



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba**

JOÃO RICARDO SCALIANTE JÚNIOR

**Perfil plasmático de ácidos graxos e taxa de concepção em
vacas Nelore suplementadas com semente de girassol**

**Araçatuba
2021**

JOÃO RICARDO SCALIANTE JÚNIOR

Perfil plasmático de ácidos graxos e taxa de concepção em vacas Nelore suplementadas com semente de girassol

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira

Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Bertan Membrive

**Araçatuba
2021**

S282p Scaliante Júnior, João Ricardo
 Perfil plasmático de ácidos graxos e taxa de concepção em vacas Nelore suplementadas com semente de girassol / João Ricardo Scaliante Júnior. -- Araçatuba, 2021
 79 f.

 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
 Orientador: Guilherme de Paula Nogueira
 Coorientador: Cláudia Maria Bertan Membrive

 1. Ômega 6. 2. Ácido linoleico. 3. IATF. 4. Reprodução. 5. Bovinos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Perfil plasmático de ácidos graxos e taxa de concepção em vacas Nelore suplementadas com semente de girassol

AUTOR: JOÃO RICARDO SCALIANTE JÚNIOR

ORIENTADOR: GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

COORIENTADORA: CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / UNESP Campus Araçatuba

Prof. Dr. ALICIO MARTINS JÚNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-UNESP

Profa. Dra. CALIE CASTILHO SILVESTRE (Participação Virtual)
Departamento de Clínica de Reprodução Animal / UNOESTE - Presidente Prudente, SP

Prof. Dr. RAFAEL SILVA CIPRIANO (Participação Virtual)
Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Araçatuba, 11 de fevereiro de 2021.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Perfil plasmático de ácidos graxos e taxa de concepção em vacas Nelore suplementadas com semente de girassol

AUTOR: JOÃO RICARDO SCALIANTE JÚNIOR

ORIENTADOR: GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

COORIENTADORA: CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / UNESP Campus Araçatuba

Prof. Dr. ALICIO MARTINS JÚNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-UNESP

Profa. Dra. CALIE CASTILHO SILVESTRE (Participação Virtual)
Departamento de Clínica de Reprodução Animal / UNOESTE - Presidente Prudente, SP

Prof. Dr. RAFAEL SILVA CIPRIANO (Participação Virtual)
Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Araçatuba, 11 de fevereiro de 2021.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Perfil plasmático de ácidos graxos e taxa de concepção em vacas Nelore suplementadas com semente de girassol

AUTOR: JOÃO RICARDO SCALIANTE JÚNIOR


ORIENTADOR: GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

COORIENTADORA: CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / UNESP Campus Araçatuba

Prof. Dr. ALICIO MARTINS JÚNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI (Participação Virtual) 
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-UNESP

Profa. Dra. CALIE CASTILHO SILVESTRE (Participação Virtual)
Departamento de Clínica de Reprodução Animal / UNOESTE - Presidente Prudente, SP

Prof. Dr. RAFAEL SILVA CIPRIANO (Participação Virtual)
Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Araçatuba, 11 de fevereiro de 2021.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Perfil plasmático de ácidos graxos e taxa de concepção em vacas Nelore suplementadas com semente de girassol

AUTOR: JOÃO RICARDO SCALIANTE JÚNIOR

ORIENTADOR: GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA

COORIENTADORA: CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / UNESP Campus Araçatuba

Prof. Dr. ALICIO MARTINS JÚNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-UNESP

Profa. Dra. CALIE CASTILHO SILVESTRE (Participação Virtual)
Departamento de Clínica de Reprodução Animal / UNOESTE - Presidente Prudente, SP



Prof. Dr. RAFAEL SILVA CIPRIANO (Participação Virtual)
Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba

Araçatuba, 11 de fevereiro de 2021.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Perfil plasmático de ácidos graxos e taxa de concepção em vacas Nelore suplementadas com semente de girassol

AUTOR: JOÃO RICARDO SCALIANTE JÚNIOR
ORIENTADOR: GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA
COORIENTADORA: CLAUDIA MARIA BERTAN MEMBRIVE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / UNESP Campus Araçatuba

Prof. Dr. ALICIO MARTINS JÚNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-UNESP

Profa. Dra. CALIE CASTILHO SILVESTRE (Participação Virtual)
Departamento de Clínica de Reprodução Animal / UNOESTE - Presidente Prudente, SP

Prof. Dr. RAFAEL SILVA CIPRIANO (Participação Virtual)
Curso de Medicina Veterinária / Centro Católico Auxilium - UNISALESIANO/Araçatuba



Araçatuba, 11 de fevereiro de 2021.

DEDICATÓRIA

Eu dedico esse trabalho a toda minha família e amigos que estiveram do meu lado num momento tão delicado em minha vida, onde essa presença foi crucial para eu estar aqui hoje. Gratidão a todos que direta ou indiretamente me ajudaram durante meu tratamento. Gratidão a DEUS!

AGRADECIMENTOS

- ✓ Agradeço primeiramente a **Deus**, por ter me proporcionado à vida e as oportunidades nela surgidas...
- ✓ Aos meus pais **João Ricardo Scaliante e Ione Mary Abonizio Scaliante**, pelo incentivo, apoio e confiança. Por não medirem esforços para que esse sonho fosse realizado e por acreditarem plenamente em mim...
- ✓ À minha irmã **Fernanda Abonizio Scaliante**, pelo amor incondicional que sempre teve comigo, por cuidar e me amar de uma forma imensurável...
- ✓ À minha noiva **Isabela Carvalho**, por todo o apoio, carinho e atenção que teve comigo, por toda paciência e respeito ao meu tempo. Por estar ao meu lado imprescindivelmente em todos os momentos e sempre querer o melhor para mim...
- ✓ À minha tia **Andréia Scaliante**, por todo amor que tens por mim, por ter dado o seu máximo no momento que mais precisei. Meu muito obrigado de coração!
- ✓ À minha **família** no geral, que são meus maiores valores. Pelo companheirismo, paciência em minhas ausências e por todo o amor envolvido...
- ✓ Ao meu orientador **Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira**, pela oportunidade, ensinamentos, confiança e grande amizade estabelecida. Meu muito obrigado!
- ✓ À minha co-orientadora **Profa. Dra. Claudia Maria Bertan Membrive**, pela oportunidade oferecida, pela grande paciência, confiança e amizade. Por não medir esforços para passar seus enormes conhecimentos. Agradeço de coração!
- ✓ À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão do auxílio financeiro (Processo nº 2016/02805-4).
- ✓ À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de doutorado.
- ✓ Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP de Araçatuba/SP, pela oportunidade oferecida.
- ✓ Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**, da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, UNESP de Araçatuba, pelos ensinamentos e formação.
- ✓ Ao **Prof. Dr. Thomas McFadden e ao Dr. Ricardo Rodrigues**, da Division of Animal Science, da University of Missouri, pela imensa colaboração ao grupo e em especial a este estudo. Agradeço pelas longas discussões e ajuda nos

delineamentos experimentais. Obrigada por dividir suas experiências e tornar nossos estudos mais relevantes.

- ✓ À **Profa. Dra. Caliê Castilho**, da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, de Presidente Prudente/SP, pela contribuição científica e apoio logístico ao experimento piloto realizado.
- ✓ Aos Pós-Doutorandos **Dr. Tiago Martins e Dra Mariângela Bueno Cordeiro Maldonado**, agradecemos o auxílio nos experimentos, colaboração científica e análise estatística dos dados.
- ✓ Aos Pós-Graduandos **Adriano Felipe Mendes, Ana Flávia Paiva e Teissiane Vasconcelos Ferreira**, pelo auxílio nos experimentos realizados.
- ✓ À **Fazenda Experimental da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE**, por disponibilizar parte dos animais utilizados neste estudo.
- ✓ Aos **técnicos da Fazenda Experimental da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE**, pelo apoio ao manejo dos animais utilizados.
- ✓ Aos proprietários da Fazenda Santa Encarnação, **Antônio do Amaral Pérez e Ivan do Amaral Pérez**, pela confiança e gentil acolhimento e por contribuírem com a grande parte dos animais utilizados neste estudo.
- ✓ Ao Zootecnista **Tiago Arriero**, responsável técnico da Fazenda Santa Encarnação, pelo apoio técnico e pelo extraordinário exemplo de pessoa e profissional.
- ✓ Aos **técnicos e funcionários da Fazenda Santa Encarnação**, pelo apoio ao manejo dos animais utilizados.
- ✓ À todos os **técnicos de laboratório da UNESP de Dracena**, pela gentileza e presteza nas atividades realizadas.

“Honra teu pai e tua mãe, para que teus dias se prolonguem sobre a terra que te dá o Senhor, teu Deus”

ÊXODO 20:12

SCALIANTE-JÚNIOR, J.R. **Perfil plasmático de ácidos graxos e taxa de concepção em vacas Nelore suplementadas com semente de girassol.** 2021. 79 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

RESUMO

A suplementação com compostos ricos em ácido linoléico (AL), dentre esses a semente de girassol (*Helianthus annuus L.*), favorece a taxa de concepção em fêmeas bovinas, entretanto, os mecanismos de tal efeito são pouco conhecidos. Em estudos prévios, realizados por esse grupo, verificou-se que a suplementação com semente de girassol durante 22 dias iniciada no dia da IATF ou no dia da retirada do implante da TETF, aumentou a taxa de concepção em 18%. Hipotetizou-se que tal suplementação promova um incremento nas concentrações plasmáticas AGPI e uma ação efetiva no aumento da concepção. Para tanto, objetivou-se: a) determinar os perfis plasmáticos de 41 ácidos graxos em vacas não suplementadas (n=13) ou suplementadas (n=14) com semente de girassol por 17 dias no D0, D7, D10, D13 e D16 (D0 = dia da IATF e início da suplementação com semente de girassol) - Experimento 1 e; b) comparar as concentrações plasmáticas de colesterol, triglicerídeos, HDL, VLDL, LDL, taxa de concepção no D30 e D60 (D0 = dia da IATF) e a mortalidade embrionária entre D30 e D60 em vacas Nelore submetidas à IATF não suplementadas (Grupo Controle; n= 108) ou suplementadas com semente de girassol por 23 dias a partir do D0 (Grupo Girassol; n=102) - Experimento 2. No Experimento 1, as fêmeas suplementadas com semente de girassol apresentaram aumento nas concentrações plasmáticas de ácido esteárico (C18:0) no D10, D13 e D16 e ácido oleico (C18:1 n9,c) no D13 e verificou-se uma diminuição de ácido palmítico (C16:0) no D7, D10 e D13 e ácido linoléico (C18:2 n6,c) no D13 e D16 comparado ao Grupo Controle; o ácido alfa-linolênico (C18:3 n3) foi constatado somente no plasma das vacas tratadas com semente de girassol. No experimento 2, não observou-se diferença na taxa de concepção no D30 e D60, assim como a taxa de mortalidade embrionária compreendida entre os dias 30 e 60. Vacas suplementadas por 23 dias com semente de girassol tiveram um aumento de concentração plasmática de colesterol, triglicerídeos, VLDL e LDL, comparado nos mesmos dias de coleta ao

grupo controle; já o HDL foi maior no final do tratamento (D22) no grupo controle quando comparado ao grupo girassol tratado pelos mesmos 23 dias. Conclui-se que a suplementação com semente de girassol alterou o perfil plasmático de ácidos graxos, mas não afetou a taxa de prenhez em vacas de corte.

Palavras-chave: Ômega 6. Ácido linoleico. IATF. Reprodução. Bovinos.

SCALIANTE-JÚNIOR, J.R. **Plasma fatty acid profile and conception rate in Nellore cows supplemented with sunflower seed.** 2021. 79 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

ABSTRACT

Supplementation with compounds rich in linoleic acid (AL), among them sunflower seed (*Helianthus annuus L.*), favors the conception rate in bovine females, however, the mechanisms of this effect are little known. In previous studies, carried out by this group, it was found that supplementation with sunflower seed for 22 days initiated on the day of the FTAI or on the day of removal of the implant from the TFET, increased the conception rate by 18%. It has been hypothesized that such supplementation promotes an increase in plasma PUFA concentrations and an effective action in increasing conception. Therefore, the objective was to: a) determine the plasma profiles of 41 fatty acids in cows not supplemented (n = 13) or supplemented (n = 14) with sunflower seed for 17 days in D0, D7, D10, D13 and D16 (D0 = IATF day and start of supplementation with sunflower seed) - Experiment 1 e; b) compare plasma concentrations of cholesterol, triglycerides, HDL, VLDL, LDL, conception rate at D30 and D60 (D0 = day of IATF) and embryonic mortality between D30 and D60 in Nellore cows submitted to non-supplemented IATF (Control Group ; n = 108) or supplemented with sunflower seed for 23 days from D0 (Girasol Group; n = 102) - Experiment 2. In Experiment 1, females supplemented with sunflower seed showed an increase in plasma stearic acid concentrations (C18: 0) in D10, D13 and D16 and oleic acid (C18: 1 n9, c) in D13 and there was a decrease in palmitic acid (C16: 0) in D7, D10 and D13 and linoleic acid (C18: 2 n6, c) in D13 and D16 compared to the Control Group; alpha-linolenic acid (C18: 3 n3) was found only in the plasma of cows treated with sunflower seed. In experiment 2, there was no difference in the conception rate at D30 and D60, as well as the embryonic mortality rate between days 30 and 60. Cows supplemented with sunflower seed for 23 days had an increase in plasma cholesterol concentration, triglycerides, VLDL and LDL, compared on the same collection days to the control group; HDL was higher at the end of treatment (D22) in the control group when compared to the sunflower group treated for the same 23 days. It was concluded that

supplementation with sunflower seed changed the plasma fatty acid profile, but did not effect the pregnancy rate in beef cows.

Keywords: Omega 6. Linoleic acid. FTAI. Reproduction. Bovine.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 -	Constituição de ácidos graxos (%) de fontes de gordura disponível para suplementação bovina	27
Tabela 2 -	Porcentagens de ácidos graxo saturado, monoinsaturado e poliinsaturados nos óleos de canola, girassol, milho, oliva e soja	28
Figura 1 -	Delineamento do experimento 1 (Grupo Controle e Grupo Girassol), ilustrando o protocolo de IATF utilizado, as dietas de suplementações oferecidas e os dias de coleta de sangue para a avaliação plasmática dos ácidos graxos	38
Figura 2 -	Delineamento do experimento 2, mostrando o protocolo de IATF utilizado, as dietas de suplementações oferecidas, os dias de coleta de sangue para a avaliação plasmática dos lipídios, e os dias do diagnóstico de prenhez	43
Figura 3 -	Concentração plasmática média (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido palmítico (C16:0) em todos os dias de coleta	47
Figura 4 -	Concentração plasmática média (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido palmítico (C16:0) em cada dia de coleta	48
Figura 5 -	Concentração plasmática média (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido esteárico (C18:0) em todos os dias de coleta	48
Figura 6 -	Concentração plasmática média (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido esteárico (C18:0) em cada dia de coleta	49
Figura 7 -	Concentração plasmática média (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido oleico (C18:1 n9,c) em todos os dias de coleta	49
Figura 8 -	Concentração plasmática média (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido oleico (C18:1 n9,c) em cada dia de coleta	50
Figura 9 -	Concentração plasmática média (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido linoléico (C18:2 n6,c) em todos os dias de coleta	51
Figura 10 -	Concentração plasmática média (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido linoléico (C18:2 n6,c) em cada dia de coleta	51
Figura 11 -	Concentração plasmática média (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido alfa-linolênico (C18:3 n3) em todos os dias de coleta	52

Figura 12 -	Concentração plasmática média \pm erro padrão (ng/ml) de progesterona (P4) nos diferentes dias de coleta	53
Figura 13 -	Sumarização dos resultados do Experimento 1	54
Figura 14 -	Concentrações plasmáticas de COLESTEROL (mg/dL), nos diferentes dias de coleta de sangue após o início da suplementação, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: A) não tratadas (Grupo Controle; n=108), B) tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102)	55
Figura 15 -	Concentrações plasmáticas de TRIGLICERÍDEOS (mg/dL), nos diferentes dias de coleta de sangue após o início da suplementação, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: A) não tratadas (Grupo Controle; n=108), B) tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102)	56
Figura 16 -	Concentrações plasmáticas de HDL (mg/dL), nos diferentes dias de coleta de sangue após o início da suplementação, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: A) não tratadas (Grupo Controle; n=108), B) tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102)	57
Figura 17 -	Concentrações plasmáticas de VLDL (mg/dL), nos diferentes dias de coleta de sangue após o início da suplementação, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: A) não tratadas (Grupo Controle; n=108), B) tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102)	58
Figura 18 -	Concentrações plasmáticas de LDL (mg/dL), nos diferentes dias de coleta de sangue após o início da suplementação, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: A) não tratadas (Grupo Controle; n=108), B) tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102)	59
Figura 19 -	Taxa de prenhez no D30, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: não tratadas (Grupo Controle; n=108) e tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102)	60
Figura 20 -	Taxa de prenhez no D60, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: não tratadas (Grupo Controle; n=108) e tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102)	60
Figura 21 -	Taxa de perdas embrionárias entre o D30 e D60, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: não tratadas (Grupo Controle; n=108), e tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102)	61
Figura 22 -	Sumarização dos resultados do experimento 2	61

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
B	Beta
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
CL	Corpo Lúteo
cm ³ /s	Centímetro cúbico por segundo
D-10	Dia menos dez
D-5	Dia menos cinco
D-2	Dia menos dois
D0	Dia zero
D4	Dia quatro
D7	Dia sete
D10	Dia dez
D13	Dia treze
D16	Dia dezesseis
D22	Dia vinte e dois
D30	Dia trinta
D60	Dia sessenta
DPP	Dias pós-parto
ECC	Escore de Condição Corporal
eCG	Gonadotrofina Coriônica Equina
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
g	Gramma
H2	Hidrogênio
HDL	High Density Lipoprotein
IA	Inseminação Artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IEP	Intervalo entre partos

IM	Intramuscular
Kg	Kilograma
LDL	Low Density Lipoprotein
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
ml	Mililitro
mm	Miligrama
mRNA	RNA mensageiro
P4	Progesterona
PB	Proteína bruta
PGF2 α	Prostaglândina 2 α
TETF	Transferência de embriões em tempo fixo
UI	Unidade Internacional
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Fontes de gordura utilizadas para aumentar a performance reprodutiva em fêmeas bovinas	26
2.2 Efeitos dos AGPI nas taxas de concepção	28
2.3 Efeitos dos AGPI nos folículos e oócitos	30
2.4 Efeitos dos AGPI no corpo lúteo	32
2.5 Efeitos dos AGPI no embrião e concepto	33
2.6 Efeitos dos AGPI no endométrio e microambiente uterino	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 Experimento 1	37
3.1.1 Local do experimento	37
3.1.2 Animais	37
3.1.3 Sincronização das ovulações	38
3.1.4 Suplementação de adaptação	38
3.1.5 Inseminação artificial em tempo fixo	39
3.1.6 Exame ultrassonográfico para confirmar à ovulação	39
3.1.7 Tratamentos	39
3.1.8 Coleta de sangue	40
3.1.9 Análise plasmáticas de ácidos graxos por cromatografia gasosa	40
3.1.10 Análise plasmática de progesterona por radioimunoensaio	41
3.1.11 Análise estatística	41
3.2 Experimento 2	42
3.2.1 Local do experimento	42
3.2.2 Animais	42
3.2.3 Sincronização das ovulações	43
3.2.4 Suplementação de adaptação	44
3.2.5 Inseminação artificial em tempo fixo	44
3.2.6 Formação dos grupos experimentais	44

3.2.7 Tratamentos	44
3.2.8 Coleta de sangue	45
3.2.9 Diagnóstico de prenhez	45
3.2.10 Análise de lipídios plasmáticos	45
3.2.11 Análise Estatística	45
4 RESULTADOS	47
4.1 Experimento 1	47
4.1.1 Ácido Palmítico	47
4.1.2 Ácido Esteárico	48
4.1.3 Ácido Oleico	49
4.1.4 Ácido Linoleico	50
4.1.5 Ácido alfa-linoleico	52
4.1.6 Progesterona	52
4.1.7 Sumarização dos resultados	53
4.2 Experimento 2	54
4.2.1 Concentrações plasmáticas de Colesterol	54
4.2.2 Concentrações plasmáticas de triglicerídeos	55
4.2.3 Concentrações plasmáticas de HDL	56
4.2.4 Concentrações plasmáticas de VLDL	57
4.2.5 Concentrações plasmáticas de LDL	58
4.2.6 Taxa de prenhez do D30	59
4.2.7 Taxa de prenhez do D60	60
4.2.8 Mortalidade embrionária entre D30 e D60	60
4.2.9 Sumarização dos resultados	61
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67
ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

A suplementação com ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), altera o perfil lipídico plasmático e favorece a performance reprodutiva de fêmeas bovinas (FONTES et al., 2018). Os principais AGPI importantes na funções reprodutivas são o ômega 3 e ômega 6, que tem como principais representantes o ácido linolênico e linoléico; respectivamente. Parte dos AGPI são disponibilizados para a síntese de importantes hormônios envolvidos no ciclo estral das fêmeas bovinas; como o estradiol, progesterona e prostaglandinas (WONNACOTT et al., 2010). Contudo, os mecanismos determinantes de tal efeito são pouco conhecidos.

Várias fontes de gorduras, com diferentes composições de AGPI, podem ser utilizadas na dieta dos animais ruminantes (STAPLES et al., 2009), sendo que o ácido linolênico (C18:3; ômega-3) e linoleico (C18:2; ômega-6) são os mais importantes no contexto reprodutivo (STAPLES et al., 2005). As sementes oleaginosas são ricas em AGPI, e uma das fontes mais ricas em ácido linoleico é a semente de girassol (*Helianthus annuus L.*). Tal semente, apresenta em sua composição 11,6% de ácidos graxos saturados e 65,3% de AGPI, sendo 65% de ácido linoleico e 20% de ácido oleico (CHEVA-ISARAKUL E TANGTWEEWIPAT, 1991).

Em estudos prévios, verificou-se que a suplementação com semente de girassol durante 22 dias, em vacas Nelore submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e em novilhas mestiças zebuínas submetidas à transferência de embriões em tempo fixo (TETF) aumentou a taxa de concepção em 18,91% (66,67% vs. 47,76%; $p < 0,05$) e 18,72% (55,66% vs. 36,94%; $p < 0,01$) respectivamente (CORDEIRO et al., 2015). Considerando que, em ambos os estudos realizados por este grupo, houve incremento bastante similar na taxa de concepção, pretende-se avaliar os mecanismos pelos quais a suplementação com AGPI, especificamente a semente de girassol, promove o aumento da taxa de concepção em fêmeas bovinas de corte. Considerando que em experimentos prévios do grupo, o incremento na taxa de concepção foi similar quando tal suplementação foi associada a programas de IATF e TETF, suspeitamos que tal suplementação aumenta a taxa de concepção por promover efeitos positivos à concepção a partir dos sete primeiros dias de desenvolvimento do embrião. Considerando que em tais experimentos prévios não houve incremento nas concentrações plasmáticas de progesterona, suspeitamos que

tal efeito no aumento da taxa de concepção não decorra de efeitos positivos no corpo lúteo promovendo aumento na síntese de progesterona. Suspeitamos que tal suplementação aumenta a taxa de concepção por promover efeitos no endométrio, microambiente uterino e concepto (embrião e membranas anexas) e portanto, alterações prévias nas concentrações plasmáticas de ácidos graxos das fêmeas suplementadas. Assim, torna-se importante identificar as alterações no perfil plasmático de ácidos graxos em fêmeas bovinas suplementadas com tal semente.

Diante desse contexto, nesse estudo hipotetizou-se que a suplementação com semente de girassol altera o perfil plasmático de AGPI, e que vacas tratadas com semente de girassol apresentam aumento nas taxas de prenhez e diminuição na perda embrionária no período entre 30 e 60 dias de prenhez. No Experimento 1, objetivou-se determinar o perfil de 41 ácidos graxos plasmáticos de vacas Nelore suplementadas com semente de girassol para verificar as variações no perfil lipídico que pode determinar o aumento na taxa de prenhez. No Experimento 2, objetivou-se identificar o efeito da dieta contendo semente de girassol na taxa de prenhez 30 dias após à IATF (D30), 60 dias após à IATF (D60), mortalidade embrionária entre D30 e D60, e as concentrações plasmáticas de colesterol, triglicerídeos, HDL, VLDL e LDL em vacas Nelore submetidas à IATF.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A demanda mundial por alimentos cresce a cada ano de forma proporcional ao aumento da população. Em 2020, o Brasil ocupou a posição de maior exportador de carne bovina e tem recebido grande atenção mundial. O rebanho bovino brasileiro em 2019 foi estimado em 213.800.000 animais, sendo que destes, 80% são destinados à produção de carne. Estima-se que a produção nacional de carne bovina em 2019 foi de 9.915.000 toneladas de equivalente-carcaça, proveniente do abate de 42.500.000 cabeças (ANUÁRIO DBO, 2019).

Na criação de bovinos de corte, a produtividade está diretamente relacionada à eficiência reprodutiva das fêmeas, onde o ideal seria um intervalo entre partos (IEP) de 12 meses, gerando a produção de 1 bezerro/matriz/ano. E, devido à baixa produtividade ocorrida no Brasil que registra um IEP médio de 17 meses, tem se empregado biotécnicas que buscam o aumento de tal eficiência, e uma biotécnica que tem sido amplamente utilizada é a inseminação artificial (IA). E para otimizar o emprego da IA, foram desenvolvidos tratamentos que permitem a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) de 100% das fêmeas tratadas em um momento pré-determinado. No Brasil, estima-se que 15% das fêmeas bovinas tenham sido inseminadas em 2019, sendo que mais de 80% do total de inseminações realizadas foram através da IATF (ASBIA, 2019). A taxa de concepção em rebanhos de corte comerciais no Brasil com o emprego da IATF é de 49,1% (BARUSELLI et al., 2008; SÁ FILHO et al., 2009).

A mortalidade embrionária é uma das maiores causas de falhas reprodutivas em rebanhos bovinos de corte (SANTOS et al., 2004; SARTORI, 2004). Nos primeiros sete dias pós-inseminação, a mortalidade embrionária é associada a falhas de fertilização, defeitos genéticos e anormalidades no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, onde nesse período a mortalidade normalmente é inferior a 10% (SARTORI et al., 2002; SARTORI, 2004). Em bovinos os principais desafios biológicos para o estabelecimento da prenhez ocorrem no período compreendido entre os dias 15 e 19 após a fecundação, conhecido como “período crítico” (BINELLI et al., 2001). Nas fêmeas bovinas, durante tal período crítico, o conceito deve produzir competentemente moléculas que interagem com o endométrio inibindo a síntese de PGF₂ α e a luteólise, condição determinante para o estabelecimento da prenhez; e

muitos estudos relatam à possibilidade de controlar a capacidade de síntese de PGF2 α no endométrio através de manipulações nos ingredientes da dieta. Em vários estudos verificou-se o impacto positivo da suplementação com AGPI, inclusive durante o período crítico, na eficiência reprodutiva de bovinos de corte e leite (FERGUSON et al., 1990; GARCIA-BOJALIL et al., 1998; SKLAN et al., 1991; STAPLES et al., 1998).

Porém, um ponto importante que devemos ressaltar, é a bio-hidrogenação ruminal, onde a grande maioria dos AGPIs consumidos pelos animais ruminantes sofrem uma transformação estrutural no rúmen durante o processo de digestão. Uma grande quantidade de bactérias e protozoários produzem enzimas que são capazes de realizar a bio-hidrogenação dos lipídios. Os lipídios que possuem duplas e triplas ligações na cadeia carbônica são hidrogenados até a formação de uma ligação simples, que é a adição de um íon H⁺ à cadeia carbônica do ácido graxo, quebrando as ligações. A grande maioria dos lipídios ingeridos na dieta de um animal ruminante é do tipo saturada, onde mais de 80% dos AGPI sofrem bio-hidrogenação da microbiota ruminal; destes 80% mais de 50% transformam-se em ácidos graxos saturados (MARQUES, 2003). Segundo Jouany et al. (2007), 80% do ácido linoleico (C18:2) que chega ao rúmen através de alimentação, sofre uma bio-hidrogenação, transformando esse C18:2 em ácido vacênico, que também é transformado rapidamente em ácido esteárico (C18:0). Considerando esse contexto, os AGPI ingeridos na dieta são em grande parte transformados no rúmen em outros AGPI e esses são incorporados ao plasma sanguíneo. Tal incremento de AGPI plasmáticos promoveriam benefícios ao endométrio, conceito e microambiente uterino de forma a favorecer a concepção. Assim, torna-se importante determinar primeiramente as modificações plasmáticas nas fêmeas suplementadas para que posteriormente possam ser elaboradas hipóteses sobre os benefícios desse efeito na taxa de concepção.

Fazendo uma análise retrospectiva das investigações já realizadas com os AGPI na performance reprodutiva de fêmeas bovinas, a maioria prioriza os efeitos da gordura protegida e em rebanhos leiteiros. Em tais estudos, os efeitos na taxa de concepção tornaram-se contraditórios e muitas vezes diferiram quando o mesmo tratamento foi comparado por diferentes autores.

2.1 - Fontes de gordura utilizadas para aumentar a performance reprodutiva em fêmeas bovinas

Devido ao mecanismo de bio-hidrogenação microbiana dos ácidos graxos no rúmen, a disponibilidade dos ácidos graxos essenciais em ruminantes torna-se menor quando comparado aos animais não ruminantes (JUCHEM et al., 2010). Assim, a adição de gorduras específicas na dieta dos ruminantes pode aumentar a disponibilidade dos ácidos graxos essenciais e desta forma favorecer a performance reprodutiva desses animais (STAPLES et al., 2005).

Além dos efeitos básicos dos ácidos graxos na fluidez de membrana e nas propriedades gerais biofísicas, a maior disponibilidade de AGPI foram relacionadas à melhoria do desenvolvimento folicular (ZACHUT et al., 2008), na qualidade de oócitos produzidos (ZERON et al., 2002) e no desenvolvimento embrionário (Thangavelu et al., 2007), além de aumentar a expressão de genes favoráveis à prenhez no endométrio uterino (MATTOS et al., 2000). Os ácidos graxos também representam os substratos para a síntese de importantes hormônios reprodutivos como estradiol, progesterona e prostaglandina (WONNACOTT et al., 2010).

Os primeiros relatos sobre o efeito na performance reprodutiva de animais que receberam suplementação lipídica na dieta foram feitos por Burr e Burr (1930), quando observaram que ratas em crescimento suplementadas tiveram menor taxa de ovulação quando comparadas às do grupo controle. Posteriormente, foram realizados estudos onde a suplementação com AGPI foi relacionada à melhorias no reconhecimento materno da prenhez (LOPES et al., 2009), retorno da ciclicidade ovariana após o parto (DE FRIES et al., 1998), desenvolvimento folicular e qualidade dos oócitos (BILBY et al., 2006; STAPLES e THATCHER, 2005), desenvolvimento e qualidade embrionária (CERRI et al., 2009), e modificações na síntese e secreção de hormônios que envolvem o processo reprodutivo, como estradiol e progesterona (STAPLES, 1998).

Na maioria dos trabalhos científicos disponíveis na literatura, os AGPI foram utilizados de forma “protegida”. Para a proteção dos AGPI utiliza-se proteínas e formaldeído. As proteínas cobrem as partículas de gordura e o formaldeído protege o complexo proteína-lipídio, evitando assim a fermentação de tais lipídios no rúmen. Tal complexo protetivo aos lipídios é rompido nas condições ácidas do abomaso, compartimento onde tais lipídios passam a ficar desprotegidos (LUCCI, 1997). Os

ácidos graxos da gordura protegida passam, em sua grande maioria, pelo rúmen e são metabolizados no intestino, onde há melhor aproveitamento de suas características originais (CERVONI, 2007).

Diferentes tipos de gorduras têm sido utilizados na tentativa de melhorar a função reprodutiva em ruminantes. Os ácidos graxos que exercem maior impacto no desempenho reprodutivo, especificamente os da família ômega 3 e ômega 6, são oriundos de sementes e plantas oleaginosas, porém cada fonte dietética de gordura varia em relação à composição de ácidos graxos específicos (HERRERA-CAMACHO et al., 2011).

As sementes oleaginosas são ricas em ácido graxo poliinsaturados, sendo que uma das fontes mais ricas em ácidos linoléico é a semente de girassol, onde o teor de óleo de girassol varia de 20 a 45% de acordo com o cultivar (DAGHIR et al., 1980; KARUNOJEEWA et al., 1989; SILVA, 1990). Essa semente caracteriza-se por ter uma alta relação de ácidos graxos poliinsaturados/saturado (65,3%/11,6%).

Há diversas opções na utilização de dietas com gordura para ruminantes, sendo que cada fonte de gordura apresenta diferenciada composição de ácidos graxos. Na Tabela 1 (STAPLES et al., 2009) e 2 (FOOD INGREDIENTS, 2014) estão sumarizadas as principais fontes de gordura utilizadas na alimentação animal.

Tabela 1. Constituição de ácidos graxos (%) de fontes de gordura disponível para suplementação bovina

(continua)

Fonte de gordura	CONSTITUIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
	Mirístico	Palmitico	Palmito-oleico	Esteárico	Oleico	Linoléico	Linolênico
Sebo	3	25	3	18	43	4	<1
Óleo reciclado de cozinha	2	21	4	11	44	14	<1
Energy Booster 100 ¹	3	40	1	43	10	2	<1
Megalac; EnerG-II ¹	1	50	<1	4	36	8	<1
Megalac-R ¹	1	36	<1	4	26	29	3
Óleo de canola	<1	4	<1	2	63	19	9
Óleo de caroço de algodão	1	23	1	3	18	54	1
Óleo de linhaça	<1	5	<	3	20	16	55

Tabela 1. Constituição de ácidos graxos (%) de fontes de gordura disponível para suplementação bovina

(conclusão)

Fonte de gordura	CONSTITUIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS (%)						
	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
	Mirístico	Palmítico	Palmito-oleico	Esteárico	Oleico	Linoléico	Linolênico
Óleo de colza	<1	5	<1	2	54	22	11
Óleo de cártamo	<1	7	<1	2	12	78	<1
Óleo de soja	<1	11	<1	4	23	54	8
Óleo de girassol	<1	7	<1	5	19	68	1
Óleo de peixe Menhaden ²	7	16	8	3	12	1	2

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 2. Porcentagens de ácidos graxo saturado, monoinsaturado e poliinsaturados nos óleos de canola, girassol, milho, oliva e soja.

ÓLEOS	ÁCIDO GRAXO SATURADO	ÁCIDO GRAXO MONOINSATURADO	ÁCIDO GRAXO POLIINSATURADO	
			Linoléico	Linolênico
Canola	6%	58%	26%	10%
Girassol	11%	2%	69%	
Milho	13%	25%	61%	1%
Oliva	14%	77%	8%	<1%
Soja	15%	24%	54%	7%

Fonte: Elaborada pelo autor

2.2 – Efeitos dos AGPI nas taxas de concepção

Uma das maiores causas de falhas reprodutivas em rebanho bovinos é a morte embrionária precoce (SANTOS et al., 2004). Nos primeiros sete dias pós inseminação artificial tais falhas são associadas às falhas na fertilização, anormalidades de desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto e defeitos genéticos, onde nesse período essas falhas normalmente são inferiores a 10% (SARTORI et al., 2004). No entanto, os principais desafios biológicos para o estabelecimento da prenhez ocorre nos dias compreendidos entre o 15º ao 19º dia pós fecundação, conhecido também, tal período como “período crítico” (BINELLI et al., 2001). Em vários estudos

verificou-se o impacto positivo da suplementação com gorduras, especialmente AGPI, na eficiência reprodutiva em bovinos de corte (COOKE et al., 2014; CIPRIANO et al., 2016; LOPES et al., 2011). Além disso, a inclusão de dos AGPI, ômega 3 (MATTOS et al., 2002; MATTOS et al., 2004) e ômega 6 (CIPRIANO et al., 2016) na dieta de vacas no período de reconhecimento materno da gestação, melhora o desempenho reprodutivo desses animais ao otimizar a interação entre o concepto e o útero (COOKE et al., 2014; SANTOS et al., 2008; THATCHER et al., 2001).

Dentre os principais trabalhos que utilizaram o ácido linoléico como principal fonte de AGPI adicionado à dieta, destacamos o estudo de Cordeiro et al. (2015). Nesse estudo, vacas Nelore multíparas, 40 a 60 dias pós-parto, suplementadas com 1,7Kg/vaca/dia de dieta contendo 60% de semente de girassol (principal fonte de ômega 6) e 40% de farelo de soja por 21 dias imediatamente após a IATF tiveram um aumento de 18,91% na taxa de prenhez quando comparado ao grupo de vacas controle que foram alimentadas com 1,7Kg/vaca/dia de dieta contendo 47% de farelo de milho e 53% de farelo de soja. Entretanto, Banta et al. (2011) trabalharam com um total de 127 vacas mestiças Angus x Hereford que também foram suplementadas com dieta à base de ômega 6, por 83 dias a partir da IA. Nesse estudo, os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos: grupo controle (1,23 Kg/dia/animal de suplemento à base de casca de soja), grupo linoléico (0,68 Kg/dia/animal de semente de girassol alto linoléico + 0,23 Kg/dia/animal de suplemento controle, sendo uma dieta rica em ômega 6) e grupo oleico (0,64 Kg/dia/animal de semente de girassol alta oleica + 0,23 Kg/dia/animal de suplemento controle, sendo uma dieta rica em ômega 3). No referido estudo, não houve diferença na taxa de concepção 30 dias após a IA, que foram de 68%, 76% e 56% nos grupos controle, linoléico e oleico, respectivamente.

Fontes et. al. (2018) suplementando um total de 60 vacas Angus e Brangus primíparas com uma dieta à base de ácido linoléico com 1,36Kg/dia/animal de ração contendo glúten de milho mais 0,23Kg/dia/animal de sais de cálcio de óleo de soja, enquanto o grupo controle recebeu 1,36Kg/dia de ração contendo glúten de milho. Tal suplementação foi realizada durante 30 dias, sendo iniciada sete dias após à IATF. Nesse referido estudo, não observou-se aumento na taxa de prenhez aos 30 dias após a IATF; que foi de 43,3% e 63,3% para o grupo tratado e controle, respectivamente.

Lopes et. al. (2009) realizou três experimentos comparando os efeitos da suplementação com AGPI (ácido linoléico) protegidos do rúmen em vacas Nelore

submetidas a protocolos de IATF. No experimento 1 (n = 910, primíparas lactantes), esses autores compararam a suplementação durante 28 dias, iniciada no dia da IATF. Nesse estudo utilizou-se a suplementação de 0,1Kg/vaca/dia de sais de cálcio de óleo de soja (Grupo Megalac E[®]) ou 0,1Kg/vaca/dia de kaolin (Grupo Controle). No referido estudo, a taxa de prenhez do grupo tratado foi maior que o grupo controle (51,2% vs. 39,6%; p = 0,04). No experimento 2 (n = 818, primíparas lactantes), os autores dividiram os animais aleatoriamente em três grupos: 0,1 Kg/vaca/dia de kaolin (Grupo controle); 0,1 Kg/vaca/dia de Megalac E[®] durante 28 dias, iniciada no dia da IATF (Grupo PF28) ou 0,1 Kg/vaca/dia de Megalac E[®] durante 16 dias, iniciada no dia da IATF (Grupo PF16). Nesse estudo, a taxa de prenhez do grupo PF28 foi maior que o grupo controle e o PF16 (42,9%, 31,3% e 35,8%; respectivamente). No experimento 3 (n = 435, nulíparas e primíparas lactantes), dos mesmos autores, comparou-se a suplementação com AGPI e ácidos graxos saturados, onde suplementaram as vacas por 28 dias pós inseminação, e o grupo tratado com AGPI tiveram uma maior taxa de prenhez comparado com o grupo tratado com ácidos graxos saturados (47,9% vs. 35,5%; p = 0,07).

Adicionando fonte de AGPI (ácido linoleico) na dieta de receptoras Nelore submetidas à protocolos de TETF, Cordeiro et.al. (2015) obtiveram um aumento de 18,8% na taxa de prenhez em novilhas receptoras que receberam uma suplementação à base de semente de girassol (1,7kg/dia/animal, sendo 60% de semente de girassol e 40 % de farelo de soja) por 21 dias após a retirada do implante de progesterona, quando comparado ao grupo controle que recebeu uma dieta controle à base de milho e soja. Já Lopes et al. (2009) obteve um aumento na taxa de prenhez em vacas Nelore receptoras que foram suplementadas com 0,1Kg/dia/vaca de sais de cálcio de óleo de soja (MegalacE[®]) por 28 dias após o final do protocolo de TETF. A taxa de prenhez foi de 49,6% e 37,7% (p<0,05) para o grupo tratado e controle que recebeu 0,1Kg/dia/vaca de kaolin, respectivamente.

2.3 – Efeitos dos AGPI nos folículos e oócitos

Os efeitos dos AGPI na eficiência reprodutiva referem-se ao maior crescimento folicular (JAHANIAN et al., 2013), maior diâmetro dos folículos ovulatórios, maior taxa de ovulação e viabilidade dos oócitos (AMBROSE et al., 2006).

Robinson et al. (2002) observou um aumento no número de folículos de tamanho médio (5 a 10 mm) em vacas leiteiras que foram suplementadas com uma fonte de energia rica em ácido linolênico (LinPreme®) e ácido linoleico (SoyPreme®) comparado ao grupo controle. No entanto, os mesmos autores observaram que vacas suplementadas com LinPreme® (alto n-3) tiveram folículos dominantes de maior diâmetro quando compararam a vacas que receberam suplementação com SoyPreme® (alto n-6) e controle.

Os ácidos graxos endógenos constituem uma importante fonte de energia para os oócitos e embriões no início do seu desenvolvimento, sendo os triglicerídeos o maior componente lipídico intracelular (STURMEY et al., 2009). Os triglicerídeos interferem diretamente na maturação dos oócitos por ocasionar modificações na composição lipídica oocitária (Bender et al., 2010) que favoreceriam a viabilidade embrionária (STURMEY et al., 2009).

Em alguns estudos observou-se que a maturação oocitária *in vitro* (FOULADINASHTA et al., 2009) e *in vivo* (ZERON et al., 2002) foi melhorada quando houve a suplementação com ômega 3 de cadeia longa e cadeia curta nos meios de maturação e na dieta da doadora de oócitos, respectivamente. Em adição, ovelhas que receberam uma dieta à base de ácido eicosapentaenoico e docosahexaenóico (rica em ômega 3) apresentaram melhora na qualidade oocitária (74.3% de melhor grau de avaliação no grupo tratado e 57.0% no grupo controle) e número total dos folículos (média de 17,5 e 14,5 no grupo tratado e controle; respectivamente). Nesse mesmo estudo, também observou-se no grupo tratado teve uma maior crio-tolerância quando comparado ao grupo controle. Observou-se no mesmo estudo que a dieta com alto n-3 aumentou a concentração de fosfolipídios nas células do cúmulus desses oócitos (ZERON et al., 2002). Porém, relata-se que a suplementação com uma concentração muito alta de n-6 pode ser prejudicial para a maturação dos oócitos (FOULADINASHTA et al., 2009), sendo que esta alta concentração de n-6 ao redor e dentro dos folículos pode inibir a retomada da meiose do estágio de vesícula germinal (MAREI et al., 2010), impedindo a maturação desses oócitos; tornando a suplementação AGPI específica e dose dependente (GULLIVER et al., 2012).

2.4 – Efeitos dos AGPI no corpo lúteo

A suplementação com dietas ricas em gordura aumenta a vida funcional do corpo lúteo (CL) e a concentração de progesterona (P4), consequentemente melhorando as taxas de prenhez (WILLIANS et al., 1989). Devido a necessidade de concentrações adequadas de P4 para o estabelecimento e manutenção da prenhez (SPENCER e BAZER, 2002), estratégias que aumentam as concentrações de P4 em bovinos antes e depois da IA têm sido positivamente associadas à melhora na taxa de prenhez (FOLMAN et al., 1990). A suplementação com AGPI demonstrou aumentar as concentrações de P4, diminuir a síntese endometrial de prostaglandina F2 α (MATTOS et al., 2002), aumentar o desenvolvimento de células luteais (LUCY et al., 1991) e diminuir o metabolismo de esteroides do fígado (SANGSRITAVONG et al., 2002), sendo tais eventos importante no sucesso da estabilização e manutenção da prenhez. Além disso, a suplementação com AGPI mostrou aumentar as concentrações de insulina circulante, que também está envolvida na expressão de genes hepáticos que estão envolvidos no processo de catabolização da P4 (LEMLEY et al., 2008).

Vacas Nelore múltíparas (n= 100; 152 \pm 1 dias pós parto) que foram suplementadas com sais de cálcio de óleo de soja (100 gramas/vaca/dia) durante 21 dias a partir da IATF tiveram um aumento significativo na concentração plasmática de P4 (4,58ng/ml e 3,89ng/ml no grupo tratado e controle; respectivamente) e volume médio do corpo lúteo (3.25cm³ e 2.76cm³ no grupo tratado e controle; respectivamente), quando comparado a vacas que receberam dieta controle à base de kaolin (100 gramas/vaca/dia) (CIPRIANO et al., 2016). Já Cooke et al. (2014) observaram um aumento na concentração de P4 plasmática (5,69ng/ml no grupo tratado e 3,91ng/ml no grupo controle) somente no dia 7 pós IATF, em vacas Nelore múltíparas não lactantes que receberam uma suplementação com sais de cálcio de óleo de soja por 18 dias imediatamente após à IA.

Em vacas Nelore múltíparas que foram suplementadas com dieta à base de semente de girassol (alto ácido linoleico) por 21 dias imediatamente após a inseminação artificial da IATF, não foi encontrado diferença nas concentrações plasmáticas de P4. A mesma suplementação à base de semente de girassol por 21 dias em novilhas zebuínas com início no dia da TETF, ocasionou um aumento na

concentração plasmática de P4 no dia 19 após o final do protocolo hormonal da TETF (CORDEIRO et al., 2015).

Lopes et al. (2009), trabalhando com vacas Girolando múltiparas ovariectomizadas, e simulando a produção de P4 através de implantes impregnados de P4 intravaginal, compararam três grupos de suplementação com ou sem AGPI para a obtenção de concentração plasmática de P4 e insulina. O grupo 1 recebeu a dieta base adicionado de 0,1Kg/dia/vaca de kaolin (grupo controle), o grupo 2 recebeu a dieta base adicionado de 0,1Kg/dia/vaca de kaolin + 0,1Kg/dia/vaca de sais de cálcio de óleo de soja (MegalacE®, grupo PF100), e o grupo 3 recebeu a dieta base adicionado de 0,1Kg/dia/vaca de kaolin + 0,2Kg/dia/vaca de sais de cálcio de óleo de soja (MegalacE®, Grupo PF200). As vacas suplementadas com PF100 tiveram uma maior concentração de P4 plasmática comparadas ao grupo controle e PF200, e as concentrações plasmáticas de insulina não tiveram diferença estatística entres os tratamentos (LOPES et al., 2009).

2.5 – Efeitos dos AGPI no embrião e concepto

O estabelecimento da prenhez nos ruminantes requer um oócito competente, a execução da IA no tempo correto e uma secreção hormonal adequada na fase folicular e luteal. O embrião deve-se desenvolver de uma forma adequada, produzindo interferon-tau suficiente para sinalizar sua existência, estimulando genes do endométrio uterino para inibir a síntese de receptores de ocitocina e conseqüentemente a produção final de prostaglandina 2α , permitindo assim o estabelecimento de um CL ativo (BOTT et al., 2010). A qualidade e competência do oócito e do embrião estão relacionados a determinados ácidos graxos que estão presente nos fosfolipídios da membrana, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento destes oócitos e embriões antes, durante e após a fertilização (SANTOS et al., 2008). Esses ácidos graxos desempenham um papel importante nas modificações biofísica e nas atividades biológicas da membrana, incluindo fluidez e proliferação celular (BILBY et al., 2006).

Brandão et al. (2018) trabalhando com vacas da raça Angus (n=1.771), múltiparas, em lactação com média de 65 dias pós-parto, onde foram suplementadas com sais de cálcio de óleo de soja (óleo de soja protegida) por 22 dias pós IATF, apresentaram uma maior concentração plasmática de ácido linoleico no D7 e D15 pós

suplementação, comparado a vacas que não receberam tal suplementação. Tais vacas também apresentaram um aumento na expressão de mRNA de *interferon-tau* pelos conceptos, e aumento da expressão de mRNA do gene *interferon-stimulated 15* e *20,50-oligoadenylate synthetase* no vigésimo dia de prenhez. Porém, vacas da raça Angus que receberam uma suplementação por 8 semanas (5 semanas pré protocolo de sincronização de ovulação, e 3 semanas pós início de protocolo de sincronização de ovulação) à base de óleo de peixe protegida (alto ômega 3) e óleo de girassol protegida (alto ômega 6), tiveram diferença no tamanho do conceito coletado com 15 dias pós inseminação, sendo que as vacas que receberam óleo de peixe tiveram um tamanho médio de 6,4 cm, contra 2,5 cm do grupo que recebeu óleo de girassol (GILLER et al., 2018).

Vacas leiteiras (n=22) que foram alimentadas com uma dieta com baixa concentração de gordura (200 gramas/dia de sais de cálcio de óleo de palma) ou com alta concentração de gordura (800 gramas/dia de sais de cálcio de óleo de palma) no período de 40 a 60 dias pós-parto, apresentaram diferença em oócitos coletados. Os animais alimentados com alta gordura tiveram a quantidade de pequenos e médios folículos diminuídos, uma melhora significativa na produção de blastocistos, e os blastocistos desses animais apresentaram significativamente mais massa celular interna e células trofotoderma, comparado aos animais que receberam a dieta com baixa gordura (FOULADI-NASHTA et al., 2007). Já o tratamento *in vitro* do complexo cúmulus-oócito com ácido linolênico (n-3), aumentou a quantidade de gametas que atingiram a segunda divisão meiótica e as divisões subsequentes dos embriões, consequentemente aumentando a taxa de blastocisto (MAREI et al., 2009). Cerri et al. (2009) trabalhando com vacas leiteiras, onde foram suplementadas com sais de cálcio de óleo de palma ou ácido linoléico + octadecaenóico vinte e cinco dias antes do parto e oitenta dias pós-parto, observaram que o grupo que recebeu ácido linoléico + octadecaenóico obteve uma maior proporção de embriões excelentes e de boa qualidade. Porém, Childs et al. (2008) alimentando novilhas mestiças de corte (n=60) com dieta enriquecida de ácido linolênico (n-3) por 50 dias pós inseminação artificial, não observou nenhuma diferença no número e qualidade dos embriões, mas obteve um menor número de embriões degenerados quando comparado com o grupo controle (média de 1.25 embriões degenerados no grupo tratado e 4.06 embriões no grupo controle). Embriões bovinos cultivados em meio com soro de novilhas que receberam na ração um alto teor de lipídios protegidos da bio-hidrogenação do rúmen

(dieta rica em óleo de palma), tiveram uma menor produção de blastocisto em comparação com o grupo controle (27,8% no grupo tratado e 36,2% no grupo controle), sendo observado uma maior expressão de genes relacionados com a apoptose no grupo tratado, como o bCL2-associado à proteína BAX (LEROY et al., 2010). Então, mesmo quando estudos mostram um melhor desenvolvimento embrionário com dietas ricas em gorduras, os resultados não são consistentes. Assim, torna-se importante averiguar quais os ácidos graxos em particular para cada situação fisiológica, buscando os AGPI mais benéficos para a sobrevivência embrionária (SANTOS et al., 2008).

2.6 – Efeitos dos AGPI no endométrio e microambiente uterino

A suplementação com AGPI demonstrou alteração no perfil de ácidos graxos do endométrio uterino em vacas de corte (BURNS et al., 2003). Alguns ácidos graxos n-3 reduziram a biossíntese de prostaglandina da série 2 em células e tecidos de estudos realizado *in vitro* (MATTOS et al., 2003), e alguns isômeros do ácido linoléico conjugado também inibiram a síntese de PGF₂α (HARRIS et al., 2001). Essas informações são interessantes pelo fato que a maioria das perdas embrionárias acontecem durante os dias 8-16 pós IA (SREENAN et al., 2001), momento em que o embrião/concepto tem que sinalizar sua existência através da liberação de interferon-tau, inibindo a síntese de PGF₂α e conseqüentemente a luteólise (THATCHER et al., 1994). Quando não tem sucesso na sinalização por parte do embrião/concepto, ocorre a incapacidade de inibir a síntese de PGF₂α durante o período crítico de reconhecimento da gestação (CHILDS et al., 2008), onde o sucesso nas taxas de sobrevivência embrionário e prenhez é dependente de tal sinalização (BINELLI et al., 2001). Alguns AGPI podem inibir a síntese uterina de PGF₂α competindo com o ácido araquidônico por meio da COX ou competindo com os ácidos araquidônicos pelas enzimas fosfolipase A2 (MATTOS et al., 2000).

Meier et al. (2009) mostraram que tecidos trofoblásticos e endometriais de vacas prenhes e não prenhes, incubados em meios suplementados com ácidos graxos (eicosapentaenoico, docosahexaenóico e ácido linoléico), tiveram uma maior liberação de PGF₂α do endométrio prenhe do que do endométrio não prenhe, e as concentrações de PGF₂α foram semelhantes.

Vacas Nelore multíparas suplementadas com 0.1Kg/dia/vaca de sais de cálcio de óleo de soja por 18 dias após a inseminação artificial não tiveram diferenças na quantidade de ácido linoleico (n-6) e linolênico (n-3) nas amostras de tecidos endometriais (COOKE et al., 2014). Cipriano et al. (2016) não encontraram diferença na expressão no mRNA do *cyclooxygenase-2* e *prostaglandin E synthase* no endométrio uterino, porém foram expressados em maior quantidade nas vacas que foram suplementadas com sais de cálcio de óleo de soja. Em adição, Fontes et al. (2018) suplementando vacas taurinas de corte com 0,23 Kg/dia/vaca de sais de cálcio de óleo de soja por trinta dias antes da IATF e 7 dias após a IA, não encontraram diferença na expressão de mRNA dos genes ISG, OAS1 e MX2 no dia 18 pós inseminação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Experimento 1

3.1.1 Local do experimento

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, localizada na cidade de Presidente Bernardes, estado de São Paulo, Brasil. O experimento foi realizado de junho a julho de 2017.

As análises plasmáticas de ácidos graxos foram realizadas no laboratório de pesquisa em bovinos de leite da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Pirassununga/SP).

As análises plasmática de progesterona foram realizadas no laboratório de endocrinologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (Araçatuba/SP).

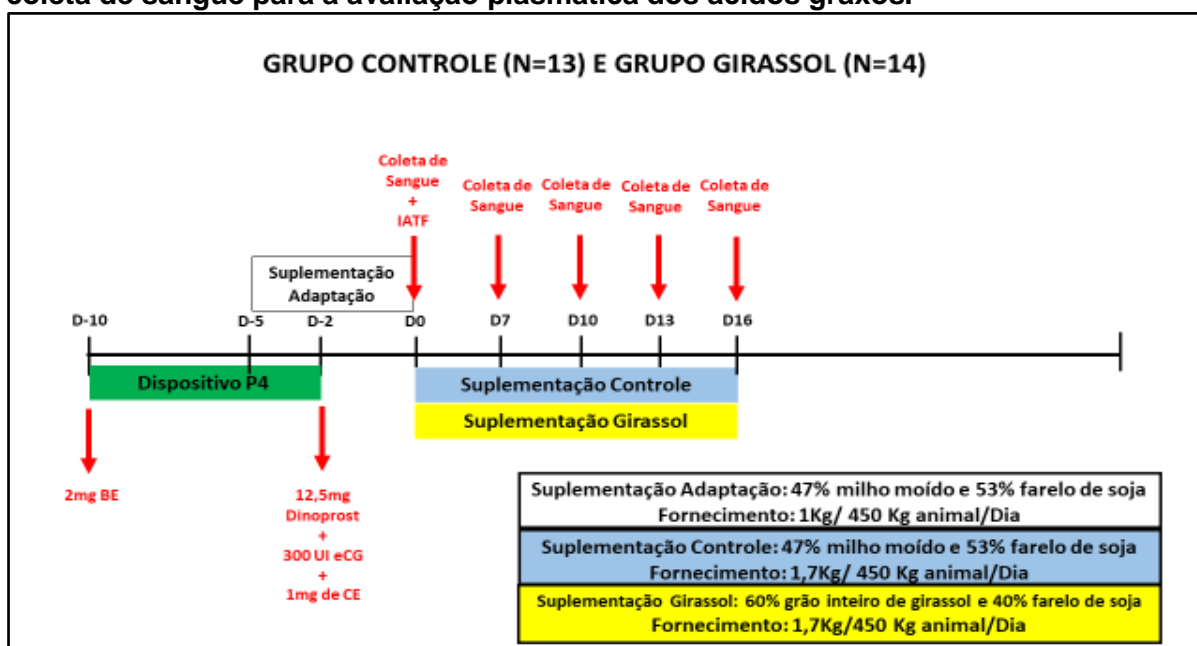
3.1.2 Animais

Foram utilizadas 30 vacas multíparas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), sem bezerro ao pé, não prenhe, com peso médio de $558,85 \pm 79,49$ kg e escore de condição corporal $2,84 \pm 0,55$ (em escala de 1 a 5; EDMONSON et al., 1989). As vacas foram alojadas em piquetes de 1 hectare, de forma que se reuniu duas vacas do mesmo grupo de tratamento em cada piquete. Cada piquete continha cochos individuais para cada vaca, que tiveram a ingestão de suplemento controlada individualmente a cada dia. Previamente ao início do protocolo de IATF, as vacas foram submetidas a um exame ginecológico por ultrassonografia transretal, utilizando um ultrassom (DP-20®, Mindray, São Paulo, Brasil) com transdutor linear de frequência 7,5 MHz (Mindray, São Paulo, Brasil). Foram consideradas aptas a participar do experimento vacas que apresentaram, no momento da avaliação, normalidade nas características do sistema genital e a presença de corpo lúteo no ovário. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso dos Animais (CEUA), da UNESP da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnologia, Campus de Dracena/SP, sob o número de protocolo 36/2016.

3.1.3 Sincronização das ovulações

As fêmeas foram submetidas à sincronização das ovulações pelo uso de um dispositivo intravaginal contendo 30g de silicone e 1g de progesterona (Sincrogest® Ouro fino, Cravinhos, São Paulo, Brasil), associado a uma injeção de 2mg de benzoato de estradiol (Sincrodiol® Ouro fino, Cravinhos, São Paulo, Brasil) administrada via intramuscular (IM); considerou-se o dia de início do protocolo o D-10. Oito dias após a colocação do dispositivo (D-2) foi realizada a retirada do dispositivo intravaginal e os animais receberam 0,075mg de cloprostenol sódico (Sincrocio® Ouro fino, Cravinhos, São Paulo, Brasil), 0,6mg de cipionato de estradiol (SincroCP® Ouro fino, Cravinhos, São Paulo, Brasil) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Novormon® Zoetis, São Paulo, Brasil), todas via intramuscular IM (Figura 1).

Figura 1 - Delineamento do experimento 1 (Grupo Controle e Grupo Girassol), ilustrando o protocolo de IATF utilizado, as dietas de suplementações oferecidas e os dias de coleta de sangue para a avaliação plasmática dos ácidos graxos.



Fonte: Elaborado pelo Autor

3.1.4 Suplementação de adaptação

Cinco dias antes das vacas iniciarem a suplementação com os tratamentos (D-5), todos os animais passaram a receber nos cochos individuais a suplementação de adaptação (40% milho moído + 53% de farelo de soja), na quantidade de 1 kg / 450 kg animal/dia) uma vez ao dia (às 8:00 horas), como estratégia para condicionar as vacas a comerem no cocho imediatamente quando iniciasse os tratamentos (Figura 1).

3.1.5 Inseminação artificial em tempo fixo

As vacas sincronizadas, 48 horas após a remoção do dispositivo vaginal (D=0), foram inseminadas com o sêmen de um touro da raça Nelore previamente reconhecido com alto índice de fertilidade em programas de IATF. As inseminações foram realizadas por um único inseminador experiente (Figura 1).

3.1.6 Exame ultrassonográfico para confirmar à ovulação

Dois dias após à IATF (D2), as vacas foram submetidas a exames ultrassonográficos para a confirmação da ovulação, tendo utilizando um ultrassom (DP-20®, Mindray, São Paulo, Brasil) com transdutor linear de frequência 7,5 MHz (Mindray, São Paulo, Brasil). Embora a suplementação das vacas tenha sido iniciada no D0, somente vacas que tiveram a ovulação confirmada (ausência do folículo dominante no exame ultrassonográfico) no D2 integraram um dos grupos experimentais. Das 30 fêmeas previamente sincronizadas, confirmou-se a ovulação de 27 vacas, que então constituíram os grupos experimentais, tendo sido 3 vacas descartadas do experimento.

3.1.7 Tratamentos

As 27 fêmeas que ovularam receberam a suplementação 1,7 kg / dia para cada 450 kg de peso vivo, sendo o fornecimento foi controlado individualmente para cada animal. O suplemento continha 40% de farelo de soja com 44% de proteína bruta (PB) e 60% de semente de girassol (Grupo Girassol; n=14) ou 53% de farelo de soja com 44% de PB e 47% de milho (Grupo Controle; n=13). A suplementação foi realizada durante 17 dias a partir do dia da IATF (D0-D16). Os dois suplementos fornecidos aos animais foram igualmente balanceados em energia e proteína, ambos com 72% de NDT e 24% de PB, porém um acrescido e o outro não com semente de girassol. Adicionalmente todas as vacas receberam 30 kg para cada 450 kg de peso vivo/dia de silagem de sorgo (Figura 1). As fêmeas foram mantidas em piquetes de aproximadamente 1 hectare, e tinham acesso à pastagem de *Brachiaria brizantha*, sal mineral e água *ad libitum*. Os 27 animais foram divididos de acordo com o peso e condição reprodutiva em 14 piquetes, sendo 7 piquetes para o grupo controle (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7) e 7 para os animais suplementados com semente de girassol (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7). A cada piquete foram alojados 2 animais que receberam os respectivos suplementos em cochos individuais com controle total da quantidade de

suplemento ingerida diariamente. As sobras diárias dos suplementos oferecidos individualmente foram observadas, entretanto, não houve sobras em nenhum dos dias nos diferentes grupos de tratamento.

3.1.8 Coleta de sangue

Amostras de sangue foram coletadas da veia caudal (às 8:00 horas) em tubos vacutainer (Becton, Dickinson and Company; BD) contendo 2% de EDTA nos dias D0, D7, D10, D13 e D16 (Figura 1). Foram coletados aproximadamente 20mL de sangue/animal/dia. O sangue foi centrifugado a 2500g durante 20 minutos. Após a centrifugação, o plasma foi removido e acondicionado em microtubos. As amostras de plasma foram armazenadas a -80°C.

3.1.9 Análise plasmáticas de ácidos graxos por cromatografia gasosa

As amostras de plasma constituíram um “pool”, em ambos os grupos específicos, para análise dos ácidos graxos. Para cada grupo foram formados três “pools” com 4 animais/pool, para cada um dos diferentes dias analisados nos tratamentos. Essas formações dos “pools” foram necessárias para obter uma quantidade de plasma suficiente exigida para realizar a técnica de cromatografia gasosa. Para a quantificação dos ácidos graxos plasmáticos foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa (GC-2010 Plus - Shimadzu, auto-injetor AOC 20i), usando coluna capilar SP-2560 (100m × 0,25 mm de diâmetro com 0,02mm de espessura, Supelco, Bellefonte, PA). Foi utilizado o método de extração de Folch, Lee e Sloane-Stanley (1957), onde a gordura separada foi metilada e os ésteres metílicos foram formados de acordo com Kramer, Fellner e Dugan (1997). Para o processo de metilação foram utilizados dois padrões internos para quantificação das perdas do processo: o ácido esteárico (C18:0) e o ácido nonadecanóico (C19:0). Foram avaliados um total de 41 ácidos graxos por amostra de plasma: (C4:0 (Butírico), C6:0 (Capróico), C8:0 (Caprílico), C10:0 (Cáprico), C11:0 (Undecanóico), C12:0 (Láurico), C13:0 (Tridecanóico), C14:0 (Mirístico), C14:1 (Miristoleico cis-9), C15:0 (Pentadecanóico), C15:1 (Pentadecanóico cis-10), C16:0 (Palmítico), C16:1 (Palmitoleico cis-9), C17:0 (Heptadecanóico), C17:1 (Heptadecanóico cis-10), C18:0 (Esteárico), C18:1 n9,t (Elaídico trans-9), C18:1 trans-11 (Vacênico), C18:1 n9,c (Oleico cis-9), C19:0 (Padrão interno), C18:2 n6,t (Linolelaídico trans-9,12), C18:2 n6,c (Linoleico cis-9,12), C20:0 (Araquídico), C18:3 n6 (gama-Linolênico cis-6,9,12), C20:1

n9 (Eicosaenóico cis-11), C18:3 n3 (alfa-Linolênico cis-9,12,15), CLA cis-9, trans-11, CLA trans-10, cis-12, C21:0 (Heneicosanóico), C20:2 n6 (Eicosadienóico cis-11,14), C22:0 (Behênico), C20:3 n6 (Eicosatrienóico cis-8,11,14), C22:1 n9 (Erúxico cis-13), C20:3 n3 (Eicosatrienóico cis-11,14,17), C20:4 n6 (Araquidônico cis-5,8,11,14), C23:0 (Tricosanóico), C22:2 n6 (Docosadienóico cis-13,16), C24:0 (Lignocérico), C20:5 n3 (Eicosapentaenóico cis-5,8,11,14,17), C24:1 n9 (Nervônico cis-15), C22:6 n3 (Docosahexaenóico cis-4,7,10,13,16,19). A temperatura inicial foi de 70°C, com aquecimento progressivo (13°C/min) até chegar a 175°C, mantendo-se por 27 minutos. Em seguida, um novo aumento de 4°C/minuto foi iniciado até 215°C, mantendo-se durante 31 minutos. O Split/Ratio utilizado foi 1:50, e hidrogênio (H₂) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 40 cm³/s.

3.1.10 Análise plasmática de progesterona por radioimunoensaio

A concentração plasmática de progesterona foi mensurada pela técnica de radioimunoensaio utilizando o Kit comercial ImmuChem™ Double Antibody 17 α -Hydroxyprogesterone 125I RIA da *MP Biomedicals, LLC Diagnostics Division Orangeburg, NY 10962*; com um limite de detecção de 0,009 ng/ml e limite de quantificação de 0,030.

3.1.11 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o SAS (versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), considerando a vaca como unidade experimental e um delineamento inteiramente casualizado. As variáveis dependentes contínuas (palmítico, esteárico, oleico, linoléico e progesterona) foram analisadas como medidas repetidas no tempo utilizando o PROC MIXED e o comando REPEATED. Incluiu-se no modelo como efeito fixo as variáveis independentes tratamento, dia e sua interação. O efeito aleatório de vaca dentro de tratamento (Grupo Controle e Grupo Girassol) foi utilizado como erro termo para se determinar o efeito do tratamento sobre as concentrações de ácido graxo palmítico, esteárico, oleico e linoleico. Em todos os modelos avaliou-se as estruturas de variância-covariância, dentre todas as estruturas testadas, selecionou-se aquela com o menor valor do critério de informação corrigido de Akaike (AICC). A premissa de normalidade do resíduo foi checada pelos gráficos de diagnóstico do PROC MIXED e pelo teste Shapiro-Wilk do PROC UNIVARIATE utilizando o resíduo studentizado (output do PROC MIXED). A opção Kenward-Roger

de ajuste dos graus de liberdade do denominador foi incorporado em todos os modelos rodados. Os efeitos das variáveis independentes no PROC MIXED foram determinados pelo teste F utilizando a soma de quadrado tipo III. Quando necessário, o comando slice foi adicionado ao procedimento LSMEANS, para identificar o efeito de tratamento em momentos específicos. Os resultados foram reportados como LSMEANS \pm EPM. Em todos os casos uma probabilidade $\leq 0,05$ indicou que a diferença foi significativa e entre $0,05 > P \leq 0,10$ indicou que diferença tendeu a ser significativa.

3.2 Experimento 2

3.2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado na Fazenda Santa Encarnação, situada na cidade de Santa Rita do Pardo, estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. O experimento foi realizado de novembro de 2017 a fevereiro 2018.

As análises de lipídios plasmáticos foram realizadas no analisador bioquímico automático (RX Daytona da Randox) do laboratório multiusuário de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade de São Paulo (Pirassununga/SP).

3.2.2 Animais

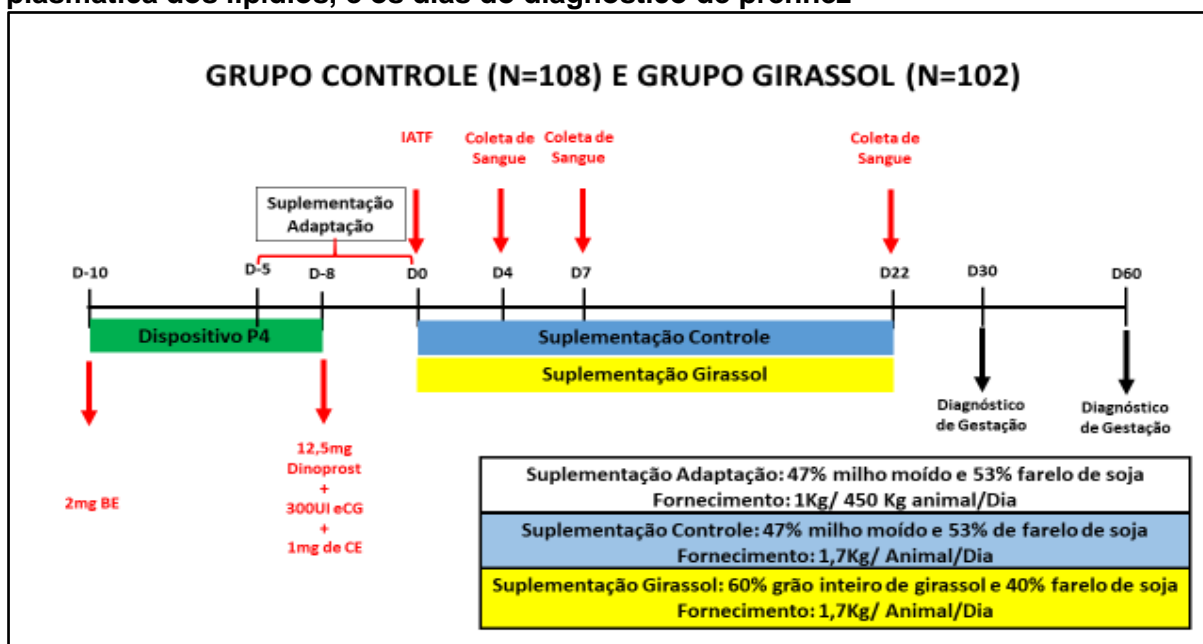
Neste estudo, realizado em duas etapas, foram utilizadas 210 vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). Na primeira etapa, realizada em novembro de 2017, foram utilizadas 133 vacas primíparas, sem bezerro ao pé, 420 dias pós-parto (± 56 DPP), peso médio de $453 \pm 48,02$ Kg e escore corporal médio de $3,067 \pm 0,42$ (em escala de 1 a 5; EDMONSON et al., 1989). Na segunda etapa, realizada em dezembro de 2017, utilizou-se 77 vacas múltiplas em lactação com bezerro ao pé, 79 dias pós-parto (± 23 DPP), com peso médio de $426 \pm 52,95$ Kg e escore corporal médio de $2,83 \pm 0,32$ (em escala de 1 a 5; EDMONSON et al., 1989). As vacas foram mantidas em um sistema extensivo, onde continha pastagem de *Brachiaria decumbens* cv. *Basilisk* com sal mineral (Fosbovi® 20, Tortuga, DSM produtos nutricionais, Brasil) e água a vontade durante todo o experimento. Antes do início da realização do protocolo de sincronização, todas as vacas foram submetidas a um exame ginecológico com ultrassonografia (DP-20®, Mindray, São Paulo, Brasil). Participaram do estudo apenas

fêmeas que apresentaram normalidade no sistema reprodutivo no momento da avaliação. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnologia - FCAT, UNESP de Dracena-SP, sob o número de protocolo 36/2016.

3.2.3 Sincronização das ovulações

As vacas receberam no D-10 um dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona (CIDR®, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários, Campinas-SP, Brasil) associado a administração de 2mg de benzoato de estradiol (Gonadiol, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários, Campinas-SP, Brasil), via IM. Oito dias após a colocação do dispositivo (D-2), o mesmo foi removido e administrou-se 12,5mg de dinoprost (Lutalyse®, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários, Campinas-SP, Brasil), 1mg de cipionato de estradiol (E.C.P.®, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários, Campinas-SP, Brasil) e 300UI de gonadotrofina coriônica equina - eCG (Novormon®, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários, Campinas-SP, Brasil), todos via IM (Figura 2).

Figura 2 - Delineamento do experimento 2, mostrando o protocolo de IATF utilizado, as dietas de suplementações oferecidas, os dias de coleta de sangue para a avaliação plasmática dos lipídios, e os dias do diagnóstico de prenhez



Fonte: Elaborado pelo Autor

3.2.4 Suplementação de adaptação

Cinco dias antes das vacas iniciarem a suplementação com os tratamentos (D-5), todos os animais passaram a receber nos cochos a suplementação de adaptação (40% milho moído + 53% de farelo de soja), na quantidade de 1Kg/450Kg animal/dia) como estratégia para condicionar as vacas a comerem no cocho (Figura 2).

3.2.5 Inseminação artificial em tempo fixo

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) foi realizada 48 horas após a retirada do implante de progesterona (D0). Todos animais foram inseminados por um único inseminador experiente. Na primeira etapa foi utilizado cinco touros da raça Nelore e na segunda etapa cinco touros da raça Aberdeen Angus. Os touros foram divididos equitativamente entre os diferentes grupos de tratamento (Figura 2).

3.2.6 Formação dos grupos experimentais

Na primeira etapa, os animais (n=133) foram divididos em dois grupos: Grupo Controle (n=66) e Grupo Girassol (n=67). Na segunda etapa, os animais (n=77) também foram divididos em dois grupos: Grupo Controle (n=42) e Grupo Girassol (n=35). Assim, considerando ambas as etapas, as vacas foram divididas equitativamente em dois grandes grupos: Grupo Controle (n=108) e Grupo Girassol (n=102).

3.2.7 Tratamentos

A suplementação fornecida continha 40% de farelo de soja com 44% de proteína bruta (PB) e 60% de semente de girassol (Suplemento Girassol) ou 53% de farelo de soja com 44% de PB e 47% de milho (Suplemento Controle). Os animais do Grupo Controle receberam 1,7kg/dia/animal de suplemento controle durante 23 dias a partir do dia da IATF (Grupo Controle). Os animais suplementados com semente de girassol receberam 1,7kg/dia/animal de suplemento a partir do dia da IATF por 23 dias (Grupo Girassol) (Figura 2). Os dois suplementos fornecidos diariamente aos animais foram igualmente balanceados em energia e proteína, ambos com 72% de NDT e 24% de PB, sendo ambos isoprotéico e isoenergético. Os cochos utilizados para o fornecimento dos suplementos apresentavam uma área de 22 cm lineares para cada vaca. A suplementação foi fornecida todos os dias no período da manhã. Ao término do dia, as sobras dos cochos foram recolhidas e pesadas.

3.2.8 Coleta de sangue

As amostras de sangue de 10% dos animais de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, foram coletadas em diferentes dias às 8:00 horas. Foi coletado sangue nos dias D4, D7 e D22 pós inseminação artificial (D0) (Figura 2). O sangue foi coletado da veia jugular, em tubos Vacutainer (Becton, Dickinson and Company; BD) contendo EDTA, onde para cada animal coletou-se aproximadamente 20mL de sangue. O sangue coletado foi imediatamente acondicionado a 4°C. O sangue foi centrifugado a 2500g durante 20 minutos. Após a centrifugação, o plasma foi removido e acondicionado em microtubos. As amostras de plasma foram armazenadas a -80°C.

3.2.9 Diagnóstico de prenhez

O diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia (DP-20®, Mindray, São Paulo, Brasil) com transdutor linear de 7,5 MHz de frequência (Mindray, São Paulo, Brasil), 30 (D30) e 60 dias (D60) após à IATF (Figura 2). As fêmeas foram classificadas em prenhes (presença de vesícula amniótica contendo um embrião vivo no D30 ou um feto vivo no D60) ou não prenhes. O diagnóstico foi realizado em todos os animais por um único profissional. A mortalidade embrionária foi calculada considerando a taxa de prenhez no D30 subtraída da taxa de prenhez no D60 (Figura 2).

3.2.10 Análise de lipídios plasmáticos

As amostras de plasma foram mensuradas para avaliar as concentrações plasmáticas de colesterol, triglicerídeos, HDL, VLDL e LDL. O colesterol, triglicérides e HDL foram quantificados através de kits comerciais (CH 3610 RX series, TR 3823 e CH 3811, respectivamente). O VLDL e o LDL foram quantificados através de fórmulas fixas ($VLDL = \text{Triglicérides}/5\text{mg/dl}$; $LDL = \text{Colesterol total} - \text{HDL} - \text{VLDL mg/dl}$).

3.2.11 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o SAS (versão 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) considerando a vaca como unidade experimental e um delineamento em blocos casualizado. As variáveis dependentes contínuas (colesterol, triglicerídeo, HDL, VLDL e LDL) dentro de cada dia D4, D7 e D22 foram analisadas utilizando o PROC MIXED. Incluiu-se no modelo como efeito fixo a variável independente tratamento e como efeito aleatório a variável bloco (primípara e

multípara). As premissas de normalidade do resíduo e homogeneidade das variâncias, teste de Levene do PROC GLM, foram checadas. Todas as variáveis dependentes contínuas atenderam a premissa de normalidade do resíduo. Logo após, procedia-se a checagem do AICC, quanto menor melhor, e das premissas. Todas as variáveis atenderam a premissa após a modelagem. Os efeitos das variáveis independentes no PROC MIXED foram determinados pelo teste F utilizando a soma de quadrado tipo III. Quando necessário, as médias entre os tratamentos foram comparadas incorporando ao comando DIFF o teste de TUKEY ajustado. Para comparação da variação das concentrações de ácido graxo ao longo dos dias para cada tratamento, utilizou-se modelo similar. Nesse caso, incluiu-se no modelo como efeito fixo a variável independente dia. Para análise da variável dependente binária (prenhes) utilizou-se o PROC GLIMMIX empregando-se a distribuição binomial. Incluiu-se no modelo o efeito fixo de efeito de tratamento e aleatório de bloco (primípara e múltipara). Os dois grupos de animais analisados (primípara e múltipara) não foram estatisticamente diferentes, sendo os dois grupos ajuntados para a realização da estatística geral. Entre os 10 diferentes touros utilizados, não se observou diferença estatística entre eles, anulando a variável touro entre os grupos. Os resultados foram reportados como LSMEANS \pm EPM. Em todos os casos uma probabilidade ≤ 0.05 indicou que a diferença foi significativa e entre $0,05 > P \leq 0,10$ indicou que a diferença tendeu a ser significativa.

4 RESULTADOS

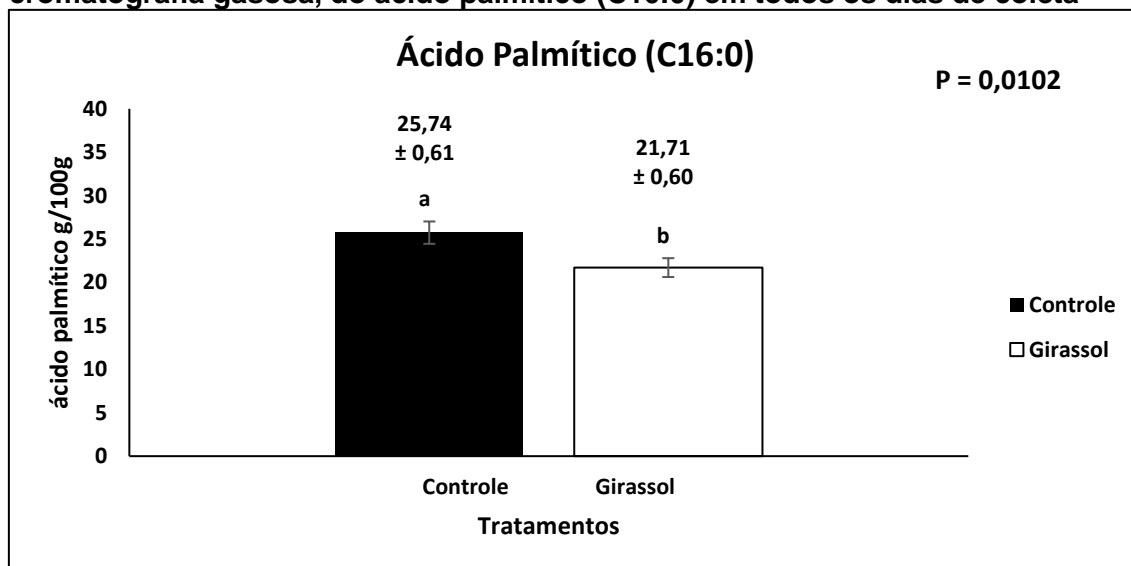
4.1 Experimento 1

Dentre os 41 ácidos graxos possíveis de serem identificados na cromatografia gasosa, apenas cinco alcançaram o pico cromatográfico. As mensurações estão expressas em g/100 gramas de plasma. Os ácidos graxos que alcançaram o pico cromatográfico foram o ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1 n9,c), ácido linoleico (C18:2 n6,c) e ácido alfa-linolênico (C18:3 n3).

4.1.1 Ácido Palmítico

Observou-se diferença estatística na concentração de ácido palmítico entre os tratamentos ($P=0,0102$) e os dias de coleta ($P=0,0020$), porém não houve efeito tratamento/dia ($P=0,2183$). Considerando a média das concentrações de todos os dias, houve uma maior concentração de ácido palmítico no grupo controle ($25,74 \pm 0,61$ g/100g) comparado ao grupo tratado com semente de girassol ($21,71 \pm 0,60$ g/100g) ($P=0,01$; Figura 3).

Figura 3 - Concentração plasmática média \pm erro padrão (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido palmítico (C16:0) em todos os dias de coleta



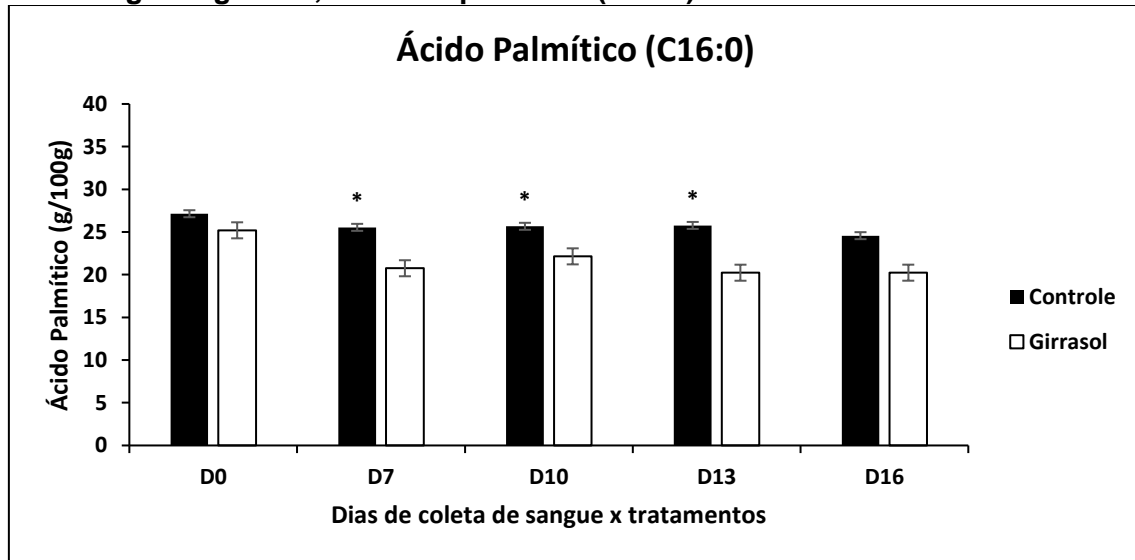
a,b Letras diferentes nas colunas difere entre os tratamentos ($P \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo Autor

Não houve diferença estatística entre os grupos no D0 ($P=0,2017$), entretanto houve uma maior concentração de ácido palmítico no grupo controle do D7, D10 e D13 ($P=0,0027$, $P=0,0295$ e $P=0,0084$; respectivamente), com uma tendência

($P=0,0758$) de maior concentração de ácido palmítico no grupo controle no dia 16 (Figura 4).

Figura 4 - Concentração plasmática média \pm erro padrão (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido palmítico (C16:0) em cada dia de coleta



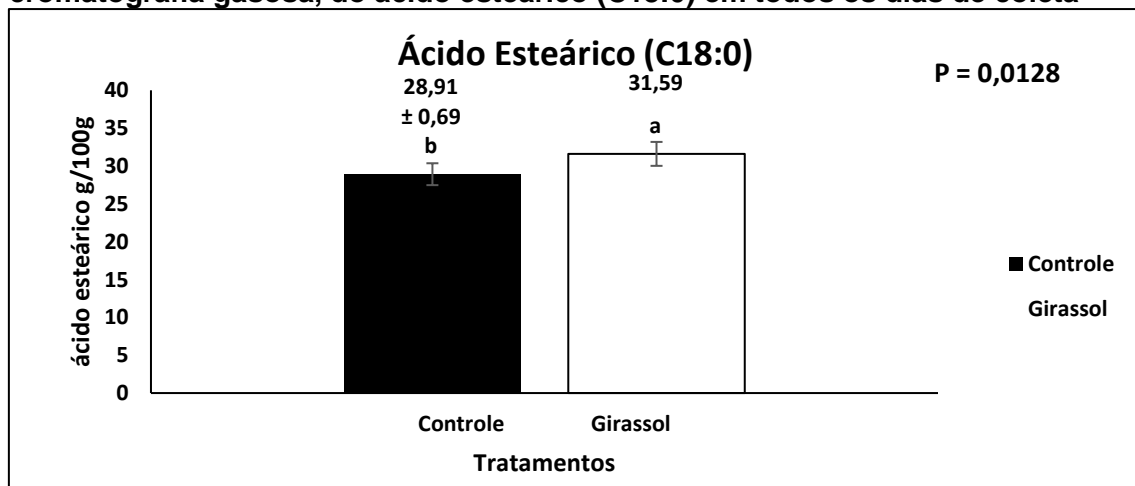
* Difere entre os tratamentos ($P \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo Autor

4.1.2 Ácido Esteárico

No grupo tratado com semente de girassol houve uma maior concentração de ácido esteárico ($31,59 \pm 0,69$ g/100g) comparado ao grupo controle ($28,91 \pm 0,69$ g/100g) ($P= 0,0128$). Entre os dias de coleta houve tendência de diferença ($P= 0,0632$) e tendência de diferença na relação tratamento x dia ($P=0,0919$; Figura 5).

Figura 5 - Concentração plasmática média \pm erro padrão (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido esteárico (C18:0) em todos os dias de coleta

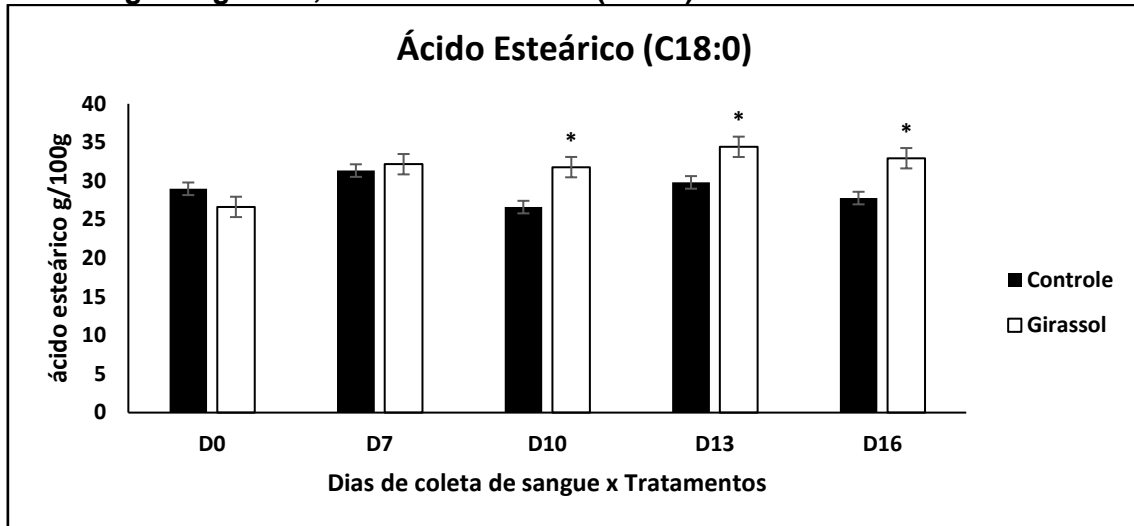


a,b Letras diferentes nas colunas difere entre os tratamentos ($P \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo Autor

Nos dias 0 e 7 não houve diferença estatística entre os grupos ($P=0,2975$ e $P=0,7106$; respectivamente). Foi observada uma maior concentração de ácido esteárico no grupo tratado com semente de girassol no D10, D13 e D16 ($P=0,0288$, $P=0,0489$ e $P=0,0292$; respectivamente) (Figura 6).

Figura 6 - Concentração plasmática média \pm erro padrão (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido esteárico (C18:0) em cada dia de coleta



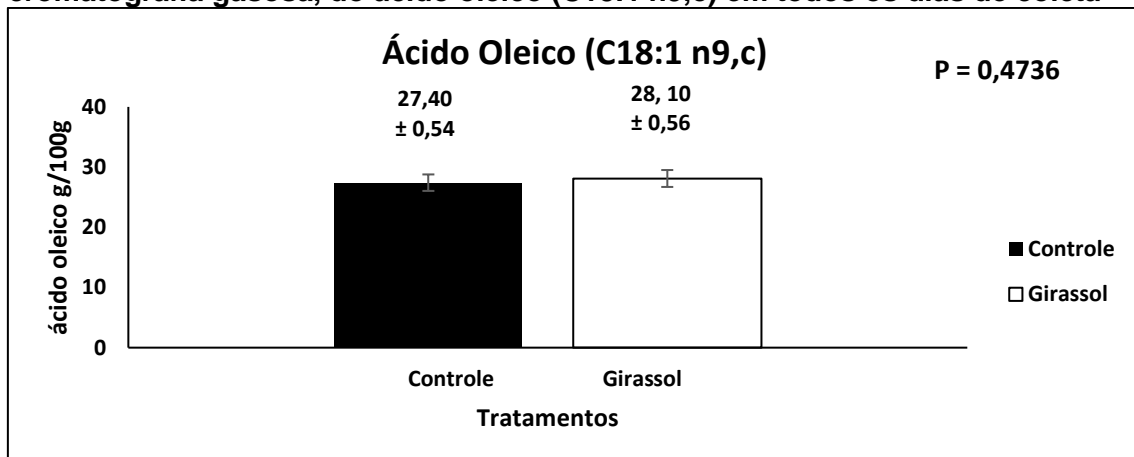
* Difere entre os tratamentos ($P \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo Autor

4.1.3 Ácido Oleico

Não houve diferença estatística na concentração de ácido oleico entre os tratamentos ($P=0,4736$) e os dias de coleta ($P=0,1222$), porém na relação tratamento/dia de coleta houve diferença estatística ($P=0,002$) (Figura 7).

Figura 7 - Concentração plasmática média \pm erro padrão (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido oleico (C18:1 n9,c) em todos os dias de coleta

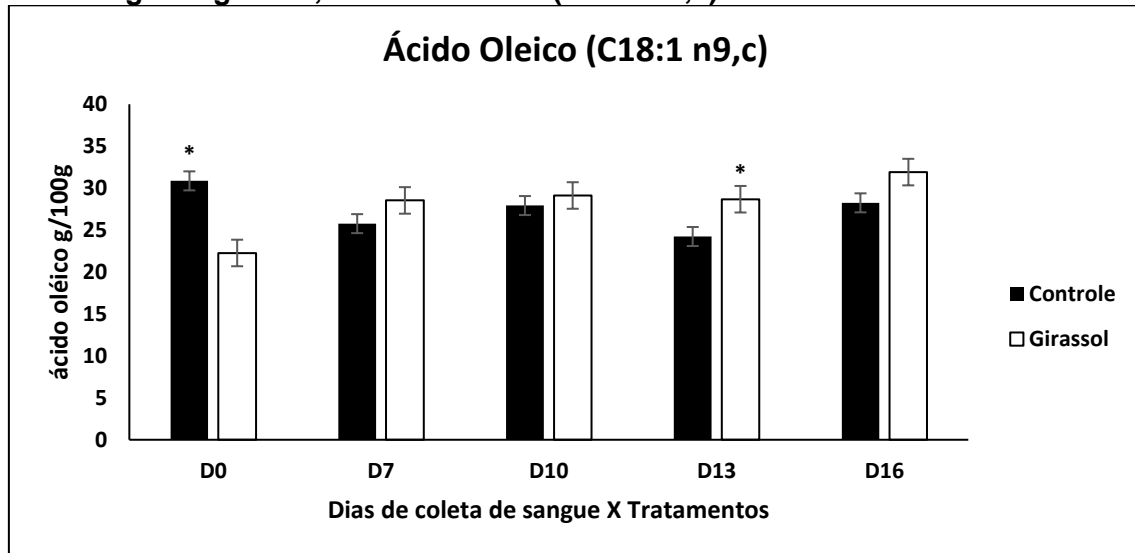


a,b Letras diferentes nas colunas difere entre os tratamentos ($P \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo Autor

Entre os tratamentos a concentração média não foi estatisticamente diferente entre o grupo controle ($27,40 \pm 0,54$ g/100g) e o grupo tratado com semente de girassol ($28,10 \pm 0,56$ g/100g). Houve diferença do ácido oleico no D0 entre os dias de coleta, onde a concentração de foi maior no grupo controle que o grupo tratado com semente de girassol ($P=0,007$), no D7 e D10 foram iguais entre os grupos ($P=0,2092$ e $P=0,5802$; respectivamente). No dia 13 o grupo tratado com semente de girassol teve uma maior concentração de ácido oleico ($P= 0,05$) e no dia 16 teve uma tendência de aumento ($P=0,10$) (Figura 8).

Figura 8 - Concentração plasmática média \pm erro padrão (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido oleico (C18:1 n9,c) em cada dia de coleta



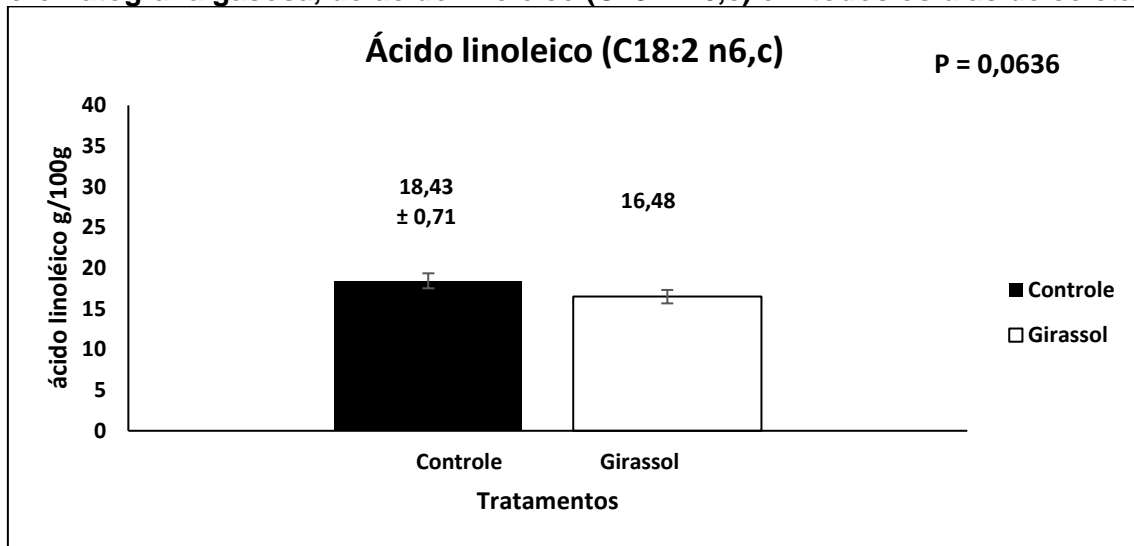
* Difere entre os tratamentos ($P \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo Autor

4.1.4 Ácido Linoleico

Houve uma tendência ($P= 0,0636$) de diferença na concentração de ácido linoleico entre os tratamentos, mas não houve diferença entre os dias de coleta ($P= 0,8687$), e houve diferença estatística na relação tratamento/dia ($P=0,0273$) (Figura 9).

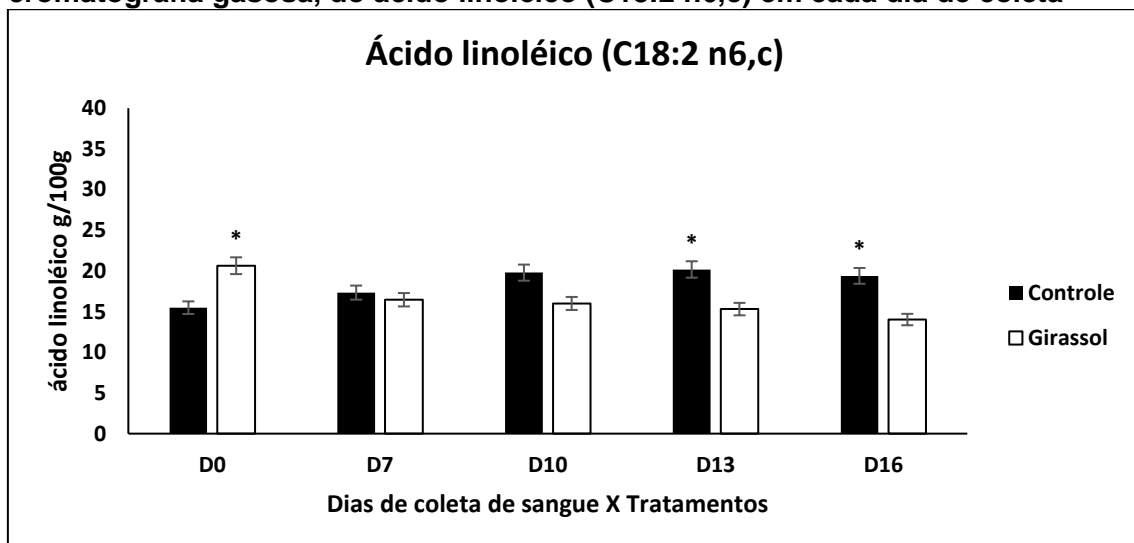
Figura 9 - Concentração plasmática média \pm erro padrão (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido linoléico (C18:2 n6,c) em todos os dias de coleta



Fonte: Elaborado pelo Autor

No D0 o grupo tratado com semente de girassol possuía maior concentração de ácido linoléico ($P=0,0458$) que o grupo controle, no D7 não houve diferença entre os grupos, no D10 o grupo controle teve uma tendência em ter maior concentração ($P=0,0955$), e no dia 13 e 16 houve uma maior concentração de ácido linoléico no grupo controle ($P=0,036$ e $P=0,0224$, respectivamente) que no grupo tratado (Figura 10).

Figura 10 - Concentração plasmática média \pm erro padrão (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido linoléico (C18:2 n6,c) em cada dia de coleta



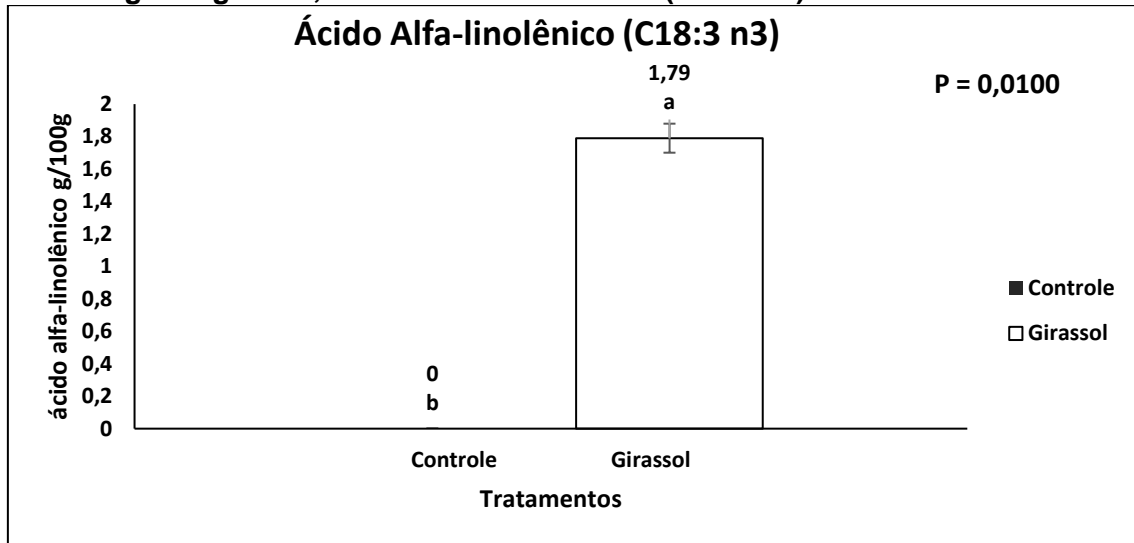
* Difere entre os tratamentos ($P \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo Autor

4.1.5 Ácido alfa-linolênico

Não observou-se nenhum pico cromatográfico de ácido alfa-linoleico nos animais do grupo controle, mas foram detectados picos de ácido alfa-linoleico nos animais do grupo que receberam semente de girassol na dieta. Na média o grupo girassol (1,79 g/100g) teve uma maior concentração ($P=0,0100$) ácido alfa-linoleico do que o grupo controle (0 g/100g) (Figura 11).

Figura 11 - Concentração plasmática média \pm erro padrão (g/100g), determinadas por cromatografia gasosa, do ácido alfa-linolênico (C18:3 n3) em todos os dias de coleta



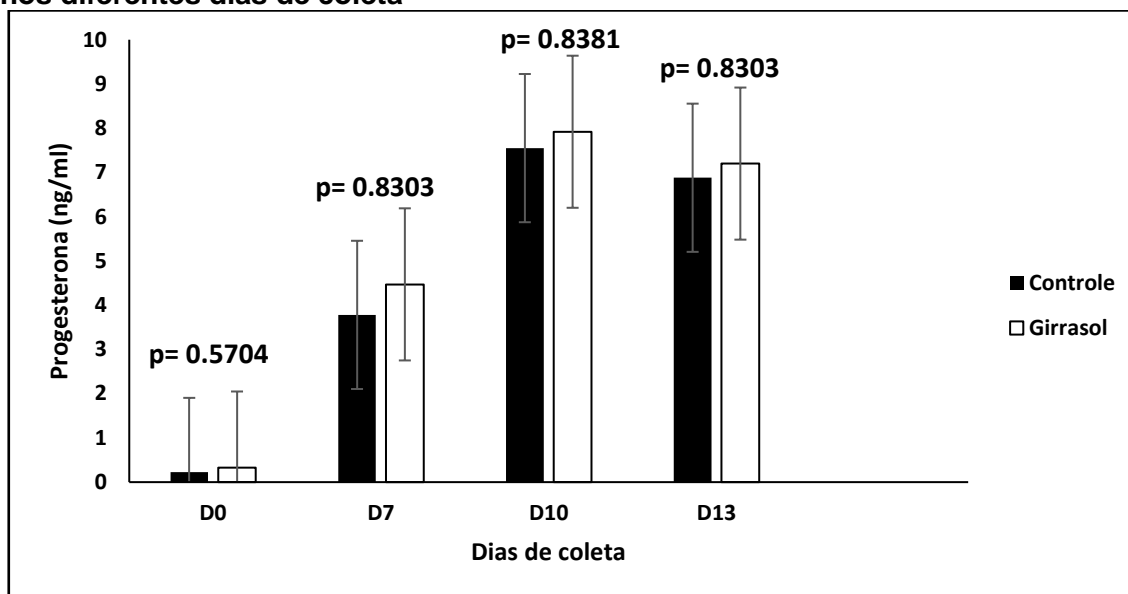
a,b Letras diferentes nas colunas difere entre os tratamentos ($P \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo Autor

4.1.6 Progesterona

Não houve diferença estatística na concentração plasmática de progesterona entre os tratamentos (Controle e Girassol) no D0 ($p=0,5704$), D7 ($p=0,4575$), D10 ($p=0,8381$) e D13 ($p=0,8303$). Os dados estão expressos na figura 12.

Figura 12 - Concentração plasmática média \pm erro padrão (ng/ml) de progesterona (P4) nos diferentes dias de coleta



Fonte: Elaborado pelo Autor

4.1.7 Sumarização dos resultados

No Experimento 1, conforme representado na Figura 12, as fêmeas suplementadas com semente de girassol apresentaram aumento nas concentrações plasmáticas de ácido esteárico (C18:0) no D10, D13 e D16 e ácido oleico (C18:1 n9,c) no D13 e verificou-se uma diminuição de ácido palmítico (C16:0) no D7, D10 e D13 e ácido linoléico (C18:2 n6,c) no D13 e D16 comparado ao Grupo Controle; o ácido alfa-linolênico (C18:3 n3) só foi constatado no plasma das vacas tratadas com semente de girassol. Quando considerou-se a média de todos os dias (Figura 13), as concentrações plasmáticas de ácido esteárico e ácido alfa linolênico foram maiores no grupo de animais suplementados com semente de girassol, enquanto no grupo controle as concentrações plasmáticas de ácido palmítico e ácido linoleico foram maiores. O ácido oleico foi igual entre os dois grupos.

Figura 13 – Sumarização dos resultados do Experimento 1



↑ Concentração plasmática aumentou; ↓ Concentração plasmática diminuiu.

⊘ Não foi detectada nenhuma concentração plasmática.

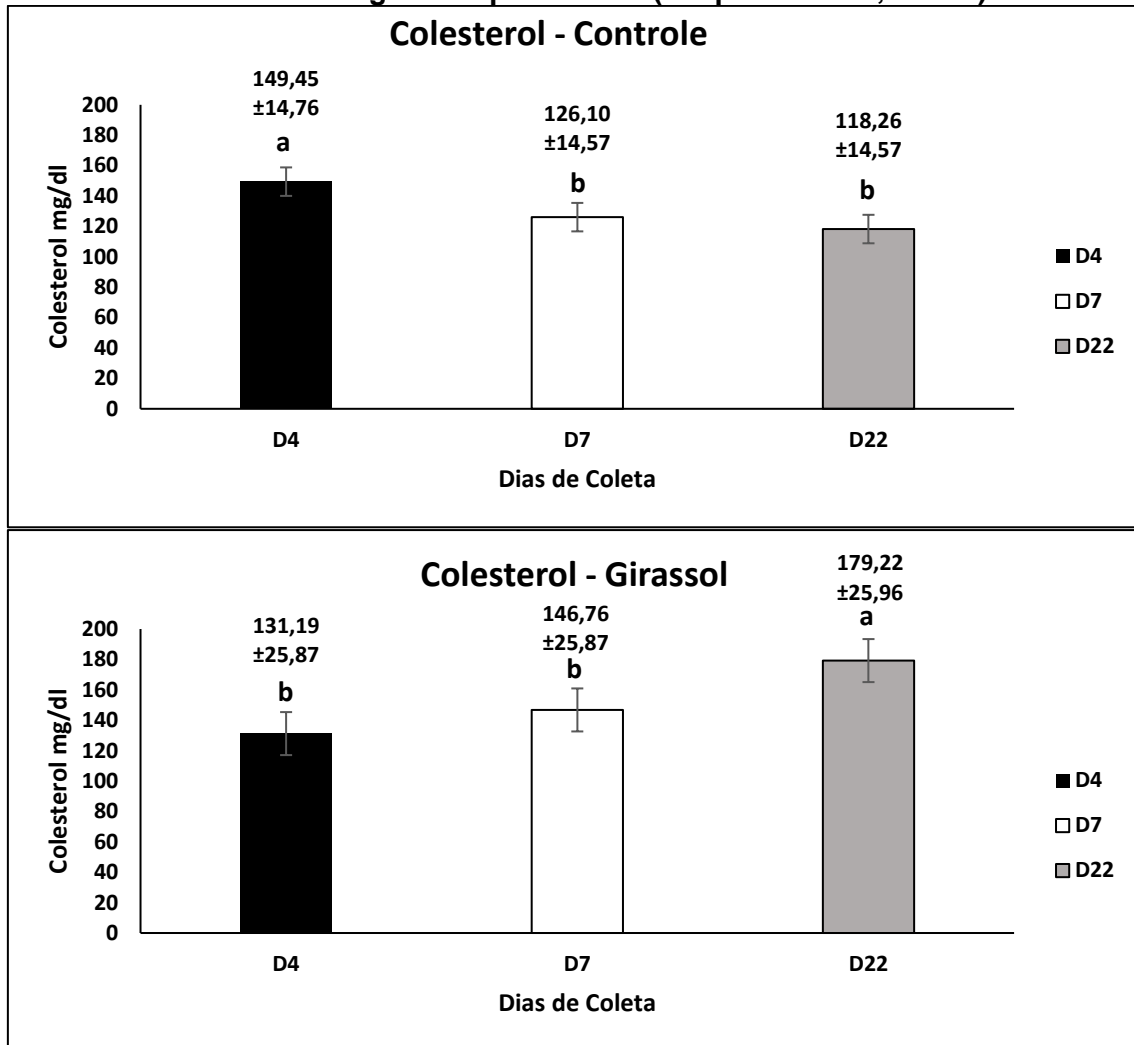
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Experimento 2

4.2.1 Concentrações plasmáticas de Colesterol

Nas amostras de sangue coletadas no D4, D7 e D22, a concentração plasmática de colesterol no Grupo Controle foi maior no D4 ($149,45 \pm 14,76$ mg/dl) comparado ao D22 ($118,26 \pm 14,57$ mg/dl) ($P=0,015$), tendeu a ser maior no D4 comparado ao D7 ($126,10 \pm 14,57$ mg/dl) ($P=0,0818$) e não diferiu entre D7 e D22 ($P=0,7266$). No grupo controle houve uma queda gradativa das concentrações plasmáticas de colesterol do D4 até o D22. No grupo tratado com Girassol houve um aumento gradativo na concentração plasmática de colesterol do D4 até o D22. A concentração plasmática de colesterol não variou entre o D4 ($131,19 \pm 25,87$ mg/dl) e o D7 ($146,76 \pm 25,87$ mg/dl) ($P=0,3116$), mas foi maior no D22 ($179,22 \pm 25,96$ mg/dl) comparado ao D4 ($P=0,0003$) e ao D7 ($P=0,0141$) (Figura 14).

Figura 14 - Concentrações plasmáticas de COLESTEROL (mg/dl \pm erro padrão), nos diferentes dias de coleta de sangue após o início da suplementação, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: A) não tratadas (Grupo Controle; n=108), B) tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102).



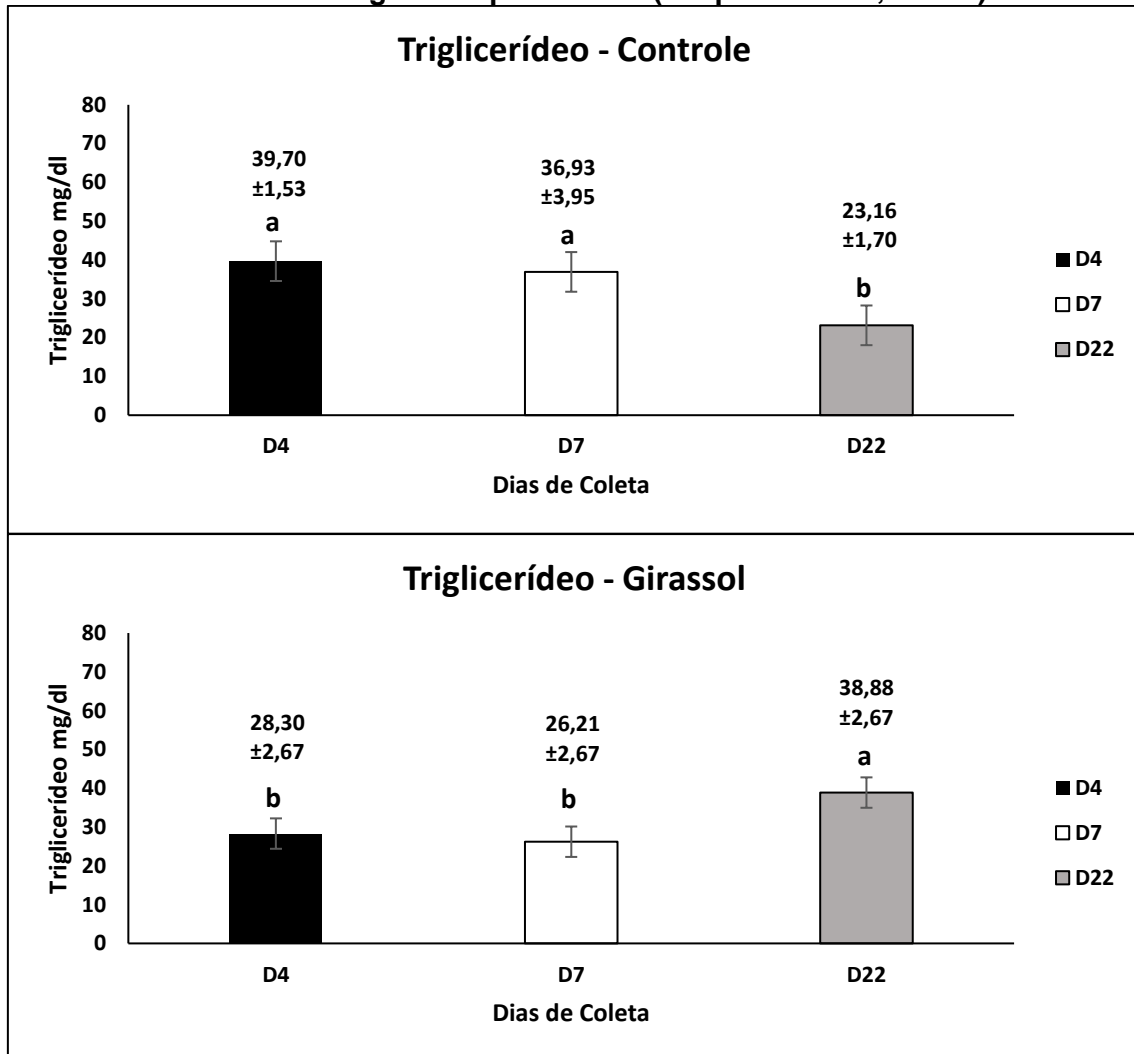
a,b,c Letras diferentes nas colunas difere entre os dias de coleta ($P \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo Autor

4.2.2 Concentrações plasmáticas de triglicerídeos

A concentração plasmática de triglicerídeos não diferiu no Grupo Controle, nas amostras de sangue coletadas no D4, D7 e D22. Entre o D4 ($39,70 \pm 1,53$ mg/dl) e D7 ($36,93 \pm 3,95$ mg/dl) ($P=0,7708$), e no D22 ($23,16 \pm 1,70$ mg/dl) a concentração de triglicerídeos foi menor que nos dias D4 ($P=0,001$) e D7 ($P=0,0054$). Em amostras coletadas nos animais do Grupo Girassol, não observou-se diferença estatística entre o D4 ($28,30 \pm 2,67$ mg/dl) e D7 ($26,21 \pm 2,67$ mg/dl) ($P=0,8457$), entretanto a concentração no D22 ($38,88 \pm 2,67$ mg/dl) foi maior comparado D4 ($P=0,0239$) e D7 ($P=0,0062$), uma variação oposta na concentração de triglicerídeos entre os dois grupos analisados (Figura 15).

Figura 15 - Concentrações plasmáticas de TRIGLICERÍDEOS (mg/dl \pm erro padrão), nos diferentes dias de coleta de sangue após o início da suplementação, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: A) não tratadas (Grupo Controle; n=108), B) tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102).



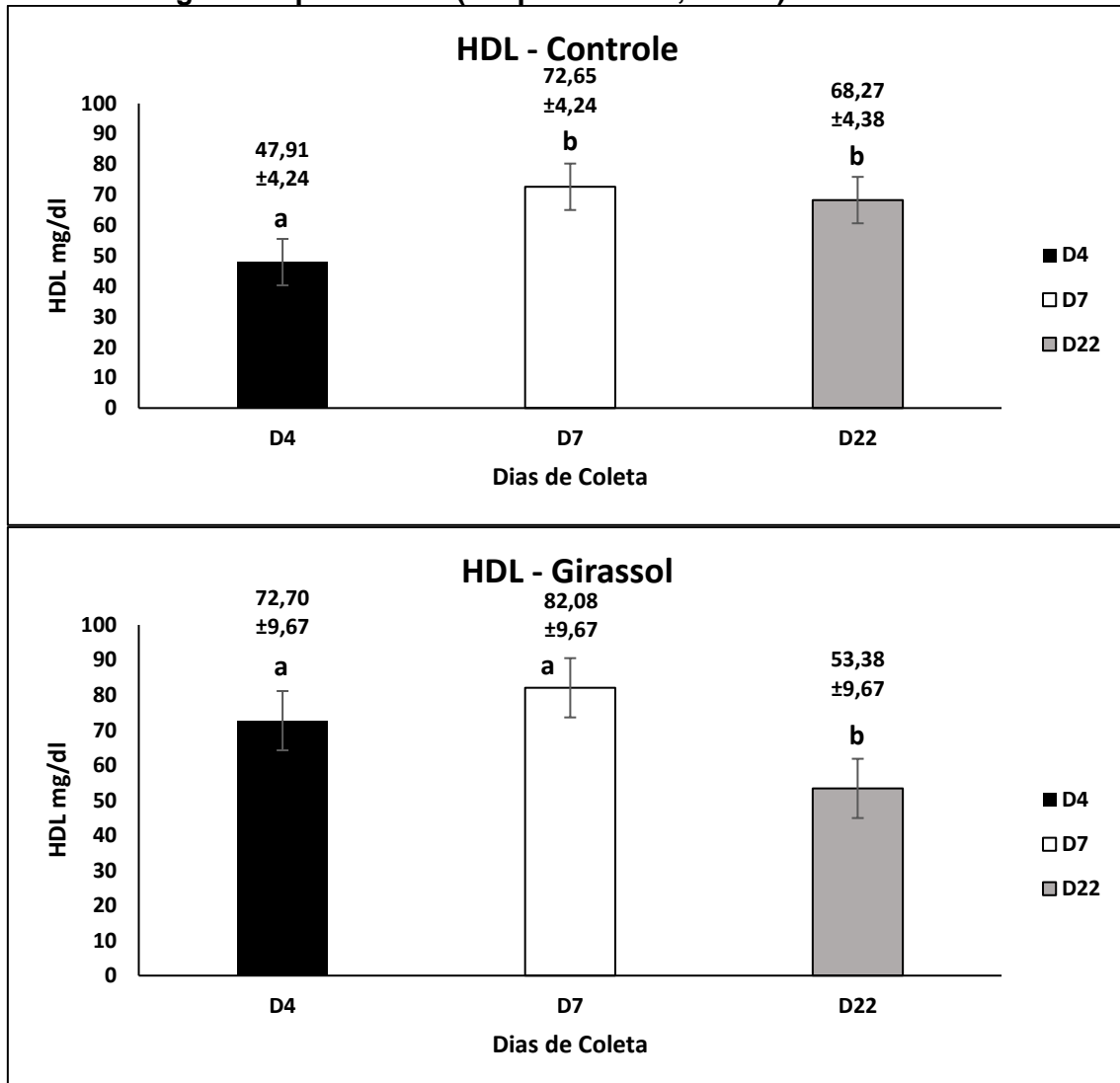
a,b,c Letras diferentes nas colunas difere entre os dias de coleta ($P \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo Autor

4.2.3 Concentrações plasmáticas de HDL

Nas amostras de sangue coletadas no Grupo Controle, verificou-se que as concentrações plasmáticas de HDL foram menores no D4 ($47,91 \pm 4,24$ mg/dl) comparado ao D7 ($72,65 \pm 4,24$ mg/dl) ($P=0,001$) e ao D22 ($68,27 \pm 4,38$ mg/dl) ($P=0,0011$), entre os D7 e D22 foram estatisticamente iguais ($P=0,6723$). No Grupo Girassol as concentrações plasmáticas de HDL não diferiram estatisticamente entre o D4 ($72,70 \pm 9,67$ mg/dl) e D7 ($82,08 \pm 9,67$ mg/dl) ($P=0,3044$), mas no D22 ($53,38 \pm 9,67$ mg/dl) foram menores comparado ao D4 ($P=0,0117$) e D7 ($P=0,0002$) (Figura 16).

Figura 16 - Concentrações plasmáticas de HDL (mg/dl \pm erro padrão), nos diferentes dias de coleta de sangue após o início da suplementação, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: A) não tratadas (Grupo Controle; n=108), B) tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102).



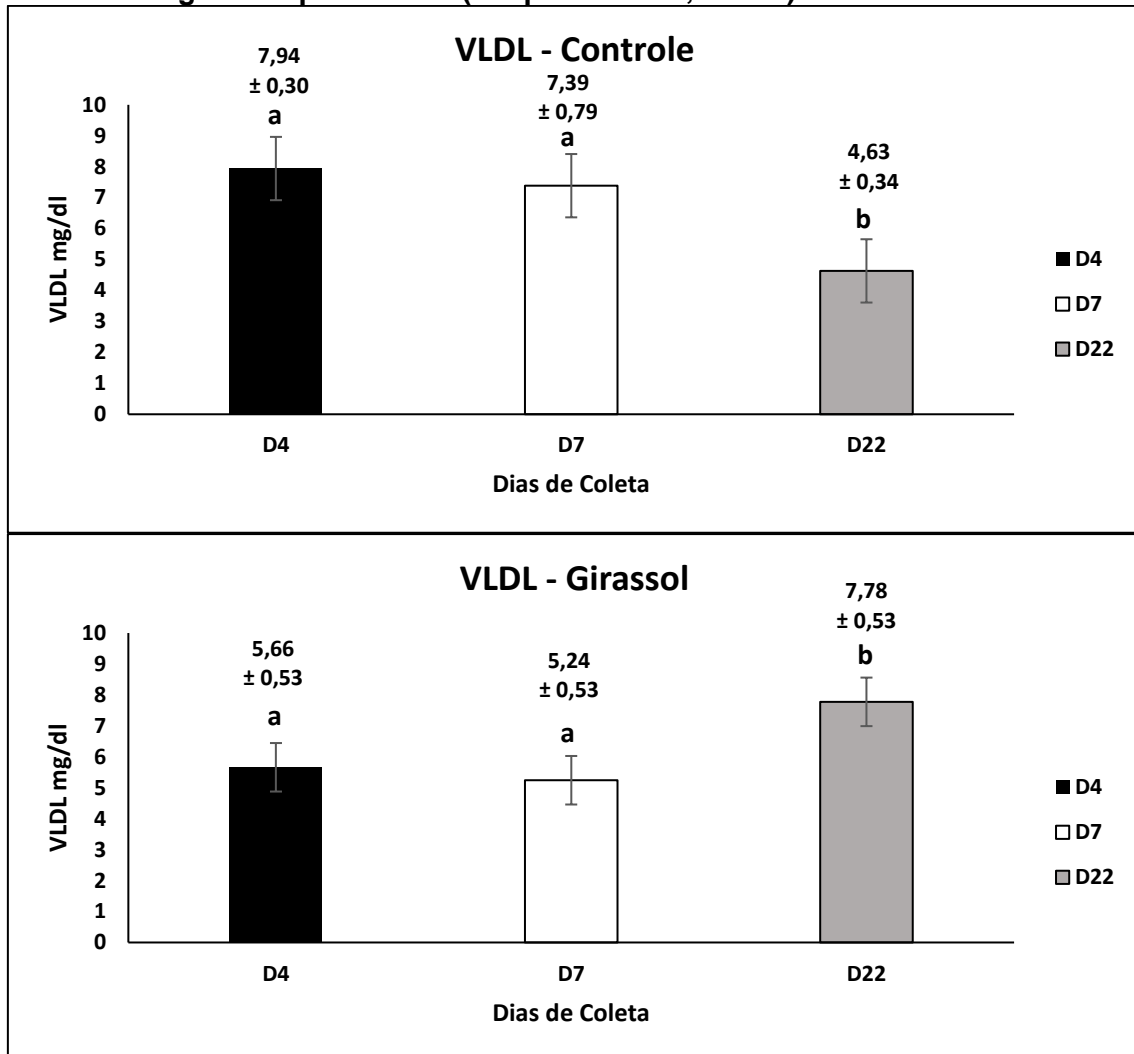
a,b,c Letras diferentes nas colunas difere entre os dias de coleta ($P \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo Autor

4.2.4 Concentrações plasmáticas de VLDL

No Grupo Controle as concentrações plasmáticas de VLDL foram estatisticamente iguais entre o D4 ($7,94 \pm 0,30$ mg/dl) e D7 ($7,39 \pm 0,79$ mg/dl) ($P=0,7708$), mas no D22 ($4,63 \pm 0,34$ mg/dl) foi menor que no D4 ($P=0,001$) e D7 ($P=0,0054$). No Grupo Girassol observou-se que as concentrações plasmáticas de VLDL não diferiram entre D4 ($5,66 \pm 0,53$ mg/dl) e D7 ($5,24 \pm 0,53$ mg/dl) ($P=0,8457$), contudo no D22 ($7,78 \pm 0,53$ mg/dl) foram maiores comparado ao D4 ($P=0,0239$) e D7 ($P=0,0062$) (Figura17).

Figura 17 - Concentrações plasmáticas de VLDL (mg/dl \pm erro padrão), nos diferentes dias de coleta de sangue após o início da suplementação, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: A) não tratadas (Grupo Controle; n=108), B) tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102).



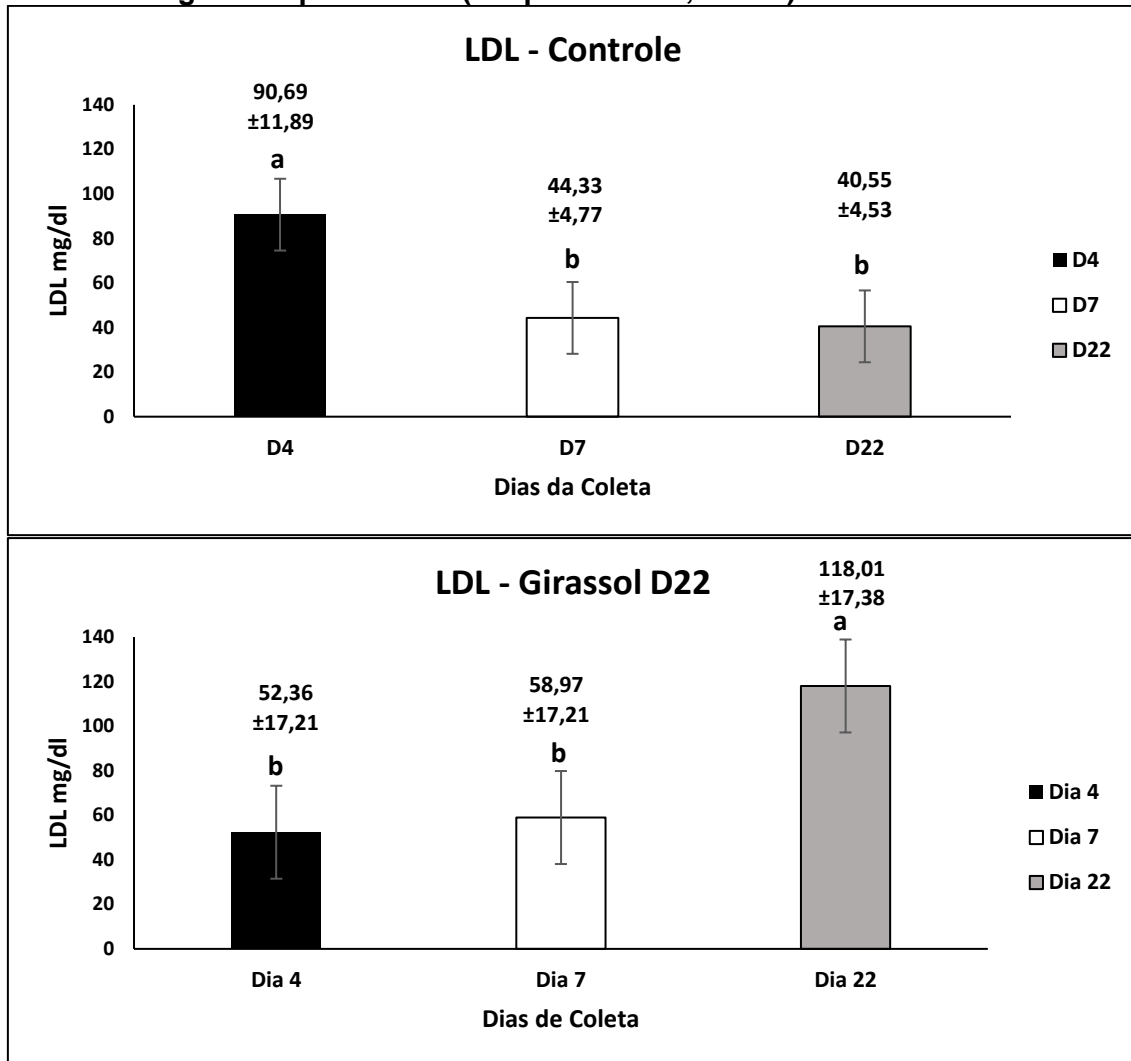
a,b,c Letras diferentes nas colunas difere entre os dias de coleta ($P \leq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo Autor

4.2.5 Concentrações plasmáticas de LDL

Nas amostras de sangue coletadas do Grupo Controle verificou-se que as concentrações plasmáticas de LDL foram maiores no D4 ($90,69 \pm 11,89$ mg/dl) quando comparado ao D7 ($44,33 \pm 4,77$ mg/dl) ($P=0,0029$) e D22 ($40,55 \pm 4,53$ mg/dl) ($P=0,0012$). A concentração no D7 foi estatisticamente igual ao D22 ($P=0,8345$). No Grupo Girassol observou-se que as concentrações plasmáticas de LDL não diferiram entre D4 ($52,36 \pm 17,21$ mg/dl) e D7 ($58,97 \pm 17,21$ mg/dl) ($P=0,8311$), contudo no D22 ($118,01 \pm 17,38$ mg/dl) a concentração foi maior comparado ao D4 ($P=0,0001$) e D7 ($P=0,0001$) (Figura 18).

Figura 18 - Concentrações plasmáticas de LDL (mg/dl \pm erro padrão), nos diferentes dias de coleta de sangue após o início da suplementação, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: A) não tratadas (Grupo Controle; n=108), B) tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102).

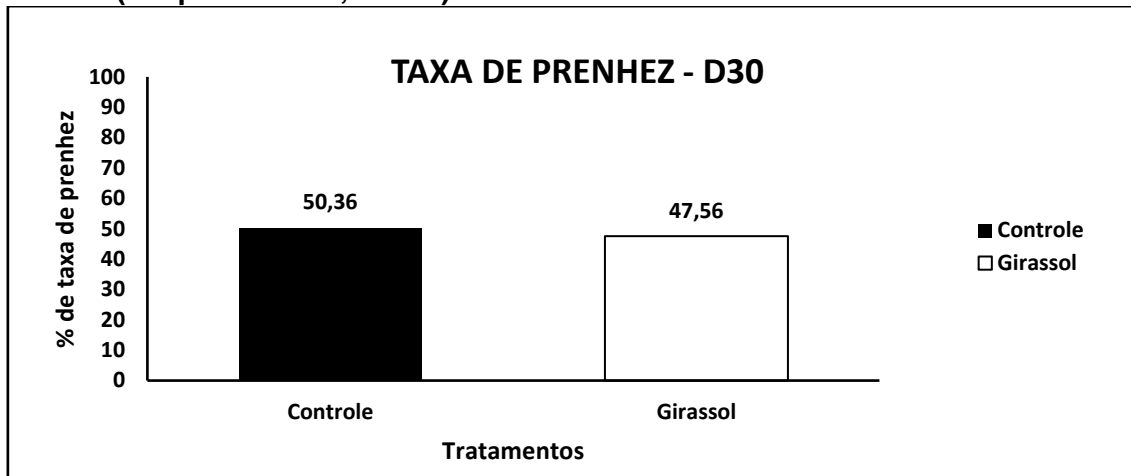


a,b,c Letras diferentes nas colunas difere entre os dias de coleta
 Fonte: Elaborado pelo Autor

4.2.6 Taxa de prenhez do D30

Não observou-se diferença entre os tratamentos ($P=0,8148$) na taxa de prenhez 30 dias após a IATF (D30); o grupo controle apresentou 50,36 % de prenhez, contra 47,56% de prenhez no grupo que recebeu a dieta contendo semente de girassol (Figura 19).

Figura 19 - Taxa de prenhez no D30, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: não tratadas (Grupo Controle; n=108) e tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102).

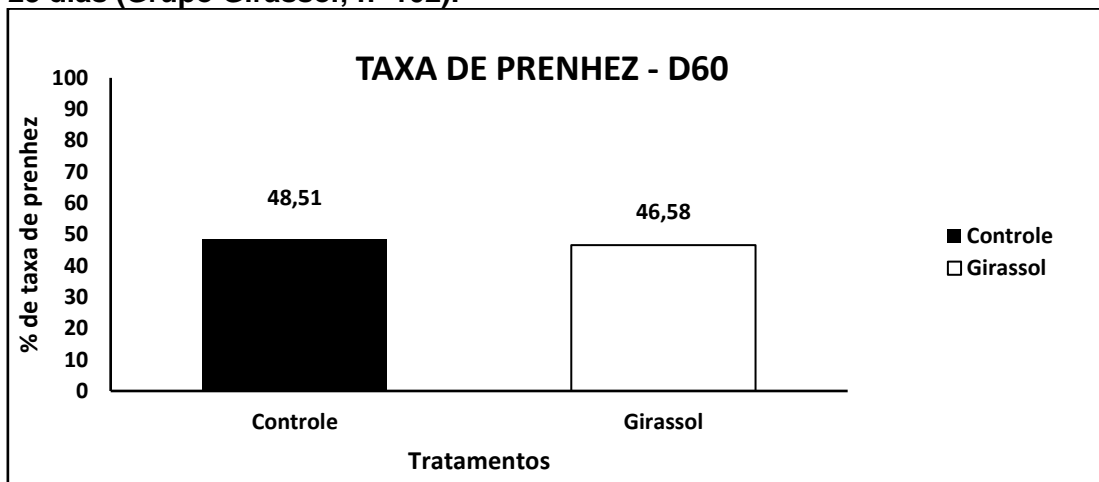


Fonte: Elaborado pelo Autor

4.2.7 Taxa de prenhez do D60

Não observou-se diferença entre os tratamentos ($P=0,4091$) para a taxa de prenhez 60 dias após a IATF (D60); o grupo controle apresentou 48,51 % de prenhez e o grupo girassol apresentou 46,58 %. (Figura 20).

Figura 20 - Taxa de prenhez no D60, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: não tratadas (Grupo Controle; n=108) e tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102).

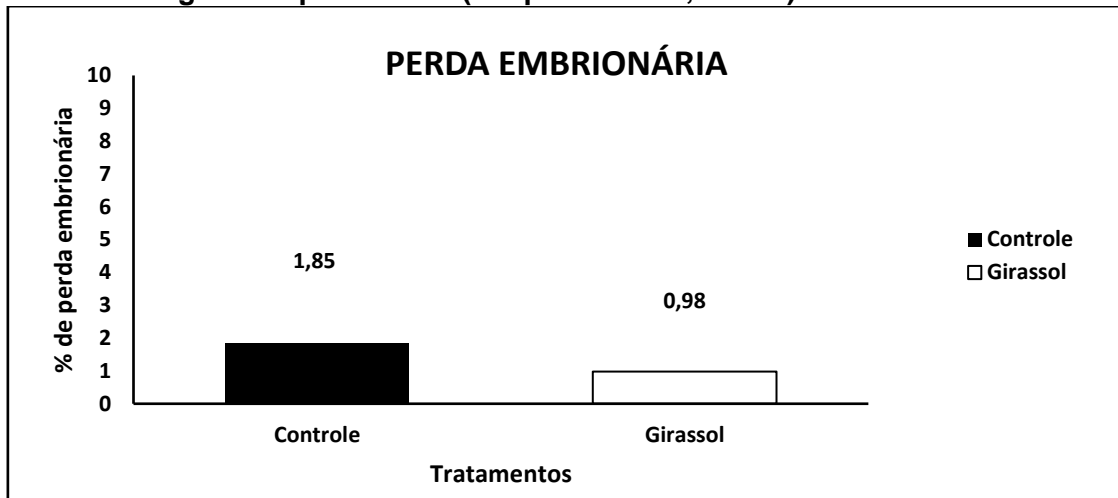


Fonte: Elaborado pelo Autor

4.2.8 Mortalidade embrionária entre D30 e D60

Para as perdas embrionárias ocorridas entre 30 e 60 dias após a IATF não observou-se diferença estatística entre os tratamentos ($P=0,7430$); o grupo girassol apresentou 1,85% de perda embrionária, e o grupo controle 0,98% (Figura 21).

Figura 21 - Taxa de perdas embrionárias entre o D30 e D60, considerando o D0 como o dia da IATF, em vacas Nelore: não tratadas (Grupo Controle; n=108), e tratadas com semente de girassol por 23 dias (Grupo Girassol; n=102).



Fonte: Elaborado pelo Autor

4.2.9 Sumarização dos resultados

No Experimento 2, conforme representado na Figura 22, os animais suplementados com semente de girassol tiveram maiores concentrações plasmáticas de colesterol, triglicerídeos, VLDL e LDL, enquanto no grupo controle verificou-se um aumento apenas no HDL.

Figura 22 – Sumarização dos resultados do experimento 2.



↑ Concentração plasmática aumentou; ↓ Concentração plasmática diminuiu;

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

No experimento 1, na avaliação geral realizada com a somatória de todos os dias de coleta analisados, observou-se uma maior concentração de ácido palmítico (C16:0) no grupo controle do que no grupo tratado com semente de girassol. Mais especificamente, o grupo controle teve maior concentração de ácido palmítico no D7, D10 e D13. A diferença entre os grupos está na suplementação recebida, o grupo controle recebeu farelo de soja como fonte de energia enquanto que o grupo tratado recebeu semente de girassol. O ácido graxo saturado mais abundante no óleo de soja, (11% do total dos ácidos graxos saturados, é o ácido palmítico (ANAI et al., 2012), o que explica as maiores concentrações do mesmo no grupo controle. Em alguns estudos relata-se que o ácido palmítico exerceria efeito apoptótico nas células da granulosa em ratos (CHEN et al. 2001) e humanos (MU et al., 2001). Embora tal efeito não tenha sido descrito em bovinos no grupo não suplementado (grupo controle), que recebeu o mesmo tratamento do experimento 1, as taxas de prenhez também não foram beneficiadas.

Os animais do grupo tratado com semente de girassol apresentaram maior concentração de ácido esteárico comparado aos animais do grupo controle (experimento 1). No óleo de girassol há 5% de ácido esteárico enquanto que no óleo de soja há 4% (ANUSHREE et al, 2017), embora a diferença na composição seja pequena, isso pode explicar porque no grupo que recebeu semente de girassol houve uma concentração 9,27% maior de ácido esteárico comparada com o grupo controle (experimento 1). Em um estudo em vacas de leite, o aumento da concentração de ácido esteárico no meio de cultura de células da granulosa aumentou a expressão de receptor para FSH, receptor para LH, aromatase, 3 β -HSD e ciclinaD2. Tais aumentos caracterizaram uma maior produção de 17 β -estradiol *in vitro* (SHARMA et al, 2019). Nesse estudo agora mencionado, o diâmetro folicular dos animais não foi avaliado, mas com o aumento da concentração de estradiol podemos esperar um maior diâmetro folicular e possivelmente um corpo lúteo mais eficiente na produção de progesterona. De fato, no presente estudo, o aumento das concentrações plasmáticas de ácido esteárico nas fêmeas tratadas com semente de girassol no experimento 1, não promoveu aumento na taxa de prenhez do experimento 2. Importante alertar que o excesso de ácidos graxos saturados pode comprometer a reprodução (MU et al.,

2001), esta situação fica evidenciada na menor fertilidade observada em humanos indivíduos obesos.

Não houve diferença na concentração plasmáticas de ácido oleico (C18:1 n9, c) entre os animais que receberam semente de girassol ou não, porém nos dias no D13 e D16 de suplementação foram observados um aumento e uma tendência de aumento na concentração do ácido oleico nas vacas que receberam semente de girassol em sua dieta (experimento 1). Isso é explicado pelo fato da semente de girassol ter uma alta porcentagem de ácido oleico (27%) em sua composição (ANUSHREE et al., 2017). A suplementação com AGPI favorece a performance reprodutiva de fêmeas bovinas, alterando o perfil plasmático de ácidos graxos nos animais tratados (FONTES et al., 2018), promovendo uma melhora na fisiologia que envolve o contexto reprodutivo. Foi demonstrado que o ácido oleico aumenta o armazenamento de lipídios em gotas aumentando a competência de desenvolvimento oocitário, esse efeito se opõe aos dos ácidos palmítico e esteárico que inibem o armazenamento de lipídios nos oócitos (AARDEMA et al., 2011; FAYEZI et al., 2018).

A concentração do ácido linoleico (C18:2 n6,c) teve uma tendência em ser menor no grupo tratado que no grupo controle ($P=0,06$). A concentração do ácido linoleico foi menor no grupo tratado a partir do D10, e permaneceu menor até o D16 de suplementação (experimento 1). Considerando que a porcentagem de ácido linoleico é um pouco menor no óleo de soja (54%) do que na semente de girassol (61%) (ANUSHREE et al., 2017), esperávamos que o grupo tratado apresentasse concentração maior de ácido linoleico. Provavelmente a semente de girassol não “protegeu” com tanta eficácia os ácidos graxos da metabolização ruminal. Quando adicionado o ácido linoléico puro à cultura de bactérias ruminais, o ácido linoléico (18:2) sofre bio-hidrogenação microbiana sendo convertido a ácido esteárico (18:0), sendo que a taxa de desaparecimento do 18:2 varia de 23,6 a 44,6%/h (JOUANY et al., 2007).

Considerando a concentração do ácido alfa-linolênico (C18:3 n3), foram detectados picos cromatográficos somente nos animais que receberam semente de girassol em sua dieta (experimento 1). Isso é um achado interessante uma vez que a semente de girassol possui 0,12% dos lipídios composto por C18:3. Em vacas de leite a suplementação com semente de girassol aumentou a perda embrionária quando comparada com vacas que receberam suplemento com óleo de linhaça rica que possui ácido alfa linolênico compondo 57% do total de lipídios (AMBROSE et al, 2006).

Por outro lado, o óleo de soja possui entre 4 e 5% dos seus lipídios composto por C18:3 (MARTIN et al, 2008), era de se esperar que a concentração de C18:3 no plasma de vacas que receberam farelo de soja também estivessem presentes. Essas discrepâncias sugerem que a metabolização ruminal interfere na biodisponibilidade dos ácidos graxos que são ingeridos e em alguns casos não aparecem na corrente sanguínea dos ruminantes.

Embora se esperava maiores concentrações de ácidos graxos poliinsaturados no grupo que recebeu a semente de girassol em sua dieta, sabemos que a metabolização ruminal interfere na biodisponibilidade desses AGPIs na concentração plasmática. Por isso é tão importante a “proteção” das gorduras, quando estas são oferecida a ruminantes (SPENCER E BAZER, 2004). Muitos AGPIs que estão presentes na dieta, são biotransformados no rúmen, sendo disponível na absorção intestinal com uma diferente ligação e composição (JOUANY et al., 2007).

No experimento 2, apesar de achados anteriores pelo mesmo grupo de pesquisa reportando uma melhor taxa de prenhez em vacas que consumiram a semente de girassol por 23 dias (CORDEIRO et al., 2015), nesse trabalho não observamos diferença na taxa de prenhez entre os grupos. Tal resultado contraditório entre experimentos do mesmo grupo de pesquisa pode ser consequência do excelente manejo dos animais da fazenda que realizamos esse trabalho, considerando que as fêmeas recebiam uma nutrição de qualidade, fazendo com que os animais desse experimento estivessem em condição corporal perfeitamente adequada no início do protocolo de IATF. Essa situação pode ter feito com que a adição de semente de girassol na dieta não interferisse na fertilidade das vacas. Os animais que integraram o experimento de Cordeiro et al. (2015) tinham um escore de condição corporal (ECC) médio de 3,74 (em escala de 1 a 9), enquanto que os animais que integraram o experimento desse trabalho tinham uma média de ECC de 3,06 (em escala de 1 a 5).

Porém, mesmo na ausência de diferença estatística na taxa de prenhez, foi possível observar diferenças no perfil de lipídios entre os grupos tratados e controle. A concentração plasmática de colesterol analisada no D4, D7 e D22 dias após a IATF diminuiu gradativamente do início até o final do oferecimento da dieta no grupo controle (D4>D22), diferente do aumento gradativo no grupo que recebeu a semente de girassol (D4<D22). O mesmo aconteceu com a concentração de triglicerídeo plasmático, cuja concentração plasmática aumentou nos animais tratados com

semente de girassol (D4<D22), e o mesmo não foi observado nos animais do grupo controle (D4>D22). Foi relatado em vacas de leite que a suplementação com semente de girassol aumentou a concentração de colesterol total e com isso a concentração de progesterona, comparado com o grupo controle (TALAVERA et al, 1985).

Foi observado um aumento gradativo na concentração plasmática de HDL, nos animais do grupo controle e uma diminuição na concentração de HDL nos animais do grupo girassol. Diferente do observado nesse experimento, o tratamento com semente de girassol em vaca de corte aumentou a concentração de HDL quando comparado com o controle (CORDEIRO et al, 2015).

As concentrações de VLDL plasmático do grupo controle foram iguais no início do fornecimento da dieta e diminuíram no último dia de dieta. Já no grupo tratado com semente de girassol, as concentrações nos primeiros dias (D4 e D7) não diferiram mas aumentaram no último dia de dieta. Esse efeito já foi observado em outro experimento do mesmo grupo de pesquisa (CORDEIRO et al, 2015), onde novamente o efeito da dieta com semente de girassol aumentou as concentrações plasmáticas de lipídeos nos animais tratados.

Uma observação muito importante nas concentrações plasmáticas de lipídios dos animais que receberam a semente de girassol em sua dieta, foi que o LDL apresentou concentração plasmática de LDL três vezes maior que no grupo controle. Em um experimento anterior, vacas de corte suplementadas com semente de girassol não apresentaram diferença na concentração de LDL se comparadas com o grupo controle (CORDEIRO et al, 2015).

Analisando as taxas de prenhez 30 e 60 dias após a IATF, juntamente com as concentrações plasmáticas dos lipídios, observamos que uma possível explicação para a não diferenciação da taxa de prenhez pode ser o escore de condição corporal (ECC) classificado como “ótimo” para a reprodução que os animais se encontravam no início do experimento, inexistindo assim a necessidade de um suplemento para aumentar sua eficácia reprodutiva. Observa-se diferenças no perfil plasmático de lipídios dos animais do experimento anterior (CORDEIRO et al., 2015) e do atual, mesmo esses animais terem sido sujeitos à um tratamento semelhante, sugerindo uma diferença de resposta, que pode explicar o menor efeito na taxa de prenhez. Mais experimentos explorativos nessa área seria necessário para explicar resultados que diferiram de outros experimentos.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se no experimento 1 que a suplementação com semente de girassol alterou o perfil plasmático de ácidos graxos, aumentando a concentração plasmática de ácido esteárico, ácido oleico e ácido alfa-linolênico em vacas Nelore de corte.

No experimento 2 a suplementação com semente de girassol alterou o perfil plasmático de lipídios, aumentando a concentração plasmática de colesterol, triglicerídeos, VLDL e LDL; porém tal suplementação não afetou a taxa de prenhez e perda embrionária em vacas Nelore de corte.

REFERÊNCIAS

AARDEMA, H.; VOS, P. L.; LOLICATO, F.; ROELEN, B. A.; KNIJN, H. M.; VAANDRAGER, A. B.; GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, p.62-69, 2011.

AMBROSE, D. J.; KASTELIC, J. P.; CORBETT, R.; PITNEY, P. A.; PETIT, H. V.; SMALL, J. A.; ZALKOVIC, P. The dietary fatty acids and their effects on reproductive performance of ruminants. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3067-3074, 2006.

ANAI, T.; HOSHINO, T.; IMAI, N.; TAKAGI, Y. Molecular characterization of two high-palmitic-acid mutant loci induced by X-ray irradiation in soybean. **Breeding Science**, n. 5, v. 61, p. 631-638, 2012.

ANUÁRIO DBO; **DBO Editores Associados**. São Paulo, SP. Disponível em: <www.portaldbo.com.br/anuario-dbo-retrato-da-pecuaria-em-2018-projecoes-para-2019>. Acesso em: 27 de Janeiro de 2021.

ANUSHREE, S.; ANDRÉ, M.; GUILLAUME, D.; FRÉDÉRIC, F. Stearic sunflower oil as a sustainable and healthy alternative to palm oil. **Agronomy Sustainable Development**, v.37, p.18, 2017.

ASBIA; **Associação Brasileira de Inseminação Artificial**, 2019. Uberaba, MG. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>>. Acesso em: 27 de Janeiro de 2021.

BANTA, J. P.; LALMAN, D. L.; OWENS, F. N.; KREHBIEL, C. R.; WETTEMANN, R. P. Effects of prepartum supplementation of linoleic and mid-oleic sunflower seed on cow performance, cow reproduction, and calf performance from birth through slaughter, and effects on intake and digestion in steers. **Journal of Animal Science**, v.89, p.3718–3727, 2011.

BARUSELLI, O. S.; MARTINS, C. M.; SALES, J. N. S.; FERREIRA, R. M. Novos avanços na superovulação de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36. p.433-448, 2008.

BENDER, K.; WALSH, S.; EVANS, A. C.; FAIR, T.; BRENNAN L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. **Reproduction**, v.139, p.1047-1055, 2010.

BERNAL, S. G.; O'DONNELL, A. M.; VICINI, J. L.; HARTNELL, G. F.; BAUMAN, D. E. Enhancing omega-3 fatty acids in milk fat of dairy cows by using stearidonic acid-enriched soybean oil from genetically modified soybeans. **Journal of Dairy Science**, v.93, p. 32-37, 2010.

BILBY, T. R.; BLOCK, J.; DO AMARAL, B. C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F. T.; HANSEN, P. J.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3891-3903, 2006.

BILBY, T. R.; SOZZI, A.; LOPEZ, M. M.; SILVESTRE, F. T.; EALY, A. D.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: I. ovarian, conceptus, and growth hormone-insulin-like growth factor system responses. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3360-3374, 2006.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1451-1463, 2001.

BOTT, R. C.; ASHLEY, R. L.; HENKES, L. E.; ANTONIAZZI, A. Q.; BRUEMMER, J. E.; NISWENDER, G. D.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; SMIRNOVA, N. P.; ANTHONY, R. V.; HANSEN, T. R. Uterine vein infusion of interferon Tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. **Biology of Reproduction**, v.82, n.4, p.725-735, 2010.

BRANDÃO, A. P.; COOKE, R. F.; SCHUBACH, K. M.; MARQUES, R. S.; BOHNERT, D. W.; CARVALHO, R. S.; DIAS, N. W.; TIMLIN, C. L.; CLARK-DEENER, S.; CURRIN, J. F.; JUMP, D. B.; POHLER, K. G.; CERRI, R. L. A.; MERCADANTE, V. R. G.

Supplementing Ca salts of soybean oil after artificial insemination increases pregnancy success in *Bos taurus* beef cows. **Journal of Animal Science**, v.96, p.2838-2850, 2018.

BURNS, P. D.; ENGLE, T. E.; HARRIS, M. A.; ENNS, R. M.; WHITTIER, J. C. Effect of fish meal supplementation on plasma and endometrial fatty acid composition in non lactating beef cows. **Journal of Animal Science**, v.81, p.2840–2846, 2003.

BURR, G. O. & BURR, M. M. On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition. **Journal of Biological Chemistry**, v.86, n.2, p.587-621, 1930.

CERRI, R. L. A.; JUCHEM, S. O.; CHEBEL, R. C.; RUTGLIANO, H.; BRUNO, R. G. S.; GALVAÕ, K. N.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in highproducing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.4, p. 1520-1531, 2009.

CERVONI, J. E. **Gordura protegida na alimentação de ruminantes**. n° art. 240506. Londrina:2006.Disponível em: <<http://www.limousin.com.br>>. Acesso: 12 dezembro de 2020.

CHEN, Z.; LEI, L.; WEN, D.; YANG, L. Melatonin attenuates palmitic acid-induced mouse granulosa cells apoptosis via endoplasmic reticulum stress. **Journal of Ovarian Research**, n. 1, v. 12, p. 43, 2019.

CHEVA-ISARAKUL, B.; TANGATAWEEWIPAT, S. Effect of different levels of sunflower seed in broiler rations. **Poultry Science**, v.70, p.2284-2294, 1991.

CHILDS, S.; CARTER, F.; LYNCH, C. O.; SREENAN, J. M.; LONERGAN, P.; HENNESSY, A. A. & KENNY, D. A. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Theriogenology**, v.70, n.6, p. 992-1003, 2008.

CHILDS, S.; HENNESSY, A. A.; SREENAN, J. M.; WATHES, C.; CHENG, Z.; STANTON, C.; DISKIN, M. G.; KENNY, D. A. Effect of level of dietary n-3

polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. **Theriogenology**, v.70, n.4, p.595-611, 2008.

CIPRIANO, R. S.; COOKE, R. F.; RODRIGUES, A. D.; SILVA, L. G. T.; BOHNERT, D. W.; MARQUES, R. S.; VASCONCELOS, J. L. M.; PIRES, A. V.; CERRI, R. L. A. Post-artificial insemination supplementation with calcium salts of soybean oil influences pregnancy establishment factors in *Bos indicus* beef cows. **Journal of Animal Science**, v.94, p.4892–4902, 2016.

COOKE, R. F.; CAPPELLOZZA, B. I.; GUARNIERI FILHO, T. A.; DEPNER, C. M.; LYTLE, K. A.; JUMP, D. B.; BOHNERT, D. W.; CERRI, R. L. A.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of calcium salts of soybean oil on factors that influence pregnancy establishment in *Bos indicus* beef cows. **Journal of Animal Science**, v.92, p.2239–2250, 2014.

CORDEIRO, M. B. ; PERES, M. S. ; DE SOUZA, J. M. ; GASPAR, P. ; BARBIERE, F. ; SÁ FILHO, M. F. ; FILHO, M. M. ; DINARDI, R. N. ; NOGUEIRA, G. P. ; MESQUITA, F. S. ; PUGLIESI, G. ; MARTINS, T. ; BINELLI, M. ; MEMBRIVE, C. M. B. Supplementation with sunflower seed increases circulating cholesterol concentrations and potentially impacts on the pregnancy rates in *Bos indicus* beef cattle. **Theriogenology**, v.83, p.1461-1468, 2015.

DAGHIR, N. J.; RAZ, M. A.; UWAYJAN, M. Studies the utilization of full fat sunflower seed in broiler rations. **Poultry Science**, v.59, p.2273-2278, 1980.

DE FRIES, C. A.; NEUENDORFF, D. A.; RANDEL, R. D. Fat supplementation influences postpartum reproductive performance in Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v.76, n.3, p.864-870, 1998.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D.; FARVER, T.; WEBSTER G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.6878, 1989.

FAYEZI, S.; LEROY, J. L.; NOVIN, M. G.; DARABI, M. Oleic acid in the modulation of oocyte and preimplantation embryo development. **Zygote**, p. 1-13, 2018.

FERGUSON, J. D.; SKLAN, D.; CHALUPA, W. V.; KRONFELD, D. S. Effects of hard fats on in vitro and in vivo rumen fermentation, milk production, and reproduction in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2864-2879, 1990.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. H. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 226, p. 497–509, 1957.

FOLMAN, Y.; KAIM, M.; HERZ, Z.; ROSENBERG, M. Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows: II. Effects of progesterone and parity on conception. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2817–2825, 1990.

FONTES, P. L. P.; HENRY, D. D.; CIRIACO, F. M.; OOSTHUIZEN, N.; COOKE, R. F.; MERCADANTE, V. R. G.; DILORENZO, N.; LAMB, G. C. Effects of polyunsaturated fatty acids supplementation on reproductive parameters associated with the performance of suckled beef cows. **The Animal Consortium**, p.1-9, 2018.

FOOD INGREDIENTS. **Food Ingredients South America**, n. 31, p. 38, São Paulo - SP, 2014. Disponível em: <www.fi-events.com.br>. Acesso em: 20 de Novembro de 2020.

FOULADI-NASHTA, A. A.; GUTIERREZ, C. G.; GONG, J. G.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. **Biology of Reproduction**, v.77, n.1, p.9-17, 2007.

FOULADI-NASHTA, A. A.; MAREI, W.; WATHES, D. C. Diverse effects of polyunsaturated fatty acids on oocyte maturation and development in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.71-71, 2009.

GARCIA-BOJALIL, C. M.; STAPLES, C. R.; RISCO, C. A.; SAVIO, J. D.; THATCHER, W. W. Protein Degradability and Calcium Salts of Long-Chain Fatty Acids in the Diets

of Lactating Dairy Cows: Reproductive Responses. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1385–1395, 1998.

GILLER, K.; DREWS, B.; BERARD, J.; KIENBERGER, H.; SCHMICKE, M.; FRANK, J.; SPANIER, B.; DANIEL, H.; GEISSLINGER, G.; ULBRICH, S. E. Bovine embryo elongation is altered due to maternal fatty acid supplementation. **Biology of Reproduction**, v.99, n.3, p.600-610, 2018.

GULLIVER, C.; FRIEND, M.; KING, B.; CLAYTON, E. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. **Animal Reproduction Science**, v.131, v.1-2, p.9-22, 2012.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA, A. J. **The Lipid Handbook**. 3^a ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

HARRIS, M. A.; HANSEN, R. A.; VIDSUDHIPHAN, P.; KOSLO, J. L.; THOMAS, J. B.; WATKINS, B. A.; ALLEN, K. G. Effects of conjugated linoleic acids and docosahexaenoic acid on rat liver and reproductive tissue fatty acids, prostaglandins and matrix metalloproteinase production. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.65, n.1, p.23-29, 2001.

HERRERA-CAMACHO, JOSÉ, SOBERANO-MARTÍNEZ, ALEJANDRA, OROZCO DURÁN, KARLOS EDMUNDO, AGUILAR-PÉREZ, CARLOS AND KU-VERA, JUAN CARLOS. **Artificial Insemination in Farm Animals: Effect of Fatty Acids on Reproductive Performance of Ruminants**. Capítulo 13. p.218 – 242, 2011.

JAHANIAN, E.; NANAIEI, H. A.; KOR, N. M. The dietary fatty acids and their effects on reproductive performance of ruminants. **European Journal of Experimental Biology**, v.3, n.6, p.95-97, 2013.

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**, p. 351-360, 2007.

JUCHEM, S. O.; CERRI, R. L.; VILLASENOR, M.; GALVAO, K. N.; BRUNO, R. G.; RUTIGLIANO, H. M.; DePETERS, E. J.; SILVESTRE, F. T.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. Supplementation with calcium salts of linoleic and trans-octadecenoic acids improves fertility of lactating dairy cows. **Reproduction Domestic Animals**, v.45, p.55-62, 2010.

KARUNOJEEWA, H.; THAN, S. H.; ABU-SEREWA, S. Sunflower seed meal, sunflower oil and full-fat sunflower seeds, hulls and kernels for laying hens. **Animal Feed Science Technology**, v.26, p.45-54, 1989.

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

LEMLEY, C. O.; BUTLER, S. T.; BUTLER, W. R.; WILSON, M. E. Short communication: Insulin alters hepatic progesterone catabolic enzymes cytochrome P450 2C and 3A in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.641–645, 2008.

LEROY, J. L.; VAN HOECK, V.; CLEMENTE, M.; RIZOZ, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; VAN SOOM, A.; UYTTERHOEVEN, M.; BOLS, P. E. The effect of nutritionally induced hyperlipidemia on in vitro bovine embryo quality. **Human Reproduction**, v.25, n.3, p.768-778, 2010.

LOPES, C. N.; COOKE, R. F.; REIS, M. M.; PERES, R. F. G.; VASCONCELOS, J. L. M. Strategic supplementation of calcium salts of polyunsaturated fatty acids to enhance reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. **Journal of Animal Science**, v.89, p.3116–3124, 2011.

LOPES, C. N.; SCARPA, A. B.; CAPPELLOZZA, B. I.; COOKE, R. F.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. **Journal Animal Science**, v.87, p.3935–3943, 2009.

LUCCI, C.S. **Nutrição e Manejo de Bovinos Leiteiros**. 1ªed., São Paulo: Manole, p.169, 1997.

LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; MICHEL, F. M.; THATCHER, W. W.; BOLT, D. J. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin F₂ α , luteinizing hormone, and follicular growth. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.483–489, 1991.

MAREI, F. W.; WATHES, D. C.; FOULADI-NASHTA, A. A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. **Reproduction**, v.139, n.6, p.979-988, 2010.

MAREI, W. F.; WATHES, D. C.; FOULADI-NASHTA, A. A. The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. **Biology of Reproduction**, v.81, n.6, p.1064-1072, 2009.

MARQUES, D. C. **Criação de Bovinos**. 7ª Ed. Belo Horizonte: CVP – Consultoria Veterinária e Publicações, 586 p., 2003.

MARTIN, C. A.; VISENTAINER, J. V.; OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, C. C.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E. Fatty acid contents of Brazilian soybean oils with emphasis on trans fatty acids. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 117-122, 2008.

MATTOS, R.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon- γ modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F₂ α and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-A₂ in bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, v.69, n.3, p.780-787, 2003.

MATTOS, R.; STAPLES, C. R.; ARTECHE, A.; WILTBANK, M. C.; DIAZ, F. J.; JENKINS, T. C.; THATCHER, W. W. The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF₂ α , milk composition, and metabolic status of periparturient holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.921–932, 2004.

MATTOS, R.; STAPLES, C. R.; WILLIAMS, J.; AMOROCHO, A.; MCGUIRE, M. A.; THATCHER, W. W. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of menhaden fish meal. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.755–764, 2002.

MATTOS, R. C.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.38-45, 2000.

MEIER, S.; LEDGARD, A. M.; SATO, T. A.; PETERSON, A. J.; MITCHELL, M. D. Polyunsaturated fatty acids differentially alter PGF₂ α and PGE₂ release from bovine trophoblast and endometrial tissues during short-term culture. **Animal Reproduction Science**, v.111, n.2-4, p.353-360, 2009.

MILLER, J. F.; VICK, B. A. Inheritance of reduced stearic and palmitic acid content in sunflower seed oil. **Crop science**, n. 2, v. 39, p. 364-367, 1999.

MU, Y. M.; YANASE, T.; NISHI, Y.; TANAKA, A.; SAITO, M.; JIN, C. H.; MUKASA, C.; OKABE, T.; NOMURA, M.; GOTO, K.; NAWATA, H.. Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. **Endocrinology**, n. 8, v. 142, p. 3590-3597, 2001.

ROBINSON R. S.; PUSHPAKUMARA, P. G. A.; CHENG, Z.; PETERS, A. R.; ABAYASEKARA, D. R. E.; WATHES, D. C. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. **Reproduction**, v.124, n.1, p.119-131, 2002.

SÁ FILHO, O. G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cattle II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v.72, p.210–218, 2009.

SANGSRITAVONG, S.; MASHEK, D. G.; GUMEN, A.; HAUGHIAN, J. M.; GRUMMER, R. R.; WILTBANK, M. C. Metabolic clearance rate of progesterone and estradiol-17 β is decreased by fat. **Journal of Animal Science**, v.80, n.1, p.142, 2002.

SANTOS, J. E.; BILBY, T. R.; THATCHER, W. W.; STAPLES, C. R.; SILVESTRE, F. T. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.23-30, 2008.

SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; BALLOU, M. A.; HIGGINBOTHAM, G. E.; KIRK, J. H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 80, p.31-45, 2004.

SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; SARTORI R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v.69, p.88–97, 2008.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.35-50, 2004.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2803-2812, 2002.

SHARMA, A.; BADDELA, V. S.; BECKER, F.; DANNENBERGER, D.; VIERGUTZ, T.; VANSELOW, J. Elevated free fatty acids affect bovine granulosa cell function: a molecular cue for compromised reproduction during negative energy balance. **Endocrine connections**, p. 493-505, 2019.

SILVA, M. N. **A cultura do girassol**. Jaboticabal: FUNEP, p.67, 1990.

SKLAN, D.; KAIM, M.; MOALLEM, U.; FOLMAN, Y. Effect of feeding calcium soaps of fatty acids on production and reproductive responses in high producing lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.510-517, 1991.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. **Frontiers in Bioscience**, v.7, p.1879–1898, 2002.

SPENCER, T. E.; AND F. W. BAZER. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Reproduction Biology Endocrinology**, v.2, p.49–63, 2004.

SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. **British Society of Animal Science**, v.1, p.93-105, 2001.

STAPLES, C. R. Aumento da taxa de prenhez em vacas leiteiras através da suplementação com gordura. In: Simpósio, **Anais**. p.91-103, 2009, Uberlândia.

STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; TACHER, W. W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance os lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.856-871, 1998.

STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of fatty acids on reproduction of dairy cows. In: GARNSWORTHY, P.C.; WISEMAN, J. (Eds.). **Recent Advances in Animal Nutrition**. Nottingham University Press, Nottingham, UK, p. 229-256, 2005.

STURMEY, R. G.; REIS, A.; LEESE, H. J.; MCEVOY, T. G. Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, n.3, p.50-58, 2009.

TALAVERA, F.; PARK, C. S.; WILLIAMS, G. L. Relationships among dietary lipid intake, serum cholesterol and ovarian function in Holstein heifers. **Journal of Animal Science**, v.60, p.1045-1051, 1985.

THANGAVELU, G.; COLAZO, M. G.; AMBROSE, D. J.; OBA, M.; OKINE, E. K.; DYCK, M. K. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v.68, p.949–957, 2007.

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1435-1440, 2001.

THATCHER, W. W.; MACMILLAN, K. L.; HANSEN, P. J.; BAZER, F. W. **Embryonic losses: causes and prevention**. In: FIELDS, M.J.S.; SAND, R.S. Editors. Factors affecting calf crop. Boca Raton, p.135-153, 1994.

THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P.; STAPLES, C. R. Dietary manipulations to improve embryonic survival in cattle. **Theriogenology**, v.76, p.1619–1631, 2011.

THOMAS, A. **Fats and Fatty Oils**: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 1^a ed. Wiley-VCH: Verlag GmbH & Co, 2000.

WILLIAMS, G. L. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. **Journal of Animal Science**, v.67, p.785-793, 1989.

WONNACOTT, K. E.; KWONG, W. Y.; HUGHES, J.; SALTER, A. M.; LEA, R. G.; GARNSWORTHY, P. C.; SINCLAIR, K. D. Dietary omega-3 and -6 polyunsaturated fatty acids affect the composition and development of sheep granulosa cells, oocytes and embryos. **Reproduction**, v.139, p.57-69, 2010.

WOOD, J. D.; RICHARDSON, R. I.; NUTE, G. R.; FISHER, A. V.; CAMPO, M. M.; KASAPIDOU, E.; SHEARD, P. R.; ENSER, M. Effects of fatty acids on meat quality: a review. **Meat Science**, v.66, n.1, p.21-32, 2003.

ZACHUT, M.; ARIELI, A.; LEHRER, H.; ARGOVE, N.; MOALLEM, U. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. **Reproduction**, v.135, p.683-692, 2008.

ZERON, Y.; SKLAN, D.; ARAV, A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. **Molecular Reproduction**, v.61, n.2, p.271-278, 2002.

ANEXO A – Comitê de Ética



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



Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **"Estudos dos mecanismos pelos quais a suplementação com semente de girassol aumenta a taxa de concepção em fêmeas bovinas"** (Study of the mechanisms by which supplementation with sunflower seed increases the conception rate in cows), registrada com o nº **33/2016.R2 - CEUA**, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Claudia Maria Bertan Membrive** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica** - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da UNESP - Câmpus de Dracena, em reunião de **18/05/2017**.

Dracena, 18 de maio de 2017.

Prof. Dr. Danilo Domingues Millen

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas - DTA

Rod. Cmt. João Ribeiro de Barros, km 651- Bairro das Antas - CEP: 17900-000 - Dracena/SP - Brasil

Tel. (18) 3821-8200 - www.dracena.unesp.br - academico@dracena.unesp.br