriais ou sais de cálcio “gorduras protegidas” fontes de lipídios praticamente inertes à ação microbiana no rumen (GRUMMER, 1988; JENKINS et al., 2008).

O fornecimento de gordura adicional à ração na forma de sementes (grão inteiro) é um tipo de gordura protegida por estar na forma de grão, onde os lipídios estão dentro da matriz protéica da semente, limitando que os lipídios estejam expostos no ambiente ruminal, minimizando os efeitos devido ao menor contato do lipídio com os microrganismos (BYERS; SCHELLING, 1989; CAVALIERI et al., 2005). Por conseguinte, a inclusão de sementes de oleaginosas na forma de grão na dieta dos ruminantes é uma prática comum para preservar aos ácidos graxos insaturados da digestão ruminal e garantir a passagem ao intestino (HESS et al., 2008; BASSI et al., 2012). Não obstante, a proteção que oferecem as sementes é limitada devido a sua ruptura durante a mastigação e na ruminação (DOREAU; FERLAY, 1994), sendo parcialmente acessíveis à microflora do rumen.

De tempo atrás, se vem fazendo pesquisas com animais em recria e terminação, onde foram avaliadas a inclusão de soja grão e outras oleaginosas como fontes alimentares de energia e proteína (FELTON; KERLEY, 2004). A alimentação com soja grão e soja extrusada para novilhos que receberam feno de capim *ad libitum* apresentaram melhor eficiência e maior ganho de peso, sobre os novilhos alimentados com feno (ALBRO et al., 1993), sendo, o ganho maior nos novilhos alimentados com soja grão do que com a soja extrusada.

O uso de gorduras protegidas no rumen como os sabões de cálcio, fonte de ácidos graxos insaturados indisponíveis para as bactérias, é relativamente inerte no ambiente ruminal em condições normais de pH, mas, dissocia-se completamente nas condições ácidas menores que 5,0 do abomaso (JENKINS; PALMQUIST, 1984; SUKHIJA; PALMQUIST, 1990). No entanto Nörnberg et al.

(2004), relataram que pode ocorrer biohidrogenação destes sais em torno de 33% e 50%, alertando que mesmo “protegidas” estes sais de cálcios de ácidos graxos não são totalmente inertes no rumen. Mas, vários autores como FIORENTINI et al., 2012) considera que, as “gorduras protegidas” podem ser utilizadas para a suplementação de ruminantes, e garantir o fluxo de ácidos graxos insaturados no intestino.

Van Soest (1994) alerta que com o uso da gordura protegida, o ruminante acaba absorvendo maior quantidade de lipídios, o que aumenta a quantidade na produção animal. Entretanto com a maior absorção de ácidos graxos insaturados ocorre modificação na composição da gordura animal e láctea. (JENKINS, 1993; LOOR et al., 2004; KOZLOSKI, 2011).

A utilização de óleos vegetais *in natura* (não protegidos) na alimentação de ruminantes tem sido relatada como complementar o fornecimento energético das rações para os animais de uma forma mais concentrada. Mas, devido a seu elevado valor comercial, os óleos vegetais puros são mais utilizados na alimentação de monogástricos, sem deixar de ser uma alternativa na alimentação de ruminantes. Os óleos estão mais acessíveis ao ambiente ruminal, podendo gerar efeitos negativos, sendo os principais deles a toxidez as bactérias ruminais afetando a diminuição da digestibilidade da fibra (HARFOOT, 1978; Van SOEST, 1994; JENKINS, 2008; LOCK et al., 2008).

Silva (2013) avaliou a associação da glicerina (10% da MS) com três fontes de lipídios (óleo de soja, soja grão e gordura protegida) a um nível de 5% EE, em dietas para novilhos da raça Nelore, com peso médio (426 kg), os animais que receberam óleo associado com glicerina apresentaram maiores valores para os consumos de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e fibra detergente neutro que aqueles alimentados com a dieta controle (sem fonte de lipídio). Para o mesmo estudo, a inclusão de lipídios nas dietas junto com glicerina não afetou a digestibilidade aparente da matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta. Os animais alimentados com óleo de soja associado à glicerina apresentaram maior eficiência alimentar e maior ganho médio diário (1,25 kg/dia) que os animais alimentados com dietas contendo soja grão, gordura protegida com valores (0,82, 0,81 e 0,76 g/kg) respectivamente.

2.3.3 Efeitos dos lipídios na fermentação ruminal

Reduções no consumo de matéria seca têm sido amplamente relatadas após a inclusão de altos níveis (>7%) de óleos para alimentação de ruminantes (SUTTON et al., 1983; CASUTT et al., 2000; SUTTER et al., 2000; JORDAN et al., 2006b). Alguns trabalhos mostram que níveis não maiores que 7% são aceitáveis sem trazer prejuízo no rendimento animal (FELTON; KERLEY, 2004; JORDAN et al., 2006a; MESSANA et al., 2012).

Felton e Kerley (2004) trabalharam com novilhos mestiços onde receberam dietas suplementares com níveis crescentes de soja grão (0%, 8%, 16% e 24%) onde o consumo de matéria seca e o ganho de peso diário aos 72 dias do experimento não apresentaram efeitos ($P>0,05$) pelos tratamentos, com os seguintes resultados médios (9,98 kg MS/d e 1,72 kg PV/d), mais não para o nível de inclusão de 24%, onde houve diferenças.

Jordan et al. (2006a) avaliaram efeitos do óleo de soja e soja grão, em relação a 6% da ingestão de matéria seca, em dietas para novilhos mestiços Charolês x Limousin (338 ± 27 kg de PV, 218 ± 17 dias de idade), com uma proporção volumoso:concentrado de 10:90, usando palha de cevada como fonte de volumoso. Os autores observaram uma redução na ingestão da matéria seca apenas para o tratamento com soja grão. Similares resultados foram encontrados por Silva (2013), ao subministrar dietas com óleo de soja, soja grão e gordura protegida em novilhos nelore, sendo a dieta com óleo de soja a que apresentou o maior consumo de matéria seca, proteína bruta e fibra detergente neutro comparado com a dieta controle.

Fiorentini et al. (2012) concluíram que os suplementos com lipídios afetam significativamente ($P<0,05$) o consumo de matéria seca, onde o fornecimento de óleo de soja e soja grão em dietas para novilhas mestiças resultou em reduções de 11,48% e 10,45%, respectivamente na ingestão de MS (kg/d) em comparação ao tratamento com gordura protegida que apresentou maior ingestão (8,8 kg animal/dia). A diminuição no consumo da MS foi possivelmente pela presença de ácidos graxos insaturados no rumen que têm efeitos sobre as bactérias Gram-positivas, resultando numa inibição de sua atividade (NICHOLSON; OMER, 1983; NAGARAJA et al., 1997).

Van Nevel e Demeyer (1988) relatam uma influência negativa na população dos protozoários ciliados na degradação dos carboidratos

estruturais que podem diminuir a degradação da fibra de dieta, quando lipídios são incluídos na dieta de ruminantes, especialmente quando a dieta contém elevados níveis de concentrado. Segundo Palmquist e Mattos (2011) certos ácidos graxos especialmente os poliinsaturados, são tóxicos aos microrganismos ruminais, e os mais suscetíveis são as bactérias Gram (+), metanogênicas e protozoários. Conseqüentemente Messana et al. (2012) não encontraram efeito dos níveis de lipídios na população de protozoários, mas no nível de 6% de EE apresentou melhor eficiência na síntese microbiana e na degradabilidade da fibra.

Cavalieri et al. (2009) trabalharam com vacas da raça Holandesa, com média de peso de 510 kg, 154±43 dias de lactação e produção de 17,6±3,7 kg de leite/dia, suplementadas com Lac100® (Yakult), com fonte de ácido graxo ômega 6 e linhaça em grão, como fonte de ácido graxo ômega 3. Os animais alimentados com gordura protegida (Lac100®) apresentaram aumento na digestibilidade aparente da FDN (57,44% e 50,80%) e do EE (77,70% e 72,18%), e não foram observados efeitos dos tratamentos sobre a digestibilidade da MS, da PB e da FDA, usando como fonte de volumoso:silagem de milho, para uma proporção volumoso: concentrado de 55:45. Onde os autores estabelecem que o grau de insaturação é possivelmente a mais importante característica que influencia a digestibilidade, e que determina a magnitude do seu efeito negativo na fermentação ruminal, onde os ácidos graxos da linhaça ficaram mais disponíveis que os ácidos graxos do Lac100® no ambiente ruminal.

A suplementação com lipídio não afeta o pH do rumen, como foi demonstrado por (Da Silva, 2007) quando avaliaram o efeito da inclusão de óleo de soja, sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa e grão de soja em cabras leiteiras. Entretanto, registram-se algumas pequenas diferenças significativas, pela diminuição na disponibilidade de cátions na formação de sabões, que pode influenciar o pH ruminal, limitando o crescimento microbiano (BYERS; SCHELLING, 1989). Em ensaios com gorduras protegidas (sabões cálcio) estas mudanças são no sentido do acréscimo do pH (GRUMMER, 1988). No entanto para (MESSANA et al., 2013) a adição de lipídios em três níveis (2%, 4%, 6%) diminuiu o pH ruminal encontrando um efeito quadrático;

em os animais que receberam o maior teor de lipídios (60 g/kg), o pH do rumen diminuiu de forma quadrática ($P < 0,001$) com o aumento do nível do lipídio.

Valinote et al. (2006) avaliaram a degradabilidade, a fermentação e a cinética ruminal de dietas com caroço de algodão e sal de cálcio de ácidos graxos com e sem monensina em novilhos Nelores, onde houve aumento do pH ruminal pela adição de gordura com uma média de 6,35, comparada com a dieta controle de 6,49. Que diverge dos resultados relatados por (Da SILVA, 2007) que não observaram modificações no pH com a adição de lipídios.

A amônia é a fonte de nitrogênio mais utilizada pelos microrganismos ruminais para a síntese de proteína microbiana, sendo o tipo de alimento um fator importante que está relacionado com a produção de amônia (Van SOEST, 1994), sendo que alimentos mais degradáveis incrementam a produção de amônia. De acordo com Doreau e Ferlay (1995), a redução na concentração de amônia no rumen é uma das principais características da defaunação ruminal, ocorrendo um aumento no fluxo de proteína microbiana para o intestino possivelmente ocasionado pela redução de protozoários ciliados (NAGARA et al., 1997). Essa redução tem sido observada por alguns autores em estudos envolvendo suplementação com lipídios (EIFERT et al., 2005; MESSANA et al., 2013), entretanto, os resultados que demonstram a influência dos lipídios na degradação protéica não são consistentes (NAGAJARA et al., 1997).

Estudos feitos por Van Nevel e Demeyer (1988) e Lin et al. (1995) observaram uma melhor eficiência da síntese microbiana com uma diminuição na concentração de $\text{NH}_3\text{-N}$ ruminal quando os animais receberam óleo na dieta, pelo fato na redução na produção de protozoários e/ou pela redução na população de bactérias desaminadoras. Van Soest (1994) e Koster et al. (1996) observaram uma íntima relação entre o nível de atividade dos microrganismos ruminais e o nível de nitrogênio amoniacal presente no rumen, onde a proteína microbiana que alcança o intestino delgado depende da eficiência de produção microbiana e do fluxo microbiano.

Valinote et al. (2006) não encontraram interação tempo vs tratamento nas concentrações de nitrogênio amoniacal, quando avaliaram dietas com sal de cálcio de ácidos graxos e caroço de algodão, como fontes de gordura, em novilhos Nelore com valores médios de 15,68 mg/dL. Esses resultados estão por acima dos observados por Messana et al. (2013), que encontraram baixas

concentrações de $\text{NH}_3\text{-N}$ ruminal nos animais alimentados com a dieta contendo 20g/kg de lipídios do que em animais alimentados com os 40 e 60 g/kg de lipídio com valores (9,1, 13,0, e 12,6 mg/dL) respectivamente. Leng (1990) sugeriu, para regiões tropicais, níveis de concentração de amônia mais elevados, propondo valores entre 15 e 20 mg/dL para maximização da digestão ruminal da MS e do consumo.

A inclusão dietética de lipídios foi sugerida, como estratégia para diminuir a porcentagem de acetato produzido no rumen, enquanto buscam-se aumentos na produção de propionato (BUNTING et al., 1996) pela liberação de glicerol no processo das lipólises que é fermentado para propionato. O aumento de propionato no rumen pode ser benéfico para a produção do gado de corte no período de terminação, porque o propionato é um precursor para a formação da gordura intramuscular (SMITH; CROUSE, 1984; PETHICK; DUNSHEA, 1996), por ser precursor de glicose.

Composição da dieta basal também pode influenciar a forma como uma fonte de lipídios afeta a fermentação ruminal. As gorduras que normalmente inibem a fermentação e a digestão, muitas vezes causam menos inibição quando o conteúdo de volumoso da dieta basal é alto, como também o tipo de volumoso utilizado. Por exemplo, Vargas et al. (2002) alimentado vacas em lactação com silagem de sorgo e concentrado suplementado com dois níveis de lipídios (3% e 7%) e avaliando duas fontes de lipídios (grão de soja moído e óleo de soja) sem causar efeitos prejudiciais sobre os padrões de ácidos graxos de cadeia curta ruminais.

Da mesma forma, Messana et al. (2013) não encontraram nenhum efeito dos níveis de lipídios (2%, 4% e 6% de EE da MS) na produção de acetato com um valor médio de 69,37 Mm/L, mas com um efeito linear negativo ($p < 0,001$) para a produção de propionato (28,1, 28,1 e 27,0 Mm/L), do butirato (18,5, 18,6 e 16,4 Mm/L), e da concentração total de ácidos de cadeia curta totais (121,3, 122,2 e 116,2 Mm/L). Para a relação acetato:propionato apresentou um efeito linear negativo (3,0, 3,0 e 2,9) para cada nível respectivamente.

Outros estudos com gado de corte não conseguiram demonstrar uma vantagem de aumento dos valores dos ácidos graxos de cadeia curta no rumen quando o lipídio foi fornecido num nível de 9% do EE. Valinote et al. (2006) não encontraram interação tempo x tratamento nas concentrações totais de ácido

acético, propiônico, e butírico com valores médios de (62,36, 23,72 e 13,92 Mm/dL) respectivamente, para uma relação média de acetato:propionato de 3,32, e sem apresentar diferenças significativas na concentração total de ácidos graxos de cadeia curta, com um valor médio 76,10 Mm.

Palmquist et al. (1993) ao avaliar dietas com gordura protegida ou sem adição de gordura (5% de MS) em vacas Holandesas canuladas, não encontraram diferenças nas concentrações e proporções de ácidos graxos de cadeia curta. Da mesma forma Zinn e Borques (1993) a cinética da digestão ruminal não foram alterados ($P>0,30$) através da adição de gordura (7,4% EE) mais ionóforos ou carbonato de cálcio à dieta. Mas, a dieta com lipídio e o ionóforo interagiram ($P<0,05$) na diminuição das proporções molares no rumen de acetato e aumentando para o propionato, com valores de 5,3% e 16,3% respectivamente, acoplado com reduzida fermentação da matéria orgânica ruminal, o aumento na proporção molar de propionato causou uma diminuição ($P<0,05$) na perda de energia do metano ruminal e aumento a energia metabolizável da dieta em 2,7%.

2.4 Processo da lipólise e biohidrogenação no rumen

Os lipídios que são liberados no rumen a partir dos alimentos, estão na forma esterificados (ligações éster) tais como: triglicerídeos das sementes, fosfolipídeos e galactolipídeos das folhas vegetais (LEHNINGER et al., 2005) Quando os lipídios estão acessíveis à microbiota do rumen são rapidamente hidrolisados (lipólise) por lípases associadas à membrana celular bacteriana mais também por fosfolipases e galactolipases bacteriana, com pouca contribuição por parte dos protozoários do rumen e fungos (HARFOOT; HAZLEWOOD 1988; JENKINS, 1993). As lípases vegetais são secundárias ou com pouca contribuição em relação às lípases microbianas (DAWSON et al., 1977), e a lípase a partir de saliva dos ruminantes tem baixa atividade (GOODEN, 1973). Os principais responsáveis pelo processo das lipólises são as bactérias *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Anaerovibrio lipolytica* e *Propionibacter* (BAUMAN et al., 2000; PARIZA et al., 2001).

Geralmente a extensão da hidrólise é alta (>85%), mas é suficiente para converter a maior parte dos triglicerídeos, fosfolipídios e galactolipídeos da dieta para ácidos graxos livres num curto espaço de tempo (JENKINS 1993;

LOOR et al. 2004), um número de fatores que afetam a taxa e a extensão desse processo têm sido identificados. Como exemplo, a extensão da hidrólise é reduzida quando o aumento do nível dietético da gordura ou gorduras com ponto de fusão elevado, ou quando outros fatores como baixo pH ruminal e o uso de antibióticos como os ionóforos que inibem a atividade e o crescimento bacteriano (JENKINS 1993; Van NEVELI; DEMEYER, 1996; BEAM et al., 2000; LOOR et al., 2004). Estudos também revelam que as taxas de lipólise são alteradas substancialmente pela maturidade do volumoso, o teor de nitrogênio e pelo tamanho da partícula do alimento no rumen (Van SOEST, 1994; BAUMAN et al., 2000; LOOR et al., 2004)

Garton et al. (1961) constataram que o óleo de linhaça fornecido a ovelhas foi hidrolisado (lipólise) em quantidade superior a 80%; e de acordo (BAUCHART, 1993) a inclusão de diversos óleos e gorduras e semente de canola moída resultaram na hidrólise de triglicerídeos superiores a 85%. Moate et al. (2004) desenvolveu um modelo que permitiu estimar a lipólise 25 alimentos (forragem, alimento não-volumoso e fontes de lipídios) com um valor em média de $82 \pm 17\%$. A menor lipólise observada em dietas com alto amido (GERSON et al., 1985) é provavelmente devido ao baixo pH ruminal causado pelo consumo de dietas suplementadas com grãos (DOHME et al., 2003).

Os ácidos graxos saturados provenientes da dieta liberados no rumen no processo da lipólise passam diretamente a intestino sem sofrer nenhum processo metabólico, mas os ácidos graxos insaturados liberados são hidrolisados e isomerizados extensivamente pelas bactérias no processo da biohidrogenação (LOOR et al., 2004; MARÍN et al., 2010).

O propósito evolutivo do papel da via da biohidrogenação microbiana é debatido, mas serve sem dúvida alguma, para a proteção das bactérias ruminais dos efeitos tóxicos de ácidos graxos especialmente os poliinsaturados (PUFAs), sendo as mais susceptíveis são as bactérias Gram positivas, metanogênicas e protozoários (PALMQUIST; MATTOS, 2011). A toxicidade está relacionada à natureza anfipática dos ácidos graxos, ou seja, aqueles que são solúveis, tanto em solventes orgânicos como em água sendo os que causam mais toxicidade (JENKIS et al., 2008). Portanto, como um mecanismo de defesa a biohidrogenação torna-se um evento muito importante no rumen.

O processo normal da biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados de 18 carbonos (ácidos oleico, linoléico e linolenico) conduz à formação de ácido esteárico (C18:0), mas em algumas ocasiões ocorrem alterações nessa rota e o produto final poderá ser alguns ácidos graxos *trans* (produtos intermediários) como consequência da incompleta biohidrogenação daqueles ácidos graxos, apresenta-se principalmente o ácido linoléico conjugado C18:2 cis-9, trans-11 e o ácido vaccênico C18:1 trans-11 (BAUMAN et al., 2000; PIPEROVA et al., 2002; JENKINS et al., 2008; LAVERROUX et al., 2011), que passará ao abomaso e ao intestino e será absorvido.

A cinética da biohidrogenação é complicada pelo movimento do “pool” dos ácidos graxos no rumen, entretanto, a produção de todas as vias detalhadas dos isômeros C18:1 encontrados no rumen não estão claras ainda (LAVERROUX et al., 2011), como, foi demonstrado em estudos (SHINGFIELD, et al., 2010). Além disso, não ocorre somente biohidrogenação a ácido esteárico, formam-se numerosos isômeros *trans*, e parte é transformado nos ácidos 10-hidroxiesteárico e 10-cetoesteárico (JENKINS et al., 2006).

Também, a biohidrogenação é uma via que tem sido sugerida como mecanismo para evitar o acúmulo de equivalentes redutores e seqüestro de íons H^+ que estão livres no rumen (JENKINS, 1993), que são o resultante da fermentação da matéria orgânica, e este seqüestro evita a formação de metano a partir dos íons H^+ e CO_2 por as bactérias metanogênicas com o *Methanobacterium ruminantium* (JENKINS; JENNY, 1989; JENKINS, 1993; MACHMÜLLER et al., 1998), este processo está determinado pela taxa da lipólise, o grau de saturação do lipídio e a quantidade suplementada (JENKINS, 1993; Van SOEST, 1994; FIEVEZ et al., 2003). Sendo uma rota sugerida como estratégia para a redução na emissão de gases efeito estufa.

Aparentemente a biohidrogenação pouco contribui como um dissipador de hidrogênio, porque, apenas 1% a 2% do hidrogênio metabólico gerado no rumen é usado para este propósito (CZERKAWSKI, 1984; JENKINS, 1993), mas a baixa contribuição da biohidrogenação somada a uma melhor eficiência alimentar do ruminante, pode ajudar e contribuir com a diminuição das emissões de metano (BERCHIELLI et al., 2012).

A capacidade de hidrogenação bacteriana depende da espécie e da concentração da população microbiana e do ambiente ruminal (HARVATINE;

ALLEN, 2006). A diversidade da população das bactérias no rumen que tem capacidade da biohidrogenação é grande, e são classificadas em relação a suas reações metabólicas (KEMP et al., 1984). Segundo Parodi (1997) o *Butyrivibrio fibrisolvens* tem sido reconhecida como a principal bactéria responsável pela biohidrogenação no rumen. Kim et al. (2002) identificaram que a *Megasphaera elsdenii* está relacionada com a produção de ácido linoléico conjugado trans-10,cis-12.

Uma alta taxa da eficiência da biohidrogenação até a formação do ácido esteárico (C18:0) no rumen, reduz o fluxo duodenal de ácidos graxos polinsaturados e incrementam os saturados (DOREAU; FERLAY, 1994). No entanto, a redução da eficiência da biohidrogenação proporciona uma maior disponibilidade intestinal de ácidos graxos insaturados (JENKINS et al., 2008). A eficiência da biohidrogenação dos ácidos graxos é mais alta a medida que há aumento do grau de insaturação, sendo os ácidos linoléico e linolenico os principais substratos que em condições normais tem taxas de biohidrogenação de 70-95% e 85-100% respectivamente (DOREAU; FERLAY, 1994; BEAM et al., 2000; GIVENS et al., 2006).

A incorporação de concentrados na dieta relaciona-se com uma redução na eficiência da biohidrogenação (SAUVANT; BAS, 2001) sendo mais intensa em dietas com alta proporção de volumoso (KUCUK et al., 2001; LEE et al., 2006). Dietas com alta proporção de concentrado e baixo volumoso, o fluxo de isômeros C18:1 trans dirigido ao duodeno se incrementa (LOOR et al., 2004), podendo passar de 4% a 25% do total de isômeros (PIPEROVA et al., 2002), dado por uma redução na eficiência da biohidrogenação. A baixa eficiência da biohidrogenação pode ser atribuída à inibição da lipólise, e a inibição das isômerase e redutase microbianas, causadas por um pH ruminal baixo provocado por esse tipo de dietas com alto concentrado (Van NEVEL; DEMEYER, 1996). Segundo Van Soest (1994), a diminuição do pH ruminal resulta com freqüência na alteração das populações bacterianas, e em consequência nas mudanças no padrão dos produtos finais da fermentação.

Em geral, as características da dieta, o tipo de lipídio, o tempo de retenção no rumen afetam a lipólise e a biohidrogenação no rumen. Sendo possível, alterar a eficiência da biohidrogenação e favorecer o acúmulo dos produtos intermediários no rumen, especialmente o ácido vaccênico, permitindo

um maior fluxo ao intestino, que vai determinar diretamente a composição dos ácidos graxos na carne e leite, sendo um critério para determinar a qualidade dos produtos finais.

2.5 Produção de metano e CO₂

Os ruminantes são dependentes da microbiota ruminal para obtenção de componentes nutricionais via fermentação anaeróbica, como resultado desta fermentação, o metano é produzido por microrganismos encontrados no rumen - conhecido como metanógenos (BERCHIELLI et al., 2012). O metano entérico é derivado da atividade das *Archaea* metanogênicas (gêneros *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*, *Methanomicrobium* e *Methanosarcina*) (TEDESCHI et al., 2003; BEAUCHEMIN et al., 2007).

As bactérias metanogênicas responderem por pequena parte da biomassa microbiana ruminal, mas são extremamente importantes para o funcionamento normal do rumen e manutenção da fermentação (JANSSEN; KIRS, 2008). O excesso de H₂ produzido pela fermentação no rumen é utilizado pelas bactérias metanogênicas (*Archaea*) como mecanismo de dreno de hidrogênio (JOHNSON; JOHNSON, 1995) e para reduzir CO₂ e conseqüentemente formar CH₄ (KOZLOSKI, 2011; PINEDO et al., 2013). De acordo com o balanço estequiométrico, a produção de acetato e butirato promovem maior produção de CH₄ pela maior produção de H₂ (TEDESCHI et al., 2003). A produção de CH₄ também pode representar perdas de energia oriunda do alimento de até 12% da energia bruta (RUSSELL, 2002).

A ação microbiana no rumen modifica a natureza dos lipídios disponíveis na dieta passando por um processo de lipólise, onde os ácidos graxos insaturados liberados são transformados em ácidos graxos saturados, finalizando na formação do ácido esteárico (C 18:0), através do processo de biohidrogenação (JENKINS 1993; LOOR et al., 2004; MARÍN et al., 2010). O processo de biohidrogenação utiliza-se os íons H⁺ livres do ambiente ruminal, para saturar os ácidos graxos, evitando o acúmulo destes íons, que são usados pelas bactérias metanogênicas, permitindo assim a redução da formação do metano, aumentando com isso, a eficiência energética da dieta (JENKINS, 1993; MACHMÜLLER et al., 1998; JORDAN et al., 2006a).

Segundo Silva (2013) a emissão de metano entérico não foi afetada ($P>0,05$) pela associação de glicerina com fontes de óleo de soja em dietas para novilhos da raça Nelore com valores em média 127,3 g CH_4 /dia, comparados com a dieta controle com um valor de 133,0 g CH_4 /dia. A emissão média calculada de todos os animais avaliados foi de 47,02 kg de CH_4 /ano, sendo menor a média para o Brasil. Jordan et al. (2006a) identificaram que um nível de 250 g de óleo de coco refinado/dia na suplementação de dieta para novilhas (com média de 500 kg de PV) reduziu as emissões de CH_4 entérico.

Estas pesquisas com ruminantes demonstram que a emissão de metano depende da quantidade de alimento ingerido e da qualidade da dieta, sendo que, geralmente, dietas com elevada digestibilidade proporcionam maior consumo com menor emissão de metano por unidade de alimento ingerido, do que dietas de baixa qualidade (PEDREIRA et al., 2013). Além da qualidade da dieta, fatores intrínsecos aos animais, como suas características genéticas e a microbiota ruminal interferem na emissão de metano entérico (HAMMOND et al., 2008). Podendo entender que uma correta manipulação da dieta, permite mitigar a produção do metano, contribuindo para ter uma produção sustentável.

De acordo com estudos canadenses da DPI Ellinbank, examinaram a relação entre o nível de adição de lipídio e a redução de emissões de CH_4 , utilizando dados a partir de 17 estudos com bovinos de corte, vacas leiteiras e cordeiros. Onde puderam estabelecer que, para cada 1% de lipídio adicionado à dieta de ruminantes pode ser reduzido em até 6% da quantidade das emissões de metano produzido por kg/MS consumida; e adicionando um nível de lipídio de 3,3% na dieta de vacas leiteiras, resultou em um aumento de 16% na produção de sólidos do leite e uma redução de 21% das emissões de metano por kg/leite produzido (GRAINGER, 2008). As reduções das emissões de CH_4 podem ser conseguidas a partir de uma variedade de fontes de gordura (por ex. resíduos de alimentos de processamento da indústria, sementes de oleaginosas), que prevê alguma flexibilidade nas estratégias de exploração.

2.6 Fluxo e digestão intestinal de lipídios

Os lipídios que deixam o rumen são predominantemente ácidos graxos livres (80-90%), fosfolipídios (10-15%) como parte das membranas celulares das bactérias e uma pequena parte de triglicerídeos e glicolipídeos no resíduo

dos alimentos não completamente fermentados (LOOR et al., 2004; JENKINS et al., 2008; KOZLOSKI, 2011). No rumen, a maioria dos ácidos graxos livres (saturados e insaturados) estão na forma de sabões de cálcio, sódio ou potássio devido ao pH ruminal que se encontra próximo da neutralidade (6,0 a 6,8) (Van SOEST, 1994; KOZLOSKI, 2011) sem ser metabolizados. Após passar pelo abomaso onde a acidez local é alta (pH próximo de 2,0) ocorrerá a dissociação desses sabões e os ácidos graxos voltam a forma livre.

Os esforços para aumentar a quantidade de ácidos graxos insaturados no intestino delgado em ruminantes têm sido estimulados por preocupações com a saúde humana sobre disposição dos ácidos graxos saturados em produtos de origem animal (LOOR et al., 2004). Além disso, os relatórios de regulação do metabolismo de ácidos graxos dos tecidos em muitas espécies animais proporcionam uma motivação adicional para aumentar a absorção de ácidos graxos insaturados (JENKINS, 1993) Por exemplo, os ácidos graxos poliinsaturados interferem no transporte de glicose e taxas lipogênicas em adipócitos de rato (LEE; Dupont 1991) e ruminantes (CHILLIARD et al., 1991).

O rumen funciona como uma barreira diminuindo a quantidade do fluxo de ácidos graxos insaturados para o intestino, sendo eles saturados no processo da biohidrogenação (Van SOEST, 1994; JENKINS et al., 2008), onde aumentar de fluxo do ácido graxo insaturados para o duodeno é muito limitada em dietas. Wu et al. (1991) alimentado vacas leiteiras com dietas contendo uma mistura de lipídios vegetal-animal e sais de cálcio ou gordura protegida (59% instaurada) com 3% e 6% de EE, constaram dois níveis de ingestão de ácido linoléico 171 e 296 g/dia respectivamente, mas o fluxo duodenal foi apenas 45 e 54 g/dia para cada respectiva dieta.

Para o mesmo estudo, os ácidos graxos nos sais de cálcio foram biohidrogenados 57%, e em animais com a mistura de gordura vegetal-animal 87%. Da mesma forma, quando óleo ácido de soja (84% insaturados) foi fornecido em dietas com 3,5% de EE em novilhos mestiços em confinamento, o consumo de ácido linoléico foi aumentado de 38 para 99g/d, e fluxo duodenal aumentou só de 19 para 27g/dia (BOCK et al., 1991). Ambos estudos mostraram, que alguns ácidos graxos insaturados escaparam à biohidrogenação assim sejam protegidas, e quando grandes quantidades de

ácidos graxos poliinsaturados desprotegidos são fornecidas em dietas para ruminantes o fluxo de ácidos graxos insaturados aumente apenas ligeiramente.

Estudos (CORL et al., 1998; PIPEROVA et al., 2002) demonstraram que vacas lactantes têm habilidade de sintetizar ácido linoléico conjugado C18:2 *cis*-9, *trans*-11 na glândula mamária, a partir do ácido vaccênico C18:1 *trans*-11 absorvido no intestino delgado, processo conhecido como síntese de novo, onde o ácido vaccênico na glândula mamária sofre uma dessaturação pela enzima Δ^9 -*dessaturase*, que também está presente em outros tecidos dos ruminantes, em especial o tecido adiposo (CORL et al., 1998). Sendo importante garantir a presença do vaccênico no intestino, já que a síntese de novo é a rota de maior fonte do ácido linoléico conjugado nos ruminantes, quando se compara com o ácido linoléico conjugado produzido na biohidrogenação no rumen (BAUMAN et. al., 2000).

Um aumento do fluxo de ácidos graxos insaturados promove uma maior disposição no intestino para sua absorção, provocando um aumento da insaturação de gordura na carcaça e leite (KEMP et al., 1980). Então, justifica-se a necessidade do que o processo da biohidrogenação não seja total no rumen. Tecnologias permitem obter estes resultados. Primeiro, o uso de gorduras protegidas ou sementes permite que os ácidos graxos insaturados escapem à biohidrogenação, ocorrendo uma maior disponibilidade de ácidos graxos insaturados no intestino para serem absorvidos (LOOR et al., 2004; CAVALIERI et al., 2005; HESS et al., 2008); segundo, reduções efetivas na lipólise (EDWARDS et al., 2012) limitando a disponibilidade de ácidos graxos insaturados no rumen.

Terceiro, quando a ingestão de ácidos graxos insaturados é alta, pode ser que a capacidade dos microrganismos do rumen em biohidrogenar seja diminuída ou limitada (JENKINS, 1993; Van SOEST, 1994; LOOR et al., 2004). Sendo esta a explicação para a sazonalidade encontrada na relação de ácidos graxos saturados:insaturados no tecido de bovinos que têm quantidades maiores de ácidos graxos poliinsaturados, ao igual que bovinos e ovinos em países com clima temperado, quando os pastagens não maduros têm quantidades maiores de ácidos graxos poliinsaturados (BAUCHART, 1993).

Da mesma forma, pode-se explicar para animais em confinamento recebendo dietas com aumentados níveis de ácidos graxos insaturados não

protegidos vs dietas com lipídios protegidos. Como, pode-se ver nos resultados obtidos por Fiorentini (2012), onde novilhas mestiças que receberam uma dieta com óleo de soja a incorporação de ácidos graxos insaturados no músculo *Longissimus* foi maior (47,09%) comparada com os animais que receberam dietas com soja grão inteiro e gordura protegida na forma de sabão de cálcio (46,49% e 45,68%) respectivamente. No trabalho de Silva (2013) não foram encontradas diferenças ($p>0,05$) na quantidade de ácidos graxos insaturados (g/100 g de lipídio) do músculo *Longissimus* de novilhos Nelore finalizados em confinamento recebendo dietas com óleo de soja, soja grão e gordura protegida em forma de sabão de cálcio.

2.7 Absorção intestinal e sínteses dos lipídios

Wu et al., (1991) encontraram que os ácidos graxos de sabão de cálcio foram mais digestíveis (80,0% vs 75,7%) do que aqueles na gordura misturada de vegetal-animal, devido à maior insaturação no intestino delgado. Jenkins e Jenny (1989) observaram redução na digestibilidade aparente dos ácidos graxos de 68 para 47% quando a fonte de lipídio com 99% de ácidos graxos insaturados foi substituída por fonte de lipídios saturada. Em estudos Grummer (1991) encontrou que a digestibilidade dos ácidos graxos saturados diminui à medida que o comprimento da cadeia aumenta, sugerindo que a digestibilidade dos ácidos graxos no intestino também é determinada pelo ponto de fusão desses ácidos. Normalmente, a eficiência na absorção intestinal de ácidos graxos varia de 80% para 92% em ácidos graxos saturados e insaturados, respectivamente em dietas convencionais com baixo teor de gordura (2% a 3% na matéria seca) (BAUCHART, 1993).

Após os lipídios serem absorvidos, vão ser esterificados na superfície das membranas citossólicas pela via do α -glicerofosfato, e armazenados no enterócito da célula epitelial da camada superficial do intestino como mono, di ou triglicerídeos, colesterol e fosfolipídeos, que são ácidos graxos pré-formados. No complexo de Golgi estes lipídios pré-formados se tornam insolúveis e são combinados com apoproteínas específicas para formar quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) para ser transportados por exocitose para os dutos linfáticos, para adentrar a veia jugular anterior ao coração, para a circulação em general. As lipoproteínas

originárias no intestino não são metabolizadas inicialmente pelo fígado. A proporção de apoproteínas aumenta na medida em que o tamanho das partículas diminui; então como a densidade do lipídio é menor e da proteína maior, formando as LDL (lipoproteína de baixa densidade) e HDL (lipoproteína de alta densidade) que participam no transporte de lipídeos para ser distribuídos pelo sistema linfático até os tecidos, incluindo a glândula mamária (BAUCHART, 1993; PALMQUIST; MATTOS, 2011).

Os quilomicrons e VLDL são transportadores de lipídios intestinais de origem alimentar, para os tecidos. A VLDL também é sintetizada no fígado e transporta ácidos graxos para tecidos periféricos, sendo, por tanto, o intestino e o fígado os únicos tecidos que sintetizam a proteína-chave a apolipoproteína B rica em triacilgliceróis (PALMQUIST; MATTOS, 2011).

Freitas Júnior et al. (2010) utilizando concentrados com diferentes fontes de gordura (5,5% de EE) nas rações de vacas em lactação da raça Holandês e, como fonte de volumoso, silagem de milho, avaliaram os efeitos sobre as concentrações dos parâmetros sanguíneos, as concentrações de colesterol total, colesterol, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e colesterol de alta densidade (HDL) foram maiores ($P < 0,05$) para as vacas alimentadas com as rações contendo fontes de gordura em relação à ração controle. As concentrações de ureia e nitrogênio ureico no soro foram semelhantes entre as rações utilizadas, com exceção da ração contendo sais de cálcio de ácidos graxos, que apresentou concentrações menores ($P < 0,05$).

A deposição de gordura em ruminantes ocorre também pela síntese de ácidos graxos, o tecido adiposo possui grande capacidade de sintetizar ácidos graxos os “sntese de novo” (LOOR et al., 2004). Cerca de 90% da síntese de ácidos graxos ocorre no tecido adiposo, onde o principal precursor é o acetato (VERNON, 1981; KOZLOSKI, 2009). Em ruminantes, o acetato é absorvido diretamente pelo epitélio ruminal ou intestinal, e deve ser transformado a acetil-CoA para ser incorporado aos ácidos graxos, por meio da oxidação dentro da mitocôndria na presença de acetil-CoA sintetase, até a produção de ácido palmítico livre (LEHHINGER et al., 2000; PALMQUIST; MATTOS, 2011;).

O palmitato, assim como os ácidos graxos de origem dietética são utilizados como substrato para posterior síntese de ácidos graxos através de procedimentos de alongamento e/ou dessaturação, no citoplasma, através da

interação de muitas enzimas catalíticas (por exemplo, redutases, dessaturases, elongases) por meio da ativação de ésteres-CoA, seguida da condensação com malonil-Coa e redução de NADPH (LALIOTIS et al., 2010). Destas enzimas, apenas a Δ -9-dessaturase atua em ácidos graxos saturados, para convertê-los ao seu respectivo ácido graxo monoinsaturado. O mais abundante é o ácido oleico produzido do ácido esteárico (18:00). A delta-9-dessaturase, que é codificada pelo gene estearoil-CoA desaturase, também converte o ácido trans-vaccênico C18:1 trans-11 ao seu correspondente ácido linoléico conjugado (CLA) cis-9, trans-11 CLA (SMITH et al., 2009). O fígado em bovinos tem uma capacidade limitada de dessaturação que o tecido adiposo, que é o principal local onde ocorre o alongamento e a dessaturação de ácidos graxos pela enzima Δ -9-dessaturase (CALDER, 1998; TEITELBAUM; WALKER, 2001).

A gordura localizada no tecido adiposo ocorre quase que exclusivamente na forma de triacilgliceróis (80-90%) com predominância de C16:0 e C18:0 e pouco de C18:1 e C18:2 (EMERY; HERDT, 1991; MARÍN et al., 2010), e até o 20% como fosfolípido, e menos de 3% como éster de colesterol e ácidos graxos não esterificados (RULE et al., 1994).

Em trabalhos de Smith e Crouse (1984), avaliando novilhos Angus em crescimento, com dois níveis de energia na dieta, encontraram que a deposição de gordura intramuscular foi alterada em função do nível de energia na dieta e em função da idade ao abate, eles usaram $U^{14}C$ (isótopos estáveis) e observaram que o acetato e o lactato estão mais relacionados com sua incorporação no tecido adiposo subcutâneo que no intramuscular (GRUMMER, 1991). Também, observaram que a glicose o composto carbônico com maior concentração de seus carbonos no tecido adiposo intramuscular em relação ao subcutâneo, e apresentou uma menor incorporação da glicose nos animais mais velhos (18 meses), achando por uma maior incorporação de acetato e lactato nestes animais.

Verseman et al. (2008) procurando determinar níveis ótimos de inclusão de glicerina na dieta de bovinos de corte confinados concluíram, que a eficiência alimentar e a deposição de gordura de marmoreio foram melhorados no nível de 10% de inclusão. Não entanto, Lage et al., (2014) encontrou que o nível de inclusão de glicerina (10% MS) nas dietas não foi o suficiente para aumentar marmoreado independente do nível de amido da dieta. E, em dietas

com lipídios, Fernandes et al. (2009), trabalhando com novilhos e novilhas Nelore alimentados com ou sem semente de linhaça constataram diferenças de marmorização entre sexos do que entre dietas. Mas, Silva (2013) concluiu que o teor de gordura intramuscular (grau de marmoreio) não foi afetado pela associação de lipídios (soja grão, óleo soja e gordura protegida) e glicerina bruta (10% MS) na dieta de bovinos de corte terminados em confinamento.

3 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo* efeito da fonte de óleo de soja em associação com a glicerina em dietas em confinamento para novilhos Nelore sobre, fermentação ruminal, síntese de proteína, eficiência da biohidrogenação ruminal e fluxo intestinal de ácidos graxos.

Analisar *in vitro* a cinética da biohidrogenação de ácidos graxos insaturados, produção de metano, dióxido de carbono e óxido nitroso por microrganismo ruminais em dietas com fontes de óleo de soja associadas com glicerina.

4 REFERÊNCIAS

ABO EI-NOR, S.; ABUGHAZALEH, A.A.; POTU, R.B.; HASTINGS, D.; KHATTAB, M.S.A. Effects of differing levels of glycerol on rumen fermentation and bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v.162, p. 99-105, 2010.

ALBRO, J.D.; WEBER, D.W.; DEL CURTO, T. Comparison of whole, raw soybeans, extruded soybeans, or soybean meal and barley on digestive characteristics and performance of weaned beef steers consuming mature grass hay. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 26-32, 1993.

BASSI, M.S.; LADEIRA, M.M.; CHIZZOTTI, M.L.; CHIZZOTTI, F.H.M.; OLIVEIRA, D.M.D.; MACHADO NETO, O.R.; CARVALHO, J.R.R.D.; NOGUEIRA NETO, A.A. Grãos de oleaginosas na alimentação de novilhos zebuínos: consumo, digestibilidade e desempenho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 353-359, 2012.

BAUCHART, D. Lipid absorption and transport in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 3864-3881, 1993.

BAUMAN, D.E.; BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; GRIINARI, J.M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1-15, 2000.

BEAM, T.M.; JENKINS, T.C.; MOATE, P.J.; KOHN, R.A.; PALMQUIST, D.L. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2564-2573, 2000.

BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; MARTINEZ, T.F.; MCALLISTER, T.A. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1990-1996, 2007.

BERCHIELLI, T.T.; MESSANA, J.D.; CANESIN, R.C. Produção de metano entérico em pastagens tropicais. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, p. 954-968, 2012.

BINES, J.A.; HART, I.C. The response of plasma insulin and other hormones to intraruminal infusion of vfa mixtures in cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 64, p. 304-305, 1984.

BOCK, B.J.; HARMON, D.L.; BRANDT, R.T.J. ; SCHNEIDER, J.E. Fat source and calcium level effects on finishing steer performance, digestion, and metabolism. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 2211-2224, 1991.

BUNTING, L.D.; FERNANDEZ, J.M.; FORNEA, R.J.; WHITE, T.W.; FROETSCHER, M.A.; STONE, J.D.; INGAWA, K. Seasonal effects of supplemental fat or undegradable protein on the growth and metabolism of Holstein calves. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1611-1620, 1996.

BYERS, F.M.; SCHELLING, G.T. Lipids in ruminant nutrition. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. New Jersey: A Reston Book, p. 298-312, 1989.

CALDER, P.C. Immunoregulatory and antiinflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 467-490, 1998.

CASTAGNINO, P.S; MESSANA, J.D.; FIORENTINI, G.; JESUS, R.B. de; SAN VITO, E.; CARVALHO, I. P. C.; BERCHIELLI, T. T. Glycerol combined with oils did not limit biohydrogenation of unsaturated fatty acid but reduced methane production in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 201, p. 14-24, 2015.

CASUTT, M.M.; SCHEEDER, M.R.; OSSOWSKI, D.A.; SUTTER, F.; SLIWINSKI, B.J.; DANILO, A.A.; KREUZER, M. Comparative evaluation of rumen-protected fat, coconut oil and various oilseeds supplemented to fattening bulls. 2. Effects on composition and oxidative stability of adipose tissues. **Arch. Tierernahr.**, v. 53, p. 25-44, 2000.

CAVALIERI, F.B.; SANTOS, G.T.; MATSUSHITA, M.; PETIT, H.V.; RIGOLON, L.P.; SILVA, D.; HORST, J.A.; CAPOVILLA, L.C.; RAMOS, F.S. Milk production and milk composition of dairy cows fed Lac100® or whole flaxseed. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 85, p. 413-416, 2005.

CAVALIERI, F.L.B.; SANTOS, G.T.; SILVA, D.C.; RIGOLON, L.P.; DAMASCENO, J.C.; CAPOVILLA, L.C.; BETINI, C.M.; RAMOS, F.S.; PETIT, H.V. Digestibilidade e metabólitos sanguíneos de vacas da raça Holandesa superovuladas que receberam Lac100® ou linhaça em grão como fontes de gordura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 896-902, 2009.

CHILLIARD, Y.; GAGLIOSTRO, G.; FLECHET, J.; LEFAIVRE, J.; SEBASTIAN, I. Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 5. Milk fatty acids and adipose tissue lipogenic activities. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1844-1854, 1991.

CHUNG, Y.H.; RICO, D.E.; MARTINEZ, C.M.; CASSIDY, T.W.; NOIROT, V.; AMES, A.; VARGA, G.A. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on lactational performance and metabolic profiles. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5682-5691, 2007.

COLLOMB, M.; SCHMID, A.; SIEBER, R.; WECHSLER, D.; RYHÄNEN, E.L. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1347-1361, 2006.

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

CZERKAWSKI, J.W. Microbial fermentation in the rumen. **Journal Proceedings of The Nutrition Society**, v. 43, p. 101-118, 1984.

DA SILVA, M.M.C.; RODRIGUES, M.T.; RODRIGUES, C.A.F.; BRANCO, R.H.; LEÃO, M.I.; DE MAGALHÃES, A.C.M.; MATOS, R.S. Efeito da suplementação de lipídios sobre a digestibilidade e os parâmetros da fermentação ruminal em cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 246-256, 2007.

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

DEFRAIN, J.; HIPPEN, A.; KALSCHEUR, K.; JARDON, P. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 4195-206, 2004.

DEVENDRA, C.; LEWIS, D. The interaction between dietary lipids and fibre in the sheep 2. Digestibility Studies. **Animal Science**, v. 19, p. 67-76, 1974.

DOHME, F.; FIEVEZ, V.; RAES, K.; DEMEYER, D. Increasing levels of two different fish oils lower ruminal biohydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid in vitro. **Journal of Applied Animal Research**, v. 52, p. 309-320, 2003.

DONKIN, S.S.; KOSER, S.L.; WHITE, H.M.; DOANE, P.H.; CECAVA, M.J. Feeding value of glycerol as a replacement for corn grain in rations fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 5111-5119, 2009.

DOREAU, M.; FERLAY, A. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 45, p. 379-96, 1994.

DOREAU, M.; FERLAY, A. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. **Livestock Production Science**, v. 43, p. 97-110, 1995.

EIFERT, E.C.; LANA, R.P.; LEÃO, M.I.; ARCURI, P.B.; VALADARES FILHO, S.C.; LEOPOLDINO, W.M.; OLIVEIRA, J.S.; SAMPAIO, C.B. Efeito da combinação de óleo de soja e monensina na dieta sobre o consumo de matéria seca e a digestão de vacas lactantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, p. 297-308, 2005.

EMERY, R.S.; HERDT, T.H. Lipid nutrition. **The veterinary clinics of North America**, v. 7, p. 341-52, 1991.

ENGLE, T.E.; SPEARS, J.W.; FELLNER, V.; ODLE, J. Effects of soybean oil and dietary copper on ruminal and tissue lipid metabolism in finishing steers. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 2713-2721, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. **FAOSTAT database**. Rome, 2013. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>. Acesso em: 10 out. 2014.

FELTON, E.E.; KERLEY, M.S. Performance and carcass quality of steers fed whole raw soybeans at increasing inclusion levels. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 725-732, 2004.

FERNANDES, A.R.M.; SAMPAIO, A.A.M.; HENRIQUE, W.; TULLIO, R.R.; OLIVEIRA, E.A. Composição química e perfil de ácidos graxos da carne de bovinos de diferentes condições sexuais recebendo silagem de milho e concentrado ou cana-de-açúcar e concentrado contendo grãos de girassol. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 705-712. 2009.

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja : taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, v. 28, p. 19-23, 2005.

FIEVEZ, V.; DOHME, F.; DANNEELS M.; RAES, K.; DEMEYER, D. Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation in vitro and in vivo. **Animal Feed Science and Technology**, v. 104, p. 41-58, 2003.

FIORENTINI, G.; SANTANA, M.C.A.; SAMPAIO, A.A.M.; REIS, R.A.; RIBEIRO, A.F.; BERCHIELLI, T.T. Intake and performance of confined crossbred heifers

fed different lipid sources. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 1490-1498, 2012.

FISHER, L.; ERFLE, J.; LODGE, G.; SAUER, F. Effects of propylene glycol or glycerol supplementation of the diet of dairy cows on feed intake, milk yield and composition, and incidence of ketosis. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 53, p. 289-296, 1973.

FRANÇOZO, M.C.; PRADO, I.N.D.; CECATO, U.; VALERO, M.V.; ZAWADZKI, F.; RIBEIRO, O.L.; PRADO, R.M.D.; VISENTAINER, J.V. Growth performance, carcass characteristics and meat quality of finishing bulls fed crude glycerin-supplemented diets. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 327-336, 2013.

FREITAS JÚNIOR, J.E. D.; RENNÓ, F.P.; SILVA, L.F.P.E.; GANDRA, J.R.; MATURANA FILHO, M.; FODITSCH, C.; VENTURELLI, B.C. Parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras suplementadas com diferentes fontes de gordura. **Ciência Rural**, v. 40, p. 950-956, 2010.

GARTON, G.A.; LOUGH, A.K.; VIOQUE, E. Glyceride hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. **Journal of General Microbiology**, v. 25, p. 215-225, 1961.

GERSON, T.; JOHN, A.; KING, A.S.D. The effects of dietary starch and fibre on the in vitro rates of lipolysis and hydrogenation by sheep rumen digesta. **The Journal of Agricultural Science**, v. 105, p. 27-30, 1985.

GIVENS, D.I.; KLIEM, K.E.; GIBBS, R.A. The role of meat as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids in the human diet. **Meat Science**, v. 74, p. 209-218, 2006.

GOFF, J.; HORST, R. Oral glycerol as an aid in the treatment of ketosis and fatty liver. **Journal Dairy Science**, v. 84, p. 40, 2003.

GOODEN, J.M. The importance of lipolytic enzymes in milk-fed and ruminating calves. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 26, p. 1189-1199, 1973.

GRAINGER, C. GIA methane: increasing fat can reduce methane emissions. GIA Newsletter. Department of Primary Industries, 2008.

GRUMMER, R.R. Influence of pilled fat and calcium salt of palm oil fatty acids on ruminal fermentation and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 117-123, 1988.

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

GUNN, P.J.; LEMENAGER, R.P.; BUCKMASTER, D.R.; CLAEYS, M.C.; LAKE, S.L. Effects of dried distillers grains with soluble and crude glycerin on performance, carcass characteristics, and metabolic parameters of early

weaned beef calves. **The Professional Animal Scientist**, v. 27, p. 283-294, 2011.

HAMMOND, K.L.; MUETZEL, S.; WAGHORN, G.C.; PINARES-PATINO, C.S.; BURKE, J.L.; HOSKIN, S.O. The variation in methane emissions from sheep and cattle is not explained by the chemical composition of ryegrass. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 69, p. 174-178, 2008.

HARFOOT, C.G. Lipid metabolism in the rumen. **Progress in Lipid Research**, v. 17, p. 21-54, 1978.

HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: HOBSON, H.D. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. New York: Elsevier Science, p. 285-322, 1988.

HARVATINE, K.J.; ALLEN, M.S. Fat Supplements Affect Fractional Rates of Ruminant Fatty Acid Biohydrogenation and Passage in Dairy Cows. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 677-685, 2006.

HESS, B.W.; MOSS, G.E.; RULE, D.C. A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. E188-E204, 2008.

HIGHTSHOE, R.B.; COCHRAN, R.C.; CORAH, L.R.; HARMON, D.L.; VANZANT, E.S. Influence of source and level of ruminal-escape lipid in supplements on forage intake, digestibility, digesta flow, and fermentation characteristics in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 69, p. 4974-4982, 1991.

JANSSEN, P.H.; KIRS, M. Structure of the Archaeal Community of the Rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3619-3625, 2008.

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

JENKINS, T.C.; ABUGHAZALEH, A.A.; FREEMAN, S.; THIES, E.J. The production of 10-hydroxystearic and 10-ketostearic acids is an alternative route of oleic acid transformation by the ruminal macrobiotic in cattle. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 926-931, 2006.

JENKINS, T.C.; JENNY, B.F. Effect of hydrogenated fat on feed intake, nutrient digestion, and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 2316-2324, 1989.

JENKINS, T.C.; PALMQUIST, D.L. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 978-986, 1984.

JENKINS, T.C.; WALLACE, R.J.; MOATE, P.J.; MOSLEY, E.E.; Board-invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 397-412, 2008.

JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2483-2492, 1995.

JORDAN, E.; KENNY, D.; HAWKINS, M.; MALONE, R.; LOVETT, D.K.; O'MARA, F.P. Effect of refined soy oil or whole soybeans on intake, methane output, and performance of young bulls. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 2418-2425, 2006a.

JORDAN, E.; LOVETT, D.K.; HAWKINS, M.; CALLAN, J.J.; O'MARA, F.P. The effect of varying levels of coconut oil on intake, digestibility and methane output from continental cross beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 859-865, 2006b.

JOUANY, J.P.; LASSALAS, B.; DOREAU, M.; GLASSER, F. Dynamic features of the rumen metabolism of linoleic acid, linolenic acid and linseed oil measured in vitro. **Lipids**, v. 42, p. 351-360, 2007.

KEMP, J.D.; MAHYUDDIN, M.; ELY, D.G.; FOX, J.D.; MOODY, W.G. Effect of feeding systems, slaughter weight and sex on organoleptic properties, and fatty acid composition of lamb. **Journal of Animal Science**, v. 51, p. 321-330, 1980.

KEMP, P.; LANDER, D.J.; GUNSTONE, F.D. The hydrogenation of some cis- and trans-octadecenoic acids to stearic acid by a rumen *Fusocillus* sp. **British Journal of Nutrition**, v. 52, p. 165-170, 1984.

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

KOSTER, H.H.; COCHRAN, R.C.; TITGEMEYER, E.C.; VANZANT, E.S.; ABDELGADIR, I.; St-JEAN, G. Effect of increasing degradable intake protein on intake and digestion of low-quality, tallgrass-prairie forage by beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 2473-2481, 1996.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria, RS. ed. Editora UFSM, 212 p., 2011

KREHBIEL, C. Ruminant and physiological metabolism of glycerin. **Journal of Animal Science**, Champaign, Abstract. v. 86, p. 392, 2008.

KUCUK, O.; HESS, B.W.; LUDDEN, P.A.; RULE, D.C. Effect of forage:concentrate ratio on ruminal digestion and duodenal flow of fatty acids in ewes. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 2233-2240, 2001.

LAGE, J.F.; BERCHIELLI, T.T.; SAN VITO, E.; SILVA, R.A.; RIBEIRO, A.F.; REIS, R.A.; DALLANTONIA, E.E.; SIMONETTI, L.R.; DELEVATTI, L.M.; MACHADO, M. Fatty acid profile, carcass and meat quality traits of young Nelore bulls fed crude glycerin replacing energy sources in the concentrate. **Meat Science**, v.96, p. 1158-1164, 2014.

LALIOTIS, G.P.; BIZELIS I.; ROGDAKIS, E. Comparative approach of the de novo fatty acid synthesis (lipogenesis) between ruminant and non ruminant mammalian species: from bio-chemical level to the Main Regulatory Lipogenic Genes. **Current Genomics**, v. 11, p. 168-163, 2010.

LAVERROUX, S.; GLASSER, F.; GILLET, M.; JOLY, C.; DOREAU, M. Isomerization of vaccenic acid to cis and trans C18:1 isomers during biohydrogenation by rumen microbes. **Lipids**, v. 46, p. 843-850, 2011.

LEE, H.C.C.; DUPONT, J. Effects of dietary fatty acids on the activity of glucose transport in adipocytes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 2, p. 38-43, 1991.

LEE, M.R.F.; TWEED, J.K.S.; DEWHURST, R.J.; SCOLLAN, N.D. Effect of forage: concentrate ratio on ruminal metabolism and duodenal flow of fatty acids in beef steers. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 31-40, 2006.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo, 1119 p., 2005.

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

LIN, H.; BOYLSTON, T.D.; CHANG, M.J.; LUEDECKE, L.O.; SHULTZ, T.D. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2358-2365, 1995.

LOCK, A.L.; BAUMAN, D.E.; JENKINS, T.C. Understanding the Biology of Milk Fat Depression: From Basic Concepts to Practical Application. In: **Intermountain Nutrition Conference**, Salt Lake City, Utah, January, 2008.

LOOR, J.J.; UEDA, K.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y.; DOREAU, M. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage: concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2472-2485, 2004.

MACH, M.; BACH, A.; DEVANT, M. Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 632-638, 2009.

MACHMÜLLER, A.; OSSOWSKI, D.A.; WANNER, M.; KREUZER, M. Potential of various fatty feeds to reduce methane release from rumen fermentation in

vitro (Rusitec). **Animal Feed Science and Technology**, v. 71, p. 117-130, 1998.

MARÍN, A.L.M.; HERNÁNDEZ, M.P.; ALBA, L.P.; CASTRO, G.G. Digestión de los lípidos en los rumiantes: Una revisión. **Interciencia**, v. 35, p. 1-7, 2010.

MESSANA, J.D.; BERCHIELLI, T.T.; ARCURI, P.B.; REIS, R.A.; CANESIN, R.C.; RIBEIRO, A.F.; FIORENTINI, G.; FERNANDES, J.J.R. Rumen fermentation and rumen microbes in Nellore steers receiving diets with different lipid contents. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, p. 204-212, 2013.

MESSANA, J.D.; BERCHIELLI, T.T.; ARCURI, P.B.; RIBEIRO, A.F.; FIORENTINI, G.; CANESIN, R.C. Effects of different lipid levels on protozoa population, microbial protein synthesis and rumen degradability in cattle. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 34, p. 279-285, 2012.

MIR, P. S.; MEARS, G.L.; MIR, Z. Vegetable oil in beef cattle diets. In: BEAUCHEMIN, K.A.; CREWS, D.H. (Ed.). *Advances in beef cattle science*. Lethbridge: **Lethbridge Research Centre**, v. 1, p. 88-104, 2001.

MOATE, P.J.; CHALUPA, W.; JENKINS, T.C.; BOSTON, R.C. A model to describe ruminal metabolism and intestinal absorption of long chain fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**, v. 112, p. 79-105, 2004.

NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; Van NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. Springer, p. 523-632, 1997.

NICHOLSON, T.; OMER, S.A. The inhibitory effect of intestinal infusions of unsaturated long-chain fatty acids on forestomach motility of sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 50, p. 141-149, 1983.

NÖRNBERG, J.L.; STUMPF JÚNIOR, W.; LÓPEZ, J.; COSTA, P.B. Valor do farelo de arroz integral como fonte de gordura na dieta de vacas Jersey na fase inicial de lactação: digestibilidade aparente de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 2412-2421, 2004.

PAGGI, R.A.; FAY, J.P.; FAVERIN, C. In vitro ruminal digestibility of oat hay and cellulolytic activity in the presence of increasing concentrations of short-chain acids and glycerol. **The Journal of Agricultural Science**, v. 142, p. 89-96, 2004.

PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. Metabolismo das lipídios. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds.). **Nutrição de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep. 616 p., 2011.

PALMQUIST, D.L.; WEISBJERG, M.R.; HVELPLUND, T. Ruminal, intestinal, and total digestibilities of nutrients in cows fed diets high in fat and undegradable protein. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1353-1364, 1993.

PARIZA, M.W.; PARK, Y.; COOK, M.E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in lipid research**, v. 40, p. 283-298, 2001.

PARKER, A.J.; DOBSON, G.P.; FITZPATRICK, L.A. Physiological and metabolic effects of prophylactic treatment with the osmolytes glycerol and betaine on *Bos indicus* steers during long duration transportation. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 2916-2923, 2007.

PARODI, P.W. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 1055-1060, 1997.

PARSONS, G.L.; SHELOR, M.K.; DROUILLARD, J.S. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 653-657, 2009.

PEDREIRA, M.S.; OLIVEIRA, S.G.; PRIMAVESI, O.; LIMA, M.A.; FRIGHETTO, R.T.S.; BERCHIELLI, T.T. Methane emissions and estimates of ruminal fermentation parameters in beef cattle fed different dietary concentrate levels. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, p. 592-598, 2013.

PERES, J.R.R.; FRITAS JUNIOR, E.D.; GAZZONI, D.L. Biocombustíveis; uma oportunidade para o agronegócio brasileiro. **Revista de Política Agrícola**, v. 14, p. 31-41, 2005.

PETHICK, D.W., DUNSHEA, F.R. The partitioning of fat in farm animals. **Nutrition Society of Australia**, v. 20, p. 3-13. 1996.

PINEDO, L.A.; RODRIGUES, P.H.M.; PAUCAR, L.C.; JUNIOR, F.P. Estratégias nutricionais para mitigação da emissão de metano entérico pelos ruminantes, relacionadas à sustentabilidade ambiental. In: **III Simpósio de Sustentabilidade; Ciência Animal (SISCA)** 21 e 22 de agosto de 2013, http://sisca.com.br/resumos/SISCA_2013_045.pdf. Acesso em: 20/08/2014.

PIPEROVA, L.S.; SAMPUGNA, J.; TETER, B.B.; KALSCHEUR, K.F.; YURAWECZ, M.P.; KU, Y.; MOREHOUSE, K.M.; ERDMAN, R.A. Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 1235-1241, 2002.

PYATT, N.; DOANE, P.; CECAVA, M. Effect of crude glycerin in finishing cattle diets. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 412, 2007.

ROGER, V.; FONTY, G.; ANDRE, C.; GOUET, P. Effects of glycerol on the growth, adhesion, and cellulolytic activity of rumen cellulolytic bacteria and anaerobic fungi. **Current Microbiology**, v. 25, p. 197-201, 1992.

RULE, D.C.; BUSBOOM, J.R.; KERCHER, C.J. Effect of dietary canola on fatty acid composition of bovine adipose tissue, muscle, kidney, and liver. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2735-2744, 1994.

RUSSELL, J.B.; MANTOVANI, H.C. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 4, p. 347-355, 2002.

SAUVANT, D.; BAS, P. La digestion des lipides chez le ruminant. **INRA, Production Animale**, v. 14, p. 303-310, 2001.

SHINGFIELD, K.J.; BERNARD, L.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. **Animal**, v.4, p.1140-1166, 2010.

SILVA, R.A. **Fontes lipídicas associadas à glicerina bruta de dieta de tourinhos nelore**. 2013. 50 f. Dissertação (Mestre em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2013.

SMITH, S.B.; CROUSE, J.D. Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue. **The Journal of Nutrition**, v. 114, p. 792-800, 1984.

SMITH, S.B.; GILL, C.A.; LUNT, D.K.; BROOKS, M.A. Regulation of fat and fatty acid composition in beef cattle. **Asian Australasian Journal of Animal Science**, v. 22, p. 1225-1233, 2009.

SOUZA, A. R.D.L.; MEDEIROS, S.R.; MORAIS, M.G.; OSHIRO, M.M.; JÚNIOR, R.A.A.T. Dieta com alto teor de gordura e desempenho de tourinhos de grupos genéticos diferentes em confinamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 746-753, 2009.

SUKHIJA, P.S.; PALMQUIST, D.L. Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 1784-1787, 1990.

SULLIVAN, H.M.; BERNARD, J.K.; AMOS, H.E.; JENKINS, T.C. Performance of lactating dairy cows fed whole cottonseed with elevated concentrations of free fatty acids in the oil. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 665-671, 2004.

SUTTER, F.; CASUTT, M.M.; OSSOWSKI, D.A.; SCHEEDER, M.R.; KREUZER, M. Comparative evaluation of rumen-protected fat, coconut oil and various oilseeds supplemented to fattening bulls. 1. Effects on growth, carcass and meat quality. **Arch Tierernähr**, v. 53, p. 1-23, 2000.

SUTTON, J.D.; KNIGHT, R.; MCALLAN, A.B.; SMITH, R.H. Digestion and synthesis in the rumen of sheep given diets supplemented with free and protected oils. **British Journal of Nutrition**, v. 49, p. 419-432, 1983.

TEDESCHI, L.O.; FOX, D.G.; TYLUTKI, T.P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets mention of trade names, proprietary products, or specific equipment does not constitute a guarantee or warranty of the product by the authors and does not imply its approval to the exclusion of other products

that also may be suitable. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, p. 1591-1602, 2003.

TEITELBAUM, J.E.; WALKER, W.A. Review: the role of omega 3 fatty acids in intestinal inflammation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 21-32, 2001.

THORNTON, P.K. Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, v. 365, p. 2853-2867, 2010.

VALINOTE, A.C.; NOGUEIRA FILHO, J.C. M.; LEME, P.R.; SILVA, S.L.; CUNHA, J.A. Fontes de lipídio e monensina sódica na fermentação, cinética e degradabilidade ruminal de bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 117-124, 2006.

VAN CLEEF, E.H.C.B.; EZEQUIEL, J.M.B.; D'AUREA, A.P.; FÁVARO, V.R.; SANCANARI, J.B.D. Crude glycerin in diets for feedlot Nellore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, p. 86-91, 2014.

VAN NEVEL, C.; DEMEYER, D. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. **Reproduction Nutrition, Development**, v. 36, p. 53-63, 1996.

VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. In: Hobson, P.N. (Ed.) **The rumen microbial ecosystem**, Essex: Elsevier, p. 387-443, 1988.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Comstock Pub, 2nd ed. Ithaca: Comstock Pub, 476 p., 1994

VARGAS, L.H.; LANA, R.D.P.; JHAM, G.N.; SANTOS, F.L.; QUEIROZ, A.C. D.; MANCIO, A.B. Adição de lipídios na ração de vacas leiteiras: parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 522-529, 2002.

VERNON, R.G. Lipid metabolism in adipose tissue of ruminants. In: CHRISTIE, W.W. **Lipid metabolism in ruminant animals**. Oxford: Pergamon Press Ltda, p. 296-329, 1981.

VERSEMANN, B.; WIEGAND, B.; KERLEY, M.; PORTER, J.; ROBERTS, K.; EVANS, H. Dietary inclusion of crude glycerol changes beef steer growth performance and intramuscular fat deposition. **Journal of Animal Science**, Abstract. v. 86, p. 478, 2008.

WANG, C.; LIU, Q.; HUO, W.J.; YANG, W.Z.; DONG, K.H.; HUANG, Y.X.; GUO, G. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. **Livestock Science**, v. 121, p. 15-20, 2009.

WATTIAUX, M.A.; ARMENTANO, L.E. Lipid metabolism in dairy cows. In: **Dairy Essentials**, Instituto Babcock for International Dairy Research and Development, University of Wisconsin-Madison, 2014. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAgKkwAA/bovinocultura-leite-completo>>. Acesso em : 20 nov. 2014.

WU, Z.; OHAJURUKA, O.A.; PALMQUIST, D.L. Ruminant synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3025-3034, 1991.

ZINN, R.A. Influence of level and source of dietary fat on its comparative feeding value in finishing diets for feedlot steers: metabolism. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 1038-1049, 1989.

ZINN, R.A.; BORQUES, J.L. Influence of sodium bicarbonate and monensin on utilization of a fat-supplemented, high-energy growing-finishing diet by feedlot steers. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 18-25, 1993.

ZINN, R.A.; JORQUERA, A.P. Feed value of supplemental fats used in feedlot cattle diets. **The Veterinary Clinics of North America**, v. 23, p. 247-268, 2007.

CAPÍTULO 2. FONTES DE ÓLEO DE SOJA EM ASSOCIAÇÃO COM GLICERINA AFETA O CONSUMO, DIGESTIBILIDADE DA MATÉRIA SECA E PARÂMETROS FERMENTATIVOS EM NOVILHOS NELORE

RESUMO: Oito novilhos da raça Nelore, com peso inicial de $554,13 \pm 36,35$ kg e idade média de 30 meses, com cânula ruminal e duodenal, foram alimentados com dietas contendo glicerina (100 g/kg MS) e três fontes de óleo de soja (50 g/kg MS), para determinar o efeito da forma disponível do lipídio em associação com glicerina sobre o consumo e a digestibilidade da matéria seca, de matéria orgânica e alguns nutrientes, dos parâmetros fermentativos e o balanço de nitrogênio. Foram fornecidas quatro tipos de dietas na proporção forragem:concentrado de 30:70, a silagem de milho foi fornecida como volumoso em todas as dietas, e o concentrado foi diferenciado pela fonte de óleo de soja: 1) dieta controle, sem fonte lipídica CO; 2) dieta com soja grão SG; 3) dieta com óleo de soja OS; e 4) dieta com gordura protegida comercial GP. Os animais foram divididos em dois quadrados latinos 4x4, com quatro períodos experimentais de 16 dias cada. As médias foram submetidas à análise de contrastes ortogonais. Não houve efeito significativo ($P>0,05$) das fontes de óleo de soja em associação com glicerina sobre o consumo da MS, MO; mas, com diferenças ($P<0,05$) no consumo de proteína bruta, EE, FDNcp e EB, no contraste SG vs GP os animais que receberam a dieta SG apresentaram o maior consumo (1,69, 0,36 e 2,67 kg/dia), respectivamente. No entanto, apresentaram diferenças ($P<0,05$) na digestibilidade ruminal e da MS, MO e EB, quando comparada à dieta CO vs OS, SG e GP; encontrou-se efeitos ($P<0,05$) na digestibilidade ruminal e total da FDNcp para os contrastes (CO vs OS, SG e GP) e (SG vs GP), sendo os animais que receberam a dieta SG a de menor digestibilidade. Não houve efeito ($P>0,05$) no pH e na concentração dos ácidos graxos de cadeia curta, mas com diferenças ($P<0,05$) na concentração de $N-NH_3$ no contraste SG vs GP, sendo o tratamento SG com o menor valor (17,57 mg/dL). Não houve ($P>0,05$) efeitos dos tratamentos na concentração dos ácidos graxos de cadeia curta; a produção de acetato foi estável para todos os tratamentos (65,63 Mm/L), e a produção de propionato foi incrementada para todos os tratamentos (40,02 Mm/L), possivelmente pela inclusão da glicerina, o que provocou uma redução na relação acetato:propionato, com valor médio de 1,69. A síntese de proteína microbiana

e o fluxo de proteína não microbiana não foram afetadas ($P>0,05$) pelos tratamentos; a eficiência da síntese de nitrogênio microbiana foi afetada ($P<0,05$), onde os animais que receberam a dieta CO foram os de menor eficiência com um valor 11,24 g N-Microbiano/kg de matéria orgânica aparente fermentável no rumen) comparados com os animais das dietas (OS, SG e GP). Os animais que receberam a dieta SG apresentaram a melhor porcentagem de nitrogênio retido no tecido ($P<0,05$) com 46,74%. Os resultados indicam que o uso de fontes de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para bovinos da raça Nelore não resulta em mudanças no pH ruminal, nem na proporção molar de acetato, nem afeta o consumo da matéria seca; mas, afetando a digestibilidade da MS, FDNcp e EE; encontrou-se aumento na proporção molar de propionato, menor relação acetato/propionato. No entanto, sugere-se que o uso de fontes de óleo de soja com 5% de EE e em associação com glicerina (100g/kg MS) pode ser utilizado em rações estratégicas para ruminantes, sendo importante levar em consideração a forma como o lipídio está disponível na fonte, influenciando na eficiência de alguns parâmetros da fermentação ruminal e na digestibilidade de nutrientes.

Palavras-chave: gordura protegida, óleo soja, parâmetros ruminais, proteína microbiana.

1 INTRODUÇÃO

O emprego da glicerina bruta e lipídios em dietas para ruminantes como fonte de energia tem apresentado resultados interessantes relacionados com o desempenho animal e qualidade da carne, e os resultados favoráveis estão relacionados com o nível máximo adequado de inclusão na dieta. O caráter gliconeogênico da glicerina permite sua utilização na alimentação de ruminantes como fonte de energia segura (DASARI et al., 2005; PARSONS et al., 2009; WANG et al., 2009).

A alta disponibilidade de glicerina no mercado do Brasil e seu valor comercial razoável permitem substituir em parte fontes de energia convencionais a base de amido especialmente o milho (SILVA, 2013; LAGE et al., 2014; Van CLEEF et al., 2014), mas com limitações na quantidade a ser utilizada. Segundo Paggi et al. (2004) níveis de glicerina na dieta de ruminantes superiores a 72 g/kg de matéria seca diminuem a digestibilidade da fibra e, portanto, diminui o consumo da matéria seca, o que causa efeito sobre o crescimento de bactérias e alguns fungos celulolíticos.

Os lipídios na alimentação de ruminantes têm sido utilizados nas últimas décadas como aporte energético quando a energia se torna limitante, o que tem permitido um maior conhecimento do uso para ruminantes. Diversos trabalhos mostram efeitos positivos em níveis recomendados sem causar efeitos negativos na fermentação ruminal e produtividade (FIORENTINI et al., 2012; MESSANA et al., 2013; SILVA, 2013). Sendo importante levar em consideração o tipo de lipídio a ser fornecido, estando diretamente relacionado com sua origem e da forma como é fornecido.

Trabalhos *in vitro* mostram que a glicerina em associação com fontes de lipídios pode inibir parcialmente lípases bacterianas no rumen (KRUEGER et al., 2010; EDWARDS et al., 2012) afetando a lipólise, processo necessário para a liberação de ácidos graxos insaturados para a continuidade do processo da biohidrogenação (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1997; LOOR et al., 2004). Castagnino et al. (2015) concluíram que a glicerina em associação com fontes lipídicas diminuiu a lipólise, mas insuficientemente para limitar a intensa biohidrogenação de ácidos graxos insaturados no fluido do rumen. De acordo com a Edwards et al. (2012) incorporando entre 8% e 15% de glicerina nas dietas de ruminantes, puderam alcançar reduções efetivas na lipólise, sem

afetar negativamente a digestão da matéria seca no rumen, mas sem ter esclarecido o mecanismo pelo qual o glicerol inibe a lipólise ruminal.

Com base nestes postulados e com o objetivo de obter um melhor entendimento do uso de fontes de óleo de soja em associação a glicerina bruta em dieta para ruminantes, foi avaliada o consumo e digestibilidade da matéria seca e alguns nutrientes, o fluxo ruminal de matéria seca, e efeitos na fermentação ruminal, estimativa da síntese de proteína microbiana, e o balanço de nitrogênio em novilhos da raça Nelore, alimentados com dietas contendo glicerina (100 g/kg MS) e três fontes de óleo de soja (soja grão, óleo de soja e gordura protegida) com 5% de extrato etéreo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e instalações

O experimento foi realizado nas instalações do Setor de Digestibilidade pertencente ao Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista. Utilizaram-se baias individuais para o alojamento dos animais durante todo o período experimental, com aproximadamente 12m², as quais continham bebedouro individual, comedouro individual, piso de concreto e coberto de telhas. Os animais permaneceram alojados em uma mesma baia pelos quatro períodos.

2.2 Animais e período experimental

Foram utilizados oito novilhos Neloires com peso corporal médio inicial de 554,13 ± 36,35 kg e de 30 meses de idade. Os animais foram providos de cânula no rumen e duodeno, para a realização das coletas do estudo dos parâmetros ruminais e fluxo duodenal. O período experimental consistiu em 74 dias, dos quais 10 foram destinados à adaptação dos animais nas baias, tratados contra endo e ectoparasitas e adaptação dos animais para o consumo das dietas com alto grão, e 64 dias para os quatro períodos experimentais de 16 dias cada, sendo nove dias destinados à adaptação dos animais às dietas experimentais e sete dias restantes para as coletas. Os animais foram pesados no início e final de cada um dos períodos.

2.3 Dietas experimentais e análise de alimentos da dieta

O experimento foi conduzido para avaliar quatro dietas. Três delas com fontes de óleo de soja: grão de soja inteiro, óleo de soja e uma gordura protegida comercial (sais de cálcio de ácidos graxos insaturados de cadeia longa, ou gordura By-pass, Megalac[®]); e uma dieta controle. Todas as dietas foram constituídas com glicerina bruta (100 g/kg MS), as dietas ficaram em média com teor de extrato etéreo de 50 g/kg MS. A fonte de volumoso foi silagem de milho, em relação volumoso:concentrado de 30:70.

As dietas foram formuladas para ganho médio de 1,25 kg/dia de acordo com Valadares Filho et al. (2010). Durante o período experimental as dietas foram fornecidas duas vezes ao dia (7 h e 14 h) em quantidades iguais e, para garantir o consumo *ad libitum*, a quantidade de alimento fornecido foi incrementado em torno de 10% para garantir a presença de sobras. Os ingredientes do concentrado foram misturados no Setor de Digestibilidade, pertencente ao Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista.

2.4 Coleta de amostras

2.4.1 Coleta das amostras de alimento, sobras e fezes

Foram tomadas amostras dos alimentos e sobras entre o 6º e 15º dia de cada período experimental. Entre o 12º e o 14º dia de cada período, foi realizada coleta total de fezes (imediatamente após defecação, as fezes foram colocadas em baldes plásticos). As fezes foram pesadas e homogeneizadas para cada dia da coleta, e foi tomada uma amostra e armazenada a -20°C, e ao final do período foi feita uma amostra composta por animal.

No final do período experimental as amostras de alimento, sobras e fezes armazenadas no freezer foram pré-secas em estufa de ventilação forçada, a 60°C por 72 horas, moídas em moinho de facas tipo Willey com peneira contendo crivos de 1mm (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA), armazenadas a temperatura ambiente em recipiente plástico com prévia identificação, depois foram submetidas às análises químico-bromatológicas no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), pertencente ao Departamento de Zootecnia, FCAV/UNESP, Jaboticabal.

2.4.2 Coleta de amostras do líquido do rumen e conteúdo duodenal

As coletas de amostras de líquido ruminal para a determinação do pH, concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), e concentrações de ácidos graxos de cadeia curta do líquido ruminal, foram coletadas nos dias 10 e 11 de cada período experimental em intervalos de 4 horas. Para que o período de 24 horas fosse representado se adiantou a coleta em duas horas de um dia para o outro, da seguinte forma: no dia 10, as coletas foram nos horários (0:00, 04:00, 08:00, 12:00, 16:00, e 20:00); e no dia 11, as coletas foram nos horários (02:00, 06:00, 10:00, 14:00, 18:00, e 22:00). Cerca de 50mL de líquido ruminal foi recolhido após filtragem em tecido duplo de algodão, a coleta foi manualmente, através da cânula. O conteúdo ruminal seco retirado foi devolvido ao rumen imediatamente após a extração do líquido ruminal. Em seguida, 20 mL de líquido ruminal foi transferido para um recipiente plástico contendo 1 mL de uma solução acidificada (1:1) de H₂SO₄ e água, e armazenado a -15°C para posterior determinação das concentrações de N-NH₃. Uma segunda alíquota de 25 mL de líquido ruminal foi armazenada a -20°C para posterior determinação da concentração dos ácidos graxos de cadeia curta.

2.4.3 Coletas de urina

As amostras de urina foram obtidas a partir de coleta total, realizada do dia 12 ao dia 14 de cada período experimental, utilizando-se coletores dispostos de um funil acoplado a uma mangueira e adaptados aos animais, que conduzirá a urina até recipientes plásticos contendo 250 mL de solução de H₂SO₄ a 20%, para evitar a perda de nitrogênio (VALADARES et al., 1997). Após a coleta de cada dia, foi determinado o volume total excretado, feita a homogeneização, em seguida retiradas duas amostras de 10 mL cada, e filtradas por uma camada tripla de gaze. Ambas as amostras foram armazenadas a -15°C para posteriores análises no laboratório.

2.5 Análises laboratoriais

2.5.1 Análises químico de alimento, sobras e fezes

Foram tomadas as amostras previamente moídas para as determinações de: matéria seca (MS; método 934.01); extrato etéreo (EE; método 954.02); matéria mineral (MN; método 942.05); energia bruta (EB) de

acordo com AOAC (1995); matéria orgânica (MO) pela fórmula: $MO (\%) = 100 - \text{matéria mineral } (\%)$. A determinação da fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (FDNcp) foi realizada segundo as recomendações de Mertens (2002) e Van Soest (1994) usando α -amilase, adaptado por análises de fibra do Ankom²⁰⁰ (Ancokom Technology, Fairport, NY). A fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) e lignina detergente ácida (LDA) foram determinadas pelo método descrito por Goering e Van Soest (1970) e adaptado pela análise de fibra Ankom²⁰⁰ (Ankom Technology, Fairport, NY). A hemicelulose foi estimada pela equação $HEM = FDN - FDA$.

A determinação de proteína bruta (PB) foi realizada pelo método de DUMAS (ETHERIDGE et al., 1998) baseada na liberação do nitrogênio por combustão em alta temperatura em oxigênio puro; no analisador de nitrogênio LECO FP-258 (LECO Corp., St. Joseph, MI, USA). A energia bruta foi medida em um calorímetro IKA® modelo 2000 Basic, automatizado. Os carboidratos totais (CT), os carboidratos não fibrosos (CNF), os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados pelas equações abaixo. A composição das dietas experimentais encontra-se na Tabela 1.

1. Carboidratos totais, CT (SNIFFEN et al., 1992): $CT = 100 - (PB + EE + MM)$

Onde: PB= proteína bruta; EE= extrato etéreo; MM= matéria mineral.

2. Carboidratos não fibrosos, CNF (SNIFFEN et al., 1992):

$$\%CNE = 100 - (\%PB + \%FDNcp + \%EE + \%MM).$$

Onde: PB = proteína bruta; FDNcp= fibra insolúvel em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; EE= extrato etéreo; MM= matéria mineral.

3. Os nutrientes digestíveis totais, NDT (NRC, 2001):

$$NDT = PD + FDND + (EED \times 2,25) + CNFD$$

Onde: PD= proteína digestível; FDND= fibra em detergente neutro digestível; CNFD= carboidratos não fibrosos digestíveis; EED= extrato etéreo digestível.

4. Energia metabolizável, (SNIFFEN et al., 1992): $EM = NDT \times 0,04409 \times 0.82$

Onde: NTD= nutrientes digestíveis totais.

Tabela 1. Ingredientes e composição de nutrientes das dietas experimentais

Itens	Dietas			
	CO	SG	OS	GP
<i>Ingredientes (% de MS)</i>				
Silagem de Milho ¹	30,00	30,0	30,00	30,00
Milho em grão moído	47,89	46,48	45,71	45,40
Farelo de Soja	8,11	0,00	8,56	8,63
Soja grão	---	9,52	---	---
Óleo de soja	---	---	1,73	---
Gordura protegida ²	---	---	---	1,97
Glicerina Bruta	10,00	10,00	10,00	10,00
Ureia	1,00	1,00	1,00	1,00
Sal mineral ³	3,00	3,00	3,00	3,00
<i>Componentes químicos (nutrientes) (% MS)</i>				
Matéria seca	69,03	68,27	68,03	67,65
Matéria orgânica	94,15	94,2	94,15	94,18
Proteína bruta	16,44	17,09	15,52	15,91
Extrato etéreo	3,74	5,26	4,98	4,79
Cinza	5,85	5,80	5,85	5,82
FDNcp ⁴	25,85	24,56	24,11	24,09
FDA ⁵	9,03	9,54	8,77	8,90
Hemicelulose	16,34	18,23	18,73	16,75
LDA ⁶	1,78	3,05	2,38	2,02
Carboidratos totais	73,97	71,85	73,66	73,48
Carboidratos não fibrosos	48,12	47,30	49,55	49,39
Nutrientes digestíveis totais ⁷	80,53	82,85	82,46	82,25
<i>Energia (Mcal/kg MS)</i>				
Energia bruta	4,44	4,63	4,52	4,53
Energia metabolizável	2,91	3,0	2,98	2,97

CO: Dieta controle; SG: Dieta com soja grão; OS: Dieta com óleo de soja; GP: dieta com gordura protegida. ¹composição silagem do milho, MS 85,02%, MO 95,16%, proteína bruta 9,72%, EE 2,96%, FDNcp 51,57%, LDA 4,32%; ²Utilizou-se gordura comercial Megalac®; ³ Suplemento mineral (Ca: 210 g; P: 20 g; S: 37 g; Sódio: 80 g; Co: 490 mg; Mg: 1.424 mg; Z: 1.830 mg; I: 36 mg; Co: 29 mg; Se: 9 mg; F (máx.): 333 mg; ⁴FDNcp: fibra insolúvel em detergente neutro corrigido pra cinzas e proteína; ⁵FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; ⁶LDA: lignina em detergente ácida; ⁷NRC, 2001.

2.5.2 Consumo e digestão total da matéria seca e dos nutrientes

O consumo total e a digestibilidade aparente total (DAT) foram calculados pelas equações abaixo:

1. Consumo Total = Alimento fornecido – Sobras de Alimento.
2. Digestibilidade aparente total (%) = $((QI - QE) / QI) \times 100$.

Onde: QI= Quantidade do alimento Ingerido; e QE= Quantidade excretada em fezes.

2.5.3 Estimativa da digestão ruminal e intestinal da matéria seca e de nutrientes

Os fluxos da digestão dentro do trato gastrintestinal foram calculados utilizando a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) como indicador interno. Foi utilizada a metodologia *in situ* (CASALI et al., 2009) utilizando um animal canulado no rumen (independente ao período experimental), onde foram incubadas as amostras de alimento, sobras, conteúdo duodenal e fezes num período de 12 dias. Incubou-se 0,5 g de amostra em sacos de Ankom (filter bags F₅₇) que posteriormente foram lavados em água corrente, fervidos em detergente neutro por uma hora, lavados em água destilada fervente por 10 minutos e, em seguida foram lavados com acetona (por duas vezes), sendo secos em estufa a 65°C por 72 horas, para depois fazer a determinação da FDNi (Van SOEST, 1994). Para o cálculo do fluxo da digesta no rumen foi utilizada a seguinte equação (CASALI et al., 2009).

1. Fluxo ruminal da matéria seca = FRMS

$$FRMS = (QMS.f \times \%FDNind.f) / \%FDNind.d$$

Onde: QMS.f = quantidade de matéria seca em fezes; %FDNind.f= porcentagem de fibra em detergente neutro indigestível em fezes; %FDNind.d= porcentagem de fibra em detergente neutro indigestível em duodeno.

2. Digestibilidade ruminal da matéria seca que atingiu o duodeno, DRMS

$$DRMS = ((QMS.i - FRMS) / QMS.i) \times 100$$

Onde: QMS.i= quantidade de MS ingerido; FRMS= quantidade ou fluxo ruminal de matéria seca.

3. Fluxo ruminal da matéria orgânica fermentável, FRMOF

- FRMOF = (FRMS x % MO em conteúdo duodenal)- EE

Onde: FRMS = fluxo ruminal da matéria seca; EE = extrato etéreo

4. Matéria orgânica aparente fermentável no rumen, MOAFR (kg)

- MOAFR = (MO ingerida – EE) – FRMOF

Onde: MOF= matéria orgânica; EE = extrato etéreo

5. Digestibilidade da matéria orgânica aparente fermentável no rumen (DMOAFR).

- DMOAFR= $[(MO\ ingerida - EE) - FRMOF] / MO\ ingerida \times 100$

6. Fluxo ruminal do nutriente a avaliar, FRN

- FRN = FRMS x % nutriente duodenal

7. Digestibilidade ruminal dos nutrientes, DR

- DR= $((QN.i - FRN) / QN.i) \times 100$

Onde: QN.i= quantidade de nutriente ingerido; FRN= quantidade ou fluxo ruminal do nutriente avaliado.

8. Digestibilidade intestinal da matéria seca, DIMS

- DIMS= $((FRMS - QMS.f) / FRMS) \times 100$

Onde: FRMS= quantidade ou fluxo ruminal de matéria seca que chega no no intestino; QMS.f = quantidade de MS em fezes.

9. Digestibilidade intestinal dos nutrientes, DI

- DI = $((FRN - QN.f) / FRN) \times 100$

Onde: FRN = fluxo ruminal do nutriente; QN.f= quantidade do nutriente em fezes.

2.5.4 Avaliações dos parâmetros ruminiais

A determinação do pH do conteúdo ruminal foi realizada imediatamente após a respectiva coleta do rumen com peagâmetro digital. Para a determinação da concentração de N-NH₃ foi realizada conforme metodologia descrita em (SILVA; QUEIROZ, 2002). As análises dos ácidos graxos de

cadeia curta foram realizadas por meio de cromatografia gasosa, segundo método preconizado por Leventini et al, (1990).

2.5.5 Produção de proteína microbiana no rumen

Uma amostra de urina foi utilizada para determinação de derivados de purinas que permitem determinar a produção microbiana, conforme técnica de (FUJIHARA et al., 1987); e a segunda amostra para determinação da ureia, utilizando o método diacetil modificado (kit comercial Labtest®), e determinação do nitrogênio total pelo método de DUMAS (ETHERIDGE et al., 1998) baseada na liberação do nitrogênio por combustão em alta temperatura em oxigênio puro; no analisador de nitrogênio LECO (FP-258). A energia bruta foi medida em um calorímetro IKA® modelo 2000 Basic, automatizado.

Para quantificação da eficiência da síntese de nitrogênio microbiano, utilizaram-se como indicador as bases ou de derivados de purina total. Estimaram-se os conteúdos de alantoína e ácido úrico presentes na urina. Para a determinação da concentração de alantoína em urina utilizou-se a técnica adaptada de espectrofotometria descrita por (CHEN et al. 1993), como padrão se utilizou alantoína puro grau AR (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.); e para a determinação do ácido úrico em urina, utilizou-se um kit comercial (Labtest®). Estabelecidas estas purinas, estimou-se a síntese ruminal de nitrogênio microbiano ou a síntese ruminal de proteína microbiana, mediante as seguintes equações:

1. Síntese ruminal de nitrogênio microbiano, SRNM (g/d).

$$- \text{SNMR} = (\text{ATPM} \times 70) / (0,134 \times 0,83 \times 1000).$$

Onde: ATPM: absorção total de purina microbiana (mmol/d); 70 é o teor de nitrogênio das purinas (mg N/mmol); 0,134 é a média da relação N-purina:N-total medido para os micróbios do rumen, o cálculo do teor de N-purina:N-total da mistura da população microbiana é constante; 0,83, a digestibilidade assumida de purinas microbianas, (CHEN; GOMES 1995).

$$- \text{ATPM} = (\text{DPT} - 0,385 \times \text{BW}^{0,75}) / 0,85,$$

Onde: ATPM: Absorção total de purina microbiana (mmol/d); DPT: derivados de purinas totais; BW: peso animal; 0,85 é a eficiência de absorção de purinas.

$$- DPT = QA + QAU$$

Onde: DPT: Derivados de purinas totais, (mmol/d); QA: Quantidade de alantoína; e QAU: Quantidade de ácido úrico.

2. Síntese ruminal de proteína microbiana, SRPM (g/d).

$$- SRPM = SRNM \times 6,25$$

Onde: SRNM = síntese ruminal de nitrogênio microbiano (g/d); 6,25 = fator geral de conversão do nitrogênio em proteínas.

3. Fluxo ruminal de proteína de origem não microbiano que chega a duodeno, FRPNM (g)

$$- FRPNM = (FRNT - SRNM) \times 6,25$$

Onde: FRNT = fluxo ruminal de nitrogênio total que chega até duodeno; SRNM = Síntese ruminal de nitrogênio microbiano que chega a duodeno; 6,25 = fator geral de conversão do nitrogênio em proteínas.

4. Porcentagem da proteína microbiana que chega a duodeno, PM (%).

$$- PM (\%) = (SRPM / (FRNT \times 6,25)) \times 100$$

Onde: SRPM = síntese ruminal de proteína microbiana; FRNT = fluxo de nitrogênio total que chegou no duodeno; 6,25 = fator geral de conversão.

5. Eficiência da síntese de nitrogênio microbiano, ESNM (g N-Mic/kg MOADR) .

$$- ESNM = SRNM (g/d) / MOADR (kg)$$

Onde: SRNM = síntese ruminal de nitrogênio microbiano que chega a duodeno (g/d); MOADR = matéria orgânica aparente degradada no rumen.

2.5.6 Cálculo do balanço de nitrogênio

Para estimar o balanço de nitrogênio, o cálculo foi segundo as quantidades médias de nitrogênio consumido e excretado em fezes e urina, utilizou-se a seguinte equação (SILVA; QUEIROZ, 2002):

1. Balanço de nitrogênio (g) = N consumido – (N fezes + N urina)
2. Nitrogênio retido (%) = (Balanço de N/N consumido) x 100
3. Nitrogênio da urina (%) = (N na urina/N consumido) x 100

2.6 Delineamento experimental e análise estatística

Os animais foram dispostos em um delineamento experimental em dois quadrados latinos 4X4 simultâneos, com quatro tratamentos, quatro períodos experimentais e quatro animais, sendo a unidade experimental constituída por um animal por baía. O delineamento foi realizado de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + \varphi_i + \tau_j + \rho_k + \delta_{l(\varphi_i)} + \varphi\tau_{ij} + \varepsilon_{ijkl}$$

Em que: Y_{ijkl} = a variável dependente; μ = a média geral das observações; φ_i = o i -ésimo efeito do quadrado latino; τ_j = o j -ésimo efeito do tratamento ou à dieta; ρ_k = o k -ésimo efeito do período; $\delta_{l(\varphi_i)}$ = o efeito do animal dentro do quadrado latino i ; $\varphi\tau_{ij}$ = o efeito da interação entre o quadrado latino i e o tratamento j ; ε_{ijkl} = o erro aleatório. Pressuposto o erro normalmente e independentemente distribuído com uma média 0) e uma variância ζ^2 .

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa SAS (2004). As médias foram comparadas através do teste de Tukey, adotando o nível de significância de 5%. As médias foram submetidas à análise de contrastes ortogonais. Para avaliar o pH, nitrogênio amoniacal e ácido graxos de cadeia curta nos diferentes horários de coleta, utilizando-se o procedimento de análise de variância com medidas repetidas no tempo, pelo procedimento MIXED do SAS (2004). Compararam-se os efeitos de tratamentos por meio dos seguintes contrastes ortogonais:

CO vs. OS, SG, e GP: comparar a dieta CO (controle) versus dietas contendo fontes lipídicas OS, SG e GP.

OS vs. SG e GP: comparar a dieta OS contendo óleo de soja versus dietas contendo soja grão (SG) e gordura protegida (GP).

SG vs. GP: comparar a dieta SG contendo soja grão versus a dieta GP contendo gordura protegida.

3 RESULTADOS

3.1 Consumo de matéria seca e nutrientes

As médias da ingestão de matéria seca, matéria orgânica, nutrientes (kg/dia) e a relação do consumo da matéria seca, proteína e FDNcp em relação ao peso corporal estão apresentadas na Tabela 2.

O consumo da matéria seca (CMS) e a matéria orgânica (CMO) não foram influenciados ($P>0,05$) pela fonte do lipídio com um valor médio de 9,36 kg/dia para matéria seca e de 8,82 kg/dia para matéria orgânica; no entanto, verificaram-se diferenças ($P<0,05$) nas médias da ingestão de matéria seca em relação ao peso vivo corporal entre o contraste SG vs GP, sendo maior para os animais que receberam a dieta SG com 1,67% e de 1,54% para os animais que receberam a dieta GP, podendo ser considerado como uma restrição alimentar da matéria seca oferecida. Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) nestas variáveis da dieta OS comparada com as dietas contendo os lipídios na forma protegida (SG e GP) (Tabela 2).

Houve diferença significativa ($P<0,05$) no consumo de proteína bruta nos tratamentos, houve redução ($P<0,05$) do consumo da proteína na dieta OS comparada com as dietas SG e GP, da mesma forma houve redução ($P<0,05$) do consumo de proteína da dieta GP comparada com a dieta OS. Quando expresso o consumo da proteína bruta em relação ao peso corporal apresentou-se diferença ($P<0,05$) para todos os três contrastes, com menor valor (0,24 e 0,24) dos animais das dietas OS e GP (Tabela 2).

Houve diferença ($P<0,05$) dos tratamentos em relação ao consumo de extrato etéreo (EE), onde houve redução ($P<0,05$) no consumo nos animais que receberam a dieta GP comparada com a dieta SG. O maior consumo do EE nas dietas com fonte lipídica associada com glicerina (SG, OS e GP) comparada com a dieta CO está em função da maior concentração de EE total que apresentaram as dietas com fonte de óleo (5,26%, 4,98% e 4,79%) respectivamente, e de menor concentração para a dieta (CO) com 3,74% de EE. Não houve diferença ($P>0,05$) para esta variável na dieta OS comparada com as dietas SG e GP, Tabela 2.

Apresentou diferença ($P<0,05$) no consumo da FDNcp, com diferença no contraste CO vs SG, OS, GP e no contraste SG vs GP ($P<0,05$), respectivamente; verificou-se aumento ($P<0,05$) no consumo da FDNcp em

relação ao peso corporal dos animais do tratamento CO, comparados com dos tratamentos SG, OS e GP; da mesma forma para o contraste SG vs GP com um menor valor ($P < 0,05$) para os animais do tratamento GP. Entretanto, não houve diferenças ($P > 0,05$) da dieta OS comparada com as dietas contendo os lipídios na forma protegida (SG e GP) Tabela 2.

Tabela 2. Consumo da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, FDNcp, carboidratos totais, carboidratos não fibrosos (kg/dia), e consumo de energia bruta (Mcal/dia), em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore.

Item	Dietas experimentais				EPM	Contraste ¹		
	CO	SG	OS	GP		CO x OS, SG, GP	OS x SG, GP	SGxGP
<i>Consumo kg/dia</i>								
Matéria seca	9,62	9,75	9,10	8,98	0,1773	NS	NS	NS
Matéria orgânica	9,06	9,19	8,58	8,46	0,1672	NS	NS	NS
Proteína bruta	1,58	1,69	1,39	1,42	0,0356	NS	0,0041	0,0002
Extrato etéreo	0,36	0,53	0,49	0,47	0,0125	NS	NS	0,0101
FDNcp	2,67	2,49	2,35	2,35	0,0411	<,0001	NS	0,0431
CT	7,12	6,97	6,70	6,57	0,1287	NS	NS	NS
CNF	4,45	4,48	4,34	4,24	0,0936	NS	NS	NS
EB (Mcal)	42,72	45,39	41,21	40,74	0,8228	NS	NS	0,0101
<i>Consumo em relação ao peso corporal (%)</i>								
Matéria seca	1,65	1,67	1,56	1,54	0,0348	NS	NS	0,0376
Proteína bruta	0,28	0,29	0,24	0,24	0,0328	0,0657	0,0025	0,0001
FDNcp	0,46	0,42	0,40	0,40	0,0071	<,0001	NS	0,0448

CO= dieta controle; SG= dieta com soja grão; OS= dieta com óleo de soja; GP= dieta com gordura protegida, (Megalac®); FDNcp = fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína; CT = carboidratos totais; CNF = carboidratos não fibrosos; EB, energia bruta. ¹Os valores são apresentados como médias dos quadrados mínimos com significância definida ($P < 0,05$); EPM, Erro padrão da média.

Em relação ao consumo de carboidratos totais e carboidratos não fibrosos (CNF) (kg/dia), a adição de lipídios em associação com a glicerina não diferiu ($P > 0,05$) entre as diferentes dietas avaliadas. Entretanto, constatou-se diferença ($P < 0,05$) no consumo de energia bruta (EB) entre os tratamentos, verificando aumento ($P < 0,05$) do consumo de EB dos animais da dieta SG, comparada com a dieta GP.

3.2 Digestibilidade da matéria seca e nutrientes

A porcentagem da digestibilidade ruminal da MS, MO e proteína bruta diferem ($P < 0,05$) entre os tratamentos avaliados; constatou-se efeito significativo ($P < 0,05$) na digestibilidade ruminal da MS no contraste CO vs SG, OS e GP, onde as dietas contendo fonte de óleo de soja em associação com glicerina diminuíram a digestibilidade ruminal da MS em 12,54%, comparada com a dieta CO; mesmo assim, houve efeito significativo ($P < 0,05$) na digestibilidade ruminal da MO no contraste CO vs SG, OS e GP, onde as dietas contendo fonte de óleo de soja diminuíram a digestibilidade ruminal da MO em 11,0%, comparada com a dieta CO, Tabela 3.

Houve efeito reduzido ($P < 0,05$) na digestibilidade ruminal da proteína bruta em 14,58% dos tratamentos SG, OS e GP, quando comparados com a dieta CO. Mesmo assim, não houve diferenças ($P > 0,05$) nestas variáveis nos animais que receberam a dieta OS comparada com as dietas contendo os lipídios na forma protegida (SG e GP), Tabela 3.

Não houve efeitos ($P > 0,05$) dos tratamentos na digestibilidade ruminal de EE. Mas, houve efeito ($P < 0,05$) dos tratamentos na digestibilidade ruminal da FDNcp, onde, verificou-se diminuição ($P < 0,05$) da digestibilidade da FDNcp em 15,73% das dietas contendo óleo de soja (SG, OS e GP) comparadas com a dieta CO; não entanto, os animais das dietas SG vs GP apresentaram diferenças ($P < 0,05$), onde os animais da dieta SG apresentaram uma diminuição na digestibilidade ruminal da FDNcp de 13,69% comparada com a dieta GP; sem encontrar efeitos no contraste OS vs SG e GP, Tabela 3.

Não houve alteração ($P > 0,05$) na digestibilidade intestinal da MS, MO, carboidratos totais, CNF e de EB com valores médios de 44,80%, 43,22%, 38,15%, 93,43% e 39,24%, respectivamente. Não houve efeito ($P > 0,05$) na digestibilidade intestinal do EE da dieta OS comparada com as dietas SG e GP, e da dieta SG vs GP; entretanto, verificou-se aumento ($P < 0,05$) na digestibilidade intestinal do EE em 16,73% das dietas com fonte de óleo de soja em associação com glicerina (SG, OS e GP) quando comparada com a dieta CO, Tabela 3.

Tabela 3. Digestibilidade ruminal e intestinal estimada, e digestibilidade total de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo, FDNcp, carboidratos totais, carboidratos não fibrosos, e energia bruta, em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore.

Item	Dietas experimentais				EPM	Contraste		
	CO	SG	OS	GP		CO x OS, SG, GP	OS x SG, GP	SGxGP
<i>Digestibilidade ruminal estimada (%)</i>								
Matéria seca	61,56	51,47	53,85	56,21	1,0772	0,0017	NS	NS
Matéria orgânica	65,01	55,62	57,43	60,53	1,0858	0,0042	NS	NS
Proteína bruta	53,15	46,56	42,38	47,26	1,1576	0,0031	NS	NS
Extrato etéreo	40,33	34,72	38,93	41,59	1,9755	NS	NS	NS
FDNcp	64,78	52,32	51,97	59,48	1,4746	0,0004	NS	0,0231
CT	68,91	59,41	61,87	64,79	1,1561	0,0084	NS	NS
CNF	71,41	63,37	67,03	67,99	1,7463	NS	NS	NS
Energia bruta	63,24	54,26	55,29	58,54	1,0944	0,0048	NS	NS
<i>Digestibilidade intestinal estimada (%)</i>								
Matéria seca	41,22	47,49	45,89	44,58	1,3603	NS	NS	NS
Matéria orgânica	39,78	45,38	44,69	43,02	1,5779	NS	NS	NS
Proteína bruta	40,41	48,53	47,70	42,36	1,2988	0,0460	NS	NS
Extrato etéreo	64,40	69,17	77,16	79,19	1,5814	0,0005	NS	0,0884
FDNcp	8,59	10,22	15,11	7,87	0,5111	0,0054	0,0032	NS
CT	35,51	39,59	39,28	38,22	2,0663	NS	NS	NS
CNF	92,99	93,65	93,43	93,66	0,4233	NS	NS	NS
Energia bruta	35,54	42,05	40,98	38,38	1,6258	NS	NS	NS
<i>Digestibilidade total (%)</i>								
Matéria seca	77,72	74,66	75,29	75,93	0,4953	0,0063	NS	NS
Matéria orgânica	79,26	76,12	76,84	77,67	0,4902	0,0072	NS	NS
Proteína bruta	72,40	72,60	70,11	69,64	0,5791	NS	NS	0,0437
Extrato etéreo	79,72	80,76	86,19	88,39	0,7194	<,0001	NS	<,0001
FDNcp	67,48	56,76	58,26	62,41	1,2220	0,0010	NS	0,0439
CT	80,40	76,18	77,39	78,47	0,5517	0,0014	NS	0,0333
CNF	98,20	97,95	98,06	98,09	0,0406	0,0163	NS	NS
Energia bruta	76,68	73,82	74,15	74,62	0,4911	0,0103	NS	NS

CO= dieta controle; SG= dieta com soja grão; OS= dieta com óleo de soja; GP= dieta com gordura protegida, (Megalac®); FDNcp = fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína; CT = carboidratos totais; CNF = carboidratos não fibrosos. ¹Os valores são apresentados como médias dos quadrados mínimos com significância definida (P<0,05); EPM, Erro padrão da média.

A digestibilidade aparente total da MS e MO diferiu (P<0,05) entre os tratamentos avaliados; constatou-se efeito significativo (P<0,05) na digestibilidade aparente total da MS no contraste CO vs SG, OS e GP, onde as dietas contendo fonte de óleo de soja em associação com glicerina diminuíram

a digestibilidade aparente total da MS em 3,13%, comparada com a dieta CO; mesmo assim, houve efeito significativo ($P < 0,05$) na digestibilidade aparente total da MO no contraste CO vs SG, OS e GP, onde as dietas contendo fonte de óleo de soja em associação com glicerina diminuíram a digestibilidade aparente total da MO em 3,01%, comparada com a dieta CO. Não foi encontradas diferenças ($P > 0,05$) nos animais que receberam a dieta OS comparada com as dietas contendo os lipídios na forma protegida (SG e GP), Tabela 3.

A digestibilidade aparente total da proteína bruta apresenta diferenças ($P < 0,05$) entre as dietas analisadas, onde apenas o contraste das dietas SG vs GP houve diferença ($P < 0,05$), com maior digestibilidade para os animais da dieta SG com 72,60% e de 69,64% para a dieta GP. Houve diferença ($P < 0,05$) na digestibilidade aparente total de EE; onde, verificou-se que as dietas com óleo de soja em associação com glicerina (SG, OS e GP) apresentaram maior ($P < 0,05$) digestibilidade aparente total de EE comparadas com a dieta CO; entretanto, não houve diferença ($P > 0,05$) da dieta OS comparada com as dietas SG e GP; mesmo assim, houve diferença ($P < 0,05$) na digestibilidade da dieta SG comparada com a dieta GP, onde foi maior para a dieta GP (88,39%) e com menor valor para a dieta SG (80,76%), Tabela 3.

Tal como na digestibilidade ruminal da FDNcp, a digestibilidade aparente total da FDNcp diferiu ($P < 0,05$) entre as dietas. Houve efeito do lipídio na digestibilidade da FDNcp, onde as dietas com óleo de soja em associação com glicerina (SG, OS e GP) comparadas com a dieta CO apresentaram uma diminuição ($P < 0,05$) na digestibilidade da FDNcp de 12,35%. Quando compara a dieta com óleo de soja (OS) frente as dietas com gorduras protegidas (SG e GP), não houve diferença ($P > 0,05$), mas quando comparada entre as dietas que contem gordura protegida SG vs GP apresentam diferenças ($P < 0,05$), com maior digestibilidade da FDNcp para a dieta GP e menor para a dieta SG (62,41% e 56,76%), respectivamente. Mesmo assim, não houve diferença ($P > 0,05$) no contraste OS vs SG e GP (Tabela 3).

Para a digestibilidade aparente total da EB, apresentou-se diferenças ($P < 0,05$). Foram encontradas diferenças ($P < 0,05$) entre a dieta CO comparada com as dietas que contem fonte de óleo de soja (OS, SG e GP), com maior valor para os animais da dieta CO (76,68%) e menor para as dietas com fonte

de óleo de soja (GP, OS e GP) em média (74,2%) Tabela 3; quando analisando os contrastes das dietas que contem óleo de soja em associação com glicerina não apresentam diferenças para esta variável ($P>0,05$).

3.3 Parâmetros Ruminais

Os valores médios de pH e as concentrações do nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) do líquido ruminal são apresentados na Tabela 4. As fontes de lipídios não tiveram efeito significativo ($P>0,05$) nos valores médios de pH ruminal, Tabela 4. Entretanto, apresentou-se diferença entre os diferentes horários de coleta ($P<0,05$), Figura 1. O maior valor médio de pH (6,27) para todos os tratamentos foi no tempo 8:00 horas, com valores (CO = 6,34; SG = 6,34; GP = 6,22; e OS = 6,19), e com o menor valor médio do pH (5,56) no horário das 18:00 horas, com valor (GP = 5,61; OS = 5,58; CO = 5,53; e SG = 5,52). Observou-se que uma hora depois de cada horário de alimentação (8:00 e 14:00 horas) houve um incremento no valor do pH em todos os tratamentos, onde o maior incremento aconteceu na refeição da manhã, o que pode ser atribuído ao maior consumo de alimento neste horário, já que o consumo de alimento durante as primeiras horas do dia é maior e o efeito tampão da saliva. No horário das 6:00 horas apresentou-se diferenças ($P<0,05$) com um maior valor do pH (6,42) para a dieta CO.

Houve resposta das concentrações de $N-NH_3$ ruminal (mg/dL) entre os diferentes tratamentos estudados, apresentando diferenças significativas ($P<0,05$); observou-se efeito da fonte de óleo se soja protegida ($P<0,05$) na concentração média de $N-NH_3$ dos animais alimentados com a dieta SG comparados com a dieta GP, sendo menor para a dieta SG (17,57 mg/dL) e maior para a dieta GP (19,64 mg/dL), Tabela 4.

Foram observados dois picos de maior concentração de nitrogênio amoniacal ruminal que coincidem ao período após o fornecimento de alimento da manhã e da tarde, o primeiro no horário das 8 horas (22,68 mg $H-NH_3/10dL$), e o segundo pico entre os horários das 16 e 18 horas com valores médios (22,0 e 20,91 mg $H-NH_3/10dL$) (Figura 2), indicando uma ativa degradação máxima da proteína nesses horários por um maior consumo de alimento, e que estão em função dos picos altos do pH ruminal (Figura 1), para estes dois últimos horários foram observadas diferenças significativas ($P<0,05$)

com menor valor da dieta CO comparadas com as dietas OS, SG e GP; entretanto, os picos mínimos foram observados nos horários das 2 e 4 horas da madrugada com valores médios (16,95 e 16,75mg N-NH₃/10dL) (Figura 2), indicando uma menor degradação da proteína dietética nesses horários, visto que os animais estão em menor atividade física “período de repouso”, e apresentam um menor consumo.

Tabela 4. Valores médios diários do pH, produção de N-NH₃ e da concentração de ácidos acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico, a proporção acético:propiônico (C2:C3), e soma total dos ácidos C2+C3+C4 no líquido ruminal, em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore¹.

Item	Dietas experimentais				EPM	Contraste		
	CO	SG	OS	GP		CO x OS, SG, GP	OS x SG, GP	SGxGP
<i>Média dos parâmetros ruminais¹</i>								
Ph	5,90	5,94	5,93	5,91	0,0398	NS	NS	NS
N-NH ₃ mg/DI	19,24	17,57	18,91	19,64	0,2858	NS	NS	0,0177
<i>Ácidos graxos de cadeia curta (mM/L)</i>								
Acético	68,51	64,53	62,04	67,44	1,8965	NS	NS	NS
Propiônico	39,82	39,94	39,64	40,68	1,4467	NS	NS	NS
Butírico	23,91	22,15	24,01	21,28	0,9889	NS	NS	NS
Isobutírico	1,09	0,99	1,19	0,94	0,0597	NS	NS	NS
Valérico	8,63	7,48	8,17	8,01	,4112	NS	NS	NS
Isovalérico	5,55	5,27	5,62	4,84	0,1975	NS	NS	NS
C2+C3+C4	132,2	126,6	125,7	129,4	0,8977	NS	NS	NS
C2:C3	1,75	1,65	1,59	1,71	0,0521	NS	NS	NS

CO= dieta controle; SG= dieta com soja grão; OS= dieta com óleo de soja; GP= dieta com gordura protegida, (Megalac®). ¹Os valores são apresentados como médias dos quadrados mínimos com significância definida (P<0,05); EPM, Erro padrão da média.

Não houve efeitos (P>0,05) das fontes de óleo de soja em associação com glicerina nas concentrações médias dos ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico) e nem na relação acético/propiônico (Tabela 4); apresentaram-se diferenças entre os horários de coleta (P<0,05), com dois picos no horário das 07:00 e 18:00 horas para o ácido acético, com um pico para o ácido propiônico das 16:00 horas até as 20:00 horas, e das 16:00 horas até as 18:00 horas para o ácido butírico (Figura 3), mas sim apresentarem diferenças (P>0,05) das dietas nos respectivos picos.

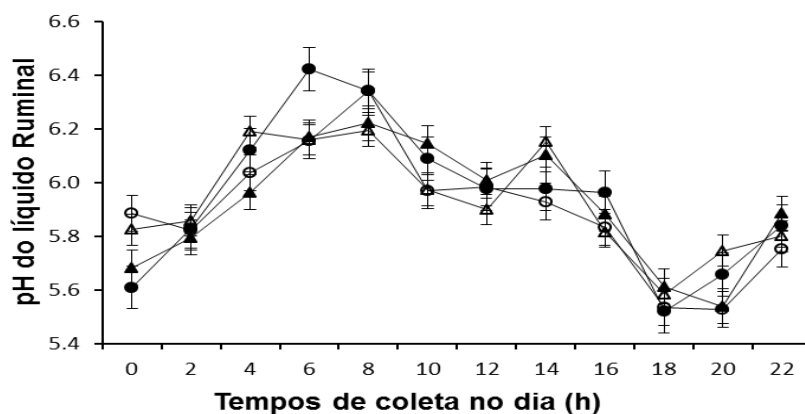


Figura 1. Valores médios de pH do líquido ruminal, amostras feitas em diferentes horas do dia, em função da fonte de de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore. -○-, Dieta controle; -●-, Dieta com soja grão; -△-, Dieta com óleo de soja; e -▲-, Dieta com gordura protegida.

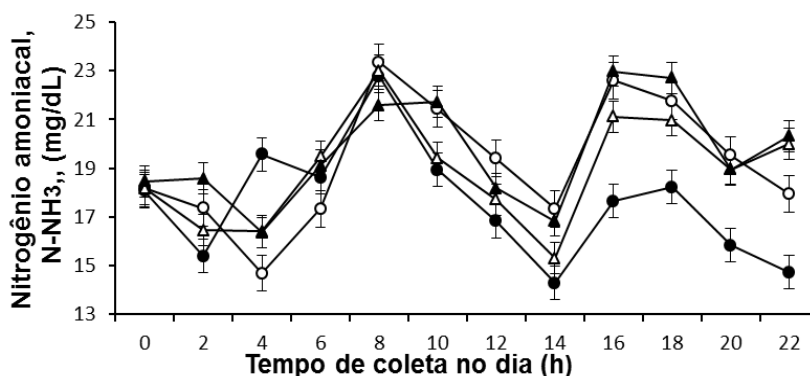


Figura 2. Valores médios das concentrações ruminais de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) (mg/dL) em diferentes tempos de amostragem, em função da disponibilidade de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore. -○-, Dieta controle; -●-, Dieta com soja grão; -△-, Dieta com óleo de soja; e -▲-, Dieta com gordura protegida.

A maior produção de ácido acético está entre os horários (18:00 e 02:00 horas) horas em média 69,21 Mmol/dL; a produção maior para o ácido propiônico está entre os horários (16:00 e 02:00 horas) em média 42,88 mmol/dL; e para o ácido butírico a maior produção está entre os horários (16:00 e 18:00 horas) em média 27,36 Mmol/dL. O pico mais baixo para a concentração do ácido acético está no horário das 10:00 horas em média 59,89 Mmol/dL; o pico mais baixo para a produção do ácido propiônico está no horário das 6 h com um valor em média de 34,63 Mmol/dL; e o pico mais baixo

para o ácido butírico está entre os horários das 04:00 e 06:00 horas em média 18,57 Mmol/dL (Figura 3).

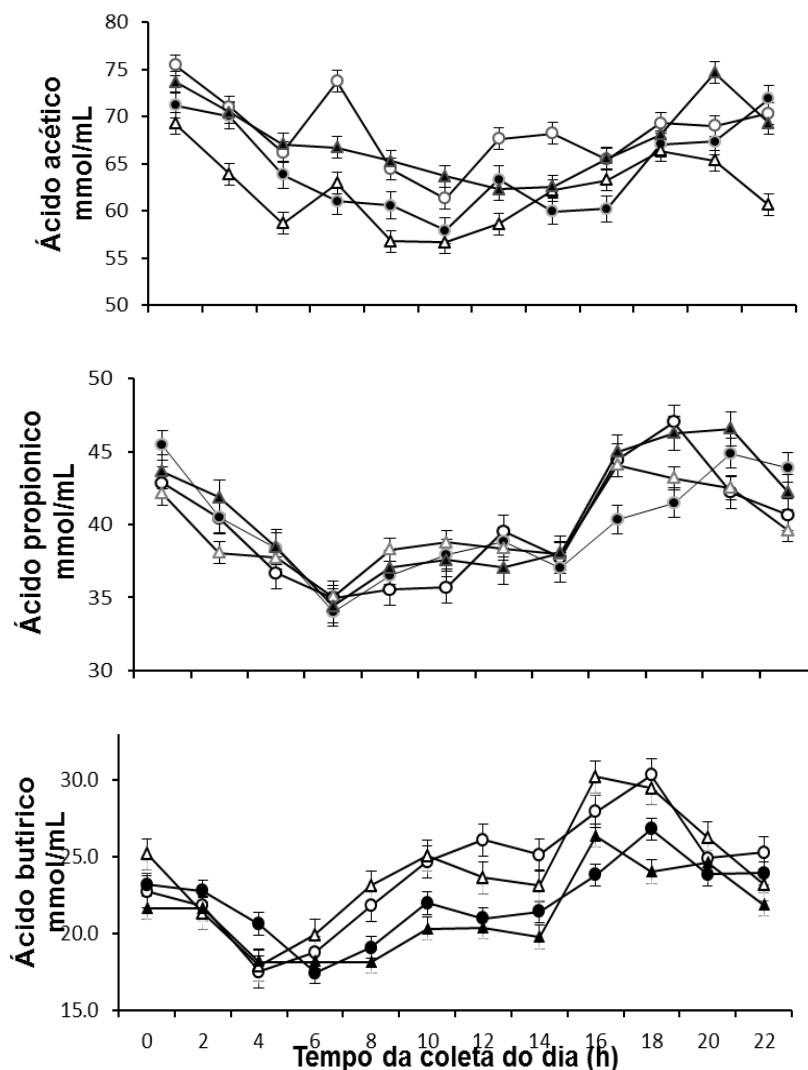


Figura 3. Médias da concentração (mmo/mL) dos ácidos graxos de cadeia curta acético, propionato e butírico nos diferentes horários do dia (h), em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore. -○-, Dieta controle; -●-, Dieta com soja grão; -△-, Dieta com óleo de soja; e -▲-, Dieta com gordura protegida.

As proporções entre os ácidos acético:propiónico:butírico no rumen em média para todos os tratamentos foi 66:40:22, respectivamente. A soma total média por dia dos ácidos graxos acético, propionato e butirato foi em média 106,7 Mmo/dL) sem apresentar diferenças ($P>0,05$) Tabela 4. A relação dos

ácidos acético/propiónico em média para todos os tratamentos foi 1,67 que pode ser considerando um valor baixo, mas está relacionada à alta concentração de ácido propiónico, justificando pelo fato de todas as dietas conterem glicerina incrementando as concentrações de propionato, sendo que as concentrações de acetato não decresceram (Figura 4).

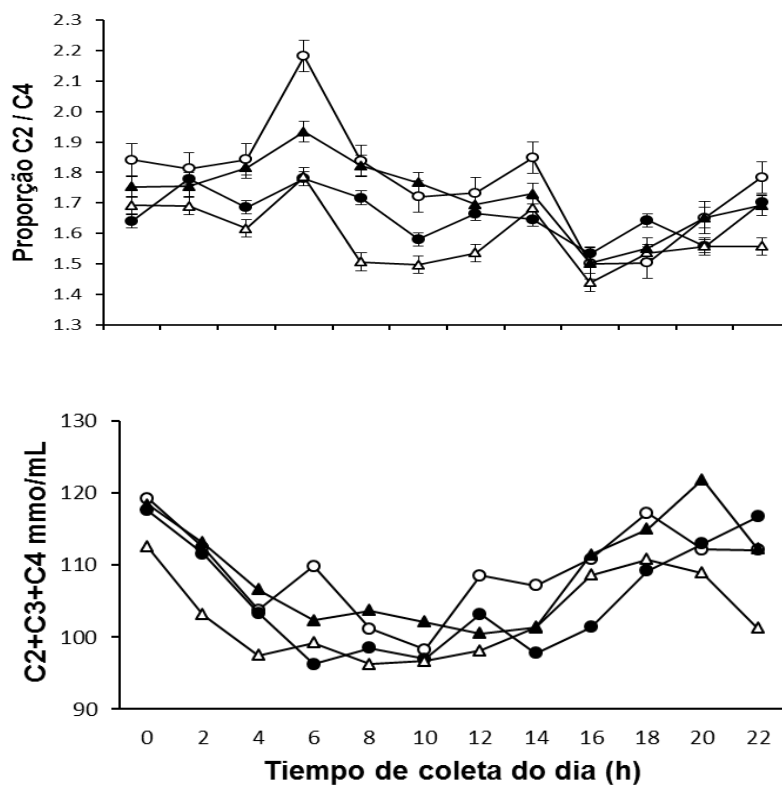


Figura 4. Médias da soma total dos ácidos graxos C2+C3+C4 e a proporção acético:propiónico (C2:C3) nos diferentes horários do dia (h), em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore. -○-, Dieta controle; -●-, Dieta com soja grão; -△-, Dieta com óleo de soja; e -▲-, Dieta com gordura protegida.

A concentração média no dia dos ácidos Isobutírico, valérico e isovalérico foram de (1,05, 8,07, 5,32) respectivamente, sem apresentar diferenças estatísticas ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 4). Logo as fontes de óleo de soja em associação com glicerina não influenciaram esses parâmetros da fermentação ruminal. Ocorreu diferença entre os horários de

coleta ($P < 0,05$); mesmo assim não houve diferença ($P > 0,05$) dos tratamentos dentro dos horários de coleta (Figura 5).

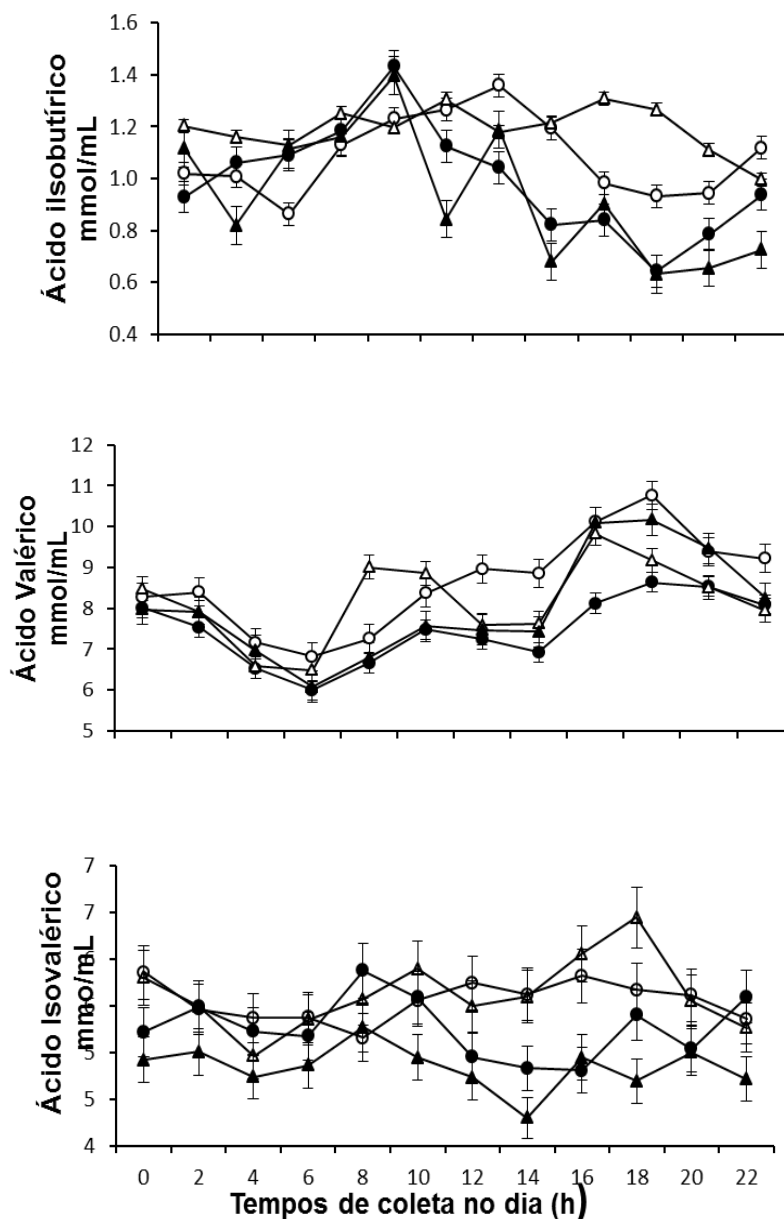


Figura 5. Médias da concentração (mm/mL) dos ácidos graxos de cadeia curta (isobutírico, valérico e isovalérico) em diferentes horários do dia (h) em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore. -○-, Dieta controle; -●-, Dieta com soja grão; -△-, Dieta com óleo de soja; e -▲-, Dieta com gordura protegida.

3.4 Síntese de proteína microbiana no rumen e fluxo ruminal de proteína

A síntese ruminal de proteína microbiana (SRPM) não diferiu ($P>0,05$) entre as dietas, sem encontrar efeito das fontes de óleo de soja associadas a glicerina comparadas com a dieta CO, com um valor em média de 416,68 g/dia (Tabela 5). Em relação ao fluxo ruminal da proteína de origem não microbiano (FRPNM) ou proteína do alimento que chegou ao duodeno não foi afetado ($P>0,05$) pela inclusão de lipídios em associação com glicerina com um valor médio de 381,3 g/dia; entretanto a porcentagem de fluxo de proteína microbiana em média para os tratamentos foi de 53,6%, e de 46,4% para a proteína de origem alimentar (Tabela 5).

A matéria orgânica aparente fermentável no rumen (MOAFR) foi afetada ($P<0,05$); houve resposta ($P<0,05$) da inclusão de lipídios em associação com glicerina quando comparada a dieta CO com as dietas OS, SG e GP), sendo maior para os animais que receberam a dieta CO (5,73 kg/dia), e menor para os animais das dietas OS, GP e SG com valores de (4,75 kg/dia, 4,91 kg/dia, e 4,94 kg/dia), respectivamente, sem apresentar diferenças ($P>0,05$) entre os contrastes contendo óleo de soja, Tabela 5; tal como aconteceu no MOAFR, a porcentagem de digestibilidade da matéria orgânica aparente fermentável no rumen (DMOAFR) foi afetada pelos tratamentos, com diferenças ($P<0,05$) para o mesmo contraste (CO vs OS, SG e GP), com maior valor para o tratamento CO com 66,04%, e sem apresentarem diferenças ($P>0,05$) entre as dietas com óleo de soja em associação com glicerina (Tabela 5).

A eficiência da síntese de nitrogênio microbiano (ESNM) quando expressa em gramas (g) de nitrogênio microbiano por quilograma (kg) de matéria orgânica fermentável no rumen, foi afetada pela inclusão de lipídios em associação com glicerina ($P<0,05$), encontrando diferenças para os tratamentos do contraste (CO vs OS, SG e GP), onde animais que receberam a dieta OS, GP e SG apresentaram os maiores valores (15,14, 13,83, e 13,60 g N-Mic/kg MOAFR), respectivamente, e com o menor valor para os animais que receberam a dieta CO (11,24 g N-Mic/kg MOAFR) (Tabela 5).

A melhor eficiência da síntese de proteína microbiana se apresenta em animais que receberam lipídios suplementares na dieta, não entanto, pode estar favorecida pela forma ou disponibilidade do lipídio no rumen, onde animais que receberam dieta com óleo de soja (OS) tiveram um maior valor na

sua eficiência comparada com os animais que receberam lipídios na forma de soja grão (SG) e gordura protegida (GP).

Tabela 5. Síntese ruminal de proteína microbiana (SRPM), fluxo ruminal de proteína não microbiana (FRPNM), digestibilidade de matéria orgânica aparente fermentada no rumen (DMOFR), e eficiência de síntese nitrogênio microbiano (ESNM) em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore¹.

Item	Dietas experimentais				EPM	Contraste		
	CO	SG	OS	GP		CO x OS, SG, GP	OS x SG, GP	SGxGP
<i>Síntese e fluxo de proteína microbiana</i>								
SRPM (g/dia)	401,2	413,8	435,6	416,1	6,222	NS	NS	NS
FRPNM (g/dia)	344,7	494,9	356,8	329,2	23,46	NS	NS	NS
<i>Degradabilidade no rumen</i>								
MOAFR (kg/dia)	5,73	4,91	4,75	4,94	0,137	0,0048	NS	NS
DMOAFR (%)	66,04	56,89	58,54	61,64	1,089	0,0052	NS	NS
ESNM (g N-Mic/kg MOAFR)	11,24	13,60	15,14	13,83	0,452	0,0023	NS	NS

CO= dieta controle; SG= dieta com soja grão; OS= dieta com óleo de soja; GP= dieta com gordura protegida, (Megalac®); ¹Os valores são apresentados como médias dos quadrados mínimos com significância definida ($P<0,05$); EPM, Erro padrão da média.

3.5 Balanço de nitrogênio

Foi encontrado efeito das fontes de óleo de soja em associação com glicerina ($P<0,05$) na quantidade de nitrogênio ingerido (consumo de proteína) para os tratamentos, nesse sentido houve diferenças ($P<0,05$) quando comparado o consumo de nitrogênio dos animais da dieta OS com o consumo dos animais das dietas SG e GP, e também foram observadas diferenças ($P<0,05$) com maior consumo de nitrogênio na dieta SG comparada com a dieta OS (Tabela 6), a maior ingestão de nitrogênio está em relação ao consumo de matéria seca dos animais, como já foi analisado anteriormente (Tabela 2). Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) dos tratamentos nos níveis de excreção para o nitrogênio fecal e para o nitrogênio na urina. No entanto, os animais que receberam as dietas CO e GP foram as que apresentaram um maior valor de excreção de nitrogênio na urina (74,75 g/dia e 76,20 g/dia) relacionado com o valor maior na concentração de N-NH₃ no

rumen (Tabela 4), e os animais que receberam a dieta SG apresentaram o maior valor no nitrogênio excretado em fezes (74,21 g/dia), que pode estar em relação ao maior fluxo da proteína de origem não microbiano (Tabela 5).

Tabela 6. Balanço de nitrogênio (g/dia) em função da fonte de óleo de soja em associação com glicerina em dietas para novilhos Nelore¹.

Item	Dietas experimentais				EPM	Contraste		
	CO	SG	OS	GP		CO x OS, SG, GP	OS x SG, GP	SGxGP
N-ingerido	253,09	271,02	222,19	226,91	5,709	NS	0,0426	<,0001
N-fecal	69,97	74,21	66,30	68,73	1,905	NS	NS	NS
N-urina	74,75	69,97	65,37	76,20	2,358	NS	NS	NS
% N-ureico	29,57	25,86	29,22	33,71	0,918	NS	NS	0,0225
Balanço N	108,37	126,83	90,52	81,98	4,027	NS	NS	<,0001
% N-retido	42,83	46,74	40,90	35,93	1,035	NS	NS	<.0001

CO= dieta controle; SG= dieta com soja grão; OS= dieta com óleo de soja; GP= dieta com gordura protegida, (Megalac®); FDNcp = fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína; CNE = carboidratos não estruturais. ¹Os valores são apresentados como médias dos quadrados mínimos com significância definida (P<0,05); EPM, Erro padrão da média.

O balanço de nitrogênio (Balanço-N) foi positivo para todos os tratamentos com um valor médio de 101,91 g/dia (Tabela 6). No entanto, o balanço de nitrogênio apresentou diferenças significativas (P<0,05) influenciado pelos tratamentos, onde no contraste SG vs GP apresentou diferenças (P<0,05), sendo os animais que receberam a dieta SG o que tiveram o maior valor (126,83 g/dia), e com menor valor (81,98 g/dia) para os animais da dieta GP.

Para a porcentagem de nitrogênio retido no tecido (%N-retido) houve diferenças (P<0,05) para tratamentos, e tal como aconteceu no balanço-N, só apresentou diferença (P<0,05) no contraste SG vs GP, onde a maior retenção de nitrogênio foi para os animais que receberam a dieta SG (46,74%) e menor para os animais da dieta GP (35,93%) Tabela 6. Observando, que a maior retenção de nitrogênio pode estar em relação ao maior nitrogênio ingerido (271,02 g/dia) dos animais da dieta SG, comparado com o menor ingestão de nitrogênio (226,91 g/dia) dos animais da dieta GP Tabela 6.

4 DISCUSSÃO

4.1 Consumo e Digestibilidade

A inclusão de 5% de EE nas dietas na forma de soja grão e gordura protegida em associação de glicerina (100 g/kg MS) não afetou ($P>0,05$) a ingestão de matéria seca, matéria orgânica. Concordando com vários estudos, que níveis até o 7,0% de EE/kg MS evita efeitos deletérios no ambiente ruminal, sem que afete o consumo de matéria seca (MIR et al., 2001; JORGE et al., 2008); e estudos com glicerina asseguram uma eficiência alimentar favorável com a inclusão de 10% da glicerina na dieta para bovinos (VERSEMANN et al., 2008; LAGE et al., 2014).

Metz (2009) avaliando um nível óleo de arroz (4,7% EE) e dois níveis de gordura protegida (4,8% e 7,3% EE) em dietas para novilhos mestiços (da raça Charolês, Nelore e suas cruzas), observou consumos médios de matéria seca (9,77 MS kg/d) muito semelhante aos encontrados no presente estudo, onde não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) para as variáveis consumo de matéria seca e matéria orgânica. Entretanto, Fiorentini et al. (2012) ao trabalharem com novilhas mestiças e Da Silva (2013) com novilhos da raça Nelore, utilizando as mesmas fontes lipídicas (soja grão, óleo de soja e gordura protegida), mas com 5,8 e 5,0% de extrato etéreo + glicerina (100 g/kgMS), respectivamente, os autores concluíram em ambos os trabalhos que os suplementos com lipídios afetaram significativamente ($P<0,05$) o consumo de matéria seca. Mas, sendo maior para o tratamento com gordura protegida no trabalho de Fiorentini et al. (2012) e o óleo de soja em associação com glicerina no trabalho de Silva (2013).

Para o presente experimento o fornecimento das fontes de óleo de soja em associação com glicerina (OS, SG e GP) diminuiu significativamente ($P<0,05$) o consumo de FDN_{cp} comparada com a dieta CO; e verificou-se efeito ($P<0,05$) no consumo da FDN_{cp} entres as fontes de óleo de soja na forma protegida (SG vs GP), com maior valor no consumo para os animais da dieta SG, podendo sugerir que o maior consumo de FDN_{cp} esta em relação ao maior consumo de MS dos animais que receberam SG (Tabela 2).

Levando em consideração o consumo de proteína bruta, extrato etéreo (EE) e energia bruta (EB), a fonte de óleo de soja na forma protegida (SG vs

GP) em associação com glicerina afetou significativamente sua ingestão, que pode estar relacionado ao maior consumo de MS dos animais que receberam a dieta SG, ressaltando a importância da forma como o lipídio está disponível na fonte, sendo uma alternativa de energia quando o consumo de matéria seca é limitante em animais de alta produção (SUKHIJA; PALMSQUIST, 1990; CAVALIERI et al., 2005).

Os resultados obtidos no presente trabalho são consistentes com outros relatos da literatura que demonstraram que a suplementação lipídica pode afetar o consumo de matéria seca, mas sem afetar ($P > 0,05$) o consumo de EB quando comparados os animais que receberam as dietas com fonte de óleo de soja (SG, OS e GP) com os animais da dieta CO, sendo o uso de fontes de óleo de soja uma alternativa quando consumo de matéria seca é limitado, da mesma forma que foi sugerido por Weiss e Pinos-Rodríguez, (2009).

Analisando os dados de digestibilidade do presente estudo, pode-se dizer que o fornecimento de fontes de óleo de soja (OS, SG e GP) numa proporção de 5% de EE associados à glicerina (100 g/kg MS) comparada com a dieta CO afetaram ($P < 0,05$) a digestibilidade ruminal da matéria seca, da matéria orgânica e da FDNcp; afetando ($P < 0,05$) também a digestibilidade total da matéria seca, da matéria orgânica e da FDNcp; mas, os tratamentos com fontes de óleo de soja apresentam a menor digestibilidade ruminal e total de MS, MO e FDNcp (Tabela 3), que além do lipídio pode estar também relacionada com o maior conteúdo de lignina (Tabela 1). Segundo Van Soest (1994) o teor de lignina influencia diretamente na digestibilidade da fibra.

Pode-se estabelecer para este experimento que independente da fonte da fonte de óleo de soja em associação com glicerina a digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica e FDNcp é diminuída. Que, de acordo com a literatura, a toxicidade de lipídios limita a função das bactérias fibrolíticas o que pode contribuir com a diminuição da degradação da fibra dietética, afetando o consumo da matéria seca (Van SOEST, 1994; NAGARAJA et al., 1997; WEIMER, 1998; LOOR et al., 2004; JENKINS et al., 2008). Também pode se observar que o uso de gordura protegida em forma de sabões de cálcio, como mecanismo para impedir que os lipídios sejam metabolizados no rumen e/ou diminuir seu efeito deletério (JENKINS; PALMQUIST, 1984; SUKHIJA; PALMQUIST, 1990; FIORENTINI et al., 2012). Mecanismo que permite

favorecer a digestibilidade da FDNcp, onde animais que receberam a dieta com gordura protegida em forma de sai de cálcio (GP) apresentaram uma maior digestibilidade ruminal e total da FDNcp da dieta GP (59,48% e 62,41%), respectivamente, comparada com a menor digestibilidade na dieta SG (52,32% e 56,76%), respectivamente. Podendo dizer, que alguns ácidos graxos da soja grão ficaram disponível no rumen causando alguns efeitos tóxicos, o que permitiu uma diminuição na digestibilidade ruminal da FDNcp. Segundo Doreau e Ferlay (1994) as sementes oferecem limitada proteção devido a sua ruptura durante a mastigação e na ruminação, sendo os lipídios acessíveis à microflora do rumen.

Além disso, a digestibilidade ruminal do extrato etéreo não apresentaram diferenças ($P>0,05$) para todos os tratamentos (Tabela 3), sem apresentar diferenças no fluxo de EE para o intestino. No entanto, isso não garante que os ácidos graxos na soja grão estejam mais disponíveis para sua absorção no intestino, visto que o tratamento com soja grão inteiro SG apresentou a menor digestibilidade intestinal e digestibilidade total (69,17% e 80,76%), respectivamente comparada com o tratamento GP (79,19% e 88,39%), respectivamente (Tabela 3). Esta menor digestibilidade da dieta SG, devido, a que as sementes ultrapassaram o rumen (como foi constatado na coleta intestinal) sem sofrer alteração física, e provavelmente associado ao fato dos lipídios estarem menos disponíveis aos processos de digestão e absorção, onde, os lipídios na soja grão estão presos na matriz protéica da semente minimizando sua disponibilidade para ser absorvidos, devido ao menor contato dos lipídios com as enzimas digestivas (Van SOEST, 1994; HARFOOT; HAZLEWOOD, 1997; CAVALIERI et al., 2005), e o contrário da gordura protegida, que por seu processo industrial tem uma baixa metabolização no rumen (quase inertes em condições normais de pH), mas acessível em condições ácidas (menores que 5,0 do abomaso) para serem absorvidas no intestino (JENKINS; PALMQUIST, 1984; SUKHIJA; PALMQUIST, 1990; NÖRNBERG et al., 2004).

Na anterior afirmação fica esclarecida com o trabalho de Silva (2013) que trabalhou com a mesma composição de dietas e com o mesmo tipo de animal (Nelore) observou maior deposição de gordura no tecido para os tratamentos com óleo de soja e gordura protegida (5,58% e 5,55%)

respectivamente, quando comparado com o tratamento soja grão inteiro de 5,12%. O mesmo autor não encontrou diferença ($P>0,05$) no perfil dos ácidos graxos no tecido, tanto para ácidos graxos saturados como insaturados nos diferentes tratamentos. Podendo também ressaltar o papel do glicerol proveniente da glicerina (componente das dietas) como precursor na síntese hepática de glicose (JOHNS, 1953; MACH et al., 2009; PARSONS, 2009), que atua como precursor de carbono na síntese de ácidos graxos (SCHOONMAKER et al., 2004) para depois serem depositados no tecido (EVANS et al., 2008; VERSEMANN et al., 2008).

Podendo estabelecer no presente experimento que a digestibilidade dos ácidos graxos no intestino vai depender da disponibilidade do lipídio na fonte utilizada na dieta.

4.2 Parâmetros Ruminais

O pH ruminal tem influência no crescimento microbiano e é um fator químico e fisiológico, que é influenciado principalmente pela produção de saliva e pelo tipo de alimento consumido (Van SOEST, 1994). Os valores de pH do líquido ruminal nos diferentes tratamentos estão em média 5,92 (Tabela 4). Este valor ligeiramente ácido não foi influenciado pelas fontes de óleo de soja em associação com glicerina utilizada nas dietas, mas, foi influenciado pelo tipo de dieta fornecido, caracterizando-se por ter uma baixa relação volumoso:concentrado (30:70), altos níveis de concentrado na dieta de ruminantes diminui o valor do pH ruminal (Van SOEST, 1994). O valor do pH no presente estudo variou entre 5,52 e 6,42 (Figura 1). Estes valores encontram-se acima da faixa que inibe o crescimento das bactérias (5,0 e 5,5) principalmente as celulolíticas, e se encontram dentro da faixa recomendável (5,5 e 7,0) para o máximo crescimento microbiano (HOOVER, 1986; HOOVER; STOKES, 1991).

Para Ørskov (1988) a digestão ruminal da matéria seca e da FDN estaria prejudicada com pH mais baixo que 6,2. Segundo De Veth e Kolver (2001) a digestibilidade da FDN é reduzida quando o pH ruminal permanece por quatro horas em valores abaixo de 6,0 e a síntese microbiana é reduzida quando o pH permanece por 12 horas abaixo deste valor. Além disso, o fornecimento de elevado níveis de lipídios na dieta afeta a digestibilidade da matéria seca e da

FDN (JENKINS et al., 2008). Estou indica que junto com o valor ligeiramente ácido do pH (5,92), a inclusão de fontes de óleo de soja em associação com glicerina tenha provavelmente influenciado na fermentação do rumen, especialmente influenciando a digestibilidade da matéria seca e da fibra como foi observado.

Em relação à concentração de N-NH₃ ruminal, as forma como foi fornecido o óleo de soja em associação com glicerina influenciaram na sua concentração, observando diferença (P<0,05) no contraste SG vs GP, onde o menor valor foi para o tratamento SG, com concentração de 17,57mg/dL e o maior valor 19,64mg/dL para os tratamentos GP. O fornecimento de soja grão, que além do lipídio contem proteína, é efeito favorável pela diminuição da degradação da proteína alimentar no rumen, no entanto uma adequada disponibilidade de N-NH₃ ruminal esta associado a uma melhor síntese microbiana (VAN SOEST, 1994), apresentando uma maior utilização do nitrogênio pelas bactérias, favorecendo seu crescimento e acompanhada de um maior fluxo de nitrogênio alimentar para o duodeno (JENKINS, 1993; PALMQUIST; MATTOS, 2011), permanecendo menos tempo no rumen, o que reduz a atividade da fermentação microbiana e favorece a menor produção de N-NH_{3r} no rumen. No entanto, pode-se entender também que a menor produção de N-NH₃ na dieta SG, que a proteína da soja grão está menos disponível.

Segundo Van Soest (1994) concentrações de N-NH₃ abaixo de 13 mg/dL podem afetar a disponibilidade de nitrogênio para os microrganismos no rumen, comprometendo assim a síntese microbiana e conseqüentemente a digestibilidade da fibra. Para o presente estudo os dados estão contidos na faixa de 14 a 24 mg de N-NH₃/dL de líquido ruminal (Figura 2) com uma média de 18,84 mg de N-NH₃/dL. A concentração de amônia no rumen serve como indicador da eficiência da utilização de nitrogênio. Altas concentrações de amônia ruminal resultam em maior absorção líquida de nitrogênio amoniacal pelas paredes do rumen na forma não ionizada (amônia não utilizada para a síntese microbiana) e transportada ao fígado para ser convertido em ureia reciclado na saliva, e seu excesso é conseqüentemente excretado por meio da via urinária (SANTOS; PEDROSO, 2011).

Lage (2014) em dietas com 40% e 60% de concentrado contendo 10% de glicerina obteve uma média na produção de N-NH₃ de 16,57 e 15,95 mg de N-NH₃/dL, respectivamente. Valores similares da concentração de N-NH₃ foram encontrados por Valinote et al. (2006) ao avaliarem dietas em novilhos da raça Nelore com fontes lipídicas (sal de cálcio, caroço de algodão) com um nível médio de EE de 8,83%, sem encontrar interação do tempo x tratamento com um valor médio N-NH₃ para os tratamentos de 15,68 mg/dL. Portanto, pode-se estabelecer no presente estudo, que a disponibilidade de óleo de soja (5% EE) em associação com glicerina (100 g/kg MS) na dieta não compromete a disponibilidade de nitrogênio para o crescimento bacteriano.

Analisando os dados relacionados à produção de ácidos graxos de cadeia curta, observou-se que a produção de ácido acético não foi afetada pela inclusão de fontes de óleo de soja em associação com glicerina na dieta para novilhos Nelore, com uma produção média de 65,63 Mm/dL (Tabela 4). Proporções semelhantes foram obtidas por Lage (2014) em dietas com duas relações volumoso:concentrado (40:60 e 60:40) associado com glicerina (10%) em novilhos Nelore com valores médios de 64,86 Mm/dL e 62,54 Mm/dL, respectivamente. Pedreira et al., (2013) encontro um valor de 68,9% na concentração ácido acético em novilhos mestiços com 60% de concentrado na dieta.

Em relação à produção do ácido propiônico, não foi encontrado efeito entre os tratamentos com uma média de 40,02 Mm/dL. Mas, este valor é alto ao ser comparado com outros estudos de 27,62 Mm/dL em dietas com lipídios (MESSANA et al., 2013) e de 22,65 Mm/dL em dietas com 60% de concentrado e 10% glicerina (LAGE, 2014). Esta elevada concentração de propionato provocou uma queda na relação acetato:propionato com um valor médio de 1,69 para todas as dietas (Tabela 4).

Segundo Chalupa et al. (1984) os lipídios insaturados inibiram as bactérias ruminais gram-positivas e estimulam aquelas produtoras de propionato, causando decréscimo na relação acetato:propionato e a produção do metano. Mas, foi a incorporação de glicerina na dieta (10% da MS) no presente trabalho que está relacionada com o incremento do propionato, segundo Krenbiel (2008) e Wang (2009), a glicerina no rumen é fermentada principalmente a propionato e absorvida pelo epitélio ruminal. Mach et al. (2009) alimentaram novilhos da raça Holandesa (*Bos taurus*) com dietas de alto

concentrado que continham diferentes teores de glicerina (4%, 8% e 12%), mostrando níveis altos de propionato (34,3; 38,6 e 35,4 Mm/dL), respectivamente, reduzindo assim a relação acetato:propionato (1,53; 1,57; e 1,32), respectivamente, estes são valores muito próximos aos obtidos no presente trabalho.

Lage (2014) relatou que animais alimentados com dietas de alto concentrado contendo glicerina tiveram maiores concentrações de propionato que os animais alimentados com rações com mais baixo concentrado ($P < 0,05$). Apesar disso, a relação acetato:propionato foi menor no líquido ruminal de animais alimentados com dietas de alto concentrado ($P < 0,05$) por ter uma menor produção de acetato. (Tabela 5). Messana et al. (2013) ao trabalharem com dietas com relação volumoso:concentrado de 50:50 e níveis de lipídios, obtiveram uma produção de propionato (27,62 Mm/dL) menor que no presente estudo, e com um pH de 6,5.

Christensen et al. (1994) não observaram efeito da adição de óleo de milho e sebo bovino em dietas sobre as concentrações de isovalérico que tenderam a diminuir, concordando com Vargas et al., 2002 que verificaram que a fonte de lipídio especialmente grão de soja tende na redução na produção de isovalérico. Se segundo os resultados obtidos no presente estudo, a adição de lipídios (5% de EE) em associação com glicerina (100 g/kg MS) gerou um efeito benéfico na produção dos ácidos graxos de cadeia curta ramificada (isobutírico, isovalérico) e valérico, o que pode favorecer a digestibilidade da dieta com uma maior síntese microbiana.

Ao estudar o crescimento de *Bacteroides succinogenes*, Bruant e Doetsch (1955), determinaram que para permitir o crescimento máximo, as concentrações mínimas de valerato e isovalérico foram de 3,0 Mmol/dL e 15,0 Mml/dL em média, respectivamente. Podendo estabelecer que a resposta da adição dos ácidos graxos está em função do nível energético do meio de cultura tendo um efeito benéfico na síntese de proteína microbiana.

4.3 Síntese de proteína microbiana

A síntese ruminal de proteína microbiana (SRPM) não foi influenciada ($P > 0,05$) pela fonte de óleo de soja em associação com glicerina, com um valor médio para os tratamento de 416,68 g/dia, representando o 52,21% do total do

fluxo de proteína para intestino, que junto com a apresentação ótima na concentração de N-NH₃ em média de 18,84 mg/dL, pode dizer que a síntese microbiana foi favorecida para todos os tratamentos. Estas porcentagens de fluxo de proteína de origem microbiana para duodeno estão dentro da faixa (55,1±16,7%) sustentado por Archimedes et al. (1997), sendo uma fração importante para o ruminante. A proteína microbiana pode suprir de 50% a 100% da proteína metabolizável exigida para bovinos de corte, sendo considerada fonte de boa qualidade em torno de uma digestibilidade intestinal de 80% e o seu perfil em aminoácidos (NRC, 2001). Em comparação à composição da proteína de concentrados protéicos de origem vegetal, a proteína microbiana contém maior proporção de metionina e lisina (VERBIC, 2002), importantes no desenvolvimento dos tecidos.

Valores similares foram apresentados por Messana et al. (2013) quando forneceram soja grão moída (6% de EE) na dieta de novilhos Nelore apresentando um valor médio de proteína microbiana de 426,34 g/dia, mas indicando que a disponibilidade de óleo de soja na dieta tem efeito na síntese da proteína microbiana.

Tal como na SRPM, o fluxo ruminal de proteína de origem não microbiana (FRPNM) não foi influenciado ($P>0,05$) pela adição de fontes de óleo de soja em associação com glicerina, com um valor médio de 381,4 g/dia, representando o 47,78% da proteína total que chegou até duodeno. Segundo Van Soest (1994) uma aceitável produção de N-NH₃ no rumen permite um efeito favorável com diminuição da degradação da proteína ruminal, apresentando maior utilização do nitrogênio pelas bactérias e seu crescimento, e acompanhada de maior fluxo de nitrogênio alimentar para o duodeno (LOOR, 2004; PALMQUIST; MATTOS, 2011).

No presente estudo, além de não existir diferenças estatísticas na SRPM, o maior fluxo ruminal de proteína microbiana para intestino está em relação com a forma como estão dispostos os lipídios na dieta, já que o maior valor foi para os animais que receberam a dieta OS com um valor de 465,6 g/dia, seguida da GP e SG (416,1 e 413,8 g/dia), respectivamente.

Segundo Clark et al. (1992), o aumento da passagem de compostos nitrogenados microbianos para o intestino delgado pode ser atribuído parcialmente à maior quantidade de energia fornecida e a quantidade de

matéria orgânica degradada no rumen. No presente estudo, a digestibilidade de matéria orgânica aparente fermentável no rumen (DMOFR) diferiu ($P < 0,05$) com maior valor para os animais que receberam a dieta CO, e menor para os das dietas com óleo de soja (OS, SG e GP); no entanto, a eficiência da síntese de nitrogênio microbiano por quilograma de matéria orgânica fermentável no rumen foi maior ($P < 0,05$) para os tratamentos contendo fonte de óleo de soja comparada com a dieta CO.

A menor disponibilidade ruminal de nitrogênio e energia são fatores nutricionais que limitam o crescimento microbiano, sendo a forma de fornecimento, o tipo de alimento e as variações na frequência de alimentação que influenciam na taxa de crescimento (BÜRGER et al., 2000; RENNÓ et al., 2000). Podendo assim refletir em uma maior produção e melhor qualidade do produto final no animal, como demonstrado por Silva (2013) ao trabalhar com soja grão, óleo de soja e gordura comercial (5% EE) associada à glicerina (100 g/kg MS), encontrando melhor ganho peso diário e melhor eficiência alimentar em novilhos que receberam a dieta de óleo de soja em associação com glicerina.

Ao observar os resultados da eficiência da síntese de proteína microbiana do tratamento CO (11,247%) quando comparados com os tratamentos SG, GP e OS (13,60%, 13,83% e 15,14%), respectivamente, pode-se interpretar que o incremento da síntese de proteína microbiana não ocorre em função da inclusão da glicerina, mas sim pela disponibilidade dos lipídios no rumen, sendo esta associação de lipídios com glicerina favorável. A adição de glicerina não prejudicou a síntese microbiana, mas foi favorecida pela adição de óleo de soja. Lage (2014) encontrou que a população bacteriana foi semelhante ao utilizar dietas em novilhos Nelores com duas relações de volumoso:concentrado e 10% de glicerina.

Podendo destacar também um efeito favorável da associação da glicerina com óleo de soja, no sentido que a glicerina inibe a lipólise no rumen (EDWARDS et al., 2012) limitando assim a liberação dos ácidos graxos insaturados dos triglicerídios do óleo de soja, diminuindo assim seu efeito tóxico e favorecendo o crescimento bacteriano no rumen. A síntese de proteína microbiana, além do nitrogênio também vai depender da disponibilidade de hidratos de carbono, existindo uma sincronização entre a disponibilidade de

energia fermentável e o nitrogênio degradável no rumen, que aumenta o crescimento microbiano (RUSSELL et al., 1992; MOSCARDINI et al., 1998).

4.4 Balanço de nitrogênio

Analisando as dietas que contem fontes de óleo de soja em associação com glicerina, o tratamento SG, apresentou menor porcentagem de nitrogênio na urina (25,86%) e com maior para os tratamentos GP (33,71%), e que têm uma relação direta com as concentrações de N-NH₃ no rumen, que também reflete no maior valor de nitrogênio retido de 46,74% para a dieta SG e com menor valor de 35,93% para os animais que receberam a dieta GP, podendo estabelecer que a retenção de nitrogênio no tecido está em função do consumo de proteína na dieta (Tabela 6).

A amônia presente no rumen, resultante da degradabilidade da proteína ou do nitrogênio não protéico é utilizada pelos microrganismos para a síntese de sua própria proteína até satisfazer seus requerimentos, e determinados pela disponibilidade de carboidratos fermentáveis (EUSTÁQUIO FILHO et al., 2008). A amônia em excesso é absorvida pela parede do rumen, vai para o fígado via porta e é convertida a ureia, que envolve custo energético, além de perda de nitrogênio (PEREIRA et al., 2007), segundo Van Soest (1994) está conversão custa ao animal 12 kcal/g de nitrogênio. A excreção de ureia pela urina representa elevado custo biológico e desvio de energia para a manutenção das concentrações corporais de nitrogênio em níveis não tóxicos (PAIXÃO et al., 2006), diminuindo a eficiência na utilização da proteína e diminuindo a produtividade animal.

O uso da glicerina no rumen tem um uso eficiente como fonte de energia (JOHNS, 1953; PARSONS, 2009; WANG et al., 2009), e a presença do nitrogênio amoniacal no ambiente ruminal é fator fundamental desde que esteja associada a uma fonte de energia adequada (Van SOEST, 1994). O que para o presente trabalho, pode refletir em animais que receberam a dieta com óleo de soja em associação com glicerina em ser mais eficiente, com uma melhor digestibilidade de EE, maior eficiência na síntese microbiana e uma eficiência energética, permitindo maior deposição de gordura e ganho de peso. Como foi demonstrado por Silva (2013) em trabalho de desempenho animal, encontrou os maiores ganhos de peso nos animais que receberam óleo de soja (5% EE)

em associação com glicerina (100 g/kg MS), com ganho médio de 1,25 kg/dia, comparado com os animais da dieta controle com ganhos de 0,76 kg/dia. Esse efeito pode ser justificado pela dieta com óleo de soja ser mais eficiente apresentando um maior sincronismo entre energia e proteína degradada, e ter proporcionado maior síntese de proteína, uma proteína de melhor qualidade (NRC, 2001).

Neste contexto, reduzir as perdas de compostos nitrogenados torna-se fundamental para maior aproveitamento dos alimentos e síntese de proteína microbiana. Onde o uso de óleo de soja natural em proporção de 5% de EE junto com associação com glicerina bruta favorece a síntese microbiana e com um possível melhor desempenho animal.

5. CONCLUSÕES

A associação do óleo de soja com a glicerina não diminui o consumo da matéria seca, mas afetando negativamente a digestibilidade da matéria seca e FDNcp. As fontes de óleo de soja em associação com glicerina não resultam em mudanças no pH ruminal nem na proporção molar de acetato; no entanto, aumenta a proporção molar de propionato e melhora a eficiência da síntese de nitrogênio microbiano.

O uso de óleo de soja na forma não protegida em relação a 5% de EE em associação com glicerina (100 g/kg MS) pode ser utilizado em rações estratégicas para ruminantes, compreendo a mesma finalidade quando se usa soja grão ou sabões de cálcio na forma de gorduras protegidas.

6. REFERÊNCIAS

ARCHIMEDE, H.; SAUVANT, D.; SCHMIDELY, P. Quantitative review of ruminal and total tract digestion of mixed diet organic matter and carbohydrates. **Reproduction, Nutrition, Development**, v.37, p. 173-189, 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS-AOAC. **Official methods of analysis**. 16 ed. Washington, 1995.

BÜRGER, P.J.; PEREIRA, J.C.; VALADARES FILHO, S.C.; COELHO da SILVA, J.F.; QUEIROZ, A.C.D.; CECON, P.R.; MAGIERO, D. Fermentação ruminal e eficiência microbiana em bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 215-224, 2000.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PEREIRA, J.C.; CUNHA, M.D.; DETMANN, K.D.S.C.; PAULINO, M.F. Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p.130-138, 2009.

CASTAGNINO, P.S; MESSANA, J.D.; FIORENTINI, G.; JESUS, R. B. de; SAN VITO, E.; CARVALHO, I. P. C.; BERCHIELLI, T. T. Glycerol combined with oils did not limit biohydrogenation of unsaturated fatty acid but reduced methane production in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 201, p. 14-24, 2015.

CAVALIERI, F.B.; SANTOS, G.T.; MATSUSHITA, M.; PETIT, H.V.; RIGOLON, L.P.; SILVA, D.; HORST, J.A.; CAPOVILLA, L.C.; RAMOS, F.S. Milk production and milk composition of dairy cows fed Lac100® or whole flax seed. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 85, p. 413-416, 2005.

CHALUPA, W.; RICKABAUGH, B.; KRONFELD, D.S.; SKLAN, D. Rumen fermentation in vitro as influenced by long chain fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 1439-1444, 1984.

CHEN, X.B.; GOMES, M. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives-an overview of the technical details**. Aberdeen: Rowett Research Institute/International Feed Research Unit, 21p, 1995.

CHEN, X.B.; KYLE, D.J.; ØRSKOV, E.R. Measurement of allantoin in urine and plasma by high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization. **Journal of Chromatography**, v. 617, p. 241-247, 1993.

CHRISTENSEN, R.A.; CAMERON, M.R.; CLARK, J.H.; DRACKLEY, J.K.; LYNCH, J.M.; BARBANO, D.M. Effects of amount of protein and ruminally protected amino acids in the diet of dairy cows fed supplemental fat. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1618-1629, 1994.

CLARK, J.H.; KLUSMEYER, T.H.; CAMERON, M.R. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2304-2323, 1992.

DASARI, M.A.; KIATSIMKUL, P.P.; SUTTERLIN, W.R.; SUPPES, G.J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: General**, v. 281, p. 225-231, 2005.

DA SILVA, G.M. **Glicerina bruta na dieta de novilhas nelore em pastejo no período da seca**. 2013. 12 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2013.

DE VETH, M.; KOLVER, E. Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2066-2072, 2001.

DOREAU, M.; FERLAY, A. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 45, p. 379-96, 1994.

EDWARDS, H.D.; ANDERSON, R.C.; MILLER, R.K.; TAYLOR, T.M.; HARDIN, M.D.; SMITH, S.B.; KRUEGER, N.A.; NISBET, D.J. Glycerol inhibition of ruminal lipolysis in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 5176-5181, 2012.

ETHERIDGE, R.D.; PESTI, G.M.; FOSTER, E.H. A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition analytical laboratory. **Animal Feed Science and Technology**, v. 73, p. 21-28, 1998.

EUSTÁQUIO FILHO, A.; DOS SANTOS, P.E.F.; YAMAMOTO, S.M. Utilização de ureia como fonte de nitrogênio não proteico (NNP) para ruminantes. **Pubvet**, v.2, n.32, 2008.

EVANS, H.L.; WIEGAND, B.R.; KERLEY, M.S.; PORTER, J.H.; ROBERTS, K.S.; VERSEMANN, B.A. Characterization of meat quality and lipid profile from steers fed crude glycerol. **Journal of Animal Science**, v. 86, E-Suppl. 2, p. 40, 2008.

FIORENTINI, G.; SANTANA, M.C.A.; SAMPAIO, A.A.M.; REIS, R.A.; RIBEIRO, A.F.; BERCHIELLI, T.T. Intake and performance of confined crossbred heifers fed different lipid sources. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p.1490-1498, 2012.

FUJIHARA, T.; ØRSKOV, E.; REEDS, P.; KYLE, D. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **The Journal of Agricultural Science**, v. 109, p. 7-12, 1987.

HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. Lipid metabolism in the rumen. in: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.) **The Rumen Microbial Ecosystem**. Blackie Academic and Professional, New York, NY. p. 382-426, 1997,

HOOVER, W.H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 2755-2766, 1986.

HOOVER, W.H.; STOKES, S.R. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3630-3644, 1991.

JENKINS, T.C. Lipid Metabolism in the Rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 3851-63, 1993.

JENKINS, T.C.; PALMQUIST, D.L. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. **Journal of Dairy Science**, v. 67, p. 978-986, 1984.

JENKINS, T. C.; WALLACE, R. J.; MOATE, P. J.; MOSLEY, E. E.; Board-invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 397-412, 2008.

JORGE, J.R.V.; ZEOULA, L.M.; PRADO, I.N.; SILVA, R.R.; ANDRADE, R.V.D.; PRADO, J.M.D.; BUBLITZ, E.E. Lipídios em dietas para novilhos holandeses: digestibilidade aparente. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, p. 743-753, 2008.

JOHNS, A. Fermentation of glycerol in the rumen of sheep. **NZJ Science. Technology**, v. 35, p. 262-269, 1953.

KRUEGER, N.A.; ANDERSON, R.C.; TEDESCHI, L.O.; CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; NISBET, D.J. Evaluation of feeding glycerol on free-fatty acid production and fermentation kinetics of mixed ruminal microbes in vitro. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 8469-8472, 2010.

LAGE, J.F. **Crude glycerin associated with starch or fiber based energy ingredients at two levels of concentrate for beef cattle**. 2014. 12 f. Tese (Doutorando em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2014.

LAGE, J.F.; BERCHIELLI, T.T.; SAN VITO, E.; SILVA, R.A.; RIBEIRO, A.F.; REIS, R.A.; DALLANTONIA, E.E.; SIMONETTI, L.R.; DELEVATTI, L.M.; MACHADO, M. Fatty acid profile, carcass and meat quality traits of young Nellore bulls fed crude glycerin replacing energy sources in the concentrate. **Meat Science**, v.96, p.1158-1164, 2014.

LEVENTINI, M.W.; HUNT, C.W.; ROFFLER, R.E.; CASEBOLT, D.G. Effect of dietary level of barley-based supplements and ruminal buffer on digestion and growth by beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 4334-4344, 1990.

LOOR, J.J.; UEDA, K.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y.; DOREAU, M. Biohydrogenation, Duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2472-85, 2004.

MACH, N.; BACH, A.; DEVANT, M. Effects of crude glycerin supplementation on performance and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 632-638, 2009.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC international**, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MESSANA, J.D.; BERCHIELLI, T.T.; ARCURI, P.B.; REIS, R.A.; CANESIN, R.C.; RIBEIRO, A.F.; FIORENTINI, G.; FERNANDES, J.J.D.R. Rumen fermentation and rumen microbes in Nellore steers receiving diets with different lipid contents. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, p. 204-212, 2013.

METZ, P.A.M. **Fontes de gordura na dieta de novilhos terminados em confinamento**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, R.S. 2009.

MIR, P.S.; MEARS, G.L.; MIR, Z. Vegetable oil in beef cattle diets. In: BEAUCHEMIN, K.A.; CREWS, D.H. (Eds.). **Advances in beef cattle science**. Lethbridge: Lethbridge Research Centre. v. 1, p. 88-104, 2001.

MOSCARDINI, S.; WRIGHT, T.C.; LUIMES, P.H.; McBRIDE B.W.; SUSMEL P. Effects of rumen-undegradable protein and feed intake on purine derivative and urea nitrogen: comparison with predictions from the Cornell Net Carbohydrate and Protein System. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2421-2329, 1998.

NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; Van NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. In: **The Rumen Microbial Ecosystem** (eds. by Hobson PN; Stewart CS): Springer Netherlands, p. 523-632, 1997.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, Seventh Revised Edition, Update, 2001. **The National Academy Press**, Washington, D.C. 2001.

NÖRNBERG, J.L.; STUMPF JÚNIOR, W.; LÓPEZ, J.; COSTA, P.B. Valor do farelo de arroz integral como fonte de gordura na dieta de vacas Jersey na fase inicial de lactação: digestibilidade aparente de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, p. 2412-2421, 2004.

ØRSKOV, E.R. **Nutrición proteica de los rumiantes**. Acribia, Zaragoza, 178p, 1988.

PAGGI, R.A.; FAY, J.P.; FAVERIN, C. In vitro ruminal digestibility of oat hay and cellulolytic activity in the presence of increasing concentrations of short-chain acids and glycerol. **Journal of Agricultural Science**. v. 142, p. 89-96, 2004.

PAIXÃO, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; LEÃO, M.I.; CECON, P.R.; MARCONDES, M.I.; SILVA, P.A.; PINA, D.S.; de SOUZA, M.G. Ureia em dietas para bovinos: consumo, digestibilidade aparente, ganho de peso, característica da carcaça e produção microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 2451-2460, 2006.

PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. Metabolismo dos lipídios. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed) **Nutrição de ruminantes**, 2ed. Funep. Jaboticabal. SP, 616 p, 2011.

PARSONS, G.L.; SHELOR, M.K.; DROUILLARD, J.S. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 653-657, 2009.

PEDREIRA, M.S.; OLIVEIRA, S.G.; PRIMAVESI, O.; LIMA, M.A.; FRIGHETTO, R.T.S.; BERCHIELLI, T.T. Methane emissions and estimates of ruminal fermentation parameters in beef cattle fed different dietary concentrate levels. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, p. 592-598, 2013.

PEREIRA, K.P.; VÉRAS, A.S.C.; FERREIRA, M.D.A.; BATISTA, A.M.V.; MARQUES, K.A.; FOTIUS, A.C.A. Balanço de nitrogênio e perdas endógenas em bovinos e bubalinos alimentados com níveis crescentes de concentrado. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 29, p. 433-440, 2007.

RENNÓ, L.N.; VALADARES, R.F.D.; LEÃO, M.I. Estimativa da produção de proteína microbiana em novilhos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 1223-1234, 2000.

RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.G.; Van SOEST, P.J.; SNIFFEN, C.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3551-3561, 1992.

SANTOS, F.A.P.; PEDROSO, A.M. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds.) **Nutrição de ruminantes**, 2ed. Funep. Jaboticabal. SP, 619 p, 2011.

SCHOONMAKER, J.P.; FLUHARTY, F.L.; LOERCH, S.C. Effect of source and amount of energy and rate of growth in the growing phase on adipocyte cellularity and lipogenic enzyme activity in the intramuscular and subcutaneous fat depots of Holstein steers. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 137-148, 2004.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM - SAS/STAT User's guide: Statistics: version 9.0. SAS Institute., Inc., Cary, N.C., 2004.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 235p, 2002

SILVA, R.A. **Fontes lipídicas associadas à glicerina bruta na dieta de tourinhos nelore**. 2013. 12f. Dissertação (Mestre em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2013.

SNIFFEN, C.; O'CONNOR, J.; Van SOEST, P.; FOX, D.; RUSSELL, J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3562-3577, 1992.

SUKHIJA, P.S.; PALMQUIST, D.L. Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 1784-1787, 1990.

VALADARES FILHO, S.C.; MARCONDES, M.; CHIZZOTTI, M.; PAULINO, P. **Exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados–BR CORTE**. 2. ed. Viçosa, MG, Brazil: UFV.DZO, 193p, 2010.

VALADARES, R.F.D.; GONCALVES, L.C.; RODRIGUEZ, N.M.; VALADARES FILHO, S.C.; da SILVA, J.F.C. Níveis de Proteína em Dietas de Bovinos. 2. Consumo, Digestibilidades e Balanço de Compostos Nitrogenados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 6, p. 1259-1263, 1997.

VALINOTE, A.C.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LEME, P.R.; SILVA, S.; CUNHA, J.A. Fontes de lipídio e monensina sódica na fermentação, cinética e degradabilidade ruminal de bovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 117-124, 2006.

VAN SOEST, P.J. Nutritional Ecology of the Ruminant. **Comstock Pub, 2nd ed. Ithaca: Comstock Pub**, 476p, 1994.

VARGAS, L.H.; LANA, R.D.P.; JHAM, G.N.; SANTOS, F.L.; QUEIROZ, A.C.D.; MANCIO, A.B. Adição de lipídios na ração de vacas leiteiras: parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 522-559, 2002.

VERBIC, J. **Factors affecting microbial protein synthesis in the rumen with emphasis on diets containing forages**. Viehwirtschaftliche Fachtagung, Milchproduktion und Rindermast. Gumpenstein, Germany: p. 24-25, 2002.

VERSEMANN, B.A.; WIEGAND, B.R.; KERLEY, M.S.; PORTER, H.; ROBERTS, K.S.; EVANS, H.L. Dietary inclusion of crude glycerol changes beef steer growth performance and intramuscular fat deposition. **Journal of Animal Science**, v.86, ESuppl. 2, p.478, 2008.

WANG, C.L.; HUO, W.J.; YANG, W.Z.; DONG, K.H.; HUANG, J.X.; GUO, G. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. **Livestock Science**, v. 121, p. 15-20, 2009.

WEIMER, P.J. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 3114-3122, 1998.

WEISS, W.P.; PINOS-RODRÍGUEZ, J.M. Production responses of dairy cows when fed supplemental fat in low- and high-forage diets. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 6144-6155, 2009.

CAPÍTULO 3. FONTES DE ÓLEO DE SOJA EM ASSOCIAÇÃO COM GLICERINA AFETA A EFICIÊNCIA DA BIOHIDROGENAÇÃO E FLUXO RUMINAL DE ÁCIDOS GRAXOS EM NOVILHOS DA RAÇA NELORE

RESUMO – Oito novilhos da raça Nelore, com peso inicial de $554,13 \pm 36,35$ kg e 30 meses de idade, com cânula ruminal e duodenal, foram utilizados para determinar o efeito de fontes de óleo de soja em associação com glicerina, sobre a taxa e eficiência da biohidrogenação, fluxo de ácidos graxos, e os efeitos em metabólitos sanguíneos. Foram fornecidas quatro dietas (forragem:concentrado de 30:70), silagem de milho como volumoso, e o concentrado diferenciado pela fonte do óleo de soja: 1) controle, CO; 2) soja grão, SG; 3) óleo de soja, OS; e 4) gordura protegida, GP. Os animais foram divididos em dois quadrados latinos 4x4, e quatro períodos experimentais de 16 dias cada. As médias foram submetidas à análise de contrastes ortogonais. Houve efeito no consumo de ácidos graxos nos diferentes tratamentos, afetando a concentração e o perfil dos ácidos graxos no rumen, e o fluxo ruminal de ácidos graxos. Encontrou-se que a taxa de passagem para o ácido linoléico foi afetada ($P < 0,05$) com o menor valor para OS e maior valor para SG e GP; no entanto, a taxa de biohidrogenação para o ácido linoléico e ácido linolenico foi maior ($P < 0,05$) para OS. A maior eficiência da biohidrogenação do ácido oleico e o ácido linoléico foi para OS, seguida do SG e GP; e a menor eficiência da biohidrogenação do ácido linolenico foi para GP. O maior fluxo de ácido esteárico foi para OS, mesmo assim, apresentou o maior ($P < 0,05$) fluxo de ácido vaccênico; os maiores fluxos do ácido linoléico e ácido linolenico foram para o GP. O maior ($P < 0,05$) fluxo de ácidos graxos insaturados foram para SG e GP, e o maior grau de saturação foi apresentado para o OS. Os metabólitos sanguíneos avaliados foram afetados pelas dietas, mas dentro da faixa de salubridade dos animais. Não foi observado efeito nas concentrações da enzima hepática AST/GOT. A modificação da quantidade e qualidade dos ácidos graxos no rumen e o fluxo que atingiu o duodeno estão em função da disponibilidade na fonte do óleo de soja, afetando a eficiência da biohidrogenação e as concentrações sanguíneas de glicose e colesterol.

Palavras-chaves: Ácidos graxos insaturados, colesterol, glicose, saturação, metabólitos sanguíneos.

1. INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos de cadeia longa no rumen sofrem uma série de transformações, em especial os insaturados, com um grande efeito sobre o perfil dos ácidos graxos que por fim são depositados no tecido (LOOR et al., 2004; PALMQUIST; MATTOS, 2011), sendo necessárias avaliações dos mesmos no rumen e intestino para entender e estabelecer suas modificações metabólicas no ambiente ruminal, e pode esclarecer seu efeito na quantidade e qualidade no fluxo de ácidos graxos que chega ao intestino (HARVATINE; ALLEN, 2006). Os microrganismos do rumen modificam o perfil de ácidos graxos da dieta através da isomerização e a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados (HARVATINE; ALLEN, 2006). A capacidade de projetar um perfil de ácidos graxos para absorção depende de um entendimento do metabolismo ruminal dos lipídios, onde, a eficiência deste processo irá definir o fluxo ruminal de ácidos graxos insaturados para o intestino, e conseqüentemente a incorporação destes ácidos nos tecidos (JENKINS, 1993; LOOR et al., 2004).

Estratégias para proteger os ácidos graxos da biohidrogenação ruminal são utilizadas, como o fornecimento na dieta do óleo de soja na forma de semente ou grão, ou o fornecimento de ácidos graxos protegidos em forma de sabões de cálcio, para que estejam indisponíveis para as bactérias e garantam a passagem ao intestino (LOOR et al., 2004; HESS et al., 2008; KOZLOSKI, 2011; BASSI et al., 2012;). Não obstante, a proteção pode estar condicionada, e os ácidos graxos podem ficar disponíveis no ambiente ruminal. No caso das sementes pode estar limitada devido a sua ruptura durante a mastigação e ruminação (DOREAU; FERLAY, 1994), e no caso dos sais de cálcio tornam-se disponíveis em condições de pH baixo no rúmen, com dissociação do íon de cálcio, sendo os ácidos graxos insaturados parcialmente acessíveis à microflora do rumen (NÖRNBERG et al., 2004), e parcialmente biohidrogenados (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1997).

Também se pode destacar neste aspecto, o fornecimento de óleo de soja na forma não protegida, mas em associação com glicerina, que em certa medida pode contribuir na diminuição da hidrólise do lipídio, no sentido que a glicerina inibe a lipólise no rumen (EDWARDS et al., 2012). Limitando assim, a liberação dos ácidos graxos insaturados do triglicerídio e estar menos exposto ou disponibilidade na forma não esterificada no ambiente ruminal para ser

biohidrogenados. Sendo está associação uma alternativa a ter em conta no sentido de limitar a eficiência da biohidrogenação e garantir um maior fluxo de ácidos graxos insaturados para o intestino.

A extensão ou eficiência da biohidrogenação microbiana é determinada pelas características da fonte de ácido graxo, o tempo de retenção e as características da população microbiana no rumen (ALLEN, 2000). A biohidrogenação é um processo de múltiplos passos complexos de compreender, que inclui um processo prévio a lipólise, seguido da isomerização, e por fim a biohidrogenação, resultando na formação de ácidos graxos saturados, mas gerando produtos intermediários isômeros *cis* e *trans* (HARVATINE; ALLEN, 2006; JENKINS et al., 2008).

Neste sentido, a análise do metabolismo dos ácidos graxos no rumen é uma prática útil e necessária para se aproximar na identificação do perfil dos ácidos graxos que atingi o duodeno, e estarem disponíveis e serem absorvidos. A quantidade e qualidade no fluxo ruminal de ácidos graxos de cadeia longa, pode estar influenciado pelo perfil de ácidos graxos da dieta, a forma como os lipídios estão disponibilidade na fonte e do ambiente ruminal (LOOR et al., 2004; JENKINS et al., 2008). Mas, pode ser controlada com gorduras protegidas, para maximizar efeitos positivos na eficiência animal e aumentar o valor do produto final. Entretanto, é essencial uma compreensão clara da cinética ruminal e do fluxo intestinal dos ácidos graxos, além de poder compreender como o tipo da fonte do lipídeo influência na cinética e fluxo intestinal dos ácidos graxos que vão estar disponíveis para ser absorvidos.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da fonte de óleo de soja associada com glicerina sobre a cinética e eficiência da biohidrogenação ruminal e no fluxo ruminal de ácidos graxos de cadeia longa, e seu efeito nas concentrações de alguns metabólicos sanguíneos em novilhos da raça Nelore.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e instalações

O experimento foi realizado nas instalações do Setor de Digestibilidade pertencente ao Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias

e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista. Foram utilizadas baias individuais para o alojamento dos animais durante todo o período experimental, com aproximadamente 12 m², as quais continham bebedouro e comedouro individual, piso de concreto e coberto. Os animais permaneceram alojados em uma mesma baia pelos quatro períodos.

2.2 Animais e período experimental

Foram utilizados oito novilhos Nelores com peso corporal médio inicial de 554,13±36,35 kg e de 30 meses de idade. Os animais foram providos de cânula no rumen e duodeno, para a realização das coletas do estudo dos parâmetros ruminais e fluxo duodenal. O período experimental consistiu em 74 dias, dos quais 10 foram destinados a adaptação dos animais nas baias, tratados contra endo e ectoparasitos e adaptações para o consumo das dietas com alto grão, e 64 dias para os quatro períodos experimentais de 16 dias cada, sendo nove dias destinados à adaptação dos animais às dietas experimentais e sete dias restantes para as coletas. Os animais foram pesados no início de cada um dos períodos e ao final do último.

2.3 Dietas experimentais e análise de alimentos da dieta

O experimento foi conduzido para avaliar quatro dietas. Três delas com diferentes disponibilidades de óleo de soja: grão de soja inteira, óleo de soja em estado natural e uma gordura comercial (sais de cálcio de ácidos graxos insaturados de cadeia longa, ou gordura By-pass, Megalac[®]); e uma dieta controle (sem fonte de gordura), para um total de quatro tratamentos. Todas as dietas foram constituídas com glicerina bruta, em relação de 100 g/kg MS, as dietas ficaram com um teor de extrato etéreo de 50g/kg MS. A fonte de volumoso foi silagem de milho, em relação volumoso:concentrado de 30:70.

As dietas foram formuladas para ganho médio de 1,25 kg/dia de acordo com Valadares Filho et al. (2010). As dietas diferiram ligeiramente no conteúdo de proteína. A composição das dietas experimentais encontra-se na Tabela 1. Os ingredientes dietéticos do concentrado foram misturados no Setor de Digestibilidade, pertencente ao Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista.

Tabela 1. Ingredientes e composição de nutrientes das dietas experimentais.

Itens	Dietas			
	CO	SG	OS	GP
<i>Ingredientes</i>	<i>% de MS</i>			
Silagem de Milho ¹	30,00	30,0	30,00	30,00
Milho em grão moído	47,89	46,48	45,71	45,40
Farelo de Soja	8,11	0,00	8,56	8,63
Soja grão	---	9,52	---	---
Óleo de soja	---	---	1,73	---
Gordura protegida ²	---	---	---	1,97
Glicerina Bruta	10,00	10,00	10,00	10,00
Ureia	1,00	1,00	1,00	1,00
Sal mineral ³	3,00	3,00	3,00	3,00
<i>Componentes químicos (nutrientes)</i>				
Matéria seca	69,03	68,27	68,03	67,65
Matéria orgânica	94,15	94,2	94,15	94,18
Proteína bruta	16,44	17,09	15,52	15,91
Extrato etéreo	3,74	5,26	4,98	4,79
Ácidos graxos insaturados				
Cinza	5,85	5,80	5,85	5,82
FDNcp ⁴	25,85	24,56	24,11	24,09
FDA ⁵	9,03	9,54	8,77	8,90
Hemicelulose	16,34	18,23	18,73	16,75
LDA ⁶	1,78	3,05	2,38	2,02
Carboidratos totais	73,97	71,85	73,66	73,48
Carboidratos não estruturais	48,12	47,30	49,55	49,39
Nutrientes digestíveis totais ⁷	80,53	82,85	82,46	82,25
<i>Energia (Mcal/kg MS)</i>				
Energia bruta	4,44	4,63	4,52	4,53
Energia metabolizável	2,91	3,0	2,98	2,97

CO, dieta controle; SG, dieta com soja grão; OS, dieta com óleo de soja; GP, dieta com gordura protegida, (Megalac®); ¹composição da silagem do milho, MS (85,02%), MO (95,16%), proteína bruta (9,72%), E,E (2,96%), FDNcp (51,57%), LDA (4,32%). ²Utilizou-se Megalac®; ³ Composição do suplemento mineral (Cálcio: 210g; Fósforo: 20g; Enxofre: 37g; Sódio: 80g; Cobre: 490mg; Manganês: 1.424mg; Zinco: 1.830mg; Iodo: 36mg; Cobalto: 29mg; Selênio: 9mg; Flúor (máx.): 333mg; ⁴FDNcp: fibra insolúvel em detergente neutro corrigido pra cinzas e proteína; ⁵FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; ⁶LDA: lignina detergente ácida.; ⁷NRC, 2001

2.4 Coleta de amostras

2.4.1 Coleta das amostras de alimentos, sobras e fezes

Durante o período experimental, as dietas foram fornecidas duas vezes ao dia (7:00 e 13:00 horas) em quantidades iguais e, para garantir o consumo *ad libitum*, a quantidade de alimento fornecido foi 110% do consumo esperado por dia. Foram tomadas amostras do alimento e sobras entre o 6º e 15º dia de

cada período experimental. Entre o 12º e o 14º dia de cada período experimental foi realizada coleta total de fezes (coletadas com uma pá e depositadas em baldes plásticas imediatamente, após a defecação), e no final de cada dia de coleta foram pesadas e homogeneizadas, e tomada uma amostra armazenada a -20°C, para depois ao final (3 dias de coleta) foi feita uma amostra composta por animal, representando cada período.

No final do período experimental as amostras armazenadas no freezer, foram liofilizadas e moídas em moinho de facas tipo Willey com peneira contendo crivos de 1mm (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) sem deixar esquentar o moinho para impedir que as fontes de lipídios fossem alteradas. Depois as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente em recipiente plástico previamente identificado, e realizadas as respectivas análises químico-bromatológicas no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), do Departamento de Zootecnia, FCAV/UNESP, Jaboticabal.

2.4.2 Coleta de amostras do líquido do rumen e conteúdo duodenal

As coletas do líquido ruminal para a determinação dos ácidos graxos de cadeia longa (no rumen e no duodeno) foram coletadas amostras nos dias 10 e 11 de cada período experimental, em intervalos de 4 horas. Para que o período de 24 horas fosse representado adiantou-se a coleta em duas horas de um dia para o outro, da seguinte forma: no dia 10, as coletas foram nos horários (0:00, 04:00, 08:00, 12:00, 16:00 e 20:00 horas); e no dia 11, as coletas foram nos horários (02:00, 06:00, 10:00, 14:00, 18:00 e 22:00 horas). Cerca de 10mL de líquido ruminal foi recolhido em um recipiente plástico (previamente identificado), após filtração em tecido duplo de algodão, sendo a coleta feita manualmente através da cânula, e armazenado a -20°C. O conteúdo ruminal seco retirado na coleta foi devolvido ao rumen imediatamente após a filtração do líquido ruminal. Após a filtração do líquido ruminal, foi determinado o pH com peagâmetro digital. No final da última coleta de cada período, tinha-se coletado uma amostra total aproximada de 120 mL, e depois foram liofilizadas, para fazer a respectiva análise no laboratório.

O conteúdo duodenal foi coletado nos mesmos dias e horários realizados para as coletas do líquido ruminal. As coletas foram obtidas manualmente através da cânula duodenal em sacolas plásticas, em quantidade

aproximada de 150 mL, e armazenado a -20° C em recipientes plásticos. No final de cada período foi feita uma amostra composta de 100 mL por animal (contendo a parte sólida e líquida), e armazenada em um recipiente plástico previamente identificado e armazenado a -20°C, depois foram liofilizadas para posterior análise no laboratório dos ácidos graxos de cadeia longa.

Para a estimativa total do fluxo ruminal dos ácidos graxos foi preciso determinar o fluxo da matéria seca, feita pelo método da FDN indigestível (FDNi) como marcador interno, determinada pela metodologia *in situ* (CASALI et al., 2009) utilizando um animal canulado no rumen (independente ao período experimental), onde foram incubadas as amostras de alimento, sobras, conteúdo duodenal e fezes num período de 12 dias. Incubou-se 0,5 g de amostra em sacos de Ankom (filter bags F57) que posteriormente foram lavados em água corrente, fervidos em detergente neutro por uma hora, lavado em água destilada fervente por 10 minutos e em seguida foram lavados com acetona (por duas vezes), sendo secos em estufa a 65°C por 72 horas, para depois fazer a determinação da FDN (Van SOEST, 1994). Para o cálculo do fluxo da digestão no rumen foi utilizada a seguinte equação (CASALI et al., 2009).

1. Fluxo ruminal da matéria seca = FRMS

$$- FRMS = (QMS.f \times \%FDNind.f) / \%FDNind.d$$

Onde: QMS.f = quantidade de matéria seca em fezes; %FDNind.f= porcentagem de FDN indigestível em fezes; %FDNind.d= porcentagem de FDN indigestível em duodeno.

2.4.3 Coleta de amostras do plasma sanguíneo

Para a determinação de parâmetros sanguíneos ou perfis metabólicos por meio das análises sanguíneas, coletaram-se amostras de sangue por animal no dia 16° do período experimental, sendo realizadas coletas em dois horários: 7 h e 13 h via punção da veia coccígea, para as coletas de sangue, utilizando-se tubos tipo vacutainer de 10mL, com EDTA (fluoreto de sódio). Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 2.700 rpm por 15 minutos para separar o plasma, que depois foi coletado, utilizando uma micropipeta, e

aconditionadas em tubos eppendorf de 2 mL que foram identificados e armazenados a -20°C, para posteriores análises no laboratório.

2.5 Análises laboratoriais

2.5.1 Análise de ácidos graxos de cadeia longa

Determinou-se a quantidade dos ácidos graxos de cadeia longa em amostras de alimento, sobras, fezes, líquido ruminal, e conteúdo duodenal. Os ácidos graxos contidos nas amostras foram diretamente extraídos e metilados em metil ésteres de ácidos graxos (FAME) segundo Sukhija e Palmquist (1988) com modificação de Loo et al., (2004). Prévia metilização das amostras, foi incluído o metil nonadecanoate (C19:0) (Sigma-Aldrich, Supelco, USA) como indicador padrão interno, recomendado por Palmquist e Jenkins (2003). Uma análise no cromatógrafo previa sem o padrão interno foi feita para descartar a presença desse ácido nas amostras. Os metil ésteres de ácidos graxos (FAME) foram depositados em tubos eppendorf devidamente identificados e armazenados a -20°C, para depois serem analisados no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), pertencente ao Departamento de Zootecnia, FCAV/UNESP, Jaboticabal.

Para as quantificações dos ácidos graxos, as amostras metilizadas foram injetadas por meio de um injetor automático em um cromatógrafo gasoso SHIMADZU GC-2010 plus, equipado com um detector de ionização de chama, e uma coluna capilar de sílica fundida Rt/2560 (RESTEK) de 100 m x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,22 µm.

As análises da quantificação dos ácidos graxos foram feitas em duplicata, sob as seguintes condições: 0,5 µL metil ésteres (FAME) em hexano, com uma temperatura do injetor mantido a 260°C, e temperatura do detector fixado em 260°C. A temperatura da coluna inicialmente foi mantida a 140°C durante 5 min, em seguida, aumentou a uma taxa de aquecimento de 4°C/min até 240°C e permanecendo por 15 minutos. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste.

Para a identificação de picos e estabelecer a correspondente curva no cromatógrafo como padrão de metil éster puro (Sigma-Aldrich, Supelco, USA) com uma concentração conhecida, utilizaram-se uma mistura com 19 metil ésteres puros (F.A.M.E. Mix C8-C22 No. 18920) e sete metil ésteres em forma individual (C18:1n11t - No. 46905-U; C18:1n6t – No. 47199-U; C18:1n6 – No.

47198-U; C18:2n9-12t – No. 46951-U; C20:5n3 – No. 47571-U; C22:5n3 – No. 47563-U; e C22:6n3 – No. 47570-U). A quantidade de ácidos graxos foi determinada segundo (HARVATINE; ALLEN, 2006).

2.5.2 Estimativa da taxa de passagem de ácidos graxos e extensão da biohidrogenação em rumen

A taxa de passagem dos ácidos graxos e do fracionamento da biohidrogenação do rumen foram calculados utilizando um modelo que responde por transferência de ácidos graxos entre o rumen e duodeno (HARVATINE; ALLEN, 2006). O modelo assume que os ácidos graxos insaturados não são oxidados, mas são hidrogenados e aparecem saturados. As quantidades de ácidos graxos são representadas em condições de estado estacionário, e que a cinética da biohidrogenação segue na primeira ordem. A permanência ruminal, o fracionamento da taxa de passagem (k_p) e o fracionamento da taxa de biohidrogenação (k_b) para cada ácido graxo insaturados no rumen foram calculados utilizando as seguintes equações (HARVATINE; ALLEN, 2006):

1. Permanência ruminal ou taxa de rotatividade (%h), TR

$$TR = [AGc (g/h) / AGR (g)] \times 100.$$

Onde: AGc = ácidos graxos consumidos g/h; AGR = Quantidade de ácidos graxos no rumen.

2. Taxa de passagem no rumen (k_p) (%h) = [FRAG (g/h) / AGR (g)] x 100.

Onde: FRAG = fluxo ruminal de ácidos graxos g/h; AGR = Quantidade de ácidos graxos no rumen.

3. Taxa de desaparecimento de AG de rumen (%h) = [AGc – FRAG] / AGR.

Onde: AGc = ácidos graxos consumidos g/h; FRAG = fluxo ruminal de ácidos graxos g/h; AGR = Quantidade de ácidos graxos no rumen.

4. Taxa de biohidrogenação do rumen (k_b) (%h), TBH

$$TBH = [AGc - FRAG] (\%h) / [(AGc - FRAG) (\%h) + FRAG (\%h)].$$

Onde: AGc = ácidos graxos consumidos g/h; FRAG = fluxo ruminal de ácidos graxos g/h.

5. Extensão ou eficiência de biohidrogenação (%), EBH

$$EBH = [(AGc - FRAG) / AGc] \times 100$$

Onde: AGc = ácidos graxos consumidos; FRAG = fluxo ruminal de ácidos graxos.

2.5.3 Análise de parâmetros sanguíneos

Para os análises dos parâmetros sanguíneos foram utilizando kits comerciais (Labtest®), e as concentrações séricas foram medidas por um analisador automático LabMax Pleno de alta sensibilidade fotométrica, que é programado para realizar testes bioquímicos, no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), do Departamento de Zootecnia, FCAV/UNESP, Jaboticabal.

Das amostras de soro foram feitos análises para glicose, colesterol total, albumina, uréia, triglicérides, colesterol total, fração de lipoproteína de alta e muito baixa densidade, (HDL e VLDL). Adicionalmente, foram determinadas as enzimas, aspartato aminotransferase ou transaminase glutâmico (AST/GOT), e a enzima hepática Gama glutamil transferase (Gama GT ou GGT), como indicadores metabólitos do funcionamento hepático.

A lipoproteína de baixa densidade (LDL), foi calculada pelo método indireto, precisando dos valores de colesterol total e do colesterol HDL, mediante a fórmula: $LDL = \frac{3}{4} \times (\text{Colesterol total} - \text{Colesterol HDL})$

2.6 Delineamento experimental e análise estatística

Os animais foram dispostos em um delineamento experimental em dois quadrados latinos 4X4 simultâneos, com quatro tratamentos, quatro períodos experimentais e quatro animais, sendo a unidade experimental constituída por um animal por baia. O delineamento foi realizado de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + \varphi_i + \tau_j + \rho_k + \delta_{l(\varphi_i)} + \varphi\tau_{ij} + \varepsilon_{ijkl}$$

Em que: Y_{ijkl} = a variável dependente; μ = a média geral das observações; φ_i = o i -ésimo efeito do quadrado latino; τ_j = o j -ésimo efeito do tratamento ou à

dieta; ρ_k = k-ésimo efeito do período; $\delta_{l(\phi_i)}$ = o efeito do animal dentro do quadrado latino i; $\phi_{T_{ij}}$ = o efeito da interação entre o quadrado latino i e o tratamento j; ϵ_{ijkl} = o erro aleatório. Pressuposto o erro normalmente e independentemente distribuído com uma média 0) e uma variância ζ^2).

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa SAS (2004). As médias foram comparadas através do teste de Tukey, adotando o nível de significância de 5%. Sendo as médias submetidas à análise de contrastes ortogonais. Compararam-se os efeitos de tratamentos por meio dos seguintes contrastes ortogonais:

CO vs. SG, OS e GP: comparar a dieta CO (controle) sem fonte de lipídio suplementar *versus* dietas contendo fontes lipídicas SG, OS e GP.

SG vs. OS e GP: comparar a dieta SG contendo soja grão *versus* dietas contendo óleo de soja (OS) e gordura protegida (GP).

OS vs. GP: comparar a dieta OS contendo óleo de soja *versus* a dieta GP contendo gordura protegida.

3. RESULTADOS

3.1 Consumo e concentrações no rumen dos ácidos graxos

O perfil e a concentração dos ácidos graxos analisados em relação ao kg EE são apresentados na Tabela 2, os tratamentos OS, SG e GP apresentam um maior valor no total de ácidos graxos (842,35 g/kg EE, 890,23 g/kg EE e 889,49 g/kg EE), respectivamente, quando comparada com a dieta CO (626,22 g/kg EE), pode ser atribuída ao tipo de dieta e as variações durante o período experimental.

Houve efeito ($P < 0,0001$) no consumo total de ácidos graxos no contraste CO vs OS, SG e GP, no entanto, esta diferença está relacionada com consumo de matéria seca e com o menor conteúdo de EE na dieta CO, fazendo que a relação de ácidos graxos por matéria seca seja baixo, com 0,025 para o tratamento CO, e de 0,048 em média para os tratamentos com fonte de lipídeos (Tabela 3).

Houve diferenças ($P < 0,05$) no consumo do ácido palmítico dos animais que receberam a dieta CO (23,42 g/dia) comparada com os animais que receberam as dietas OS, SG e GP com um valor médio de 42,16 g/dia. Não foi

encontrado efeito ($P>0.05$) no consumo do ácido palmítico entre os animais que receberam as dietas contendo fonte de óleo de soja (Tabela 3).

Tabela 2. Perfil e conteúdo de ácidos graxos das dietas experimentais para novilhos Nelore

Item	Dietas experimentais			
	CO	SG	OS	GP
<i>Ácidos graxos</i>	<i>g/kg do EE. total</i>			
C8:0 (Caprílico)	2,74	2,72	3,00	5,19
C10:0 (Cáprico)	9,13	8,91	9,10	9,88
C12:0 (Láurico)	7,22	7,28	7,32	9,80
C13:0 (Tridecanóico)	8,78	9,01	8,74	8,95
C14:0 (Mirístico)	6,82	7,10	7,33	9,68
14:1 cis- 9 (Meristoleico)	12,45	12,18	12,42	12,74
C15:0 (Pentadecanóico)	5,17	5,24	5,45	5,99
C16:0 (Palmítico)	64,50	83,05	84,67	87,51
16:1 cis-9 (Palmitoleico)	4,88	5,10	5,16	5,68
C17:0 (Margárico)	10,30	10,47	11,48	14,09
C18:0 (Esteárico)	29,51	41,68	29,11	32,77
18:1 trans-6 (Octadecenoico)	8,45	7,87	8,50	8,43
18:1 cis-6 (Petroselenoico)	9,36	13,11	9,17	9,26
18:1 cis-9 (Oleico)	120,72	145,73	150,02	139,46
18:1 trans-9 (Octadecenoico)	6,24	6,12	43,81	29,90
18:1 trans-11 (vaccênico)	15,60	19,81	19,83	18,53
18:2 cis-9, cis-12 (linoléico)	200,40	316,19	338,55	366,19
18:3 cis-9, cis-12, cis-15 (Linolenico)	30,08	37,35	31,25	31,44
C20:0 (Aráquico)	9,33	9,78	9,40	9,33
20:1n cis-11 (Eicosenóico)	43,54	71,45	74,31	51,61
C22:0 (Behênico)	16,45	16,93	16,78	17,51
22:1 cis 13 (Eurocatenóico)	4,38	4,96	4,61	5,35
22:5 cis 7,10,13,16,19 (Docosapentaenoico)	0,20	0,22	0,22	0,21
Total de ácidos graxos/kg EE	626,22	842,25	890,23	889,49
Total ácidos graxos, g/kg MS	23,4	44,3	44,3	42,6
Ácidos graxos insaturados, %	72,9	76,0	78,4	76,3

CO, dieta controle; SG, dieta com soja grão; OS, dieta com óleo de soja; GP, dieta com gordura protegida, (Megalac®).

Foram encontradas diferenças ($P<0,05$) nos três contrastes para o consumo do ácido esteárico, com o menor valor para os animais que receberam a dieta CON (10,71 g/dia) seguidos das dietas OS, GP e SG com valores médios (14,25 g/dia, 15,45 g/dia e 21,97 g/dia) (Tabela 3). Em relação ao consumo dos ácidos graxos insaturados oleico, linoléico e linolenico, foram encontradas diferenças ($P<0,05$) com o menor consumo para os animais que

receberam a dieta CO (43,83 g/dia, 72,76 g/dia, 10,92 g/dia), respectivamente. No entanto, não houve diferenças ($P>0,05$) no consumo do ácido linoléico e linolenico quando comparados os animais que receberam as dietas OS vs SG e GP, mas, com diferenças ($P<0,05$) para o linolenico (Tabela 3).

Tabela 3. Consumo de ácidos graxos (g/dia) em dietas com fontes de óleo de soja em associação com glicerina para novilhos Nelore

Item	Dietas experimentais				EPM	Contraste ¹		
	CO	SG	OS	GP		CO x OS, SG, GP	OS x SG, GP	SGxGP
Consumo de MS	9621	9754	9100	8975	177,28	NS	NS	NS
$\Sigma < C15$	18,99	27,53	26,11	29,34	0,786	<,0001	0,0069	NS
C16:0 (Palmítico)	23,42	43,79	41,43	41,26	1,541	<,0001	NS	NS
16:1 cis-9 (Palmitoleico)	1,77	2,69	2,52	2,67	0,075	<,0001	0,0338	NS
C17:0 (Margárico)	3,73	5,52	5,61	6,64	0,200	<,0001	0,0092	<,0001
C18:0 (Esteárico)	10,71	21,97	14,25	15,45	0,752	<,0001	<,0001	<,0001
18:1 trans-6 (Octadecenoico)	3,07	4,15	4,16	3,97	0,096	<,0001	NS	NS
18:1 cis-6 (Petroselenoico)	3,40	6,91	4,49	4,37	0,238	<,0001	<,0001	<,0001
18:1 cis-9 (Oleico)	43,83	76,82	73,41	65,76	2,447	<,0001	NS	<,0001
18:1 trans-9 (Octadecenoico)	2,27	3,23	2,14	1,41	0,118	NS	0,0106	<,0001
18:1 trans-11 (Vaccênico)	5,66	10,44	9,70	8,74	0,343	<,0001	NS	<,0001
18:2 cis-9, cis-12 (linoléico)	72,76	166,7	165,7	172,7	7,631	<,0001	NS	NS
18:3 cis-9, cis-12, cis-15 (Linolenico)	10,92	19,69	15,29	14,82	0,589	<,0001	0,0002	<,0001
$\Sigma > C20$	26,83	54,4	51,54	39,61	2,025	<,0001	0,0020	<,0001
Total de ácidos graxos	221,7	433,4	406,3	398,0	15,691	<,0001	NS	0,0105
Total AGI (%)	75,13	78,19	79,53	77,53	0,281	<,0001	<,0001	<,0001
Relação AG/MS Consumida	0,025	0,048	0,049	0,048	0,002	<,0001	NS	NS

CO, dieta controle; SG, dieta com soja grão; OS, dieta com óleo de soja; GP, dieta com gordura protegida, (Megalac®); ¹Os valores são apresentados como médias dos quadrados mínimos com significância definida ($P<0,05$); EPM, Erro padrão da média.

As estimativas das concentrações dos ácidos graxos do conteúdo ruminal/dia são apresentadas na Tabela 4. A quantidade da concentração ruminal do total de ácido palmítico (C16:0) não apresentaram diferença ($P>0,05$) para os contrastes das dietas com fonte de óleo de soja, mas com diferenças ($P<0,05$) dos animais que receberam a dieta CO (34,47 g/dia) comparada com as concentrações dos animais das dietas OS, SG e GP (50,27 g/dia, 54,93 g/dia e 48,38 g/dia), respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Estimação da concentração de ácidos graxos (g/dia) no rumen e taxa de rotatividade em dietas com fontes de óleo de soja em associação com glicerina para novilhos Nelore

Item	Dietas experimentais				EPM	Contraste		
	CO	SG	OS	GP		CO x OS, SG, GP	OS x SG, GP	SGxGP
<i>Concentração ruminal, g/dia</i>								
Σ < C15	41,09	64,41	74,52	65,56	2,7032	<,0001	0,0171	NS
C16:0 (Palmítico)	34,47	54,93	50,27	48,38	2,2810	0,0009	NS	NS
16:1 cis-9 (Palmitoleico)	2,75	3,38	3,49	3,34	0,1234	NS	NS	NS
C17:0 (Margárico)	3,95	4,67	5,09	4,63	0,1601	NS	NS	NS
C18:0 (Estearico)	28,17	37,77	59,80	32,39	2,2241	<,0001	<,0001	0,0043
18:1 trans-6(Octadecenoico)	5,42	7,61	9,37	7,39	0,6537	NS	NS	NS
18:1 cis-6 (Petroselenoico)	1,95	2,76	2,88	2,65	0,1523	NS	NS	NS
18:1 cis-9 (Oleico)	39,04	56,67	46,87	64,85	2,5299	0,0015	0,0101	NS
18:1 trans-9 Octadecenoico	6,16	8,74	8,75	8,53	0,4191	NS	NS	NS
18:1 trans-11 (Vaccênico)	13,85	16,37	20,17	17,66	0,8251	0,0237	NS	NS
18:2 cis-9, cis-12 (linoléico)	43,92	61,48	57,32	89,22	3,4100	<,0001	0,0006	<,0001
18:3 cis-9, cis-12, cis-15 (Linolenico)	8,05	10,32	17,08	15,53	0,9691	0,0024	0,0399	0,0271
Σ > C20	14,93	17,21	16,49	19,39	0,5598	0,0275	NS	NS
Total de ácidos graxos	243,8	346,3	372,1	379,5	11,925	<,0001	NS	NS
Total AGI (%)	58,0	57,10	52,52	62,95	0,7354	NS	<,001	<,0001
<i>Taxa de rotatividade (%/h)</i>								
Total de ácidos graxos	3,80	5,31	4,63	4,44	0,1561	0,0034	NS	0,0265
Ácidos de 16- carbonos	2,87	3,53	3,63	3,70	0,1688	NS	NS	NS
Ácidos de 18-carbonos	4,33	6,46	5,47	5,07	0,4527	0,0006	NS	0,0026

CO, dieta controle; SG, dieta com soja grão; OS, dieta com óleo de soja; GP, dieta com gordura protegida, (Megalac®); ¹Os valores são apresentados como médias dos quadrados mínimos com significância definida (P<0,05); EPM, Erro padrão da média.

Encontraram-se diferenças (P<0,05) dos tratamentos na concentração ruminal do ácido esteárico para todos os contrastes, onde os animais que receberam a dieta CO apresentaram o menor valor (28,17 g/dia), e com um maior valor para os animais da OS (59,80 g/dia); no contraste SG vc GP apresentou diferenças (P<0,05) com a menor concentração ruminal do ácido esteárico na dieta GP (Tabela 4). Para as concentrações ruminais do ácido oleico, houve diferenças (P<0,05) no contraste CO vs OS, SG, com o menor valor para os animais da dieta CO (39,04 g/dia). Do mesmo jeito, foi encontradas diferenças (P<0,05) no contraste OS vs SG, GP, com o menor valor para os animais da dieta OS (46,87 g/dia); entretanto, não houve

diferenças ($P>0,05$) quando comparados os animais da dieta SG com da dieta GP (Tabela 4).

Houve efeito ($P<0,05$) dos tratamentos na concentração ruminal do ácido vaccênico dos animais que receberam a dieta CO com um valor médio de 13,85 g/dia, comparados com os animais que receberam as dietas com fonte de óleo de soja; mas, sem encontrar diferença ($P>0,05$) quando analisados os contrastes com fontes de óleo de soja OS vs SG, GP e SG vs GP, com um valor médio de 18,07 g/dia (Tabela 4).

As concentrações ruminiais do ácido linoléico e o ácido linolenico foram afetadas pelos tratamentos, encontrando diferenças ($P<0,05$) nos três contrastes analisados (Tabela 4), onde os animais que receberam a dieta CO apresentaram as menores concentrações do ácido linoléico e ácido linolenico (43,92 g/dia e 8,05 g/dia), respectivamente; no contraste OS vs SG e GP o menor concentração ruminal do ácido linoléico foi para os animais da dieta OS (57,32 g/dia), e no contraste SG vs GP a menor concentração do ácido linoléico foi para os animais da dieta SG (61,48 g/dia) e maior para os animais da dieta GP (89,22 g/dia) (Tabela 4). No contraste SG vs GP a menor concentração para o ácido linolenico foi para os animais da dieta SG (10,32 g/dia) e maior para os animais da dieta GP (15,53 g/dia). Não houve diferenças ($P>0,05$) nos contrastes OS vs SG e GP e SG vs GP nas concentrações totais de ácidos graxos com um valor médio (365,97 g/dia); no entanto, apresentou-se diferenças os animais que receberam a dieta CO com um menor valo (243,8 g/dia) quando comparado comparados com os animais que receberam as dietas com fonte de óleo de soja (Tabela 4).

Não houve diferenças ($P>0,05$) na porcentagem da concentração ruminiais de ácido graxos insaturados total para o contraste dos animais que receberam a dieta CO quando comparados com os animais das dietas OS, SG e GP, com um valor médio de 57,64% (Tabela 4). No entanto, analisando o contraste OS vs SG e GP houve diferenças ($P<0,05$) na porcentagem dos ácidos graxos insaturados em rumen, com um menor valor para os animais que receberam dieta OS (52,52%) e com um maior valor para os animais com óleos protegidos com um valor médio de (62,95%); da mesma maneira, houve diferenças ($P<0,05$) no contraste SG vs GP, com maior valor para os animais que receberam a dieta GP (62,95%) e menor para os animais da dieta SG

(57,10%) (Tabela 4). Pode-se observar uma evidente diminuição da proporção dos ácidos graxos insaturados no ambiente ruminal (Tabela 3) comparada com a concentração no consumo dos ácidos insaturados (Tabela 4), dado pelo falto da saturação dos mesmos.

A taxa de rotatividade ou de permanência no rumen dos ácidos graxos, não foi afetada ($P>0,05$) pelos tratamentos para os ácidos de 16 carbonos (Tabela 4). No, entanto houve efeitos ($P<0,05$) dos tratamentos na taxa de rotatividade dos ácidos de 18 carbonos em animais que receberam a dieta CO que apresentarem o menor taxa (4,33%/h) comparada com o maior valor para os animais das dietas OS, SG e GP (5,47%/h, 6,46%/h e 5,07%/h), respectivamente, e observando que a menor taxa de rotatividade foi para os animais da dieta GP quando comparados com a dieta SG (Tabela 4).

De acordo ao modelo, a taxa de passagem (%/h) para o ácido palmítico, não foi afetada ($P>0,05$) pelos tratamentos. Mas, para o ácido esteárico foram encontradas diferenças no contraste OS vs SG e GP, com o menor valor para os animais que receberam a dieta CO (8,37%/h); da mesma maneira, foram achadas diferenças na taxa de passagem dos animais que receberam a dieta SG comparada com a dieta GP, com valores (8,50%/h e 9,69%/h), respectivamente (Tabela 5).

Não houve efeito ($P>0,05$) dos tratamentos na taxa de passagem para os ácidos oleico, vaccênico, linolenico com os seguintes valores médios (3,44%/h, 2,17%/h, 3,19%/h); no entanto, apresentou diferenças nos três contraste na taxa de passagem para o ácido linolenico, com o menor valor para os animais que receberam a dieta OS (0,76%/h) (Tabela 5). As fontes de óleo de soja em associação com glicerina não influenciaram ($P>0,05$) na taxa de desaparecimentos dos ácidos graxos de 16 e 18 carbonos (Tabela 5).

3.2 Biohidrogenação e fluxo ruminal de ácidos graxos

A taxa de biohidrogenação (%/h) não foi afetada ($P>0,05$) pelos tratamentos para o ácido oleico, ácido octadecanoico e o ácido linolenico, com um valor médio para cada de 22,03%/h, 65,14%/h e 23,32%/h, respectivamente (Tabela 6). Houve efeito ($P<0,05$) na taxa de biohidrogenação para o ácido linoléico nos três contrastes avaliados. A menor taxa de biohidrogenação foi para os animais que receberam a dieta CO (57,38%/h)

comparada com a maior taxa dos animais com as dietas com fonte de óleo de soja; no contraste OS vs SG e GP a maior taxa de biohidrogenação, foi para os animais que receberam a dieta OS (81,41%/h); e no contraste SG vs GP a maior taxa de biohidrogenação foi para os animais da dieta GP (72,81%/h), e por fim a menor taxa de biohidrogenação foi para os animais da dieta SG (60,41%/h) (Tabela 6).

Tabela 5. Taxa de passagem e desaparecimento de ácidos graxos no rumen em dietas com fontes de óleo de soja em associação com glicerina para novilhos Nelore

Item	Dietas experimentais				EPM	Contraste		
	CO	SG	OS	GP		CO x OS, SG, GP	OS x SG, GP	SGxGP
<i>Taxa de passagem, %h</i>								
C16:0 (Palmítico)	2,60	3,17	3,35	3,60	0,1749	NS	NS	NS
C18:0 (Esteárico)	8,37	8,50	6,64	9,69	0,2632	NS	<,0001	0,0414
18:1 cis-9 (Oleico)	3,06	3,53	3,98	3,19	0,1336	NS	NS	NS
18:1 trans-9 (Octadecenoico)	4,34	4,97	4,56	4,80	0,4304	NS	NS	NS
18:1 trans-11 (Vaccênico)	1,72	2,64	2,49	1,83	0,1592	NS	NS	NS
18:2 cis-9, cis-12 (linoléico)	1,77	1,65	0,76	1,13	0,0950	0,0010	0,0011	0,0130
18:3 cis-9, cis-12, cis-15 (Linolenico)	2,82	3,57	2,89	3,49	0,1854	NS	NS	NS
Total ácidos 18 carbonos	4,86	5,46	4,98	4,76	0,1144	NS	NS	NS
Total de ácidos graxo	4,08	4,64	4,37	4,30	0,1057	NS	NS	NS
<i>Taxa de desaparecimento, %/h</i>								
Total de ácidos graxos	0,98	1,11	1,05	1,03	0,0254	NS	NS	NS
Ácidos de 16 carbonos	0,64	0,76	0,80	0,85	0,0404	NS	NS	NS
Ácidos de 18 carbonos	1,17	1,31	1,19	1,14	0,0275	NS	NS	NS

CO, dieta controle; SG, dieta com soja grão; OS, dieta com óleo de soja; GP, dieta com gordura protegida, (Megalac®); ¹Os valores são apresentados como médias dos quadrados mínimos com significância definida (P<0,05); EPM, Erro padrão da média.

Encontrou-se que a extensão da biohidrogenação foi afetada (P<0,05), pelos tratamentos para o ácido octadecenoico no contrastes SG vs GP com valores de 75,16% e 22,00%, respectivamente. Houve efeito (P<0,05) na taxa de biohidrogenação dos animais que receberam a dieta com óleo de soja comparada com os animais da dieta SG e GP, com um maior valor para os animais que receberam a dieta OS (40,12%) e menor valor para os animais da dieta SG (38,68%) seguido da dieta GP (26,94%) (Tabela 6).

Tabela 6. Taxa e extensão da biohidrogenação em dietas com fontes de óleo de soja em associação com glicerina para novilhos Nelore

Item	Dietas experimentais				EPM	Contraste		
	CO	SG	OS	GP		CO x OS, SG, GP	OS x SG, GP	SGxGP
<i>Taxa de biohidrogenação, %h</i>								
18:1 trans-6 Octadecenoico	69,25	60,58	72,87	51,62	1,6871	0,0153	0,0312	0,0041
18:1 cis-9 (Oleico)	26,64	20,77	18,65	22,05	2,6602	NS	NS	NS
18:2 cis-9, cis-12 (linoléico)	57,38	60,41	81,41	72,81	2,3941	0,0011	0,0011	0,0128
18:3 cis-9, cis-12, cis-15 (Linolenico)	35,59	15,63	30,48	27,99	1,8283	NS	0,0001	0,0105
<i>Extensão da biohidrogenação</i>								
18:1 trans-6 Octadecenoico	66,29	75,16	62,46	42,02	6,3505	NS	NS	0,0007
18:1 cis-9 (Oleico)	36,65	38,68	40,12	26,94	1,7716	NS	0,0407	0,0067
18:2 cis-9, cis-12 (linoléico)	74,81	85,64	93,63	85,96	1,3745	<,0001	0,0004	NS
18:3 cis-9, cis-12, cis-15 (Linolenico)	52,35	55,29	29,21	16,83	3,7785	0,0057	NS	<,0001

CO, dieta controle; SG, dieta com soja grão; OS, dieta com óleo de soja; GP, dieta com gordura protegida, (Megalac®); ¹Os valores são apresentados como médias dos quadrados mínimos com significância definida (P<0,05); EPM, Erro padrão da média.

A taxa da biohidrogenação do ácido linolénico foi afetada (P<0,05) pelos tratamentos, para o contraste CO vs OS, SG e GP, os animais que receberam a dieta CO apresentaram o menor taxa (74,81%); para o contraste OS vs SG e GP a maior taxa foi para os animais da dieta OS (93,63%); para o contraste SG vs GP não apresentaram diferentes. Não houve efeito (P>0,05) dos tratamentos na extensão da biohidrogenação para o ácido linolenico no contraste OS vs SG e GO; no entanto, houve diferenças (P<0,05) no contraste SG vs GP, com o maior valor para os animais que receberam a dieta SG (55,29%) e menor para os animais da dieta GP (16,83%) (Tabela 6).

Houve efeito (P<0,05) dos tratamentos no fluxo ruminal dos ácidos graxos menores de 15 carbonos para os contrastes CO vs OS, SG, GP e SG vs GP, com os menor valor para os animais que receberam a dieta CO (21,63 g/dia), no primeiro contraste, com o menor valor para os animais da dieta SG (30,42 g/dia) no segundo contraste (Tabela 7). Apresentou-se efeito (p<0,05) das fontes de óleo de soja em associação com glicerina no fluxo ruminal do ácido palmítico no contraste CO vs OS, GP e GP, com o menor valor para os animais que receberam a dieta CO (20,97 g/dia) comparados com os animais das dietas com fontes óleo de soja para um valor médio (38,92 g/dia); sem

apresentar diferenças ($P>0,05$) nos contrastes OS vs SG, GP e SG vs GP (Tabela 7).

Tabela 7. Fluxo ruminal de ácidos graxos que atingem o duodeno em dietas com fontes de óleo de soja em associação com glicerina para novilhos Nelore

Item	Dietas experimentais				EPM	Contraste		
	CO	SG	OS	GP		CO x OS, SG, GP	OS x SG, GP	SG x GP
<i>Fluxo duodenal, g/d</i>								
$\Sigma < 15$ carbonos	21,63	30,42	36,06	36,38	1,2698	<,0001	NS	0,0013
C16:0 (Palmítico)	20,97	39,19	38,14	39,43	1,5569	<,0001	NS	NS
16:1 cis-9 (Palmitoleico)	1,96	2,79	2,41	2,24	0,1079	0,0317	NS	NS
C17:0 (Margarico)	3,13	4,55	5,14	4,06	0,2565	0,0026	NS	NS
C18:0 (Estearico)	56,67	76,08	95,36	75,74	2,9681	<,0001	0,0004	NS
18:1 trans-6 Octadecenoico	1,03	1,03	1,56	2,98	0,2202	0,0249	NS	0,0002
18:1 cis-6 (Petroselenoico)	1,33	1,51	2,07	3,50	0,1792	0,0002	NS	<,0001
18:1 cis-9 (Oleico)	27,59	46,89	43,78	47,59	1,6428	<,0001	NS	NS
18:1 trans-9 Octadecenoico	55,19	93,78	87,48	95,19	3,2856	<,0001	NS	NS
18:1 trans-11 (vaccênico)	5,38	9,95	11,17	7,45	0,6316	0,0007	0,0338	NS
18:2 cis-9, cis-12 (linoléico)	18,51	23,84	10,46	23,94	1,1954	NS	<,0001	NS
18:3 cis-9, cis-12, cis-15 (Linolenico)	5,21	8,77	10,70	12,20	0,5718	<,0001	NS	0,0013
$\Sigma > 20$ – carbonos	18,60	41,63	41,43	34,63	1,7800	<,0001	NS	0,0017
Total de ácidos graxos	237,2	380,4	385,8	385,3	11,809	<,0001	NS	NS
Total AGI (%)	53,10	53,33	48,42	54,72	0,6011	NS	<,0001	NS
Saturação (%) (AGI-FAGI)/AGI	23,99	39,85	41,87	30,87	1,8926	<,0001	0,0369	0,0149
Relação AG/ FMS	6,60	8,15	9,37	10,08	0,3310	<,0001	NS	0,0013
<i>Ácidos graxos, g/kg total de ácidos graxos</i>								
C16:0 (Palmítico)	88,28	103,1	99,03	102,4	2,3223	NS	NS	NS
C18:0 (Estearico)	240,8	200,0	247,4	197,2	6,4893	0,0445	0,0012	NS
18:1 cis-9 (Oleico)	116,5	122,9	113,3	123,4	1,7327	NS	NS	NS
18:1 trans-9 (Octadecenoico)	233,1	245,8	226,4	246,9	3,4737	NS	NS	NS
18:1 trans-11 (Vaccênico)	22,27	26,18	28,88	19,17	1,4149	NS	NS	NS
18:2 cis-9, cis-12 (linoléico)	77,15	62,95	27,09	62,24	3,9134	0,0001	<,0001	NS
18:3 cis-9, cis-12, cis-15 (Linolenico)	21,89	23,10	27,85	31,55	1,0891	0,0085	NS	0,0019

CO, dieta controle; SG, dieta com soja grão; OS, dieta com óleo de soja; GP, dieta com gordura protegida, (Megalac®); ¹Os valores são apresentados como médias dos quadrados mínimos com significância definida ($P<0,05$); EPM, Erro padrão da média.

O fluxo ruminal do ácido esteárico foi influenciado ($P<0,05$) pelas fontes de óleo de soja em associação com glicerina com um menor valor (56,67 g/dia) para os animais que receberam a dieta CO comparados com os animais das

dietas OS, SG e GP (95,36 g/dia, 76,08 g/dia e 75,74 g/dia), respectivamente; quando comparando os animais que receberam a dieta OS com os animais das dietas SG e GP apresentaram diferenças ($P < 0,05$) no fluxo de ácido esteárico; no entanto, não houve diferenças dos animais que receberam a dieta SG comparada com os animais da dieta GP (Tabela 7).

Houve efeito ($P < 0,05$) das fontes de óleo de soja em associação com glicerina no fluxo ruminal do ácido oléico dos animais que receberam a dieta CO comparados com os animais das dietas (OS, SG e GP), com o menor valor (27,59 g/dia) para os animais da dieta CO, e maior para os animais das dietas com óleo de soja com um valor médio (46,09 g/dia) (Tabela 7). Para o ácido vaccênico apresentou efeito no fluxo ruminal das fontes de óleo de soja nos animais que receberam a dieta CO (5,38 g/dia) comparados com os animais dos tratamentos OS, SG e GP com valores (11,17 g/dia, 9,95 g/dia e 7,45 g/dia), respectivamente (Tabela 7). Da mesma maneira, houve efeito ($P < 0,05$) no fluxo do ácido vaccênico das fontes de óleo de soja associada a glicerina dos animais que receberam a dieta OS comparada com animais da dieta SG e GP; entretanto, não houve efeito entre os animais que receberam as dietas SG vs GP (Tabela 7).

O fluxo ruminal do ácido linoléico houve efeito ($P < 0,05$) no contraste OS vs SG e GP, com o menor valor para os animais que receberam a dieta OS (10,46 g/dia) e um maior valor (23,84 g/dia e 23,94 g/dia) para os animais das dietas SG e GP; entretanto, não houve ($P > 0,05$) efeito quando comparados os animais que receberam as dietas SG vs GP (Tabela 7). Houve efeito ($P < 0,05$) das fontes de óleo de soja em associação com glicerina no fluxo ruminal do ácido linolênico, com um menor valor para os animais que receberam a dieta CO (5,21 g/dia) comprados com o maior valor para os animais das dietas OS, SG e GP (10,70 g/dia, 8,77 g/dia e 12,20 g/dia); no entanto, não houve diferenças ($P > 0,05$) quando comparar-se os fluxo ruminal do ácido linolênico dos animais que receberam a dieta CO com os animais das dietas SG e GP; mas, com diferenças ($P < 0,05$) quando comparar entre os animais das dietas SG vs GP, com um menor valor para os animais que receberam a dieta SG e um maior valor para os animais da dieta GP (Tabela 7).

Para o total de ácidos graxos que atingem o duodeno foram apresentadas diferenças ($P < 0,05$) dos tratamentos, com um menor valor (237

g/dia) para os animais que receberam a dieta CO, comparada com um maior valor dos animais das dietas OS, SG e GP (385,8 g/dia, 380,4 g/dia e 385,3 g/dia), respectivamente, e sem apresentar diferenças ($P>0,05$) entre os contrastes dos animais que receberam as dietas com fontes de óleo de soja (Tabela 7). No entanto, para o fluxo de ácidos graxos insaturados que atingirem o duodeno só apresentaram diferenças ($P<0,05$) os animais que receberam a dieta OS comparadas com os animais que das dieta SG e GP, com porcentagem menor para os animais da dieta OS (48,42%) e uma maior porcentagem para os animais das dietas SG e GP (53,33% e 54,72%).

Por fim com relação à porcentagem de saturação, foram observados efeitos ($P<0,05$) das fontes de óleo de soja em associação com a glicerina nos três contrastes, observando que os animais que receberam a dietas com fontes de óleo de soja apresentaram as maiores porcentagem de saturação, comparadas com o menor valor para os animai da dieta CO (23,99%). Observa se diferenças ($P<0,05$) na porcentagem de saturação dos animais que receberam a dieta com óleo de soja com um maior valor (41,87%) comparadas com o menor valor para os animais da dieta SG e GP, mas analisando o contraste SG vs GP apresentou diferenças ($P<0,05$) com a maior porcentagem de saturação (39,85%) para os animais que receberam a dieta SG e uma menor porcentagem (30,87%) para os animais da dieta GP (Tabela 7).

3.3 Análise de parâmetros sanguíneos

Os resultados das análises mostram que os metabólitos sanguíneos avaliados foram afetados pelos tratamentos em cada horário de coleta. Para a glicose não encontrou diferenças dos tratamentos ($P>0,5$) (no horário da 7:00) com um valor médio de 77,81 mg/dL; mas no horário das 13:00 houve diferenças ($P<0,05$) com um menor valor para o tratamento OS (63,69 mg/dL), comparados com os animais das dieta SG e GP (71,19 mg/dL e 70,38 mg/dL), respectivamente (Figura 1).

Os valores para os triglicerídios não foram afetados ($P>0,05$) na coleta da 7:00 horas, com um valor médio 14,63 mg/dL; no entanto, apresentaram diferenças ($P<0,05$) no horário das 13:00 horas, para o contraste CO vs SG, OS, GP, onde os animais que receberam a dieta CO apresentaram o maior valor (14,00 mg/dL); e para o contraste OS vs SG e GP também foi encontrada

diferença ($P < 0,05$) com o menor valor foi para os animais que receberam a dieta OS (10,19 mg/dL) e com maior valor para os animais das dietas SG e GP (12,69 mg/dL e 11,50 mg/dL) (Figura 1).

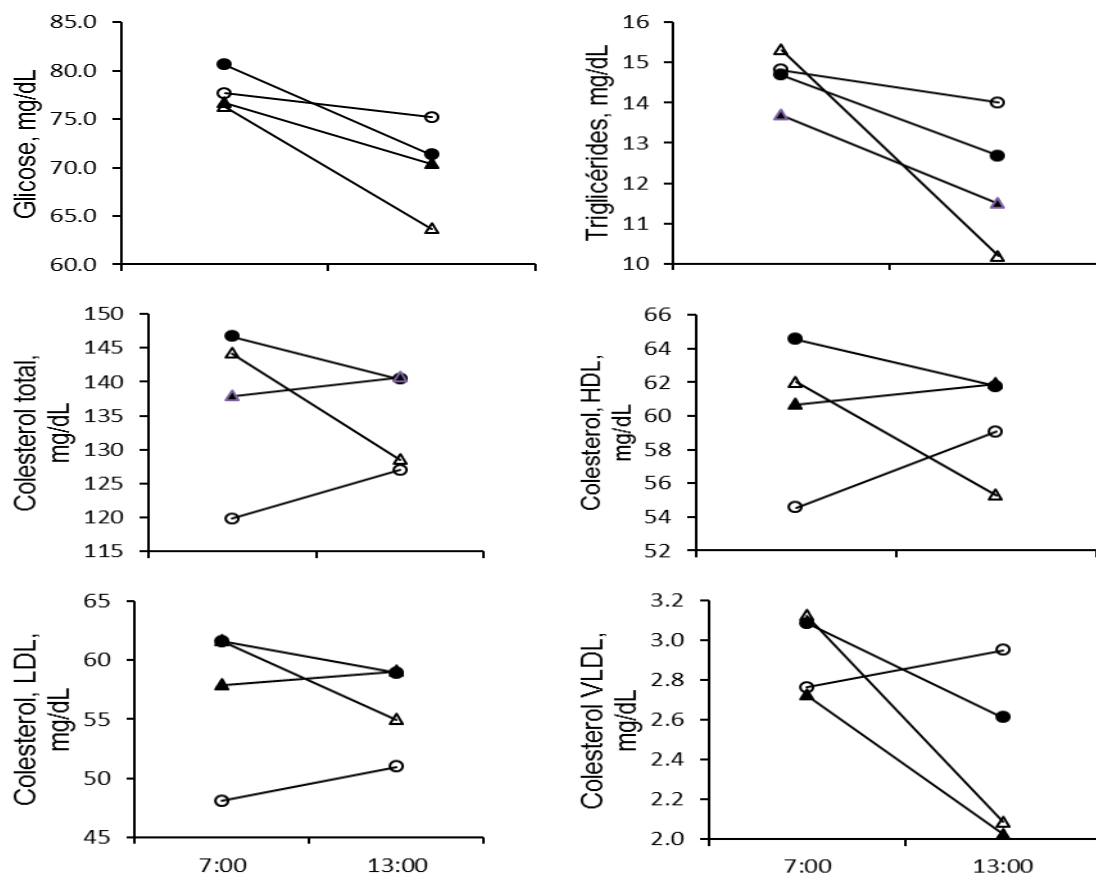


Figura 1. Concentrações sanguíneas de glicose, triglicérides, colesterol total e lipoproteínas de alta, média e muito baixa densidade (HDL, LDL e VLDL) realizadas em dois horários (07:00 e 13:00 h) em função da fonte de óleo de soja em dietas para novilhos Nelore. Dieta controle, ○); Dieta com soja gr o, ●); Dieta com óleo de soja, Δ); e a Dieta com gordura protegida, ▲).

Em relação aos níveis de colesterol total os valores foram afetados ($P < 0,05$) pelas fontes de óleo de soja em associação com glicerina no horário das 7:00 horas para o contraste CO vs OS, SG e GP, o menor valor foi para os animais que receberam a dieta CO (119,81 mg/dL); mas, sem apresentar diferenças ($P > 0,05$) nos outros dois contrastes (OS vs SG, GO e SG vs GP) com um valor médio de (142,94 mg/dL). Para o horário das 13:00 horas os valores do colesterol total não foram afetados ($P > 0,05$) pelos tratamentos, com um valor médio de (134,16 mg/dL) (Figura 1)

Houve variação ($P < 0,05$) na resposta dos tratamentos em relação a os valores de colesterol HDL (no horário da 7:00 horas) dos animais que receberam a dieta CO, com um menor valor (54,56 mg/dL) comparada com valores dos animais das dietas OS, SG e GP (62,00 mg/dL, 64,54 mg/dL e 60,69 mg/dL), respectivamente; mas, sem apresentar diferenças ($P > 0,05$) nos contrastes OS,vs SG, GP e SD vs GP; no horário das 13 horas não foi encontrado efeito ($P < 0,05$) nos valores de colesterol HDL pelos tratamentos com um valor médio de 59,50 mg/dL (Figura 1).

Os valores de LDL colesterol apresentaram efeito ($P < 0,05$) das fontes de óleo de soja em associação com glicerina para cada horários de coleta (7:00 e 13:00). Os animais que receberam a dieta CO apresentaram o menor valor (48,07 mg/dL e 50,96 mg/dL) nos horários das 7:00 e 13:00 horas, respectivamente, e com valores maiores para os animais das dietas OS, SG e GP (60,39 mg/dL e 57,67 mg/dL) no horário das 7:00, e 13:00 horas, respectivamente. Não houve efeito ($P > 0,05$) das dietas nos valores de LDL para os contrastes OS vs SG, GP e SG vs GP em os dois horários (Figura 1).

Os níveis de o colesterol VLDL para o horário da 7:00 não foi afetado ($P > 0,05$) pelos tratamentos, com um valor médio de 2,93 mg/dL; no entanto, houve efeito ($P < 0,5$) com um maior valor nos animais que receberam a dieta CO (2,95 mg/dL) comparado com o menor valor dos animais que receberam as dietas OS, SG e GP (2,09 mg/dL, 2,61 mg/dL e 2,03 mg/dL), respectivamente; e analisando os valores do contraste SG vs GP também foram diferentes ($P < 0,05$) com maior valor para os animais que receberam a dieta SG (2,61 mg/dL) e menor para os animais da dieta GP (2,03 mg/dL) (Figura 1).

Os níveis de albumina não foram afetados ($P > 0,05$) pelos tratamentos para cada horário, com um valor em média 2,34 g/dL no horário das 7:00 e de 2,32 g/dL no horário das 13:00 horas. Não houve efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos nos níveis de uréia para cada horários de coleta, com um valor médio de (35,30 mg/dL e 37,98 mg/dL) para o horário das 7:00 e 13:00, respectivamente, (Figura 2).

A inclusão de fontes de óleo de soja associadas com glicerina não influenciou ($P > 0,05$) nas concentrações da enzima hepática AST/GOT no horário da 7:00 com valor médio de 44,27 U/L; da mesma maneira, não houve influência ($P > 0,05$) dos tratamentos no horário das 13:00 horas com valor

médio de e 39,78 U/L. Para as concentrações da enzima hepática Gama GT, não foram encontradas efeitos pelos tratamentos no horários de coleta das 7:00 horas, com um valor médio de 39,69 U/L; entretanto, houve diferenças ($P < 0,05$) no horários das 13:00 dos animais que receberam a dieta CO com um valor maior 42,63 U/L comparado os animais das dietas OS, SG e GP com valores (39,50 U/L, 40,25 e 40,25 U/L); mesmo assim, não houve diferenças nos outros dois contrastes OS vs SG, GP e SG vs GP (Figura 2).

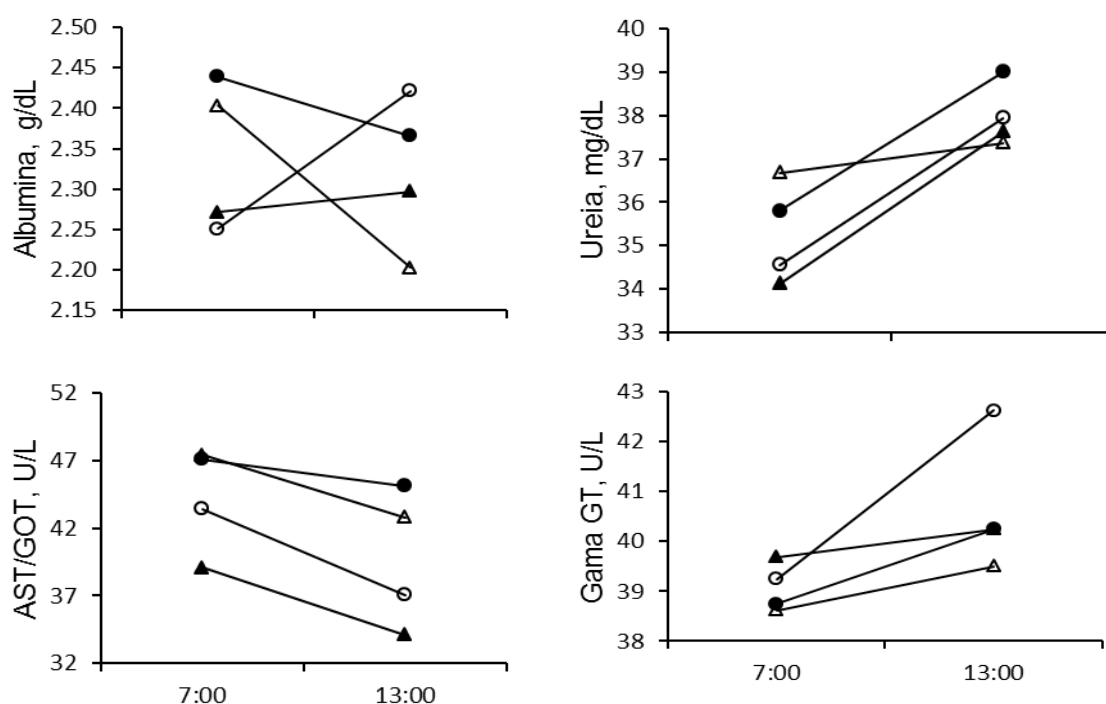


Figura 2. Concentrações sanguíneas de albumina, uréia, AST/GOT e Gama GT ou GGT. Realizadas em dois horários (07:00 e 13:00 h) em função da fonte de óleo de soja em dietas para novilhos Nelore. Dieta controle, (○); Dieta com soja grão, (●); Dieta com óleo de soja, (△); e a Dieta com gordura protegida, (▲).

4. DISCUSSÃO

4.1 Consumo e concentrações no rumen dos ácidos graxos

Os resultados do presente trabalho mostraram que o menor consumo de matéria seca dos animais que receberam as dietas óleo de soja (OS) e gordura protegida na forma de sais de cálcio (GP) esta em função da disponibilidade de lipídios no rumen, com uma redução no consumo em 7,4% quando comparada com o consumo dos animais da dieta com soja grão (SG). Este valor esta algo

próximo ao reportado por Fiorentini et al. (2012), onde encontraram uma redução de 11,48% no consumo de MS seca quando forneceram óleo de soja em dietas para novilhas mestiças. Que pode estar relacionado com os efeitos negativos dos ácidos graxos insaturados na forma não esterificada disponíveis no rumen sobre as bactérias principalmente as Gram positivas, resultando numa inibição de sua atividade afetando a fermentação e consumo de MS (NAGARAJA et al., 1997; JENKINS et al., 2008).

Entretanto, Nörnberg et al. (2004) relataram que os sais de cálcio de ácidos graxos fornecidos mesmo “protegidos” não são totalmente inertes em condições ácidas do rumen, podendo estar disponíveis no rumen. E pela condição ligeiramente ácida no rumen no presente experimento em determinadas horas do dia na faixa de pH de 5,30 a 6,35, pode ter facilitado a dissociação dos sais de cálcio, permitindo que alguns ácidos graxos insaturados estivessem disponíveis no ambiente ruminal afetando o consumo da MS (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1997; NÖRNBERG et al., 2004).

Outra possível explicação para a redução do consumo da MS no tratamento com óleo de soja e gordura protegida, é que os ácidos graxos insaturados regulam o consumo com um aumento na secreção de colecistoquinina (CCK), que inibe a mobilidade no rumen e retículo, reduzindo o consumo de alimentos (NICHOLSON; OMER, 1983).

Em relação à quantidade e tipo de ácidos graxos insaturados consumidos está em função da quantidade de EE na dieta, no presente estudo o menor consumo significativamente ($P < 0,05$) foi para os animais que receberam a dieta CO. No entanto, pode-se observar um favorecimento no consumo de um ou outro ácido graxo nos tratamentos (OS, SG e GP), mesmo assim, sejam de igual fonte (óleo de soja), está diferença ($P < 0,05$) pode estar em relação: origem da fonte, processo industrial da matéria prima, manipulação na elaboração do concentrado, a palatabilidade da dieta, e o fato seletivo dos animais que foi observado no momento da condução do experimento. Podendo destacar que, o fornecimento do óleo de soja na forma de semente (SG) acrescentou significativamente ($P < 0,05$) o consumo do ácido esteárico, ácido oleico, ácido linolenico, quando comparado com o consumo dos animais que receberam os ácidos graxos da fonte de óleo de soja na forma de gordura protegida (GP), mas, sem encontrar diferenças ($P > 0,05$) para o ácido linoléico.

O perfil e as quantidades de ácidos graxos no rumen foram estimados por um modelo matemático (HARVATINE; ALLEN, 2006), e não representam o verdadeiro perfil de ácidos graxos do conteúdo do rumen, porque os ácidos graxos podem associar-se de forma diferente com frações líquidas e sólidas do rumen, a polarização da amostra, ou lugar de onde se obtêm a amostra do rumen, e para o caso específico das amostras da dieta com soja grão (SG) no presente experimento, tem limitações na quantificação dos ácidos graxos, pelo fato que nem todos os ácidos graxos são liberados no rumen, podendo ficarem contidos no interior do grão.

Os resultados deste trabalho mostraram que as concentrações de ácidos graxos insaturados foram diminuídas em relação às concentrações dos ácidos graxos insaturados consumidos em uma porcentagem de 24,05%, justificado pelo processo da biohidrogenação, onde os ácidos graxos insaturados são saturados no rumen (LOOR et al., 2004; JENKINS et al., 2008). O tipo de fonte de óleo de soja influenciou nas concentrações no rumen do ácido oleico, ácido linoléico e ácido linolênico, como também foi descrita por Harvatine e Allen (2006), quando trabalhou com mistura de óleo de milho, e gorduras protegidas em vacas leiteiras holandesas. De mesma forma, houve similar comportamento com estudos dos mesmos autores, em relação ao incremento das concentrações ruminiais de ácido palmítico, ácido esteárico e ácido vaccênico, em animais que receberam dietas com fontes de lipídios adicionais (óleo de soja) quando comparadas com as menores concentrações dos animais que receberam a dieta CO (sem fonte de gordura adicional).

A maior concentração de ácido esteárico ocorreu nos animais que receberam óleo de soja na dieta (OS) (59,80 g/dias), comparada com os menores valores dos animais que receberam as gorduras protegidas soja grão (SG) e sais de cálcio (GP) com valores (37,77 g/dia e 32,39 g/dia), respectivamente. A maior saturação apresentada na dieta OS pode estar em relação a que os ácidos graxos estão mais disponíveis no rumen, e sofrem uma ativa saturação. Segundo Loor et al. (2004) e Marín et al. (2005), os ácidos graxos insaturados liberados no rumen são hidrolisados e isomerizados extensivamente pelas bactérias no processo da biohidrogenação, formando especialmente o ácido esteárico (LOOR et al., 2004; MARÍN et al., 2010). A menor concentração do ácido esteárico no rumen (28,17 g/dias), dos animais

que receberam a dieta sem fonte lipídica (CO) está determinada pela menor porcentagem do EE na dieta.

A presença de ácido vaccênico no rumen é importante, é reconhecido como um produto intermediário da biohidrogenação, e é componente indispensável na síntese de *novo* no tecido (BAUMAN et al., 2000; JENKINS et al., 2008). No presente trabalho, pode-se estabelecer que as fontes de óleo de soja utilizadas permitem a formação de este importante ácido graxo, podendo garantir seu fluxo para o intestino e ser absorvido, mas a quantidade que atinge o duodeno vai depender da fonte e o tipo de dieta fornecida. Segundo Bauman et al. (1999) citados por Marin et al., (2010), a taxa em que ácido vaccênico é reduzido para ácido esteárico é mais lento do que as etapas anteriores a sua própria formação, fato que permite um maior tempo no rumen antes de ser biohidrogenado, favorecendo seu escape do rumen e disponibilizado no duodeno.

A menor disponibilidade do ácido oleico e ácido linoléico no rumen ocorreu nos animais que receberam a dieta com óleo de soja (OS) (46,87 g/dia e 57,32 g/dia), respectivamente, e com maior valor para os animais que receberam a dieta SG (56,67 g/dia e 61,46 g/dia) e GP (64,85 g/dia e 89,22 g/dia). A maior concentração do ácido oleico e linolenico nos tratamentos SG e GP, pode estar relacionado com a menor disponível no ambiente ruminal para ser biohidrogenado até a formação do ácido esteárico, pelo fato de estar protegidas, podendo garantir um maior fluxo para duodeno de ácido oleico e ácido linoléico. O uso de sais de cálcio na dieta de ruminantes favorece que os ácidos graxos insaturados não sejam hidrogenados (NÖRNBERG et al., 2004; JENKINS et al., 2008); da mesma forma, o uso de sementes de oleaginosas na dieta de ruminantes (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1997; CAVALIERI et al., 2005) e garantir o fluxo de ácidos graxos insaturados no intestino.

Em relação á taxa de rotatividade (definida com o giro de ácidos graxos no rumen em um determinado tempo) os valores encontrados no presente experimento concordam os dados de (HARVATINE; ALLEN, 2006) quando trabalhou com mistura de óleo de milho, e gorduras protegidas em vacas leiteiras holandesas encontrando uma taxa de 8,1%h sem diferenças significativas ($P>0,05$). A taxa de rotatividade para os ácidos graxos de 18 carbonos, observou-se no presente trabalho efeito ($P<0,05$) no tipo de gordura

protegida, onde foi menor para os animais que receberam as sais de cálcio (GP) (5,07%h) quando comparada com os animais que receberam o óleo de soja na forma de grão (SG) (6,46%h). Indicando um maior movimento dos ácidos graxos (entre entradas e saídas do rumen) na dieta SG, pelo maior consumo de MS. No fato, que os ácidos graxos insaturados liberados da forma não esterificada no rumen inibe a mobilidade do rumen (NICHOLSON; OMER, 1983), que no caso dos animais do tratamento GP e com as condições ácidas do rumen, as sais de cálcio podem ser dissociadas, liberando ácidos graxos na forma não esterificada, permitindo uma maior disponibilidade no ambiente ruminal afetando os movimentos ruminais (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1997; NÖRNBERG et al., 2004) afetando a taxa de rotatividade.

4.2 Biohidrogenação e fluxo ruminal de ácidos graxos

A taxa de passagem do ácido esteárico e o ácido linoléico foram menores nos animais que receberam a dieta com óleo de soja (OS) (6,64%h e 0,76%h), respectivamente quando comparados com as dietas SG e GP; mas, quando comparadas as dietas SG vs GP, o menor valor da taxa de passagem do ácido esteárico e o ácido linoléico é para os animais da dieta SG (8,50%h e 1,65%h), respectivamente e maior para os animais da dieta GP (9,69%h e 1,13%h), respectivamente. Estes valores, são similares ao encontrados por (HARVATINE; ALLEN, 2006) onde animais que receberam na dieta sais de cálcio a taxa de passagem para o ácido esteárico e o ácido linoléico foi de (7,6%h e 2,6%h), respectivamente. No entanto, a taxa de desaparecimento não apresentou diferenças ($P < 0,05$) significativas. As taxas de passagem e a taxa de desaparecimento estão em relação às concentrações do ácido graxo no rumen e ao movimento ruminal.

A taxa de biohidrogenação do ácido oleico não apresentou diferenças nos tratamentos com um valor médio (22,03%h), mas quando comparando com os resultados de (HARVATINE; ALLEN, 2006) quando trabalhou com mistura de óleo de milho, e gorduras protegidas em vacas leiteiras holandesas encontrando diferenças ($P < 0,05$) nos seus tratamentos, onde os animais que receberam a gordura protegida apresentou um valor de 15,7%h e para os animais da dieta controle de 20,8%h.

Os resultados mostram uma alta taxa de biohidrogenação nos diferentes tratamentos. Para o ácido linoléico e o ácido linolenico apresentaram diferenças ($P < 0,05$) com a maior taxa para os animais que receberam a dieta com óleo de soja (OS) com valores (81,41%/h e 30,38%/h) e menor para os animais das dietas com SG (60,41%/h e 15,63%/h) e GP (72,81%/h e 27,99%/h), respectivamente. Estes resultados estão algo por acima dos resultados apresentados por (HARVATINE; ALLEN, 2006) para o ácido linolénico com um valor médio de (15,6%/h), mas, similares para os resultados do ácido linolénico com uma média de (33,1%/h). Moate et al. (2004) estimaram taxas médias de biohidrogenação *in vivo* para os mesmos ácidos de 27,0%, 88,0% e 244,0% por hora, respectivamente. A maior taxa de biohidrogenação do ácido linoléico encontradas obedece às maiores concentrações desse ácido no rumen.

A taxa de biohidrogenação para o ácido octadecenoico (C18:1 trans-6) no presente estudo foi menor para os animais da dieta GP (51,625%/h), este valor é similar quando comparado com os resultados de Harvatine e Allen (2006) para o ácido C18:1 trans de 40,85%/h. As diferenças nos diferentes valores podem ser atribuídas ao fato do tipo de dieta, fatores ambientais externos e o efeito animal. O caminho direto do fracionamento da biohidrogenação entre a rota direta e indireta não é conhecida e pode variar com população bacteriana e ambiente ruminal (HARVATINE; ALLEN 2006).

A maior eficiência (extensão) de biohidrogenação para o ácido oleico e ácido linoléico com diferenças significativas ($P < 0,05$) foram para os animais que receberam óleo de soja não protegida na dieta (OS) (40,12% e 93,63%), apresentaram comparados com os animais que receberam óleo de soja na forma de semente (SG) (38,68% e 85,64%) e sais de cálcio ou gordura protegida (GP) (26,93% e 85,96%), com diferenças significativas ($P < 0,05$). Os valores da eficiência do ácido linoléico são similares aos apresentados por (HARVATINE; ALLEN 2006) em vacas mestiça alimentadas com gordura protegida (86,6%), mas baixos quando comparamos a eficiência do ácido oleico (63,6%). Mesmo assim, os valores indicam que os animais que receberam as três fontes de óleo de soja com um nível de 70% de concentrado foram submetidos a um ativo processo de biohidrogenação, mesmo as fontes estiverem protegidas.

Os resultados mostram no presente estudo que o maior fluxo duodenal para o ácido esteárico foi para os animais que receberam na dieta óleo de soja

(OS) (95,36 g/dia), comparado com o menor fluxo dos animais que receberam a dieta com soja grão SG e GP (76,08 g/dia e 75,74 g/dia), respectivamente. Entretanto, analisando a diferença em relação com a menor quantidade de ácido esteárico consumida, apresenta-se biohidrogenação dos ácidos graxos assim estivessem protegidas, com um incremento de 246,3% para a dieta SG, e de 390,2% para a dieta GP, valores que está em relação com os resultados apresentados por (HARVATINE; ALLEN 2006) com um incremento de 770,4%, na quantidade do ácido esteárico que atingiu o duodeno, em dietas com gordura protegida para vacas leiteiras.

O maior fluxo do ácido vaccênico foi para os animais que receberam na dieta óleo de soja (11,17 g/dia), comparado com o menor valor com os animais que receberam na dieta soja grão e gordura protegida (9,95 g/dia e 7,45g/dia). Estudos de (Corl et al., 1998; Piperova et al., 2002) demonstraram que os ruminantes têm habilidade de sintetizar ácido linoléico conjugado C18:2 cis-9, trans-11 no tecido, a partir do ácido vaccênico C18:1 trans-11 absorvido no intestino delgado, processo conhecido como síntese *de novo*, onde o vaccênico no tecido (glândula mamária e tecido adiposo) sofre uma dessaturação pela enzima Δ^9 -dessaturase; e segundo Bauman et al. (1999) A síntese de novo é a rota de maior fonte do ácido linoléico conjugado nos ruminantes. Então, os resultados mostram que óleo de soja fornecido em dietas para ruminantes pode garantir uma maior quantidade de ácido vaccênico em duodeno, ácido indispensável para a síntese de *novo*.

Pode observar que os animais que receberam a dieta com óleo de soja apresentaram um menor fluxo duodenal do ácido linoléico (10,46 g/dia), comparados com os animais que receberam na dieta soja grão e gordura protegida (23,84 g/dia e 23,94 g/dia), pelo fato do óleo de soja na dieta (OS) não estar protegido, está mais exposto a sofrer maior hidrólises e biohidrogenação, mas, se foi compensado pela maior presença de ácido vaccênico, para a sínteses do ácido linoléico conjugado no tecido. O que, pode-se explicar dos resultados encontrados por Fiorentini (2009) e Silva (2013), mas sem encontrar diferenças ($P > 0,05$) quando foi fornecida soja grão, óleo de soja e gordura protegida, em novilhas mestiças e novilho Nelore, respectivamente. Apresentando maiores concentrações do ácido linoléico conjugado (g/100 g de gordura) do músculo *Longuíssimus dorsi* com valores

para o trabalho de Fiorentini de (0,49; 0,56; e 0,50 g/100g de gordura) e com valores para o trabalho de Silva de (0,40; 0,39; 0,40 g/100g de gordura), respectivamente.

Em geral, os animais que receberam lipídios protegidos em forma de soja grão (SG) e sais de cálcio (GP) apresentaram um maior fluxo duodenal de ácidos graxos insaturados (53,33% e 54,72%), respectivamente; que comparados com os animais que receberam óleo de soja (OS) apresento um fluxo de ácidos graxos insaturados de 48,42%. No entanto, a só presença dos ácidos graxos no intestino não garante que sejam absorvidos. No presente estudo em os animais alimentados com a dieta SG foi observado a presença de restos ou frações de semente de soja grão, quando foi feita a coleta do conteúdo duodenal, que em certa forma podem limitar a disponibilidade em duodeno dos ácidos graxos que estão conteúdos na semente ainda, e passam para as fezes. O que pode ser corroborado pela menor digestibilidade intestinal do EE apresentada nos animais que receberam a dieta (SG) com 69,17%, comparada com o maior valor para os animais da dieta OS e GP (77,16% e 79,19%), respectivamente (Valores apresentados no capítulo anterior).

A presença de ácidos graxos insaturados no duodeno como o ácido oleico, ácido linoléico e ácido linolenico nos animais que receberam a dieta com óleo de soja (OS) além de não estar protegida indica que a eficiência da biohidrogenação no rumen não foi total. Esta situação pode justificar em parte pela associação com a glicerina, segundo Edwards et al. (2012) a glicerina inibe a lipólise no rumen; pelo baixo valor do pH na faixa de 5,30 a 6,2 causado pela quantidade de concentrado na dieta (relação volumoso:concentrado, 30:70), segundo Sauvante et al. (1999) e Dohme et al. (2003) a menor lipólises observada no seu experimento em dietas com alto amido foi provavelmente ao baixo pH ruminal causado por este tipo de dietas; e por fim, pode ser devida a limitada capacidade dos microrganismos do rumen em biohidrogenar quando a ingestão de ácidos graxos insaturados é muito grande (Van SOEST, 1994; LOOR et al., 2004; JENKINS et al., 2008).

4.3 Parâmetros sanguíneos

Dentro dos processos de alimentação animal, é importante conhecer alguns constantes metabólicos que nos determinam o estado de salubridade

dos animais quando são submetidos em avaliação de dietas experimentais. As concentrações plasmáticas dos metabólitos analisados se encontram dentro da faixa normal de salubridade animal em todos os tratamentos (GONZÁLEZ, 2000). No entanto, variações nos níveis dentro da faixa podem estar em relação com o efeito da dieta.

A determinação de glicose em bovinos como um metabólito energético não representa uma acertada avaliação, visto que os bovinos fazem um forte controle homeostático hormonal fazendo que o animal se mantenha sobre sua concentração constante, independente de fatores associados à dieta (GONZÁLEZ, 2000). No entanto, os animais que receberam a dieta OS apresentaram um menor valor (63,69 mg/dL) no horário da tarde. A mesma situação foi encontrada para os triglicerídios, sem diferenças no horário das 7:00 para os tratamentos, e comum menor valor na coleta das 13:00 horas para os animais que receberam a dieta OS (10,19 mg/dL), podendo indicar uma maior uso de glicose e triglicerídios para suas atividades metabólicas, ou hábitos alimentícios.

Animais que receberam as dietas com fontes de óleo de soja apresentaram maiores concentrações de colesterol total (139,74 mg/dL), colesterol-HDL (61,03 mg/dL) e colesterol-LDL (59,03 mg/dL) comparadas com animais da dieta controle (123,41 mg/dL; 56,80 mg/dL; 49,52 mg/dL), respectivamente, indicando incrementos plasmáticos para estes metabólitos. A variação no lipidograma parcial no soro pode ser justificada com a maior disponibilidade de ácidos graxos no intestino nas dietas com lipídios, e a diferença entre os horários a uma maior atividade metabólica, e segundo Schauff e Clark (1992) os incrementos dos lipídios no plasma sanguíneo estão em relação aos incrementos na demanda necessária para a digestão, absorção e transporte de ácidos graxos de cadeia longa no tecido.

Um propósito do lipograma seria um mecanismo que ajude a estabelecer alguns critérios na deposição de gordura no tecido dos animais. Estudo em dietas para humanos, alimentados com óleo de palma, óleo de soja parcialmente hidrogenada (10,28% de ácidos graxos trans do total de lipídio) e gordura esterificada após 4 semanas de avaliação, encontraram que as dietas com gorduras insaturadas alterou o metabolismo de lipoproteínas, aumento da

glicose com diminuição da insulina em relação da dieta com óleo de palma (mais saturada) sem ser modificado (SUNDRAM; KARUPAIAH; HAYES, 2007).

Outros estudos podem nos ajudar a esclarecer a importância de considerar o lipograma nas avaliações de dietas para ruminantes que podem ser útil, mas precisam ser mais bem interpretadas. Petit (2002) observou que os animais alimentados com linhaça em grão apresentaram menores concentrações de colesterol total que os animais alimentados com Megalac® ou soja moída. Cavalieri et al. (2005) ao avaliarem os efeitos de duas fontes de gordura, observaram que as concentrações sanguíneas de LDL, HDL, colesterol total foram maiores nos animais alimentados com Lac100®, não havendo efeito do Lac100® nas concentrações de VLDL, triglicérides, glicose total e N-ureico. Os animais alimentados com Lac100® apresentaram maiores concentrações de LDL (111,00 mg/dL vs 45,46 mg/dL), HDL (82,27 mg/dL vs 64,93 mg/dL) e colesterol total (203,60 mg/dL vs 116,13 mg/dL) e menor concentração de N-ureico (13,22 mg/dL vs 15,19 mg/dL) para os animais alimentados com grão de linhaça.

Não observou efeitos das fontes de óleo de soja em associação com a glicerina nos níveis de N-ureico no sangue, sem encontrar relação clara com os níveis de N-NH₃ encontrados no rumen. Os níveis normais encontrados no presente estudo de albumina (0,29 g/dL até 0,42 g/dL), e colesterol (139,74 mg/dL) podem indicar funcionamento adequado do fígado, segundo Gonzáles (2000) quando os valores estão abaixo revela que função hepática está comprometida.

5. CONCLUSÕES

O fluxo ruminal do ácido oleico, ácido linoléico e ácido linolenico foram favorecidos com o uso de óleo de soja na forma protegida (semente ou sais de cálcio); no entanto, o óleo de soja na forma não protegida em associação com glicerina pode garantir uma maior quantidade de ácido vaccênico no intestino indispensável na síntese de *novo*.

O fornecimento de lipídios em forma de semente ou gordura protegida não foi garantia para evitar ou processo de biohidrogenação no rumen em condições específicas do ambiente ruminal.

O uso de fontes de óleo de soja em 5% do EE da MS em associação com glicerina (100 g/kg MS) não afeta a função hepática, o que permite assegurar uma adequada saúde animal e uma deposição de gordura no tecido. No entanto, as concentrações sanguíneas de glicose, triglicérides, colesterol total e suas frações (HDL, LDL e VLDL) podem ser alterados podendo afetar os rendimentos produtivos do animal.

6. REFERÊNCIAS

ALLEN, M.S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1598-15624, 2000.

BAUMAN, D.E.; BAUMGARD, L.H.; CORL, B. A.; GRIINARI, J. M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1-15, 2000.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PEREIRA, J.C.; CUNHA, M.D.; DETMANN, K.D.S.C.; PAULINO M.F. Estimação de teores de componentes fibrosos em alimentos para ruminantes em sacos de diferentes tecidos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.130-138, 2009.

CAVALIERI F.B.; SANTOS G.T.; MATSUSHITA M.; PETIT H.V.; RIGOLON L.P.; SILVA D.; HORST J.A.; CAPOVILLA L.C.; RAMOS F.S. Milk production and milk composition of dairy cows fed Lac100® or whole flaxseed. **Canadian Journal of Animal Science**, v.85, p.413-416, 2005.

DOHME, F.; FIEVEZ, V.; RAES, K.; DEMEYER, D. Increasing levels of two different fish oils lower ruminal biohydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid in vitro. **Journal of Applied Animal Research**, v.52, p.309-320, 2003.

EDWARDS, H.D.; ANDERSON, R.C.; MILLER, R.K.; TAYLOR, T.M.; HARDIN, M.D.; SMITH, S.B.; KRUEGER, N.A.; NISBET, D.J. Glycerol inhibition of ruminal lipolysis in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.5176-5181, 2012.

FIORENTINI, G. **Fontes lipídicas na terminação de novilhas**. 2009. Dissertação (Mestre em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.

FIORENTINI, G.; SANTANA, M.C.A.; SAMPAIO, A.A.M.; REIS, R.A.; RIBEIRO, A.F.; BERCHIELLI, T.T. Intake and performance of confined crossbred heifers fed different lipid sources. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.490-498, 2012.

GONZÁLEZ, F.H.D. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso**

em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: Brasil. UFRGS, p. 63-74, 2000.

HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P.N.; Stewart, C.S. (Eds.). **The rumen microbial ecosystem.** 2nd ed. London (UK): Blackie Academic and Professional, p.382-426, 1997.

HARVATINE, K.J.; ALLEN, M.S. Fat supplements affect fractional rates of ruminal fatty acid biohydrogenation and passage in dairy cows. **The Journal of Nutrition**, v.136, n.3, p.677-685, 2006.

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

JENKINS, T.C.; WALLACE, R.J.; MOATE, P.J.; MOSLEY, E.E. BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v.86, n.2, p.397-412, 2008.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes.** 3.Ed. Santa Maria: Editora UFSM, 212 p. 2011

LOOR, J.J.; UEDA K.; FERLAY A.; CHILLIARD Y.; DOREAU M. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy ows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.2472-2485, 2004.

MARÍN A.L.M.; HERNÁNDEZ M.P.; ALBA L.P.; CASTRO G.G. Digestión de los lípidos en los rumiantes: Una revisión. **Interciencia**, v.35, p.1-7, 2010.

MOATE, P.J.; CHALUPA, W.; JENKINS, T.C.; BOSTON, R.C. A model to describe ruminal metabolism and intestinal absorption of long chain fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**, v.112, p.79-105, 2004.

NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; Van NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. In: **The Rumen Microbial Ecosystem.** Hobson, P.N.; Stewart, C.S. (Eds.), Springer. p. 523-632, 1997.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, Seventh Revised Edition, Update, 2001. **The National Academy Press**, Washington, D.C. 2001.

NICHOLSON, T.; OMER, S.A. The inhibitory effect of intestinal infusions of unsaturated long-chain fatty acids on fore stomach motility of sheep. **British Journal of Nutrition**, v.50, p.141-149, 1983.

NÖRNBERG, J.L.; STUMPF JÚNIOR, W.; LÓPEZ, J.; COSTA, P.B. Valor do farelo de arroz integral como fonte de gordura na dieta de vacas Jersey na fase inicial de lactação: digestibilidade aparente de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, p.2412-2421, 2004.

PALMQUIST, D.L.; JENKINS, T.C. Challenges with fats and fatty acid methods, **Journal of Animal Science**, v.81, n.12, p.3250-3254, 2003.

PETIT, H.V. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.1482-1490, 2002.

SAUVANT, D.; MESCHY, F.; MERTEN, D. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. **Production Animale**, v.12, p.49-60, 1999.

SCHAUFF, D.J.; CLARK, J.H. Effects of feeding diets containing calcium salts of long-chain fatty acids to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2990-3002, 1992

SILVA, R.A. **Fontes lipídicas associadas à glicerina bruta na dieta de tourinhos nelore**. 2013. 50f. Dissertação (Mestre em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2013.

SUKHIJA, P.S.; PALMQUIST, D.L. Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.1784-1787, 1990.

SUNDRAM, K; KARUPAIAH, T.; HAYES, K.C. Stearic acid-rich interesterified fat and trans-rich fat raise the LDL/HDL ratio and plasma glucose relative to palm olein in humans. **Nutrition and Metabolism**, v.4, p.1-12, 2007. doi:10.1186/1743-7075-4-3, 2007.

VALADARES FILHO, S.C.; MARCONDES M.; CHIZZOTTI M.; PAULINO P. **Exigências nutricionais de zebuínos puros e cruzados-BR CORTE**. 2.ed. Viçosa, MG, Brazil: UFV.DZO.193p, 2010.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Comstock Pub, 2nd ed. Ithaca: Comstock Pub, 476p, 1994.

CAPÍTULO 4. FONTES DE ÓLEO DE SOJA EM ASSOCIAÇÃO COM GLICERINA AFETAM A EFICIÊNCIA DA BIOHIDROGENAÇÃO E PRODUÇÃO DE METANO E CO₂ EM DIETAS PARA BOVINOS DE CORTE AVALIADAS *In Vitro*

RESUMO: Estimou-se a taxa e a eficiência da biohidrogenação e a produção de metano (CH₄) e dióxido de carbono (CO₂) *in vitro*. Foram avaliadas dietas para ruminantes com fonte de lipídio, óleo de soja (OS), ácido linoléico puro (AL), ácido linolenico puro (ALN) e controle (CO) em associação com glicerina (100 g/kg MS). Nove novilhos da raça Nelore foram utilizados como doadores do líquido ruminal, que receberam uma dieta (volumoso:concentrado, 30:70). O conteúdo ruminal foi recolhido após 15 dias de adaptação. Foram três dias de coletas. Para cada dia de coleta, cinco séries de garrafas foram preparadas com líquido ruminal e uma dieta; foram avaliados seis tempos de incubação (0:00, 1:00, 5:00, 12:00, 24:00 e 36:00 horas). A proporção de gases total em média para o tratamento foi afetada pela associação do lipídio com a glicerina (P<0,05). Houve efeito dos tratamentos (P<0,05) na porcentagem da produção de CH₄ e CO₂, onde ALN, AL e OS apresentaram a menor concentração de CH₄ (15,3%, 15,2% e 16,7%), respectivamente; e a menor concentração de CO₂ foi para o AL e OS (24,6% e 25,0%), respectivamente. A produção de ácido esteárico, oleico, linoléico, linolenico e o vaccênico foi influenciada pelos tratamentos e pelos horários de incubação (P<0,05). A taxa de biohidrogenação para os ácidos graxos é maior nas primeiras horas de incubação. Houve efeito de interação (P<0,05) tratamentos pelos horários na eficiência da biohidrogenação do ácido linoléico, e sem efeito da interação para a biohidrogenação do ácido linolenico. Conseguiu-se estabelecer que os lipídios na forma protegida não garantizam a inibição do processo de biohidrogenação. No entanto, o efeito associativo da glicerina com óleo de soja na forma não protegida permite reduzir a eficiência da biohidrogenação e podem garantir a diminuição de CH₄ e CO₂.

Palavras-chaves: ácido esteárico, ácido oleico, ácido vaccênico, taxa de biohidrogenação.

1 INTRODUÇÃO

Produtos de ruminantes como a carne e o leite são fontes significativas de ácidos graxos saturados e ácidos graxos trans, como o ácido linoléico conjugado (CLA), importante na dieta para humanos (MOSLEY et al., 2002). No rumen, acontece um processo de conversão de ácidos graxos insaturados provenientes da dieta para produtos finais mais saturados, onde ácidos graxos intermediários *cis* e *trans* são formados, sendo este processo feito por microrganismos, que é conhecido como biohidrogenação (LOOR et al., 2004; JENKINS et al., 2008). A biohidrogenação é um processo biológico único predominante no ecossistema microbiano do rumen (MOSLEY et al., 2002; HARVATINE; ALLEN 2006).

Estudos demonstraram que ruminantes têm habilidade de sintetizar ácido rumênico ou ácido linoléico conjugado (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) na glândula mamária e no tecido adiposo pela Δ^9 -dessaturase a partir do ácido vaccênico C18:1*trans*-11 absorvido no intestino delgado proveniente do rumen, processo conhecido como síntese *de novo* (CORL et al., 1998; PIPEROVA et al., 2002). Sendo, a síntese *de novo* a rota de maior fonte do ácido linoléico conjugado nos ruminantes, quando se compara com o ácido linoléico conjugado que provém diretamente da biohidrogenação no rumen (BAUMAN et. al., 1999; JENKINS et al., 2008). Este isômero foi demonstrado que possui propriedades antioxidantes e anticancerígenas em humanos (McDONALD, 2000), e por isso a importância de aumentar sua deposição no tecido.

Se aceita que os ácidos linoléico C18:2n6 e linolenico C18:3n9, típicos em dietas para ruminantes, são convertidos em vários isômeros insaturados contendo *trans* (por exemplo, CLA *trans*-9,*cis*-11 e CLA *trans*-11,*cis*-15), respectivamente, e em ambas rotas dando lugar ao ácido vaccênico C18:1n *trans*-11 (LOOR et al., 2004; MARÍN et al., 2010). O ácido oleico C18:1n9c, também típico na alimentação de ruminantes em muitas citações é geralmente descrito como sendo diretamente hidrogenado para ácido esteárico C18:0 sem a formação de *trans* intermediários (HARFOOT; HAZELWOOD 1988). No entanto, Selner e Schultz (1980) observaram um aumento significativo no teor de ácidos graxos C18:1 *trans* da gordura do leite de 3% para 8% quando as vacas em lactação foram alimentadas com o ácido oleico. Estes resultados juntamente com os obtidos por Loor et al. (2002), apóiam a possibilidade de

que o C18:1 trans também é sintetizado a partir de ácido oleico por microrganismos do rumen.

O lipídio dentro da produtividade dos bovinos de corte é um nutriente essencial para a produção e qualidade do músculo, e sua eficiência de produção está relacionada com o tipo de deposição de gordura no tecido e em especial pela quantidade dos ácidos graxos insaturados. Os resultados mostram que a deposição de gordura no tecido está intimamente ligada ao tipo da dieta e à eficiência e taxa de biohidrogenação no rumen (LOOR et al., 2004; SULLIVAN et al., 2004; JENKINS et al., 2008) que vai permitir o maior ou menor fluxo de ácidos graxos insaturados para o intestino, em especial o ácido rumênico (CLA) C18:2 cis-9, trans-11 e o ácido vaccênico C18:1 trans-11 que pode aumentar o teor dos CLA em carne e leite (LOOR et al., 2004; COLLOMB et al., 2006; GIVENS et al., 2006; JENKINS et al., 2008; MARÍN et al., 2010).

Os ácidos graxos trans, incluindo vários isômeros de CLA são conhecidos por atuar como modificadores metabólicos do metabolismo de lipídios (MOSLEY et al., 2002). Trabalhos de Blankson (2000) em seres humanos com excesso de peso e moderadamente obesos tiveram uma redução significativa na massa de gordura corporal quando foram alimentados com uma mistura de isômeros de CLA, recebendo 3,4 g de CLA/dia. Griinari e Bauman (1999) quando trabalharam com vacas leiteiras, mostraram que o tipo de dieta induz a diminuição da gordura e que está relacionada com aumento do C18:1 trans-10 na gordura do leite, e onde a produção de C18:1 trans-10 foi atribuído a biohidrogenação de C18:2 trans-10,cis-12. E segundo Baumgard et al. (2000), o C18:2 trans-10,cis-12 é considerado o isômero principal responsável pela diminuição da síntese de gordura do leite.

O mecanismo exato pelo qual ácidos graxos trans alteram o metabolismo da gordura é desconhecido (MOSLEY et al., 2002). No entanto, em ratos o C18:2 cis-9,trans-11 foi mostrado por ter um efeito potente sobre o transporte de lipídios e de metabolismo *in vivo*. Isto é atribuído ao efeito como ligador de alta afinidade e ativador que o CLA tem pelo receptor nuclear peroxissoma-proliferador (PPAR α) (MOYA-CAMARENA, 1999). Estudos em nutrigenômica têm mostrado que a expressão do receptor PPAR- α em relação ao consumo de uma dieta rica em gordura não isocalórica é sexo específica, com maior diminuição de receptor em animais machos do que nas fêmeas

(PRIEGO et al., 2009). Considerando-se então que a dieta não tem os mesmos efeitos sobre os indivíduos, sejam eles da mesma espécie, e pode-se adaptar a dieta ao perfil genético de certos indivíduos, e melhorar a eficiência dos processos fisiológicos.

Estratégias na alimentação de ruminantes têm-se desenvolvido para garantir que maiores concentrações de ácidos graxos insaturados passem para o intestino, como é o uso das gorduras protegidas ou sabões de cálcio, que se justifica no sentido que os ácidos graxos insaturados escapem ao processo da biohidrogenação (LOOR et al., 2004; CAVALIERI et al., 2005; HESS et al., 2008). Outra alternativa que pode garantir o fluxo de ácidos graxos insaturados e alguns isômeros trans nos ruminantes é o uso da glicerina em associação com os lipídios, por apresentar reduções na taxa efetiva da lipólise (EDWARDS et al., 2012), que refletem na baixa eficiência da biohidrogenação (Van NEVEL; DEMEYER, 1996). No entanto, trabalhos *in vitro* de Castagnino et al. (2015) não encontrou efeitos significativos ($P > 0,05$) da glicerina no perfil dos ácidos graxos, quando foi usada em doses de 150 g/kg MS com dois tipos de óleos.

Outro aspecto importante a considerar dentro da produtividade dos ruminantes, são alguns gases não desejados, gerados pela atividade metabólica no rumen e que são produzidos em grandes quantidades, como é o dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4) eliminados através da respiração (CERRI et al., 2010). Os lipídios, especialmente os insaturados, podem exercer um papel algo significativo na redução das emissões desses gases de origem entérico, quando forem incorporados nas dietas de ruminantes (CHIZZOTTI et al., 2012), visto que existe uma limitada porcentagem de lipídios insaturados fornecida em dietas. Sendo este outro dos interesses atuais do uso dos lipídios (não protegidos) como mecanismo mitigador em dieta de ruminantes para a redução de metano entérico, que permite o seqüestro de íons H^+ livres gerados na fermentação de carboidratos no rumen, sendo incorporados nos ácidos graxos insaturados por intermédio do processo da biohidrogenação e ser saturados (LOOR et al., 2004; CHIZOTTI et al., 2012).

OBJETIVO

Estabelecer o perfil e a cinética ruminal de ácidos graxos, e a eficiência da biohidrogenação no rumen em dietas para ruminantes que contém óleo de

soja, gordura protegida, ácido linoléico puro e ácido linolenico puro em associação com glicerina, e avaliar seu efeito na produção de metano e dióxido de carbono medidas *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e instalações

O experimento foi realizado no Laboratório de nutrição animal (LANA), pertencente ao Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista.

2.2 Coletas do líquido ruminal

Nove novilhos da raça Nelore adultos, pesando em média 540 ± 20 kg, e com 40 meses de idade, providos de cânula no rumen foram utilizados como doadores do líquido ruminal. Os animais foram mantidos de acordo com a ética e princípios descritos para animais de experimentação pela Sociedade Brasileira da Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA), que foi aprovado pela Comissão de Ética Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV-UNESP Câmpus-Jaboticabal (número de protocolo 021119/11). Para reduzir o efeito animal, os animais doadores do líquido ruminal foram divididos em três grupos de três animais cada, onde o primeiro grupo recebeu uma dieta controle (CO) sem fonte de lipídio; o segundo grupo uma dieta suplementada com óleo de soja (OS); e um terceiro grupo que recebeu dieta com gordura protegida (GP). Foram alimentados *ad libitum* com consumo em média de 9,4kg de matéria seca por dia, em duas refeições iguais nos horários (07:00 e 14:00 horas). As dietas corresponderam às mesmas utilizadas no experimento anterior (capítulo 2 e capítulo 3) com exceção da dieta com soja grão.

O líquido ruminal foi coletado após 15 dias de adaptação as dietas. Nos três dias seguintes, foram coletadas três réplicas antes da refeição da manhã, através da cânula de aproximadamente 500 mL por dia de líquido ruminal por animal, que foi filtrado em tecido de algodão e transferido rapidamente para garrafas térmicas garantindo temperatura de 39°C. Foi reunido um total de 1500mL do líquido por cada grupo de animais, e imediatamente encaminhado para o laboratório para incubação *in vitro* (LAVERRONX et. al., 2011).

2.3 Incubação *in vitro*

Para cada dia dos três dias das coletas, cinco séries de seis garrafas de vidro foram utilizadas como incubadoras experimentais (Figura 1), e foram preparadas com cinco dietas experimentais (Tabela 1) e receberam o líquido ruminal correspondente dos animais doadores.

Cada série correspondeu a um tratamento, da seguinte forma: 1ª Série: dieta controle (CO), mais o líquido ruminal dos animais que receberam a dieta controle; 2ª Série: dieta com óleo de soja (OS), mais o líquido ruminal dos animais que receberam a dieta com óleo de soja; 3ª Série: dieta com gordura protegida (GP), mais o líquido ruminal dos animais que receberam a dieta com gordura protegida; 4ª Série: dieta com ácido linoléico (pureza de 99%) (AL), mais o líquido ruminal dos animais que receberam a dieta com óleo de soja; e 5ª Série: dieta com ácido linolenico (pureza de 99%) (ALN), mais o líquido ruminal dos animais que receberam a dieta com óleo de soja. Para um total de cinco tratamentos com três repetições (dias das coletas).

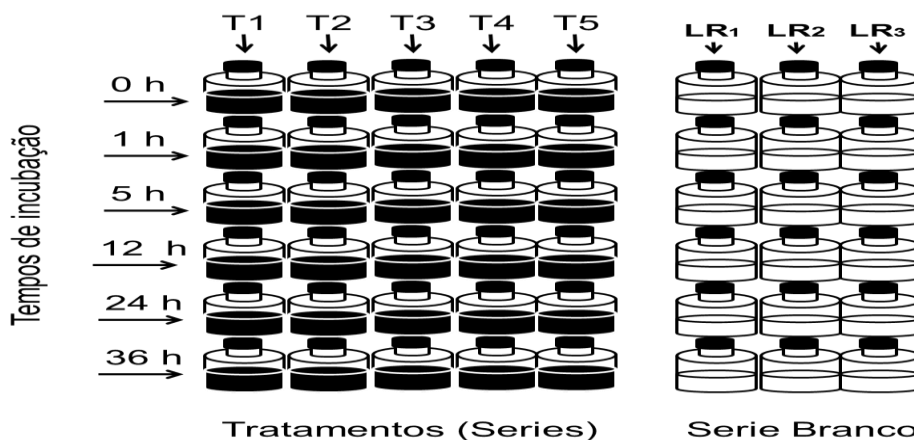


Figura 1. Desenho da disposição das garrafas nos diferentes tratamentos e horários e as garrafas em branco para a incubação *in vitro*, T: os tratamentos, LR: líquido ruminal

As seis garrafas de cada série corresponderam aos seis tempos de incubação avaliados (0:00, 1:00, 5:00, 12:00, 24:00 e 36:00 horas) (Figura 1). As garrafas com uma capacidade de 120 mL foram envolvidas em papel alumínio. Adicionou-se 1000 mg da dieta respectiva (em relação 70% concentrado e 30% de volumoso), 25 mL de solução tampão Simplex

(GOERING; VAN SOEST, 1970), com as modificações sugeridas por Mould et al. (2005) e foi aquecido a 39°C.

Tabela 1. Ingredientes e composição de nutrientes das dietas experimentais

Itens	Dietas				
	CO	OS	GP	AL	ALN
<i>Ingredientes</i>					
Silagem de Milho ¹	30,00	30,00	30,00	30,00	30,00
Milho em grão moído	47,89	45,71	45,40	45,71	45,71
Farelo de Soja	8,11	8,56	8,63	8,56	8,56
Óleo de soja	---	1,73	---	---	---
Gordura protegida ²	---	---	1,97	---	---
Ácido linoléico	---	---	---	1,73	---
Ácido linolenico	---	---	---	---	1,73
Glicerina Bruta	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Ureia	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Sal mineral ³	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
<i>Componentes químicos (nutrientes)</i>					
Matéria seca	69,03	68,03	67,65	68,03	68,03
Matéria orgânica	94,15	94,15	94,18	94,15	94,15
Proteína bruta	16,44	15,52	15,91	15,52	15,52
Extrato etéreo	3,74	4,98	4,79	4,90	4,92
Cinza	5,85	5,85	5,82	5,83	5,83
FDNcp ⁴	25,85	24,11	24,09	24,10	24,10
FDA ⁵	9,03	8,77	8,90	8,77	8,77
Hemicelulose	16,34	18,73	16,75	18,71	18,70
LDA ⁶	1,78	2,38	2,02	2,35	2,36
Carboidratos totais	73,97	73,66	73,48	73,70	73,68
Carboidratos não estruturais	48,12	49,55	49,39	49,50	49,58
NDT ⁷	80,53	82,46	82,25	82,46	82,46
<i>Energia (Mcal/kg MS)</i>					
Energia bruta	4,44	4,52	4,53	4,52	4,52
Energia metabolizável	2,91	2,98	2,97	2,99	2,99

CO: Dieta controle; OS: Dieta com óleo de soja; GP: dieta com gordura protegida. AL: Dieta com ácido linoléico; ALN: Dieta com ácido linolenico. ¹composição da silagem do milho, MS (85,02%), MO (95,16%), proteína bruta (9,72%), extrato etéreo (2,96%), FDNcp (51,57%), LDA (4,32%). ²Utilizou-se gordura comercial Megalac®; ³Composição do suplemento mineral, Cálcio: 210g; Fósforo: 20g; Enxofre: 37g; Sódio: 80g; Cobre: 490mg; Manganês: 1.424mg; Zinco: 1.830mg; Iodo: 36mg; Cobalto: 29mg; Selênio: 9mg; Flúor (máx.): 333mg; ⁴FDNcp: fibra insolúvel em detergente neutro corrigido pra cinzas e proteína; ⁵FDA: fibra insolúvel em detergente ácido; ⁶LDA: lignina detergente ácida; ⁷NDT: Nutrientes digestíveis totais (NRC, 2001)

O conteúdo ruminal no laboratório foi novamente filtrado em um ambiente de baixo oxigênio com um tecido de nylon de 250 µm, e 15 mL de

líquido ruminal, e foi adicionado nas correspondentes garrafas, prévia gaseificação com CO₂ por 10 min. As garrafas foram seladas para garantir condições anaeróbicas e colocadas em banho Maria a 39°C com agitação de 100 agitações/min. Adicionalmente às series de garrafas dos tratamentos, colocaram-se três séries de garrafas branco com o líquido ruminal respectivo sem substrato (dieta), para fazer a correção da produção do gás (Figura 1).

Uma garrafa experimental de cada tratamento foi retirada antes de iniciar a incubação, que foi o tempo zero (t_0), depois foram retiradas uma garrafa por tratamento no seu respectivo tempo de incubação (t_1 , t_5 , t_{12} , t_{24} e t_{36}). A pressão do gás foi medida a cada duas horas até o fim de cada tempo com um sensor de pressão digital (PDL200). Para analisar a composição dos gases metano, CO₂ e N₂O, foram retiradas amostras de aproximadamente 5 mL com uma seringa plástica depois da medição da pressão (THEODOROU et al., 1994). As amostras foram analisadas imediatamente em um cromatógrafo de gases.

O conteúdo final das garrafas foi colocado em potes individuais e determinado o pH, em seguida, os potes foram congelados imediatamente a -20°C. O conteúdo foi liofilizado e pesado para determinar o teor da matéria seca, que foi moído em moinho de faca tipo Willey contendo crivos de 1mm. Na hora de moer as amostras e evitar perdas dos ácidos graxos por esquentamento do moinho foi deixando um espaço de tempo de 15 minutos entre uma amostra e outra. As amostras foram analisadas no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), do Departamento de Zootecnia, FCAV/UNESP Câmpus Jaboticabal.

2.4 Análises laboratoriais

2.4.1 Produção de gases

Para avaliar a cinética de produção de gases *in vitro* adotou-se a metodologia descrita por Theodorou et al. (1994) e adaptada para o sistema semi-automático de Mauricio et al. (1999). Foi descontado o gás produzido pelos frascos sem substratos (brancos), para ajustar a produção de gás presente na garrafa com apenas líquido ruminal. Os valores de pressão foram convertidos em mL de gás usando equação previamente determinada em condições laboratoriais.

$$V = (4,25 \times P) - 0,1$$

Onde: V = volume de gás (mL); P = pressão medida (psi).

Para a análise da composição dos gases metano, dióxido de carbono e óxido nitroso. A proporção de gases produzidos pela fermentação das dietas foi mensurada nos tempos 1:00, 5:00, 12:00, 24:00 e 36:00 horas de incubação. Nesses tempos o gás depois da coleta em seringas foi imediatamente analisado no cromatógrafo de gases Shimadzu CG-2014, com detector por ionização em chama, contendo uma coluna capilar Hayesep D80/100 de 4 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ de diâmetro da fase. As análises da quantificação dos gases foram realizadas sob as seguintes condições: volume de injeção de 50 μ L, com temperatura do injetor mantida a 250°C, e temperatura do detector fixado em 280°C. A temperatura da coluna inicialmente foi mantida a 240°C durante 4 min. Os resultados formam expressos em porcentagem para CH₄ e CO₂ e em ppm para N₂O (Tabela 3).

2.4.2 Análises de ácidos graxos

Os ácidos graxos contidos nas amostras foram diretamente extraídos e transesterificados em metil ésteres de ácidos graxos (FAME) segundo Sukhija e Palmquist (1988) com modificação de Loo et al. (2004). Prévia metilização das amostras, foi incluído o metil nonadecanoate (C19:0) (Sigma-Aldrich, Supelco, USA) como indicador estandar interno, recomendado por Palmquist e Jenkins (2003). Uma corrida separada no cromatógrafo sem o padrão interno foi feita para descartar a presença deste ácido nas amostras. Os metil ésteres de ácidos graxos (FAME) foram depositados em tubos *ependorf*, devidamente identificados e armazenados a -20°C, para depois serem analisadas no cromatógrafo de gases.

Para as quantificações dos ácidos graxos, as amostras transesterificadas foram injetadas por meio de um injetor automático em um cromatógrafo gasoso SHIMADZU GC-2010 plus, equipado com um detector de ionização de chama, e uma coluna capilar de sílica fundida Rt/2560 (RESTEK) de 100 m x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,22 μ m. As análises da quantificação dos ácidos graxos foram realizadas sob as seguintes condições: 0,5 μ L metil ésteres (FAME) em hexano, com temperatura do injetor mantida a 260°C, e temperatura do detector fixado em 260°C. A temperatura da coluna inicialmente foi mantida a

140°C durante 5 min, em seguida, aumentou a uma taxa de aquecimento de 4°C/min para 260°C e permanecendo por 15 minutos. O nitrogênio foi utilizado como gás de arraste.

Para a identificação de picos e estabelecer a correspondente curva no cromatógrafo foram utilizados padrões de metil éster puro (Sigma-Aldrich, Supelco, USA) com uma concentração conhecida. Utilizaram-se uma mistura com 19 metil ésteres puros (F.A.M.E. Mix C8-C22 No. 18920); e oito metil ésteres em forma individual: No. 46905-U, C18:1n11t ; No. 47199-U, C18:1n6t; No. 47198-U, C18:1n6c; No. 75160, C18:1 9t; No. 46951-U, C18:2n9-12t; No. 47571-U, C20:5n3; No. 47563-U, C22:5n3; e No. 47570-U, C22:6n3.

Separação satisfatória da maioria dos ácidos graxos C8:0, C10:0, C12:0, C13:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 cis e trans e isômeros de CLA, C20:5n3c (EPA) e C22:6n3c (DHA). As análises foram feitas em duplicata, sendo calculada a média e desvio padrão das amostras.

A taxa da biohidrogenação ou eficiência de saturação (eficiência da biohidrogenação) da reação foi calculada para o ácido oleico, ácido linoléico, e ácido linolenico, avaliando a concentração do substrato desaparecido durante o período de incubação (Δt) dividido para o total do substrato avaliado para a reação considerada com as seguintes equações (TROEGELER-MEYNADIER, et al., 2006):

$$1. \text{ Taxa de biohidrogenação. } TH = (C_i - C_t) / \Delta t$$

$$2. \text{ Eficiência saturação, } Es = [(C_i - C_t) / C_i] / \Delta t \cdot 100$$

Onde: C_t = Concentração total final; C_i = concentração inicial; Δt = horário de incubação.

Estimou-se a fração de ácido vaccênico para cada horário de incubação, como é um ácido intermediário que aparece e desaparece no incubador, pelo método utilizada não foi possível saber quanto este ácido é transformado para C18:0 e quanto para o outro C18:1 isômeros. Neste sentido, foram calculadas as quantidades existentes em cada horário, e que tem possibilidade de ser transformado ou passar para intestino. Cada um dos isômeros foi expresso como uma percentagem do ácido que desapareceu em cada horário.

O ácido esteárico C18:0 que foi produzido a mais para cada horário da coleta considerou que foi convertido da saturação do ácido oleico, linoléico e linolenico e foi medida a taxa de produção e a eficiência da produção e do ácido esteárico com a seguinte equação (TROEGELER-MEYNADIER, et al., 2006):

1. Taxa de produção. $TP = (C_i - C_t) / \Delta t$
2. Eficiência produção, $Ep = [(C_t - C_i) / C_i] \times 100$

Onde: C_t = Concentração total final; C_i = concentração inicial de incubação.

2.5 Delineamento experimental e estatístico

As análises estatísticas da biohidrogenação e da produção de gases foram realizadas em delineamento de blocos completos, os tratamentos em um arranjo fatorial 5x6, 5 tratamentos como fator A, e 6 horários de coletas como o fator B. Para as comparações das médias foram analisadas usando o processo Mixed do SAS versão 9.2. Onde os efeitos fixos foram os tratamentos, e como efeito aleatório foram os dias das coletas e os tempos da incubação. O delineamento foi de acordo com o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \rho_k + \beta_j + (\alpha\rho)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} = a variável dependente; μ = a média geral das observações; α_i = o efeito do i-ésimo n vel do fator A; ρ_k = o efeito do k-ésimo n vel fator B; β_j = o efeito do j-ésimo n vel do loque; $(\alpha\rho)_{ij}$ = o efeito da interação entre ambos fatores A e B; ϵ_{ijk} = o erro aleatório. Pressupostos os erros normalmente e independentemente distribuído com uma com uma média (0) e variâncias (ζ^2_δ e ζ^2_ϵ). As médias serão comparadas através do teste de Tukey, adotando o nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

3.1 Produção de gases

O pH do líquido ruminal dos grupos de animais doadores não diferiu (6,7; 6,7 e 6,6) para os doadores alimentados com as dietas CO, OS e GP, respectivamente. No entanto, o valor do pH está em função do tempo de incubação ($P < 0,05$), mas não apresentou diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$), com os seguintes valores em média (6,51; 6,47; 6,22; 6,08; e 5,91) nos horários (1:00, 5:00, 12:00, 24:00 e 36:00), respectivamente (Figura 2).

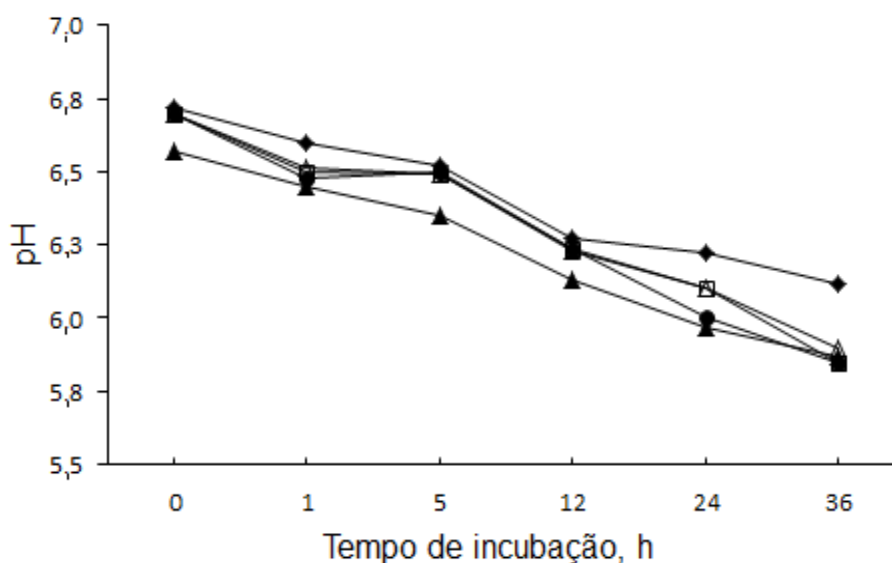


Figura 2. Evolução do pH durante a incubação *in vitro*, avaliando dietas com diferentes fontes de lipídio em associação com glicerina. CO: Dieta controle (◆); OS: Dieta com óleo de soja (●); GP: dieta com gordura protegida (▲). AL: Dieta com ácido linoléico (◻); ALN: Dieta com ácido linolenico (△).

A proporção de gases total em média para o tratamento foi afetada significativamente pela associação do lipídio com a glicerina ($P < 0,05$), onde a menor produção foi para os tratamentos ALN e GP (99,02 mL e 110,58 mL), respectivamente (Tabela 2). Houve efeito ($P < 0,05$) do tempo de incubação na produção média total do gás (Tabela 2). Os maiores incrementos na produção de gás acumulado estão entre os horários 1:00 e 12:00 horas, e uma baixa produção nos horários das 12:00, 24:00 e 36:00 horas, onde estatisticamente são iguais (Tabela 2). Entretanto, nos respectivos horários não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) na produção total de gás entre os tratamentos (Figura 3).

Tabela 2. Efeito dos tratamentos e dos horários nos valores médios da produção de gases, porcentagem de metano, dióxido de carbono e óxido nitroso, em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliadas *in vitro*.

Itens	Tratamentos ¹					EPM ²	P-valor
	CO	OS	GP	AL	ALN		
Gás total, mL	110,1a	107,7a	101,0b	110,6 ^a	99,0b	3,0120	0,0260
Metano, %	18,6a	16,7b	18,8a	15,2b	15,3b	0,7411	0,0014
Metano, mL	26,2a	22,9b	24,4a	21,4b	20,4b	0,9369	0,0005
CO ₂ , %	27,6a	25,0b	27,6a	24,6b	27,3a	2,0232	0,0363
N ₂ O, ppm	0,57	0,49	0,42	0,46	0,46	0,1747	0,6237

Itens	Horários					EPM	P-valor
	0-1	0-5	0-12	0-24	0-36		
Gás total, mL	20,5c	60,6b	138,7a	148,5a	160,1a	3,0120	<,0001
Metano, %	3,2c	10,2b	14,6b	16,7ab	22,7a	0,7411	<,0001
CO ₂ , %	8,76c	11,6b	29,0ab	38,7a	44,0a	2,0232	<,0001
N ₂ O, ppm	0,37b	0,30b	0,48b	0,56a	0,68a	0,1747	0,0040

¹CO: Dieta controle; OS: Dieta com óleo de soja; GP: dieta com gordura protegida. AL: Dieta com ácido linoléico; ALN: Dieta com ácido linolenico. ²EPM: Erro padrão da média; P-valor: Significância estatística. Médias não seguidas pela mesma letra diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Houve efeito dos tratamentos ($P < 0,05$) na porcentagem da produção de metano e dióxido de carbono, onde os tratamentos ALN, AL e OS apresentaram a menor concentração de metano (15,2%; 15,3% e 16,7%), respectivamente; e a menor concentração para o dióxido de carbono foi para os tratamentos AL e OS (24,6% e 25,0%), respectivamente. A produção de óxido nitroso não foi afetada pelos tratamentos (Tabela 2).

Houve efeito ($P < 0,0001$) dos tempos (horários) de incubação para a produção de metano, dióxido de carbono e óxido nitroso, onde a produção foi incrementada no tempo. Para todos os gases avaliados, as maiores produções de gás acumulada foram nos tempos 24:00 e 36:00 horas, sendo entre eles similares estatisticamente, com 16,7% e 22,72% para o metano, 38,7% e 44,0% para o CO₂ e de 0,56% e 0,68% para o N₂O, respectivamente (Tabela 2). Na interação tratamentos vs horário, não houve efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos no respectivo horário em relação à produção de CH₄, CO₂ e N₂O (Figura 3)

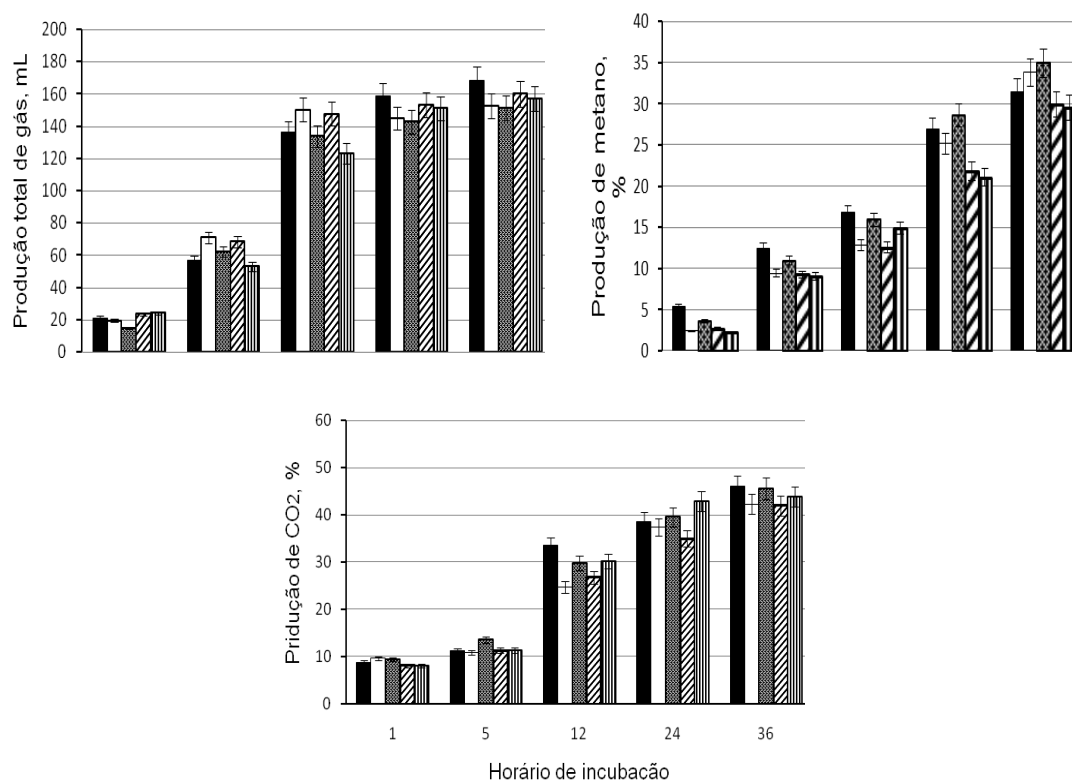


Figura 3. Produção total de gás (mL), produção de metano (mL), e produção de dióxido de carbono (%) *in vitro*, em diferentes tempos de incubação, contendo dietas com diferentes fontes de lipídios em associação com glicerina. CO: Dieta controle (■); OS: Dieta com óleo de soja (□); GP: dieta com gordura protegida (▨); AL: Dieta com ácido linoléico (▧); ALN: Dieta com ácido linolenico (▩).

3.2 Análises de ácidos graxos

O perfil e as quantidades dos ácidos graxos no conteúdo das garrafas incubadoras dos diferentes tratamentos no tempo 0:00 (*t*₀) são apresentados na Tabela 3. Os análises do *t*₀ foram feitas incluindo o líquido ruminal na garrafa para não subestimar os valores ao longo dos tempos. As garrafas com os tratamentos AL e ALN, possuíram maior quantidade do C18:2n-6 e C18:3n-9 respectivamente, já que a fonte fornecida foi o ácido graxo em forma pura para o respectivo tratamento. A dieta CO, apresentou a menor quantidade de ácidos graxos totais, que correspondeu ao menor extrato etéreo na formulação da dieta (Tabela 1).

Os perfis e a quantidade de ácidos graxos de dezoito carbonos formados durante o período de incubação são apresentados na Figura 4. Apresentou-se efeito ($P < 0,05$) do tratamento na concentração do ácido esteárico C18:0, nos

horários de incubação e na interação horários por tratamento, observa-se claramente um incremento da produção do ácido esteárico no longo do tempo para todos os tratamentos (Figura 4). Para a produção de ácido esteárico C18:0 no horário das 36:00 horas a maior produção foi para os tratamentos AL, ALN e OS (76,51 mg/L, 72,79 mg/L e 54,79 mg/L), respectivamente, e com menor valor para os tratamentos CO e GP (39,21 mg/L e 39,40 mg/L). (Tabela 4 e Figura 4). Em geral o ácido esteárico aumentou com o tempo de incubação em todos os tratamentos. Independente do tratamento a concentração do ácido esteárico depois do horário das 24:00 horas a produção não tem diferenças (Tabela 5).

A produção do ácido oleico C18:1n-9c foi influenciada ($P < 0,05$) pelos tratamentos (Tabela 4 e Tabela 5). As concentrações no tratamento CO e OS são irregulares nos diferentes horários, mesmo assim, a maior concentração foi para o tratamento OS nos horários 5:00 e 12:00 horas (70,38 mg/L e 77,61 mg/L), respectivamente (Tabela 4 e Figura 3). O tratamento GP apresenta uma diminuição na sua concentração do C18:1n-9c ao longo do tempo, e os tratamentos AL e ALN um efeito contrário (Tabela 4 e Figura 3). A concentração do ácido oleico teve efeito ($P < 0,05$) dos horários, as menores concentrações foram nos tempos 1:00 e 24:00 horas (28,7 mg/L e 29,9 mg/L), respectivamente, e com maiores concentrações nos horários 0:00, 5:00, e 36:00 horas com valores (36,3 mg/L, 32,1 mg/L e 30,2 mg/L), respectivamente (Tabela 5), está diferenças nas concentrações nos horários podem indicar sua sínteses quando incrementa, e indica metabolização quando diminui (Tabela 5).

Para o ácido linoléico C18:2n-6c, no horário das 36:00 horas apresentou-se diferenças ($P < 0,05$), onde a maior concentração foi para os tratamentos GP e OS com valores (93,80 mg/L e 76,54 mg/L), seguidos com uma menor concentração os tratamentos ALN, AL, e CO com valores (48,95 mg/L; 37,59 mg/L; e 28,60 mg/L), respectivamente. (Tabela 4). Para o ácido linolenico C18:3n-9c no horário das 36:00 horas apresentou-se diferenças ($P < 0,05$), onde a maior concentração foi para o tratamento ALN (21,86 mg/L), seguida dos tratamentos AL, GP e OS com valores (4,18 mg/L; 3,85 mg/L; e 3,14 mg/L), respectivamente e com o menor valor para o CO (1,30 mg/L). As

diminuições nas concentrações no longo do tempo indicam uma saturação dos ácidos insaturados (metabolização) (Tabela 4).

Tabela 3. Perfil e quantidade dos ácidos graxos encontrados nas garrafas incubadoras para o tempo t_0 de acordo a dieta em mg/L em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliada *in vitro*.

Ácido graxos	Tratamentos ¹				
	CO	OS	GP	AL	ALN
Ácidos graxos totais	220,97	346,70	334,40	334,43	337,57
$\Sigma \leq C15$	30,43	29,81	26,32	26,35	29,95
C16:0 (Palmítico)	28,24	28,74	25,37	25,37	26,92
16:1 cis-9 (Palmitoléico)	2,81	2,52	1,94	1,94	2,23
C17:0 (Margarico)	4,47	4,22	3,55	3,55	4,24
C18:0 (Estearico)	8,77	12,08	12,34	12,34	11,20
18:1 cis-6 (Petroselênico)	1,87	1,80	2,11	2,11	1,51
18:1 trans-6 (Octadecenoico)	5,47	3,58	2,88	2,88	3,04
18:1 trans-9 (Octadecenoico)	4,58	18,34	12,82	12,82	2,29
18:1 cis-9 (Oléico)	37,70	59,75	58,22	14,08	11,63
18:1 trans-11 (vaccênico)	4,69	8,69	10,33	10,33	10,42
18:2 cis-6, cis-12 (linoléico)	63,41	141,62	147,47	197,69	77,52
18:3 cis-9, cis-12, cis-15 (Linolenico)	9,71	12,46	13,46	12,94	122,48
$\Sigma \geq C20$	18,82		17,57	17,57	34,12

¹CO: Dieta controle; OS: Dieta com óleo de soja; GP: dieta com gordura protegida. AL: Dieta com ácido linoléico; ALN: Dieta com ácido linolenico.

As concentrações do ácido linoléico e linolenico tiveram efeito ($P < 0,05$) pelos horários, e suas concentrações diminuíram no longo do tempo (Tabela 5). Relacionando as concentrações do tempo 0:00 horas (concentração inicial) e o tempo 36:00 horas (concentração final) as diminuições em média na concentração foram de 54,1% e 79,9% para o linoléico e linolenico, respectivamente (Figura 5 e Tabela 5), indicando uma alta metabolização com uma saturação mais intensa para o ácido linolenico. Em geral, as diminuições nas suas concentração representam a saturação destes ácidos insaturados para ser transformados possivelmente em ácido esteárico. As diminuições do ácido linoléico e linolenico ao longo do tempo foram muito mais definidas que comparados com o ácido oleico (Tabela 4 e Figura 4).

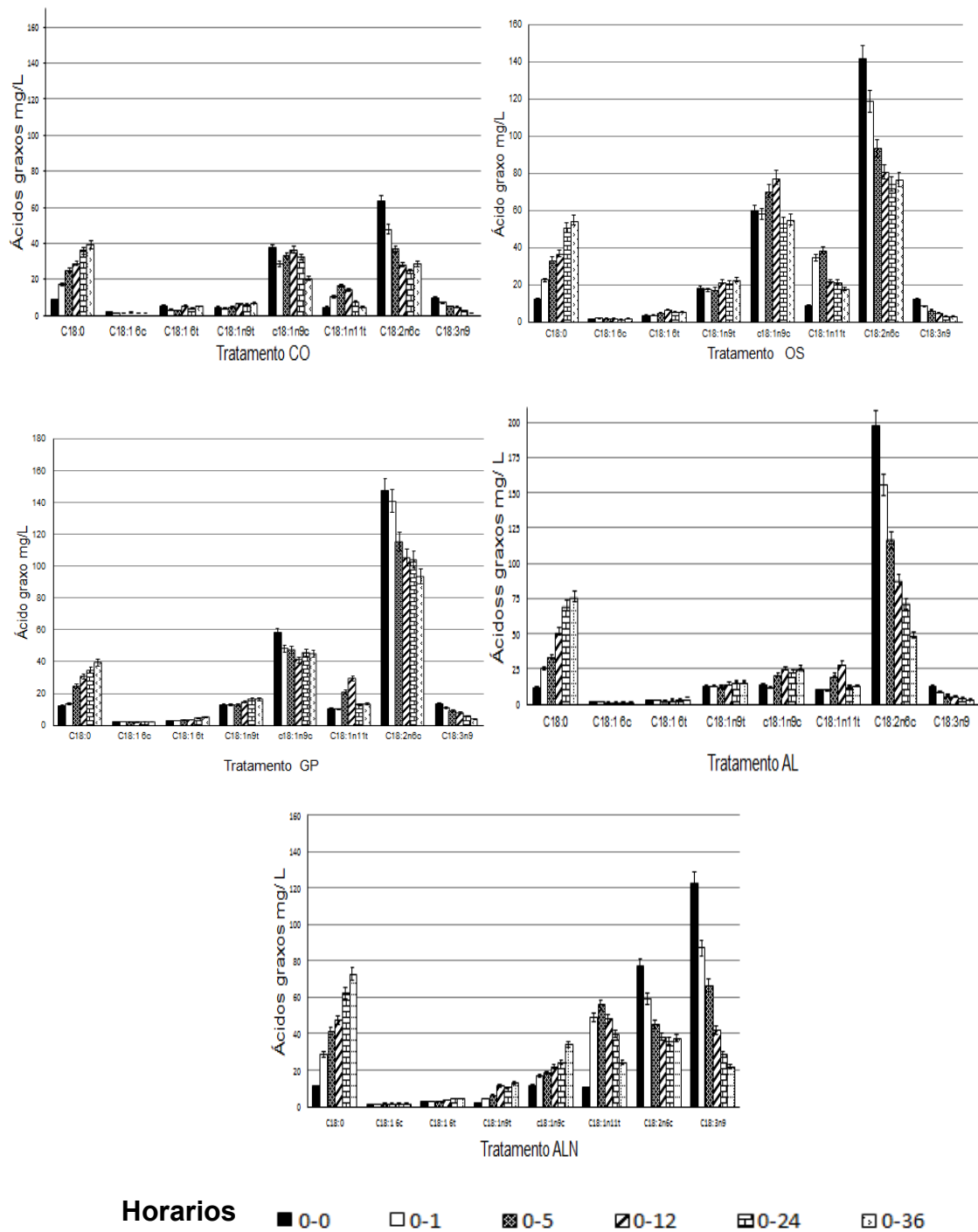


Figura 4. Perfil e quantidade de ácidos graxos de dezoito carbonos formados durante o período de incubação, em dietas com diferentes fontes de lipídios em associação com glicerina avaliadas *in vitro*. CO: Dieta controle; OS: Dieta com óleo de soja; GP: Dieta com gordura protegida; AL: Dieta com ácido linoléico puro; ALN: Dieta com ácido linolenico puro.

Tabela 4. Efeito da interação dos tratamentos nos horários em relação as concentrações médias (mg/L) da produção de ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9c), ácido linoléico (C18:2n6c) e ácido linolenico (C18:3n9c) em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliadas *in vitro*.

Itens	Horários					
	0	0-1	0-5	0-12	0-24	0-36
Tm.	C18:0					
CO	8,77b	17,04a	25,08b	28,99b	35,89b	39,21c
OS	12,51a	22,51a	33,45ab	36,98b	50,76a	54,70ab
GP	12,46a	13,46b	24,66b	30,77b	34,62b	39,40c
AL	11,87a	25,15a	33,86ab	51,98 ^a	69,82a	76,51a
ALN	11,19a	28,61a	41,57a	47,50 ^a	62,23a	72,79a
EPM	2,5711	2,5711	2,5711	2,5711	2,5711	2,5711
P-valor	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	C18:1n-9c					
CO	37,70b	28,85b	32,98b	36,38b	32,17ab	20,46b
OS	59,75a	57,97a	70,38a	77,61 ^a	53,37a	55,16a
GP	58,22a	48,16a	47,55b	40,99b	45,76a	44,83a
AL	14,08c	11,78c	21,36c	25,31bc	23,66b	26,30b
ALN	11,63c	16,60c	18,35c	22,17c	24,41b	34,20ab
EPM	3,1844	3,1844	3,1844	3,1844	3,1844	3,1844
P-valor	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	C18:2n-6c					
CO	63,42c	47,84b	36,80b	28,16c	24,69c	28,60c
OS	141,62b	118,67a	93,60a	80,73b	74,34b	76,54a
GP	147,47b	140,93a	115,58a	105,38 ^a	104,10a	93,80a
AL	197,69a	155,70a	116,62a	87,71b	71,48b	48,95b
ALN	77,52c	58,99b	45,07b	38,28c	36,27c	37,59bc
EPM	5,9012	5,9012	5,9012	5,9012	5,9012	5,9012
P-valor	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	C18:3n-9c					
CO	9,71b	7,03b	5,05b	4,66b	3,03b	1,30c
OS	12,46b	8,53b	6,43b	5,16b	3,39b	3,14b
GP	13,46b	11,00b	9,08b	7,86b	5,75b	3,85b
AL	12,94b	8,54b	6,82b	6,09b	5,25b	4,18b
ALN	122,48a	87,22a	66,56a	42,07 ^a	28,58a	21,86a
EPM	1,3744	1,3744	1,3744	1,3744	1,3744	1,3744
P-valor	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001

CO: Dieta controle; OS: Dieta com óleo de soja; GP: dieta com gordura protegida, AL: Dieta com ácido linoléico; ALN: Dieta com ácido linolenico. EPM: Erro padrão da média; P-valor: Significâncias estatísticas, Médias não seguidas pela mesma letra diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 5. Efeito dos horários de incubação em relação as concentrações (mg/L) dos ácido palmítico (C16:0) e ácidos graxos com dezoito carbonos em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliadas *in vitro*.

Itens	Horários (h)						EPM	P-valor
	0	1	5	12	24	36		
AG total	314,4	310,1	304,3	307,4	306,3	302,1	7,2026	NS
C16:0	27,0b	26,0b	25,6b	28,2ab	30,5 ^a	30,5a	1,8558	0,0373
C18:0	11,2c	21,3bc	31,7b	39,2b	50,7 ^a	56,5a	1,4251	<,0001
C18:1n-9c	36,3a	28,7b	32,1a	36,59a	29,9b	30,2a	1,7264	0,0079
C18:1n-9t	8,06b	11,35b	13,4ab	16,2a	17,10 ^a	18,3a	0,6582	<,0001
C18:1n-6c	1,79	1,78	1,76	1,97	1,88	1,83	0,1132	NS
C18:1n-6t	3,74b	6,12b	6,49b	7,96a	8,03 ^a	8,03a	0,7462	0,0019
C18:1n-11	9,04b	33,4 ^a	37,6a	32,3a	21,5b	16,8b	2,1876	<,0001
C18:2n-6c	125,5a	104,4 ^a	81,5ab	68,05b	62,2b	57,1b	3,0757	<,0001
C18:3n-9c	34,2a	24,46 ^a	18,79b	13,17b	9,20c	6,87c	0,6232	<,0001

¹CO: Dieta controle; OS: Dieta com óleo de soja; GP: dieta com gordura protegida. AL: Dieta com ácido linoléico; ALN: Dieta com ácido linolenico. ²EPM: Erro padrão da média; P-valor:Significância estatística. Médias não seguidas pela mesma letra diferem ($P<0,05$) pelo teste de Tukey.

A produção do ácido vaccênico C18:1n-11 foi afetada ($P<0,05$) pelos horários de inoculação, com as maiores concentrações para os horários 1:00, 5:00, e 12:00 horas (33,4 mg/L; 37,6 mg/L; e 32,3 mg/L), respectivamente (Tabela 5) indicando sua sínteses e metabolização. Houve desaparecimento e aparecimentos nos diferentes horários do ácido vaccênico para todos os tratamentos, e apresentou diferenças ($P<0,05$) dos tratamentos no respectivo horários (Tabela 6), indicando uma ativa metabolização e síntese. Na Figura 4, pode-se apreciar melhor o efeito das variações nas concentrações no tempo.

Outros intermediários trans da biohidrogenação são formados, como o C18:1n-9t com diferenças significativas entre tratamentos ($P<0,05$), mas sua produção foi incrementado ao logo do tempo (Tabela 5); para o trans C18:1n6t não houve efeitos entre os tratamentos ($P>0,05$), mas apresentou efeito nos horários de incubação ($P<0,05$), suas maiores produções forma após do horário das 12:00 horas (Tabela 5 e Figura 4); e para o ácidos C18:1n6c não foram encontradas efeito ($P>0,05$) pelos horários (Tabela 5) .

A taxa de formação do ácido esteárico e o ácido vaccênico teve efeito dos horários ($P<0,05$), apresentando aparecimentos e desaparecimentos do

ácido graxo, as maiores taxas de formação (%h) foram nas primeiras 5 horas (Tabela 7), estou por uma maior disponibilidade de substrato nos primeiros horários para ser transformado. Houve efeitos ($P < 0,05$) dos tratamentos nos respectivos horários na taxa de formação do ácido esteárico (Tabela 8), para o tratamento GP apresenta a menor taxa de formação nos horários 1:00 e 5:00 horas (1,12%h e 2,46%h), indicando uma menor saturação pelo fato de estar protegido; e a maior taxa de formação foram para os tratamentos OS, AL e ALN (10,4%h, 11,6%h e 17,42%h), respectivamente, pelo fato de estar mais disponível para as bactérias.

Tabela 6. Efeito da interação dos tratamentos nos horários em relação as concentrações médias (mg/L) da produção de ácido vaccênico (C18:1-tras-11) em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliadas *in vitro*.

Itens	Horários					
	0	1	5	12	24	36
CO	4,69c	10,54c	16,33c	13,99c	7,80d	4,55d
OS	8,68b	34,51c	38,69b	21,96b	21,64b	17,90b
GP	10,33a	10,15d	20,89c	29,20b	13,06c	13,47b
AL	11,10a	63,15a	56,31a	48,18a	25,40b	24,21 ^a
ALN	10,43a	48,81b	55,97a	48,11a	39,83a	24,10 ^a
EPM	3,5150	3,5150	3,5150	3,5150	3,5150	3,5150
P-valor	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001

CO: Dieta controle; OS: Dieta com óleo de soja; GP: dieta com gordura protegida, AL: Dieta com ácido linoléico; ALN: Dieta com ácido linolenico. EPM: Erro padrão da média; P-valor: Significâncias estatísticas, Médias não seguidas pela mesma letra diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A maior taxa de formação (%h) do ácido vaccênico no horário da 1:00 hora foi para os tratamentos AL e ALN (52,06%h e 38,38%h), respectivamente, seguidos dos tratamentos OS e CO (25,82%h e 5,85%h); e com valor negativo (-0,17%h) para o tratamento GP, indicando o menor processo de formação e metabolismo do vaccênico nas primeiras horas de incubação, no entanto, apresentando valores positivos nos demais horários, indicando uma hidrólise dos lipídios no longo do tempo, além da gordura estar protegida no tratamento (Tabela 8).

Tabela 7. Efeito dos horários na formação de ácido esteárico, vaccênico e a taxa e eficiência da biohidrogenação do ácido oleico, linoléico e linolenico em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliada *in vitro*.

Itens	Horários (h)					EPM	P-valor
	0-1	0-5	0-12	0-24	0-36		
Taxa de formação (%h)							
C18:0	9,76a	4,09b	2,33c	1,64c	1,64c	0,2633	<,0001
C18:1n-11	24,4a	5,71b	1,93c	0,52c	0,22c	0,8734	<,0001
Taxa de biohidrogenação (%h)							
C18:1n-9c	3,60	-0,36	-0,35	0,02	0,01	0,6823	0,0004
C18:2n-6c	21,1a	8,80b	4,79bc	2,64c	1,90c	1,1575	<,0001
C18:3n-9c	9,75a	3,08b	1,75c	1,04c	0,76c	0,2292	<,0001
Eficiência da biohidrogenação							
C18:1n-9c	2,79	-21,31	-34,83	-27,75	-42,04	10,90	0,0561
C18:2n-6c	18,26c	36,1b	46,75a	51,14 ^a	53,0a	2,8315	<,0001
C18:3n-9c	27,95c	44,47b	54,03b	66,82 ^a	76,30a	2,1879	<,0001

¹CO: Dieta controle; OS: Dieta com óleo de soja; GP: dieta com gordura protegida. AL: Dieta com ácido linoléico; ALN: Dieta com ácido linolenico. ²EPM: Erro padrão da média; P-valor: Significância estatística. Médias não seguidas pela mesma letra diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A taxa de biohidrogenação (%h) e a eficiência da biohidrogenação para o ácido oleico apresenta diferenças ($P < 0,05$), com uma diminuição (desaparecimento) e aumento nos diferentes tempos de incubação indicando sua alta participação metabólica no processo da biohidrogenação na formação do ácido esteárico (Tabela 7); Houve efeito ($P < 0,05$) dos tratamentos nos diferentes horários de incubação na taxa de biohidrogenação, sendo maior nas duas primeiras horas (Tabela 9) mantendo a mesma situação de um enriquecimento e uma metabolização do ácido graxo. Entretanto, não houve diferenças ($P > 0,05$) dos tratamentos nos horários de incubação em relação á eficiência da biohidrogenação (Tabela 10), mas, observando uma ativa metabolização do ácido oleico, indicado pelos aparecimentos e desaparecimentos do ácido graxo, registrando até valores negativos. Estes valores negativos na taxa e a eficiência demonstram que, no momento da avaliação os valores do ácido insaturados aumentaram em relação aos valores originais, afetando a eficiência da biohidrogenação, onde a concentração final foi muito menor que a concentração inicial, e fazendo que sua permanência seja muito instável no ambiente. As maiores transformações do ácido oleico foi

apresentado para os tratamentos AL e ALN, possivelmente por ser fornecidos puros (Tabela 10).

Tabela 8. Efeito dos tratamentos em seus repetitivos horários na taxa de formação do ácido esteárico e o ácido vaccênico em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliada in vitro.

Itens	Horários				
	0-1	0-5	0-12	0-24	0-36
Taxa de formação C18:0 (%h)					
CO	8,27b	3,26ab	1,69b	1,13b	0,85b
OS	10,4ab	4,27ab	2,07b	1,61b	1,19b
GP	1,12c	2,46c	1,53b	0,93b	0,75b
AL	11,6ab	4,40ab	3,34a	2,42a	1,80a
ALN	17,42a	6,07a	3,02a	2,12a	1,72a
EPM	0,5888	0,5888	0,5888	0,5888	0,5888
P-valor	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
Taxa de formação C18:1 n 11					
CO	5,85c	2,33c	0,77b	0,13c	-0,003b
OS	25,82b	6,00b	1,12b	0,54b	0,26a
GP	-0,17d	2,11c	1,57b	0,11c	0,09b
AL	52,06a	9,04a	3,09a	0,60b	0,36a
ALN	38,38a	9,11a	3,14a	1,23a	0,38a
EPM	1,5912	1,5912	1,5912	1,5912	1,5912
P-valor	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001

¹CO: Dieta controle; OS: Dieta com óleo de soja; GP: dieta com gordura protegida. AL: Dieta com ácido linoléico; ALN: Dieta com ácido linolenico. ²EPM: Erro padrão da média; P-valor: Significância estatística. Médias não seguidas pela mesma letra diferem (P<0,05) pelo teste de Tukey.

A taxa de biohidrogenação (%h) para o ácido linoléico e ácido linolenico teve efeito (P<0,05) dos horários (Tabela 7), a taxa vai diminuindo no longo do tempo pela falta de disponibilidade de substrato, a maior taxa foi no horário da 1:00 hora com 21,1%h e 9,75%h para o ácido linoléico e ácido linolenico, respectivamente; no entanto, a eficiência da biohidrogenação vai incrementando no longo do tempo, que para no final da inoculação no tempo das 36:00 horas foi de 53,0% para o ácido linoléico e de 76,3% para o ácido linolenico. Indicando que a saturação vai depender do tempo de permanência do lipídeo no ambiente ruminal, a maior tempo de permanência no ambiente maior saturação, e, também, pode-se observar que a saturação é mais intensa no ácido linolenico, onde a eficiência da biohidrogenação está em função do grado de insaturação (Tabela 7).

A taxa de biohidrogenação (%h) para o ácido linoléico e o ácido linolênico foi afetada ($P < 0,05$) pelos tratamentos nos seus respectivos horários (Tabela 9). No horário da 1:00 hora a maior taxa de biohidrogenação para o ácido linoléico foi para o tratamento AL (41,99%h) e com um menor valor para o tratamento GP (6,54%h), para o ácido linolênico foi para o tratamento ALN (35,27%h) e com menor taxa para os tratamentos AL, OS e GP (4,40%h, 3,93%h e 2,47%h), a taxa de biohidrogenação está em relação à disponibilidade dos ácidos graxos no ambiente e é mais intensa nas primeiras horas de incubação (Tabela 9).

A eficiência da biohidrogenação para o ácido linoléico foi afetada ($P < 0,05$) pelos tratamentos nos seus respectivos horários (Tabela 10). Pode-se observar para o final do período de incubação no horário 36h, os tratamentos AL e ALN foram os que apresentaram a melhor eficiência de biohidrogenação com 75,36% e 61,92%, respectivamente (Tabela 10), e o tratamento OS apresenta a maior eficiência da biohidrogenação (46,071%) que o tratamento GP (36,367%). O tratamento com gorduras protegidas (GP) apresentou uma maior eficiência de biohidrogenação para o ácido linoléico a partir do horário das 5:00 horas, eficiência que vai incrementando até o no final do período de incubação, indicando uma atividade metabólica no longo do tempo, além que a fonte foi protegida (Tabela 10). A eficiência da biohidrogenação para o ácido linolênico não foi afetado ($P > 0,05$) pelos tratamentos nos seus respectivos horários (Tabela 10), observando que o ácido linolênico nas dietas apresentou uma alta eficiência da biohidrogenação, que em média para o final da incubação foi de 76,30% (Tabela 10).

Tabela 9. Efeito dos tratamentos na taxa de biohidrogenação do ácido oleico, ácido linoléico e ácido linolenico com relação aos horários em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliada *in vitro*.

Itens	Horários				
	0-1	0-5	0-12	0-24	0-36
Taxa de biohidrogenação C18:1n9c					
CO	8,85	0,94	0,11	0,23	0,48
OS	1,78	-2,12	-1,49	0,27	0,13
GP	10,06	2,13	1,44	0,52	0,37
AL	2,30	-1,45	-0,93	-0,40	-0,34
ALN	-4,97	-4,97	-4,97	-4,97	-0,63
EPM	1,5257	1,5257	1,5257	1,5257	1,5257
P-valor	0,0053	0,0053	0,0053	0,0053	0,0053
Taxa de biohidrogenação C18:2n-6c (%h)					
CO	15,58b	5,32b	2,94b	1,62b	0,97b
OS	22,95b	9,61b	5,08b	2,80ab	1,81b
GP	6,54c	6,38b	3,51b	1,81c	1,49b
AL	41,99a	16,21a	9,16a	5,26a	4,13a
ALN	18,53b	6,49b	3,27b	1,72b	1,11b
EPM	2,5883	2,5883	2,5883	2,5883	2,5883
P-valor	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002
Taxa de biohidrogenação C18:3n-9c (%h)					
CO	2,68b	0,93b	0,42b	0,28b	0,24b
OS	3,93b	1,21b	0,61b	0,38b	0,26b
GP	2,47b	0,88b	0,47b	0,32b	0,27b
AL	4,40b	1,22b	0,57b	0,32b	0,24b
ALN	35,27a	11,19a	6,70a	3,91a	2,80a
EPM	0,5125	0,5125	0,5125	0,5125	0,5125
P-valor	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001

CO: Dieta controle; OS: Dieta com óleo de soja; GP: dieta com gordura protegida, AL: Dieta com ácido linoléico; ALN: Dieta com ácido linolenico. EPM: Erro padrão da média; P-valor: Significâncias estatísticas, Médias não seguidas pela mesma letra diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 10. Efeito dos tratamentos na eficiência da biohidrogenação do ácido oleico, ácido linoléico e ácido linolenico em dietas com óleo de soja em associação com glicerina avaliada in vitro.

Itens	Horários				
	0-1	0-5	0-12	0-24	0-36
Eficiência da biohidrogenação C18:1n-9c					
CO	23,60	12,57	3,76	14,65	45,72
OS	3,02	-17,88	-30,00	10,81	7,71
GP	16,98	18,37	29,44	21,36	22,90
AL	16,93	-55,53	-78,31	-69,75	-91,54
ALN	-46,59	-64,09	-99,05	-115,83	-194,99
EPM	24,3757	24,3757	24,3757	24,3757	24,3757
P-valor	0,0599	0,0599	0,0599	0,0599	0,0599
Eficiência da biohidrogenação C18:2n-6c					
CO	24,76a	42,02a	55,73a	61,14a	54,97b
OS	16,27a	33,93ab	43,12a	47,51a	46,07b
GP	4,40b	21,62b	28,57b	29,37b	36,36c
AL	21,16a	40,99a	55,62a	63,93a	75,36a
ALN	24,19a	42,13a	60,79a	53,72a	61,92a
EPM	5,5169	5,5169	5,5169	5,5169	5,5169
P-valor	0,0378	0,0378	0,0378	0,0378	0,0378
Eficiência da biohidrogenação C18:3n-9c					
CO	27,16	48,23	51,66	68,30	86,10
OS	30,85	48,32	58,38	72,35	74,29
GP	18,48	32,59	41,60	57,37	71,41
AL	34,47	47,49	52,86	59,37	67,55
ALN	28,79	45,66	45,66	76,66	82,15
EPM	4,8923	4,8923	4,8923	4,8923	4,8923
P-valor	0,3652	0,3652	0,3652	0,3652	0,3652

CO: Dieta controle; OS: Dieta com óleo de soja; GP: dieta com gordura protegida, AL: Dieta com ácido linoléico; ALN: Dieta com ácido linolenico. EPM: Erro padrão da média; P-valor: Significâncias estatísticas, Médias não seguidas pela mesma letra diferem ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

4 DISCUSSÃO

4.1 Produção de gases

Os resultados indicam que lipídios ou ácidos graxos em associação com glicerina estando disponíveis no ambiente ruminal afetam a produção de gases, em quantidade. Dietas com óleo de soja, e com ácidos linoléico puro (99,0% de pureza) produzem um a maior quantidade de gás, no entanto, apresentaram menor porcentagem na emissão do metano (16,7% e 15,2%), respectivamente, e uma menor produção de CO₂ (25,0% e 24,6%), respectivamente, mantendo

uma menor proporção CH₄:CO₂. E as maiores porcentagem na produção de metano e CO₂ foi para o tratamento controle (CO) e o tratamento com gordura protegida (GP), com valores para metano de (18,6% e 18,8%), respectivamente, e com a similar a porcentagem para o CO₂ (27,6%). Podendo concluir que a diminuição do metano e CO₂ está em função da disponibilidade do óleo no ambiente ruminal. Confrontando com o conceito de Van Soest (2004) e Jenkins (2008) que a proporção dos gases produzidos na fermentação ruminal é decorrente de vias metabólicas específicas e de microrganismos específicos em condições ruminais determinadas e seu metabolismo vai depender da forma de como o alimento é fornecido.

Os resultados *in vitro* do presente estudo mostram que o uso de óleos não protegidos (óleo de soja, ácido linoléico e ácido linolenico) em associação com glicerina (100 g/kg MS) na dieta para ruminantes diminuiu parcialmente a produção de metano em 15,25% quando comparada com a dieta controle (CO) sem gordura adicional, e de 15,41% quando comparada com a dieta contendo gordura protegida (GP). Conseqüentemente, o uso de gorduras protegidas em associação com glicerina não causou alterações na produção do metano quando comparada com o controle, sem destacar um efeito claro da glicerina na redução do metano quando usada com uma gordura protegida. No entanto, resultados de Castagnino et al. (2015) quando avaliaram dietas com fontes de lipídeos (óleo de soja e óleo de linhaça) associados ou não com glicerina, onde eles concluírem que o glicerol em associação com glicerina não sustenta ser uma fonte eficaz como uma estratégia nutricional para reduzir a produção de metano, já que mesmo dietas na ausência de glicerol as concentrações de metano foram significativamente similares para no caso das dietas com linhaça e controle com e sem e glicerina, onde a adição de glicerol diminuiu as concentração de metano somente para a dieta com óleo de soja com glicerina em (7,6% metano/g MS) quando comparada da dieta óleo de soja sem glicerina.

Estudos *in vivo* (SILVA, 2013) relatam que a emissão de metano entérico não foi afetada ($P>0,05$) pela associação de glicerina com óleo de soja, soja grão e gordura protegida em dietas para novilhos Nelores com valores de 137,0 gCH₄/dia; 135,0 gCH₄/dia e 110,0 gCH₄/dia respectivamente, comparados com a dieta controle com um valor de 133,0g CH₄/dia. Estudos *in*

vitro de (EDWARDS et al., 2012) indicam que o glicerol adicionado inibe a lipólise, quando 6% ou 20% diminuem a liberação dos ácidos graxos livres em 80% e 86%, respectivamente até às 48 horas de incubação. Segundo Loo et al. (2004) e Jenkins et al (2008) a baixa disponibilidade de ácidos graxos insaturados livres no rumen afetam a eficiência da biohidrogenação disponibilizando H^+ no rumen para a formação de metano. Que pode ser uma das explicações dos resultados da diminuição parcial na produção de metano em dietas com óleo no protegido em associação com glicerina obtidas no presente experimento.

Também, deve-se levar em consideração, a influência do pH no líquido ruminal, onde as bactérias metanogênicas são pH sensitivas, afetando a metanogênese e reduzindo a produção de metano no ambiente ruminal (Van SOEST, 1994). Isto também pode ter contribuído para a diminuição da produção do metano no presente experimento, considerando que o pH foi reduzido a valores menores de 6,3 após das 12 horas de incubação.

Considerando os resultados do presente trabalho referente à produção de metano, o uso óleo de soja na forma não protegida em associação com glicerina pode ser uma alternativa viável para conseguir redução das emissões de metano em dietas para ruminantes, e que juntamente com a eficiência alimentar (Van SOEST, 1994; PEDREIRA et al., 2013) e, fatores intrínsecos aos animais como suas características genéticas e a microbiologia ruminal (HAMMOND et al., 2008), podem ajudar na diminuição parcial nas emissões de metano de origem entérico, contribuindo em parte para ter uma produção de gado sustentável.

4.2 Perfil e cinética dos ácidos graxos

As concentrações do ácido oleico C18:1n-9c aumentaram nas primeiras 12 horas de incubação, para depois diminuir nos tempos 24:00 e 36:00 horas de incubação. As concentrações do ácido linoléico e o ácido linolenico, diminuiram com o tempo, e o percentual de ácido esteárico aumentou e a concentração de intermediários da biohidrogenação aumentou nas primeiras 12 horas de incubação, diminuindo sua disponibilidade após esse período. As quantidades de ácido vaccênico foram incrementadas nas primeiras 5 horas para depois diminuir ao longo do tempo.

Do outro lado, as concentrações dos diferentes ácidos de 18 carbonos avaliados foram modificadas pela dieta. As maiores concentrações para o ácido esteárico C18:0 foram para as dietas OS, AL e ALN (54,70 mg/L, 76,51 mg/L, e 72,79 mg/L), respectivamente, provocado pelas saturações dos ácidos oleico, linoléico e linolenico presentes nas dietas, e com menor formação de ácido esteárico para os tratamentos CO e GP (39,21 mg/L e 39,40 mg/L), que fica esclarecido por sua menor taxa de biohidrogenação em especial nas primeiras 5 horas de incubação, provocando uma menor produção do ácido esteárico no final da incubação, por a uma menor disponibilidade dos ácidos graxos insaturados para serem biohidrogenados.

Segundo Jenkins et al. (2008) e Kozloski (2011), as gorduras protegidas em forma de sais de cálcio são uma fonte de ácidos graxos insaturados indisponíveis para as enzimas bacterianas calcificadas como inerte no ambiente ruminal. Mas, alguns ácidos graxos podem estar disponíveis às bactérias e sendo parcialmente hidrogenados no rumen (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1988), o fato que explica o aumento da concentração do ácido esteárico encontrado no presente experimento em dietas que levaram à gordura protegida.

Dentro do processo da biohidrogenação do ácido linoléico e o ácido linolenico está a formação de vários isômeros, destacando o ácido vaccênico C18:1n trans-11 indispensável para a síntese *de novo* (PIPEROVA et al., 2002; JENKINS et al., 2008). Os resultados mostraram que a formação do ácido vaccênico se manteve aumentada em 269,47% na primeira hora de incubação e com pouca variação no longo do tempo. Segundo Bauman et al. (1999) a velocidade com que o ácido vaccênico é reduzido a ácido esteárico é lenta comparada com suas etapas de formação em passos prévios, permitindo maior acúmulo no rumen, e o fluxo para o intestino e ser absorvido, permitindo maior síntese *de novo* do ácido linoléico conjugado no tecido por está rota, sendo esta rota de maior fonte do ácido linoléico conjugado nos ruminantes, (BAUMAN et. al., 1999; JENKINS et al., 2008).

A menor produção do ácido vaccênico em média na primeira hora de incubação foi para as dietas GP e CO (10,15 mg/L e 10,54 mg/L), respectivamente, sustentada com a menor taxa de formação, seguida da concentração da dieta OS (34,51 mg/L) e com uma maior concentração para as

dietas dos tratamentos AL e ALN (63,15 mg/L e 48,81 mg/L), respectivamente. A produção do ácido vaccênico foi favorecida nas dietas AL, ALN e OS comparada com GP, pois os ácidos graxos estão mais disponíveis para serem biohidrogenados, como foi explicado anteriormente. Onde o fornecimento de óleo de soja não protegido em dietas para ruminantes garante uma maior formação e disponibilidade de ácido vaccênico.

Observou-se um incremento nas concentrações do ácido C18:1n-9t e do ácido C18:1n-6t. Esta formação pode ter ocorrido pela biohidrogenação do ácido oleico, onde sua concentração no presente experimento foi diminuída no longo do tempo. Segundo Mosley et al. (2002), para o caso do ácido oleico não ocorre somente a biohidrogenação para o ácido esteárico, se não que também forma numerosos isômeros trans. Laverroux et al. (2011), utilizando [C¹³] C18:1-trans *in vitro* em líquido ruminal de ovelhas, encontraram C¹³ enriquecido em ácido esteárico, isômeros cis e trans do C18:1, ácido linoléico, ácido linolenico e em ácido palmítico. Confirmando que a rota do ácido oleico não ocorre somente a formação de ácido esteárico como é citado em literatura, e que não estão esclarecidas ainda.

Os valores negativos na taxa e a eficiência da biohidrogenação para o ácido oleico C18:1n-9c nos tratamentos OS, AL e ALN, indicam que apresentaram um desaparecimento (metabolização) e aparecimento (formação) do ácido em alguns horários, como intermediário na formação principalmente do ácido esteárico. O desaparecimento se justifica pela saturação no processo da biohidrogenação, mas o aparecimento do ácido oleico pode se entender como se houvesse formado ou sintetizando o ácido graxo, mas ainda não se pode comprovar este processo neste trabalho.

As maiores taxas de biohidrogenação ocorreram para o ácido linoléico e o ácido linolenico no horário da 1:00, com 21,1%h e 9,75%h, respectivamente, diminuindo consideravelmente no horário das 5:00 horas, passando para 8,80%h e 3,03%h no horário das 5:00 horas, respectivamente. A baixa taxa de biohidrogenação do ácido linoléico no tratamento GP (6,54%h) na primeira hora se justifica pela fato de estar protegidas diminuindo a disponibilidade no ambiente ruminal do ácido graxos para ser biohidrogenado. Estes valores são menores quando comparados a outros trabalhos, mas justificada pela diferentes condições dos tratamentos. Moate et al. (2004) estimaram taxa

média de biohidrogenação *in vitro* dos ácidos linoléico e linolenico em 88% e 244% por hora, respectivamente. Indicando que o processo da biohidrogenação é um processo rápido, e que se justifica pelo fato da toxicidade dos ácidos graxos insaturados para as bactérias, estando relacionada à natureza anfipática, ou seja, aqueles que são solúveis, tanto em solventes orgânicos como em água, são mais tóxicos (JENKIS et al., 2008). Portanto, como um mecanismo de defesa a biohidrogenação torna-se um evento muito importante no rumen

Com respeito à eficiência da biohidrogenação do ácido linoléico e linolenico, a maior eficiência ocorre para o ácido linolenico com 66,82% e 76,30% no final do horário das 24:00 e 36:00 horas, respectivamente; e para o ácido linoléico de 51,14% e 53,0% nos respectivos horários. Segundo Enjalbert et al. (2003) encontraram uma eficiência de 38% e 46% por hora para os ácidos linoléico e linolenico, respectivamente. A eficiência da biohidrogenação dos ácidos graxos é maior a medida que há aumento do grau de insaturação, sendo os ácidos linoléico e linolenico os principais substratos que em condições normais apresentam taxas de biohidrogenação de 70-95% e 85-100%, respectivamente (DOREAU; FERLAY, 1994; BEAM et al., 2000b; GIVENS et al., 2006)..

O menor valor da eficiência da biohidrogenação obtidos no presente experimento pode estar justificado pelo fato da associação do lipídio com a glicerina, utilizado nas dietas (100 g/kgMS), que segundo estudos *in vitro* (EDWARDS et al., 2012) o glicerol adicionado em um nível 6% ou 20% inibe a lipólise. E a eficiência da biohidrogenação depende da taxa de lipólise e do tipo e forma dos lipídios que chegam ao rumen, e da quantidade e estrutura dos ácidos graxos insaturados livres no ambiente ruminal (Van SOEST, 1994; LOOR et al., 2004). Uma alta taxa da eficiência da biohidrogenação até a formação do ácido esteárico (C18:0) no rumen, reduz o fluxo duodenal de ácidos graxos poliinsaturados e incrementam os saturados (DOREAU; FERLAY, 1994). No entanto, a redução da eficiência da biohidrogenação proporciona maior disponibilidade intestinal de ácidos graxos insaturados (ZINN, 1988; ZINN; PLASCENCIA, 1993, JENKINS et al., 2008).

Neste contexto, segundo os resultados obtidos, o uso do óleo de soja em associação com a glicerina diminui a eficiência da biohidrogenação

favorecendo o fluxo ruminal de ácidos graxos insaturados. No entanto, essa limitada taxa de biohidrogenação, favorece a liberação de ácidos graxos, que serão biohidrogenados, favorecendo a captura de H⁺ diminuindo em parte a produção de metano. Também a incorporação de glicerina na dieta, é favorecida por ser um constituinte glicogênico como fonte de energia e como precursor na síntese de ácidos graxos.

5. CONCLUSÕES

O efeito associativo do uso da glicerina com o óleo de soja na forma não protegida permite reduzir parcialmente a eficiência da biohidrogenação garantindo a presença de ácidos graxos insaturados e alguns trans principalmente o vaccênico no ambiente ruminal. No entanto, o fornecimento de lipídios na forma de gordura protegida em dietas de bovinos, não garante totalmente a inibição do processo de biohidrogenação.

Independentemente da fonte de óleo de soja utilizada, a maior taxa de biohidrogenação se apresenta nas primeiras horas de incubação, sendo a mais intensa para o ácido linolênico caracterizado por seu maior grau de insaturação.

O uso de óleo de soja na forma não protegida em associação com glicerina pode ser uma alternativa viável para conseguir redução das emissões de metano e CO₂ em dietas para ruminantes.

6. REFERÊNCIAS

BAUMAN, D.E.; BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; GRIINARI, J.M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Production American Society of Animal Science**. <http://www.animal-science.org/content/77/E-Suppl/1.32.full.pdf>, 1999. Acesso em: 10/08/2012.

BAUMGARD, L.H.; CORL, B.J.; DWYER, D.A.; SAEBO, A.; BAUMAN, D.E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal Physiol Regulatory Integrative and Comparative Physiology**. v.278, p.179-184, 2000.

BLANKSON, H.; STAKKESTAD, J.A.; FAGERTUN, H.; THOM, E.; WADSTEIN J.; GUDMUNDSSEN, O. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. **The Journal of Nutrition**. v.130, p.2943-2948, 2000.

CASTAGNINO; P.S; J.D. MESSANAA, FIORENTINI, G., DE JESUS, R.B.; SAN VITO, E., CARVALHO, I.P.C.; BERCHIELLI, T.T. Glycerol combined with oils did not limit biohydrogenation of unsaturated fatty acid but reduced methane production in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v.201, p.14-24, 2015.

CAVALIERI, F.B.; SANTOS, G.T.; MATSUSHITA, M.; PETIT, H.V.; RIGOLON, L.P.; SILVA, D.; HORST, J.A.; CAPOVILLA, L.C.; RAMOS, F.S. Milk production and milk composition of dairy cows fed Lac100® or whole flaxseed. **Canadian Journal of Animal Science**, v.85, p.413-416, 2005

CERRI, C.C.; BERNOUX, M.; MAIA, S.M.F.; CERRI, C.E.P.; JUNIOR, C.C.; FEIGL, B.J.; FRAZÃO, L.A.; MELLO, F.F.C.; GALDOS, M.V.; MOREIRA, C.S.; CARVALHO, J.L.N. Greenhouse gas mitigation options in Brazil for land-use change, livestock and agriculture. **Scientia Agricola**, v.67, p.102-116, 2010.

CHIZZOTTI, M.L.; PEREIRA, L.G.R.; CHIZZOTTI F.H.M.; LADEIRA, M.M.; MACHADO, O.R.N. Uso da nutrição para redução na geração de metano: Eficiência no uso da energia para ruminantes x meio ambiente. In: I **Simpósio Brasileiro de Produção de Ruminantes no Cerrado, Sustentabilidade do Sistema Produtivo**, 15 a 16 de março de 2012, Uberlândia, MG: FAMEV, UFU, p.137-159, 2012.

EDWARDS, H.D.; ANDERSON, R.C.; MILLER, R.K.; TAYLOR, T.M.; HARDIN, M.D.; SMITH, S.B.; KRUEGER, N.A.; NISBET, D.J. Glycerol inhibition of ruminal lipolysis in vitro. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.5176-5181, 2012.

ENJALBERT, F.; EYNARD, P.; NICOT, M.C.; TROEGELER-MEYNADIER, A.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R. In vitro versus in situ ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids from a raw or extruded mixture of ground canola seed/canola meal. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.351-359, 2003

GOERING, H.K; VAN SOEST, P.J, **Forage fiber analyses, apparatus, reagents, procedures, and some applications**. U.S. Agricultural Research Service; for sale by the Supt. of Docs, U.S. Govt. Print. Off, Washington, Handbook 379:1-20, 1970.

GRIINARI, J.M.; BAUMAN, D.E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: **Advances in Conjugated Linoleic Acid Research**. URAWECZ, M.P.Y.; MOSSOBA, M.M.; KRAMER, J.K.G.; PARIZA, M.W.; NELSON, G.J. (Eds.) AOCS Press, Champaign, IL. 180-200. 1999.

HARFOOT, C.G.; HAZELWOOD, G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. Hobson, P.N. (Ed.) Elsevier Science Publishing, New York. 285-322, 1988.

HAMMOND, K.L.; MUETZEL, S.; WAGHORN, G.C.; PINARES-PATINO, C.S.; BURKE, J.L.; HOSKIN, S.O. The variation in methane emissions from sheep

and cattle is not explained by the chemical composition of ryegrass. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v.69, p.174-178, 2008.

HESS B.W.; MOSS G.E.; RULE, D.C. A decade of developments in the area of fat supplementation research with beef cattle and sheep. **Journal of Animal Science**, v.86, p.E188-E204, 2008.

JENKINS, T.C.; WALLACE, R.J.; MOATE, P.J.; MOSLEY E.E. Board-Invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal Animal Science**, v.86, p.397-412, 2008.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. Ed. UFSM, 212p. 2011.

KREHBIEL, C. Ruminant and physiological metabolism of glycerin. **Journal Animal Science**, v.86, p.392 Abstract, 2008.

LAVERROUX, F.; GLASSER, F.; GILLET, M.; JOLY, C.; DOREAU, M. Isomerization of vaccenic acid to *cis* and *trans* C18:1 isomers during biohydrogenation by rumen microbes. **Journal of Lipids**, v.46, p.843-850, 2011.

LOOR, J.J.; BANDARA, A.B.P.A.; HERBEIN, J.H. Characterization of 18:1 and 18:2 isomers produced during microbial biohydrogenation of unsaturated fatty acids from canola and soya bean oil in the rumen of lactating cows. **Journal Animal Physiology Animal Nutrition**, v.86, p.422-432, 2002

LOOR, J.J.; UEDA, K.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y.; DOREAU, M. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.2472-2485, 2004.

MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**. v.79, p.321-330, 1999.

MARÍN, A.L.M.; HERNÁNDEZ, M.P.; ALBA, L.P.; CASTRO, G.G. Digestión de los lípidos en los rumiantes: Una revisión. **Interciencia**, v.35, p.1-7, 2010.

MOATE, P.J.; CHALUPA, W.; JENKINS, T.C.; BOSTON, R.C. A model to describe ruminal metabolism and intestinal absorption of long chain fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**, v.112, p.79-105, 2004.

MCDONALD, H.B. Conjugated linoleic acid and disease preventions: A review of current knowledge. **Journal of Animal College Nutrition**. v.19. p.111-118, 2000.

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

MOULD, F.L.; MORGAN, R.; KLIEM, K.E.; KRYSTALLIDOU, E. A review and simplification of the in vitro incubation medium. **Animal Feed Science and Technology**, V.?, p.155-172, 2005.

MOYA-CAMARENA, S.Y.; VANDEN HEUVEL, J.P.; BLANCHARD, S.G.; LEESNITZER, L.A; BELURY, M.A. Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR α . **The Journal of Lipid Research**, v.40, p.1426-1433, 1999.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, Seventh Revised Edition, Update, 2001. **The National Academy Press**, Washington, D.C. 2001

PALMQUIST, D.L.; JENKINS, T.C. Challenges with fats and fatty acid methods, **Journal of Animal Science**, v.81, n.12, p.3250-3254, 2003.

PEDREIRA, M.S.; OLIVEIRA, S.G.; PRIMAVESI, O.; LIMA, M.A.; FRIGHETTO, R.T.S.; BERCHIELLI, T.T. Methane emissions and estimates of ruminal fermentation parameters in beef cattle fed different dietary concentrate levels. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, p. 592-598, 2013.

PIPEROVA, L.S.; SAMPUGNA, J.; TETER, B.B.; KALSCHUR, K.F.; YURAWECZ M.P.; KU, Y.; MOREHOUSE, K.M.; ERDMAN, R.A. Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that post absorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. **The Journal of Nutrition**, v.132, p.1235-1241, 2002.

PRIEGO, T.; SÁNCHEZ, J.; PALOU, A.; PICÓ, C. Effect of high-fat diet feeding on leptin receptor expression in white adipose tissue in rats: depot- and sex-related differential response. **Genes Nutrition**, v.4, p.151-156, 2009;

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

SILVA, R.A. **Fontes lipídicas associadas à glicerina bruta na dieta de tourinhos nelore**. 2013. Dissertação (Mestre em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

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

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B., FRANCE, J. A simple gas-production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.185-197, 1994.

TROEGELER-MEYNADIER, A.; BRET-BENNIS, L.; ENJALBERT, F. Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. **Reproduction Nutrition Development**, v.46, p.713-724, 2006.

VAN NEVEL, C.; DEMEYER, D. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents *in vitro*. **Reproduction Nutrition Development**, v.36, p.53-63, 1996.

VAN SOEST, P.J. Nutritional Ecology of the Ruminant. **Comstock Pub, 2nd ed. Ithaca: Comstock Pub**, 1994. 476p.